

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 817 780**

51 Int. Cl.:

C07H 21/00 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.07.2011 PCT/IL2011/000554**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2012 WO12007945**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2011 E 11806392 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 2593468**

54 Título: **Polinucleótidos aislados y métodos y plantas que usan los mismos para regular la acidez de las plantas**

30 Prioridad:

12.07.2010 US 363291 P

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

08.04.2021

73 Titular/es:

**THE STATE OF ISRAEL, MINISTRY OF
AGRICULTURE AND RURAL DEVELOPMENT,
AGRICULTURAL RESEARCH ORGANIZATION,
(A.R.O.), VOLCANI CENT (100.0%)
P.O. Box 6
50250 Beit-Dagan, IL**

72 Inventor/es:

**SCHAFFER, ARTHUR A.;
COHEN, SHAHAR;
BURGER, YOSEF y
KATZIR, NURIT**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 817 780 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

Polinucleótidos aislados y métodos y plantas que usan los mismos para regular la acidez de las plantas

Campo y antecedentes de la invención

5 La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a nuevos polinucleótidos y polipéptidos aislados que controlan la acidez de una planta, y, más particularmente, pero no exclusivamente, a métodos para usar los mismos para modular la acidez de plantas, y para reproducción y cultivo asistidos por marcadores de plantas que tienen la acidez deseada.

10 Se ha reconocido desde hace tiempo que el nivel de ácido de los frutos es un determinante importante de la calidad, junto con los componentes de azúcar y volátiles. En muchos casos, la calidad se determina realmente por la relación de azúcar a ácido, como por ejemplo para uvas y cítricos. La mayor parte de los frutos desarrollan un contenido de ácido del fruto en el rango ácido, lo que contribuye al sabor: los valores de pH del zumo de fruta exprimida están generalmente en el rango ácido de 4-5 y determinados frutos, tales como limones o pepinos maduros pueden alcanzar niveles de acidez incluso mayores con niveles de pH por debajo de 3.

15 Los melones dulces (*Cucumis melo*) son bastante únicos entre los frutos carnosos ya que tienen un nivel inhabitualmente bajo de acidez, y los valores de todos los melones dulces cultivados están en el rango casi neutro de aproximadamente 6-7. Por consiguiente, los melones dulces tienen un contenido de ácido orgánico inhabitualmente bajo. El ácido cítrico, el ácido orgánico principal en los cultivos de melón dulce estudiados hasta la fecha, contribuye solo con aproximadamente el 0,2% del peso fresco del fruto. Esto se diferencia del fruto maduro tal como fresa, piña o albaricoque, que pueden contener aproximadamente 5 veces la cantidad de ácido orgánico.

20 Una de las características útiles del *Cucumis melo* es que existen variedades primitivas en las especies que tienen frutos ácidos con una concentración de ácido orgánico de cerca del 1%. El rasgo se ha estudiado y se ha determinado que la herencia está controlada por un único locus principal, denominado *So* (Agrio) o *pH* (Danin-Poleg et al., 2002, Euphytica, 125: 373-384; Burger et al., 2003, J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128: 537-540). El fruto agrio, de bajo pH, es dominante sobre el fruto no agrio y la evolución en domesticación de los melones dulces estaba acompañada aparentemente de la selección del mutante recesivo no agrio *soso* (Burger et al., 2003, Supra). Todas las variedades de melón dulce con alto contenido de azúcar cultivadas, independientemente del grupo de fruto (cantaloupe, honeydew, galia, charantais) tienen un contenido ácido bajo mientras que todas las variedades primitivas ácidas cultivadas y no cultivadas tienen un contenido de azúcar bajo. Sin embargo, existe una necesidad global en los mercados de frutos que tengan sabor dulce y agrio.

30 A pesar de la importancia de la acumulación y metabolismo de los ácidos orgánicos en los frutos, se sabe poco acerca de las rutas y su control de las grandes diferencias temporales y genéticas. La complejidad de la ruta, sus múltiples componentes y la compartimentalización múltiple de la ruta hace que el estudio de las enzimas individuales sea arduo en esta estrategia.

35 También existe variabilidad genética para los niveles de ácido en otras especies, tales como variedades de cítricos, tomate, uva y melocotón, en donde se han descrito cambios en los ácidos orgánicos y los azúcares durante los estadios tempranos del desarrollo del fruto cítrico ácido y no ácido.

40 La patente de EE. UU. 5.476.998 describe un melón híbrido F1 *Cucumis melo* con sabor agrio, derivado de la línea de reproducción y cultivo producida a partir de una planta crecida de una semilla que tiene un alelo dominante que produce carne con un valor medio de pH por debajo de 5,4 y al menos un alelo dominante para la expresión de carácter jugoso en la pulpa.

Boualem A., et al. 2008 (Science 231: 836-838) describen una mutación en la enzima de la biosíntesis del etileno que da lugar a andromonoecia en melones.

45 Harel-Beja et al. 2010 (Theor. Appl. Genet, 121: 511-533) describen un mapa genético de melón altamente enriquecido con loci de rasgos cuantitativos (QTL) de calidad de fruto y marcadores de etiqueta de secuencia expresada (EST) incluyendo genes del metabolismo de azúcares y carotenoides.

50 En la industria de las flores, el color de la flor es uno de los rasgos más importantes de las flores. Aunque se han cultivado variedades cultivadas de diversos colores usando reproducción y cultivo convencional por cruzamiento, es raro que una única especie de planta tenga variedades cultivadas de todos los colores. Los componentes principales del color de las flores son un grupo de compuestos flavonoides denominado antocianinas, cuyo color depende parcialmente de sus estructuras. Además, como las antocianinas están presentes en la vacuola de la célula, el pH de las vacuolas tiene un gran impacto en el color de las flores. Se piensa que la vacuola de las células de las plantas está regulada por una ATPasa de transporte de protones vacuolar y pirofosfatasa de transporte de protones vacuolar, pero no se ha elucidado el mecanismo de cómo estas bombas de protones están implicadas en el color de las flores. Además, en las vacuolas de las plantas existe un antiportador ion sodio-protón y transporta iones de sodio en las vacuolas, dependiendo del gradiente de concentración de protones entre la parte externa e interna de las vacuolas, mediante el que los protones son transportados a la parte externa de las vacuolas dando lugar a un gradiente reducido

de concentración de protones. Se cree que, si se pudiera modificar el pH de las vacuolas, p. ej., elevarse, el color de las flores podría volverse azul. Las especies de plantas representativas que carecen de colores azules incluyen rosas, crisantemos, claveles, gerberas y similares, que son flores cortadas muy importantes.

La Patente de EE. UU. No. 6.803.500 describe genes que codifican proteínas que regulan el pH de las vacuolas.

- 5 Quattrocchio R, 2006 (The Plant Cell, Vol. 18, 1274-1291) describen la identificación de PH4 de Petunia, una Proteína MYB R2R3, que activa la acidificación vacuolar a través de interacciones con factores de transcripción básico-hélice-bucle-hélice de la ruta de las antocianinas.

10 El pH del fruto afecta la calidad después de la recolección del fruto. Así, una reducción del pH puede tener efectos positivos en el almacenamiento de los frutos y en la inhibición de los ataques de patógenos, por ejemplo, en productos de pasta de tomate [Clavero, M.R.S. 2001, Acta Horticulturae, 542: 75-81]. Además, el control químico del ennegrecimiento u oscurecimiento enzimático del fruto y verdura cortada requiere la inhibición de la actividad de PPO por el ajuste del pH [Ferrar, P. H., Walker, J. R. L. Inhibition of diphenol oxidases- a comparative study, J. Food Biochem. 1996, 20, 15-30; Walker, J. R. L.; Ferrar, P. H. Diphenol oxidases, enzyme-catalyzed browning and plant disease resistance, Biotechnol. Genetic Eng. Rev. 1998, 15, 457-498].

15 El pH de las raíces y del suelo circundante impacta en la captación de nutrientes desde el suelo. Por ejemplo, la captación de aluminio se incrementa fuertemente a un pH por debajo de 5 y da lugar a toxicidad por aluminio de la planta [Panda SK, et al. Aluminum stress signaling in plants. Plant Signal Behav. 2009 4:592-7]. Además, con un pH disminuido del suelo, se observaron incrementos dramáticos en la desorción de metales pesados de constituyentes del suelo y disolución en disolución en el suelo para Cd, Pb y Zn. Además, está bien documentada en numerosos estudios una correlación negativa entre el pH del suelo y la movilidad y disponibilidad de metales pesados para las plantas (Zeng F, 2011 The influence of pH and organic matter content in paddy soil on heavy metal availability and their uptake by rice plants. Environ Pollut. 159:84-9).

25 La modificación del pH de la rizosfera también puede contribuir positivamente a la captación de elementos no tóxicos necesarios haciendo que determinados nutrientes estén disponibles para la planta [Haynes RJ, y Swift RS, 1985. Effects of soil acidification on the chemical extractability of Fe, Mn, Zn and Cu and the growth and micronutrient uptake of high bush blueberry plants. Plant Soil 84, 201-212; Silber, A., Ben Yones, L. y Dori, I. (2004). Rhizosphere pH as a result of nitrogen level and NH₄/NO₃ ratio and its effect on Zn availability and on growth of rice flower (Ozothamnus diosmifolius). Plant Soil, 262, 205-213].

30 Los antecedentes de la técnica adicionales incluyen Peters J.L. et al., 2003 (Trends in Plant Science, 8: 484-491); Henikoff S., et al. 2004 (TILLING. Traditional Mutagenesis Meets Functional Genomics. Plant Physiology, 135: 630-636).

Sumario de la invención

35 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una célula de planta o una planta que comprende una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad con un polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO:2 y un elemento regulador que actúa en cis para dirigir la transcripción de dicha secuencia de ácido nucleico en dicha planta, en donde dicho polipéptido modula la acidez de la planta y en donde la planta es de una familia de plantas seleccionada del grupo que consiste en Solanaceae, Cucurbitaceae, Rutaceae, Rosaceae, y Vitaceae.

40 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para generar una planta transgénica, que comprende expresar en la planta una construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad con un polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO:2 y un elemento regulador que actúa en cis para dirigir la transcripción de dicha secuencia de ácido nucleico en dicha planta, en donde dicho polipéptido modula la acidez de la planta, generando de esta manera la planta transgénica, en donde la planta transgénica es de una familia de plantas seleccionada del grupo que consiste en Solanaceae, Cucurbitaceae, Rutaceae, Rosaceae, y Vitaceae.

45 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para incrementar la acidez de una planta, que comprende expresar en la planta una construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad con un polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO:2 y un elemento regulador que actúa en cis para dirigir la transcripción de dicha secuencia de ácido nucleico en dicha planta, en donde dicho polipéptido regula al alza la acidez de la planta, incrementando de esta manera la acidez de la planta, en comparación con plantas no transformadas de la misma especie que se crecen en las mismas condiciones de crecimiento; y un método para disminuir la acidez de una planta, que comprende regular a la baja un nivel de expresión de un polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad con un polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO:2, disminuyendo de esta manera la acidez de la planta, en comparación con una planta no transformada de la misma especie que se crece en las mismas condiciones de crecimiento, en donde dicha regulación a la baja se realiza transformando una célula de planta de la planta con un polinucleótido capaz de regular a la baja el nivel de expresión del polipéptido.

- 5 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para identificar una variación de ácido nucleico asociada con una acidez disminuida de una planta, que comprende: identificar en al menos una planta de una pluralidad de plantas una mutación de pérdida de función en un polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad con un polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO:2, en donde el polipéptido modula la acidez de una planta, identificando de esta manera la variación de ácido nucleico asociada con una acidez disminuida de una planta.
- Se describe un método para influir en el color de los pétalos de las flores, que comprende regular la acidez de los pétalos de las flores según el método de algunas realizaciones de la invención, para cambiar de esta manera el color de los pétalos de las flores.
- 10 Se describe que cuando la regulación comprende incrementar la acidez de los pétalos de las flores, entonces el color de los pétalos de las flores es más rojo que en una planta no transgénica o no transformada de la misma especie en condiciones de crecimiento idénticas, y en donde cuando la regulación comprende disminuir la acidez de los pétalos de las flores, entonces el color de los pétalos de las flores es más azul que en una planta no transgénica o no transformada de la misma especie en condiciones de crecimiento idénticas.
- 15 Según algunas realizaciones de la descripción, el polinucleótido es al menos un 60% idéntico a un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 3, 30, 31, 32, 33, 34 y 35.
- Según algunas realizaciones de la descripción, la regulación comprende incrementar la acidez de la planta, y la modulación comprende la regulación al alza del nivel de expresión del polipéptido.
- 20 Según algunas realizaciones de la descripción, la regulación comprende disminuir la acidez de la planta, y la modulación comprende regular a la baja el nivel de expresión del polipéptido.
- Según algunas realizaciones de la descripción, la regulación al alza se efectúa transformando una célula de planta de la planta con un polinucleótido que codifica el polipéptido.
- Según algunas realizaciones de la descripción, la regulación a la baja se efectúa transformando una célula de planta de la planta con un polinucleótido capaz de regular a la baja nivel de expresión del polipéptido.
- 25 Según algunas realizaciones de la invención, la planta comprende un fruto.
- Según algunas realizaciones de la invención, el fruto es un fruto maduro.
- Según algunas realizaciones de la invención, el fruto es de una familia de plantas seleccionada del grupo que consiste en: Solanaceae, Cucurbitaceae, Rutaceae, Rosaceae, y Vitaceae.
- 30 Según algunas realizaciones de la invención, la modulación del nivel de expresión se efectúa usando un promotor específico de fruto.
- Según algunas realizaciones de la invención, la modulación se efectúa usando un promotor específico de desarrollo para modular la expresión del polipéptido antes de la maduración del fruto.
- Según algunas realizaciones de la invención, la planta comprende una parte distinta de fruto.
- Según algunas realizaciones de la invención, la parte distinta de fruto comprende raíces.
- 35 Según algunas realizaciones de la invención, la mutación de pérdida de función se identifica en el ADN de la pluralidad de plantas.
- Según algunas realizaciones de la invención, la mutación de pérdida de función se selecciona del grupo que consiste en una mutación sin sentido, una mutación de desplazamiento de marco, una inserción, una mutación de duplicación o una mutación de delección.
- 40 Según algunas realizaciones de la invención, la parte distinta de fruto comprende pétalos de flores.
- A no ser que se define otra cosa, todos los términos técnicos y/o científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la invención.
- 45 La implementación del método y/o sistema de realizaciones de la invención puede implicar realizar o completar tareas seleccionadas manualmente, automáticamente, o una combinación de las mismas. Además, según la instrumentación y equipamiento real de las realizaciones del método y/o sistema de la invención, varias tareas seleccionadas podrían implementarse por hardware, por software o por firmware o por una combinación de las mismas usando un sistema operativo.
- Por ejemplo, el hardware para realizar tareas seleccionadas según realizaciones de la invención podría implementarse como un chip o un circuito. Como software, las tareas seleccionadas según realizaciones de la invención podrían implementarse como una pluralidad de instrucciones de software que se ejecutan por un ordenador usando cualquier
- 50

sistema operativo adecuado. En una realización ejemplar de la invención, una o más tareas según realizaciones ejemplares del método y/o sistema como se describe en la presente memoria se realizan por un procesador de datos, tal como una plataforma de computación para ejecutar una pluralidad de instrucciones. Opcionalmente, el procesador de datos incluye una memoria volátil para almacenar las instrucciones y/o datos y/o un almacenamiento no volátil, por ejemplo, un disco duro magnético y/o medio removible, para almacenar las instrucciones y/o datos. Opcionalmente, también se proporciona una conexión a red. También se proporcionan opcionalmente una pantalla y/o un dispositivo de entrada de usuario tal como un teclado o ratón.

Descripción breve de los dibujos

Algunas realizaciones de la invención se describen en la presente memoria, solo como ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Ahora, con referencia específica a los dibujos en detalle, se enfatiza que los particulares mostrados son como ejemplo y para propósitos de discusión ilustrativa de las realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos pone de manifiesto para los expertos en la técnica cómo pueden llevarse a la práctica las realizaciones de la invención.

En los dibujos:

Las FIG. 1A-D representan las secuencias de ARNm y aminoácidos del gen pH, de dos variedades de melón, caracterizadas por pH bajo y alto, respectivamente. Figura 1A - Secuencia de ARNm del gen pH de melón agrio empezando con ATG y finalizando con el codón de parada TAA (SEQ ID NO:1); Figura 1B - Secuencia de proteína traducida del transportador de membrana de melón agrio (SEQ ID NO:2); Figura 1C - Secuencia de ARNm del gen pH de melón no agrio empezando con ATG y finalizando con el codón de parada TAA (SEQ ID NO:3; la secuencia TTAATT GTTGCA (SEQ ID NO: 42) que se somete a duplicación se muestra en amarillo, y la secuencia duplicada se muestra en negrita); Figura 1D - secuencia de proteína del transportador de membrana de melón no agrio [SEQ ID NO:4; la secuencia LIVA original que se somete a duplicación se muestra en amarillo, y la secuencia duplicada se muestra en negrita].

La FIG. 1E representa el alineamiento entre secuencias de aminoácidos de variedades de melón agrio (SEQ ID NO:2) y no agrio (SEQ ID NO:4).

Las FIG. 2A-F representan las secuencias de aminoácidos de genes pH ortólogos de tomate (Figura 2A, Tomate TC200226, SEQ ID NO:5), pepino (Figura 2B, Pepino Csa011116, SEQ ID NO:6), melón dulce (Figura 2C, SEQ ID NO:7), manzana (Figura 2D, manzana TC80539, SEQ ID NO:8), álamo (Figura 2E, Álamo EEF05451, SEQ ID NO:9) y Arabidopsis (Figura 2F, Arabidopsis NP_195819, SEQ ID NO: 10). Las secuencias son de las bases de datos NCBI [World Wide Web (punto) ncbi (punto) nlm (punto) nih (punto) gov/] y TIGR [Protocolo de Transferencia de Hipertexto ://compbio (punto) dpci (punto) Harvard (punto) edu/tgi/plant (punto) html] y los números de acceso se listan después del nombre de la planta.

La FIG. 3 representa el alineamiento de secuencias de los genes pH ortólogos de melón dulce, melón agrio, manzana, tomate, pepino, álamo y Arabidopsis. El alineamiento Clustal se llevó a cabo por el programa Clustal 2W en el Protocolo de Transferencia de Hipertexto://World Wide Web (punto) ebi (punto) ac (punto) uk/Tools/. Alineamiento de secuencias múltiples CLUSTAL 2.0.12 - La mutación/duplicación en el melón dulce no agrio está subrayada en negrita.

Las FIG. 4A-D representan el modelado proteico (TMhMM) [Protocolo de Transferencia de Hipertexto://World Wide Web (punto) cbs (punto) dtu (punto) dk/services/TMHMM-2.0/] de los dominios transmembrana de la proteína del melón agrio (Figuras 4A-B) y del melón no agrio (Figuras 4C-D) que contienen la mutación/duplicación de cuatro aminoácidos. Figura 4A - Resumen del modelado de proteína de melón agrio; Figura 4B - presentación esquemática del modelado de proteína de melón agrio, probabilidades posteriores a TMHMM para secuencia. Rojo = transmembrana; azul = interior; rosa - exterior. Figura 4C - Resumen del modelado de proteína de melón no agrio; Figura 4D - presentación esquemática del modelado de proteína de melón no agrio. probabilidades posteriores a TMHMM para secuencia. Rojo = transmembrana; azul = interior; rosa - exterior. Obsérvese que la mutación de duplicación LIVA se produce en el tercer dominio transmembrana.

La FIG. 5 es la imagen de un gel que representa ADN-PCR para el genotipado de plantas de 20 variedades de melón representativas para determinar la presencia o ausencia de la mutación de duplicación LIVA. El ADN de las hojas de variedades de melón se sometió a PCR usando cebadores específicos para la mutación de duplicación (SEQ ID NO: 12 y 13). Para el control, se incluyeron las líneas parentales cv. Dulce (dul) y la línea reproducción y cultivo PI414723 (pi) en el análisis y se presentan en los dos carriles más a la derecha, en donde la línea Dulce incluye la duplicación LIVA y presenta una banda de peso molecular mayor (137 pares de bases (pb)) y el PI414723 no tiene la duplicación LIVA y presenta una banda de peso molecular menor (125 pb). Los carriles corresponden a las siguientes variedades de melón: 1 - PSR; 2 - TVT; 3 - HBJ; 4 - PI 157080; 5 - INB; 6 - PDS; 7 - ESL; 8 - PI 157071; 9 - KRY; 10 - CHT; 11 - CHF; 12 - DUD2; 13 -DUD3; 14 - MAK; 15 - OGE; 16 - PH406; 17 - Carril de blanco; 18 - Rochet; 19 - Dulce control; 20 -PI414723 control. Los resultados del genotipado se resumen en la Tabla 5 en el Ejemplo 5 de la sección de Ejemplos más adelante.

La FIG. 6 representa un árbol filogenético [producido por World Wide Web (punto) phylogeny (punto) fr, Dereeper A., Audic S., Claverie J.M., Blanc G. *BLAST-EXPLORER helps you bulding datasets for phylogenetic analysis*. BMC Evol

Biol. 2010 enero 12;10:8] indicando el clado de secuencias asociadas con las secuencias de melón y tomate reportadas en la presente memoria. Las secuencias referidas como PIN, LAX son transportadores conocidos de auxina/protones. Las cinco secuencias de Arabidopsis presentadas en el clado más superior son un clado de secuencias relacionado de cerca de función desconocida, anotado como transportadores potenciales del flujo de auxinas. Los números (mostrados en rojo) representan valores de soporte de rama, o bootstrap en% como se determinan por el programa World Wide Web (punto) phylogeny (punto) fr. El valor bootstrap de 100 que separa los cladros de las familias LAX y PIN de la familia del gen pH indica que estos cladros son significativamente distintos.

Descripción de realizaciones específicas de la invención

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a usos de polinucleótidos aislados y polipéptido codificado por los mismos, construcciones de ácidos nucleicos, células huésped y plantas transgénicas que comprenden los mismos, y más particularmente, pero no exclusivamente, a métodos para usar los mismos para modular la acidez de una planta para controlar la acidez de un fruto, la captación de nutrientes por las raíces y el color de los pétalos de las flores.

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no está limitada necesariamente en su aplicación a los detalles mostrados en la siguiente descripción o ejemplificados por los Ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de llevarse a la práctica o realizarse de diversas maneras dentro del alcance de las reivindicaciones.

Los presentes inventores han descubierto, después de experimentaciones laboriosas, el gen que controla la acidez de una planta (denominado en la presente memoria de aquí en adelante como el "gen pH").

Así, como se muestra en la sección de Ejemplos que sigue, el gen se identificó en melones por clonación basada en mapeo usando líneas endogámicas recombinantes que tienen valores de pH definidos (Tabla 1, Ejemplo 1), y se identificaron las secuencias de ARNm y genómicas del gen pH [SEQ ID NO:14 (secuencia genómica), 1 (ARNm de melón agrio), y 2 (proteína de melón agrio)]. También se identificaron los homólogos en tomates y pepino [SEQ ID NO:31 y 5 (ARNm y proteína de tomate, respectivamente); y las SEQ ID NO: 30 y 6 (ARNm y proteína de pepino, respectivamente)]. La comparación de secuencias entre el gen aislado de melones agrios y no agrios reveló la presencia de una mutación genética que está presente en melones no agrios y está ausente en melón agrio. La mutación es una duplicación de 12 ácidos nucleicos en las posiciones de nucleótidos 325-336 como se muestra en la SEQ ID NO:3 (325_336dupTTAATTGTTGCA) que codifican una mutación de duplicación de la secuencia de aminoácidos LIVA (SEQ ID NO:27) en las posiciones de aminoácidos 107-110 como se muestra en la SEQ ID NO:4 (107_110dupLIVA) (Figuras 1A-E, Ejemplo 2). Los alineamientos de secuencias múltiples mostraron que el nuevo gen pH está presente en diversas plantas no relacionadas (Figuras 2A-F y 3, Ejemplo 3) con una similitud de secuencia (Tabla 3, Ejemplo 3) e identidad (Tabla 4, Ejemplo 3) significativas. Un análisis adicional de modelado de proteínas reveló que la mutación de duplicación LIVA encontrada en el melón no agrio se espera que cambie la conformación de la proteína pH (Figuras 4A-D, Ejemplo 4). Además, a través de los análisis de genotipo y fenotipo se demostró una correlación directa entre la presencia de la mutación de duplicación LIVA y una disminución en la acidez del fruto (es decir, valores de pH mayores) en variedades de melón (Figura 5, Tablas 5 y 6, Ejemplo 5). Un árbol filogenético generado usando el nuevo gen pH mostró que un clado de secuencias altamente similares relacionadas con el gen pH de melón está completamente separado de un clado relacionado de cerca de proteínas con función indeterminada (que se anotan parcialmente como "transportadores de auxina" o como proteínas hipotéticas o potenciales) que están relacionadas más distantemente con las familias caracterizadas de transportadores de auxina de PIN y AUX (Figura 6, Ejemplo 6). Además, los miembros del clado relacionado de cerca del gen pH se expresan en plantas, tanto en tejido de fruto como en tejidos no de fruto tales como hojas, flores, raíces y tallos (Tabla 7, Ejemplo 6). Los presentes inventores han construido además plantas transgénicas transformadas para expresar un vector de silenciamiento dirigido a regular a la baja los genes pH en melón y tomate, que presentan una acidez disminuida (es decir, valores de pH mayores) (Tabla 8, Ejemplo 7). Por otra parte, se encontró que las plantas de tomate transgénicas que sobreexpresan el gen pH bien de tomate o melón agrio presentan un incremento significativo en la acidez de la planta como se muestra por la disminución en los valores medidos de pH (Tabla 9, Ejemplo 8). Estos resultados demuestran que el gen pH aislado identificado en la presente memoria puede usarse para regular la acidez de la planta.

Así, se describe un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos un 60% identidad con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO:2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 28 y 29, en donde el polipéptido modula la acidez de una planta.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "polinucleótido" se refiere a una secuencia de ácido nucleico mono o bicatenaria que está aislada y se proporciona en la forma de una secuencia de ARN, una secuencia de polinucleótido complementario (ADNc), una secuencia de polinucleótido genómico y/o una secuencia de polinucleótido compuesta (p. ej., una combinación de las anteriores).

El término "aislado" se refiere a separado al menos parcialmente del entorno natural p. ej., de una célula de planta.

Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "secuencia de polinucleótido complementaria" se refiere a una secuencia, que se produce a partir de la transcripción inversa de ARN mensajero usando una transcriptasa inversa u otra ADN polimerasa dependiente de ARN. Dicha secuencia puede amplificarse posteriormente *in vivo* o *in vitro* usando una ADN polimerasa dependiente de ADN.

- 5 Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "secuencia de polinucleótido genómica" se refiere a una secuencia derivada (aislada) de un cromosoma y representa así una porción contigua de un cromosoma.

10 Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "secuencia de polinucleótido compuesta" se refiere a una secuencia, que es al menos parcialmente complementaria y al menos parcialmente genómica. Una secuencia compuesta puede incluir algunas secuencias exónicas requeridas para codificar el polipéptido de la presente invención, así como algunas secuencias intrónicas interpuestas entre ellas. Las secuencias intrónicas pueden ser de cualquier origen, incluyendo de otros genes, y típicamente incluirán secuencias señal de corte y empalme conservadas. Dichas secuencias intrónicas pueden incluir además elementos reguladores de la expresión que actúan en *cis*.

15 Según la descripción, el polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 61%, al menos aproximadamente un 62%, al menos aproximadamente un 63%, al menos aproximadamente un 64%, al menos aproximadamente un 65%, al menos aproximadamente un 66%, al menos aproximadamente un 67%, al menos aproximadamente un 68%, al menos aproximadamente un 69%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 71%, al menos aproximadamente un 72%, al menos aproximadamente un 73%, al menos aproximadamente un 74%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 76%, al menos aproximadamente un 77%, al menos aproximadamente un 78%, al menos aproximadamente un 79%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 81%, al menos aproximadamente un 82%, al menos aproximadamente un 83%, al menos aproximadamente un 84%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 86%, al menos aproximadamente un 87%, al menos aproximadamente un 88%, al menos aproximadamente un 89%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 91%, al menos aproximadamente un 92%, al menos aproximadamente un 93%, al menos aproximadamente un 94%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99%, p. ej., un 100% de identidad u homología con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO:2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 28 y 29, en donde el polipéptido modula la acidez de una planta.

20 El porcentaje de identidad (p. ej., identidad global entre secuencias de aminoácidos de dos proteínas), u homología (p. ej., porcentaje de homología) puede determinarse usando cualquier software de comparación de homología, incluyendo, por ejemplo, el software BlastP o TBLASTN del National Center of Biotechnology Information (NCBI) tal como usando parámetros por defecto, cuando se empieza a partir de una secuencia de polipéptido; el algoritmo tBLASTX (disponible en el NCBI) tal como usando parámetros por defecto, que compara los productos de traducción conceptuales de seis marcos de una secuencia de nucleótidos de búsqueda (ambas cadenas) frente a una base de datos de secuencias de proteínas; o el programa EMBOSS NEEDLE de alineamiento por pares disponible en Protocolo de Transferencia de Hipertexto //World Wide Web (punto) ebi (punto) ac (punto) uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide (punto) html, usando parámetros por defecto (Matriz: BLOSUM62; APERTURA DE HUECO: 10; Extensión de HUECO: 0,5; Formato de salida: par; penalización por HUECO TERMINAL: falso; APERTURA DE HUECO TERMINAL: 10; EXTENSIÓN DE HUECO TERMINAL: 0,5).

Las secuencias homólogas incluyen tanto secuencias ortólogas como parálogas. El término "paróloga" se refiere a duplicaciones génicas en el genoma de una especie que dan lugar a genes parálogos. El término "ortóloga" se refiere a genes homólogos en diferentes organismos debido a una relación ancestral.

45 Una opción para identificar ortólogos en especies de plantas monocotiledóneas es realizar una búsqueda blast recíproca. Esto puede hacerse por una primera comparación con blast que implica la utilización de blast para la secuencia de interés frente a cualquier base de datos de secuencias, tal como la base de datos NCBI disponible públicamente que puede encontrarse en: Protocolo de Transferencia de Hipertexto://World Wide Web (punto) ncbi (punto).nlm (punto) nih (punto) gov. Si se buscaran los ortólogos en arroz, la secuencia de interés se blasted frente a, por ejemplo, los 28.469 clones de ADNc de longitud completa de *Oryza sativa* Nipponbare disponible en NCBI. Los resultados de la comparación con blast pueden filtrarse. Se utiliza entonces blast de nuevo para las secuencias de longitud completa bien de los resultados filtrados o de los resultados no filtrados (segunda comparación con blast) frente a las secuencias del organismo del que deriva la secuencia de interés. Después, se comparan los resultados de la primera y segunda comparación con blast. Un ortólogo se identifica cuando la secuencia que posee la puntuación más alta (mejor acierto) en la primera comparación con blast identifica en la segunda comparación con blast la secuencia de búsqueda (la secuencia de interés original) como el mejor acierto. Usando la misma base racional, se encuentra un parálogo (homólogo de un gen en el mismo organismo). En el caso de familias de secuencias mayores, puede usarse el programa ClustalW [Protocolo de Transferencia de Hipertexto://World Wide Web (punto) ebi (punto) ac (punto) uk/Tools/clustalw2/index (punto) html], seguido de un árbol de unión de vecinos (Protocolo de Transferencia de Hipertexto://en (punto) wikipedia (punto) org/wiki/Neighbor-joining) que ayuda a visualizar el agrupamiento.

Según algunas realizaciones de la invención, la homología es una homología global, es decir, una homología sobre las secuencias completas de aminoácidos o ácido nucleico de la invención y no sobre porciones de las mismas.

5 La identidad (p. ej., porcentaje de homología) puede determinarse usando cualquier software de comparación de homología, incluyendo, por ejemplo, el software BlastN del National Center of Biotechnology Information (NCBI) tal como usando parámetros por defecto.

Según algunas realizaciones de la invención, la identidad es una identidad global, es decir, una identidad sobre las secuencias completas de aminoácidos o ácido nucleico de la invención y no sobre porciones de las mismas.

Según la descripción, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO:2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 28 y 29.

10 Las secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos de algunas de las realizaciones de la invención pueden optimizarse para la expresión. Los ejemplos de dichas modificaciones de secuencia incluyen, pero no están limitados a, un contenido alterado de G/C para aproximarse más de cerca al encontrado típicamente en la especie de planta de interés, y la eliminación de codones encontrados atípicamente en la especie de planta referido comúnmente como optimización de codones.

15 La expresión "optimización de codones" se refiere a la selección de nucleótidos de ADN apropiados para uso en un gen estructural o fragmento del mismo que se acerca al uso de codones en la planta de interés. Por lo tanto, un gen o secuencia de ácido nucleico optimizada se refiere a un gen en el que la secuencia de nucleótidos de un gen nativo o natural se ha modificado con el fin de utilizar los codones estadísticamente preferidos o estadísticamente favorecidos en la planta. La secuencia de nucleótidos se examina típicamente a nivel del ADN y la región codificadora se optimiza
20 para la expresión en la especie de planta se determina usando cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, como se describe en Sardana et al. (1996, Plant Cell Reports 15:677-681). En este método, puede calcularse la desviación estándar del uso de codones, una medida del sesgo en el uso de codones, encontrando en primer lugar la desviación proporcional al cuadrado del uso de cada codón del gen nativo respecto al de genes de la planta altamente expresados, seguido un cálculo de la desviación al cuadrado promedio. La fórmula usada es: $1 \text{ SDCU} = n = 1 \text{ N} [(X_n - Y_n) / Y_n]^2 / N$, donde X_n se refiere a la frecuencia de uso del codón n en genes de la planta altamente expresados, donde Y_n es la frecuencia del uso del codón n en el gen de interés y N se refiere al número total de codones en el gen de interés. Una Tabla del uso de codones de genes altamente expresados de plantas dicotiledóneas se compila usando los datos de Murray et al. (1989, Nuc Acids Res. 17:477-498).

30 Un método para optimizar la secuencia de ácido nucleico según el uso de codones preferidos para un tipo de célula de planta particular se basa en el uso directo, sin realizar ningún cálculo estadístico extra, de Tablas de optimización de codones, tales como las proporcionadas en línea en la Base de Datos del Uso de Codones a través del banco de ADN delNIAS (National Institute of Agrobiological Sciences) en Japón (Protocolo de Transferencia de Hipertexto://World Wide Web (punto) kazusa (punto) or (punto) jp/codon/). La Base de Datos del Uso de Codones contiene tablas del uso de codones para varias especies diferentes, habiéndose determinado cada Tabla del uso de
35 codones estadísticamente sobre la base de los datos presentes en Genbank.

Mediante el uso de las Tablas anteriores para determinar los codones más preferidos o más favorecidos para cada aminoácido en una especie particular (por ejemplo, arroz), una secuencia de nucleótidos natural que codifica una proteína de interés puede optimizarse por codones para esa especie de planta particular. Esto se efectúa reemplazando los codones que pueden tener una baja incidencia estadística en el genoma de la especie particular
40 por los codones correspondientes, respecto a un aminoácido, que están más favorecidos estadísticamente. Sin embargo, puede seleccionarse uno o más codones menos favorecidos para deleccionar sitios de restricción existentes, para crear unos nuevos en uniones potencialmente útiles (extremos 5' y 3' para añadir un péptido señal o casetes de terminación, sitios internos que podrían usarse para cortar y unir segmentos entre sí para producir una secuencia de longitud completa correcta), o para eliminar secuencias de nucleótidos que pueden afectar negativamente la
45 estabilidad o expresión del ARNm.

La secuencia de nucleótidos codificadora natural puede contener ya, antes de cualquier modificación, varios codones que corresponden a un codón estadísticamente favorecido en una especie de planta particular. Por lo tanto, la optimización de codones de la secuencia de nucleótidos nativa puede comprender determinar qué codones, en la secuencia de nucleótidos nativa, no están estadísticamente favorecidos respecto a una planta particular, y modificar
50 estos codones según la tabla del uso de codones de la planta particular para producir un derivado con optimización de codones. Una secuencia de nucleótidos modificada puede optimizarse completamente o parcialmente para el uso de codones de la planta siempre que la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos modificada se produzca a un nivel mayor que el de la proteína codificada por el gen natural o nativo correspondiente.

Según la descripción, el polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos
55 aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 61%, al menos aproximadamente un 62%, al menos aproximadamente un 63%, al menos aproximadamente un 64%, al menos aproximadamente un 65%, al menos aproximadamente un 66%, al menos aproximadamente un 67%, al menos aproximadamente un 68%, al menos aproximadamente un 69%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 71%, al menos

aproximadamente un 72%, al menos aproximadamente un 73%, al menos aproximadamente un 74%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 76%, al menos aproximadamente un 77%, al menos aproximadamente un 78%, al menos aproximadamente un 79%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 81%, al menos aproximadamente un 82%, al menos aproximadamente un 83%, al menos aproximadamente un 84%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 86%, al menos aproximadamente un 87%, al menos aproximadamente un 88%, al menos aproximadamente un 89%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 91%, al menos aproximadamente un 92%, al menos aproximadamente un 93%, al menos aproximadamente un 94%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99%, p. ej., un 100% idéntica al polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 3, 30, 31, 32, 33, 34 y 35.

Según la descripción, la secuencia de ácido nucleico modula la acidez de una planta.

Según la descripción, se proporciona un polinucleótido aislado capaz de regular a la baja la expresión del polinucleótido aislado de algunas realizaciones de la invención en una célula huésped.

Según la descripción, el polinucleótido que regula a la baja previene al menos aproximadamente un 20%, p. ej., al menos aproximadamente un 30%, al menos aproximadamente un 40%, al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, p. ej., un 100% del nivel de expresión del polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 3, 30, 31, 32, 33, 34 y 35.

Los polinucleótidos que regulan a la baja pueden usarse, por ejemplo, en la cosupresión, supresión antisentido, interferencia de ARN y moléculas de ribozima como se describe adicionalmente más adelante en la presente memoria y en los Ejemplos 7 y 9 de la sección de Ejemplos que sigue. Los métodos y ensayos para cualificar el efecto del polinucleótido que regula a la baja sobre el nivel de expresión de un polinucleótido de interés son conocidos en la técnica y se describen adicionalmente más adelante en la presente memoria.

Los ejemplos no limitativos de polinucleótidos que regulan a la baja incluyen aquellos mostrados por las SEQ ID NO: 15-16 (para regular a la baja el gen pH del melón); las SEQ ID NO: 17-18 (para regular a la baja el gen pH del tomate); y las SEQ ID NO: 40-41 (para regular a la baja el gen pH de la petunia).

Según la descripción, se proporciona un par de cebadores del polinucleótido aislado capaz de amplificar específicamente el polinucleótido aislado de algunas realizaciones de la invención.

Los pares de cebadores no limitativos que pueden amplificar el polinucleótido aislado de algunas realizaciones de la invención incluyen los representados en las SEQ ID NO: 7 y 11; y 12 y 13.

Así, la descripción engloba secuencias de ácidos nucleicos descritas anteriormente en la presente memoria; fragmentos de las mismas, secuencias hibridables con las mismas, secuencias homólogas a las mismas, secuencias que codifican polipéptidos similares con un uso de codones diferente, secuencias alteradas caracterizadas por mutaciones, tales como deleción, inserción o sustitución de uno o más nucleótidos, bien naturales o inducidas por el hombre, bien aleatoriamente o de una forma dirigida.

La descripción proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 61%, al menos aproximadamente un 62%, al menos aproximadamente un 63%, al menos aproximadamente un 64%, al menos aproximadamente un 65%, al menos aproximadamente un 66%, al menos aproximadamente un 67%, al menos aproximadamente un 68%, al menos aproximadamente un 69%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 71%, al menos aproximadamente un 72%, al menos aproximadamente un 73%, al menos aproximadamente un 74%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 76%, al menos aproximadamente un 77%, al menos aproximadamente un 78%, al menos aproximadamente un 79%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 81%, al menos aproximadamente un 82%, al menos aproximadamente un 83%, al menos aproximadamente un 84%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 86%, al menos aproximadamente un 87%, al menos aproximadamente un 88%, al menos aproximadamente un 89%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 91%, al menos aproximadamente un 92%, al menos aproximadamente un 93%, al menos aproximadamente un 94%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99%, p. ej., un 100% idéntica u homóloga a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO:2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 28 y 29, en donde el polipéptido modula la acidez de una planta.

Según la descripción, el polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 28 y 29.

Según la descripción, el polipéptido se muestra por las SEQ ID NO:2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 28 o 29.

La descripción también engloba fragmentos de los polipéptidos descritos anteriormente y polipéptidos que tienen mutaciones, tales como deleciones, inserciones o sustituciones de uno o más aminoácidos, bien naturales o inducidas por el hombre, bien aleatoriamente o de una forma dirigida.

5 Según la descripción, se proporciona un método para generar una planta transgénica, que comprende expresar en la planta el polinucleótido aislado de algunas realizaciones de la invención, o la construcción de ácido nucleico de algunas realizaciones de la invención, generando de esta manera la planta transgénica.

10 La expresión "que expresa en la planta un polinucleótido exógeno" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a regular al alza el nivel de expresión de un polinucleótido exógeno en la planta mediante la introducción del polinucleótido exógeno en una célula de planta o planta y expresándolo por medios recombinantes, como se describe adicionalmente más adelante en la presente memoria.

Tal y como se usa en la presente memoria "expresar" se refiere a la expresión al nivel del ARNm y opcionalmente del polipéptido.

15 Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "polinucleótido exógeno" se refiere a una secuencia de ácido nucleico heteróloga que puede no expresarse naturalmente en la planta o sobreexpresión en la planta se desea. El polinucleótido exógeno puede introducirse en la planta de una manera estable o transitoria, de manera que se produce una molécula de ácido ribonucleico (ARN) y/o una molécula de polipéptido. Debe indicarse que el polinucleótido exógeno puede comprender una secuencia de ácido nucleico que es idéntica o parcialmente homóloga a una secuencia de ácido nucleico endógena de la planta.

20 El término "endógeno" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier polinucleótido o polipéptido que está presente y/o se expresa naturalmente en una planta o una célula de la misma.

25 El término "planta" tal y como se usa en la presente memoria engloba plantas completas, ancestros y progenie de las plantas y partes de las plantas, incluyendo semillas, brotes, tallos, raíces (incluyendo tubérculos), y células, tejidos y órganos de las plantas. La planta puede estar en cualquier forma incluyendo cultivos en suspensión, embriones, regiones meristemáticas, tejido de callo, hojas, gametofitos, esporofitos, polen, y microesporas. Las plantas que son particularmente útiles en los métodos de la invención incluyen todas las plantas que pertenecen a la superfamilia Viridiplantae, en particular plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas incluyendo una leguminosa de pienso o forraje, planta ornamental, cultivo alimentario, árbol, o arbusto seleccionado de la lista que comprende *Acacia* spp., *Acer* spp., *Actinidia* spp., *Aesculus* spp., *Agathis australis*, *Albizia amara*, *Alsophila tricolor*, *Andropogon* spp., *Arachis* spp., *Areca catechu*, *Astelia fragrans*, *Astragalus cicer*, *Baikiaea plurijuga*, *Betula* spp., *Brassica* spp., *Bruguiera gymnorrhiza*, *Burkea africana*, *Butea frondosa*, *Cadaba farinosa*, *Calliandra* spp., *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Capsicum* spp., *Cassia* spp., *Centroema pubescens*, *Chacoomeles* spp., *Cinnamomum cassia*, *Coffea arabica*, *Colophospermum mopane*, *Coronillia varia*, *Cotoneaster serotina*, *Crataegus* spp., *Cucumis* spp., *Cupressus* spp., *Cyathea dealbata*, *Cydonia oblonga*, *Cryptomeria japonica*, *Cymbopogon* spp., *Cynthea dealbata*, *Cydonia oblonga*, *Dalbergia monetaria*, *Davallia divaricata*, *Desmodium* spp., *Dicksonia squarosa*, *Dibeteropogon amplexans*, *Dioclea* spp., *Dolichos* spp., *Dorycnium rectum*, *Echinochloa pyramidalis*, *Ehrafia* spp., *Eleusine coracana*, *Eragrostis* spp., *Erythrina* spp., *Eucalyptus* spp., *Euclea schimperi*, *Eulalia villosa*, *Pagopyrum* spp., *Feijoa sellowiana*, *Fragaria* spp., *Flemingia* spp., *Freyinetia banksii*, *Geranium thunbergii*, *GinAgo biloba*, *Glycine javanica*, *Gliricidia* spp., *Gossypium hirsutum*, *Grevillea* spp., *Guibourtia coleosperma*, *Hedysarum* spp., *Hemaphysa altissima*, *Heteropogon contortus*, *Hordeum vulgare*, *Hyparrhenia rufa*, *Hypericum erectum*, *Hypochaeris dissoluta*, *Indigo incamata*, *Iris* spp., *Leptarrhenia pyrolifolia*, *Lespedeza* spp., *Lettuca* spp., *Leucaena leucocephala*, *Loudetia simplex*, *Lotonous bainesii*, *Lotus* spp., *Macrotyloma axillare*, *Malus* spp., *Manihot esculenta*, *Medicago sativa*, *Metasequoia glyptostroboides*, *Musa sapientum*, *Nicotiana* spp., *Onobrychis* spp., *Ornithopus* spp., *Oryza* spp., *Peltophorum africanum*, *Pennisetum* spp., *Persea gratissima*, *Petunia* spp., *Phaseolus* spp., *Phoenix canadensis*, *Phormium cookianum*, *Photinia* spp., *Picea glauca*, *Pinus* spp., *Pisum sativum*, *Podocarpus totara*, *Pogonarthria fleckii*, *Pogonaffria squarrosa*, *Populus* spp., *Prosopis cineraria*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pterolobium stellatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Rhaphiolepis umbellata*, *Rhopalostylis sapida*, *Rhus natalensis*, *Ribes grossularia*, *Ribes* spp., *Robinia pseudoacacia*, *Rosa* spp., *Rubus* spp., *Salix* spp., *Schyzachyrium sanguineum*, *Sciadopitys vefficillata*, *Sequoia sempervirens*, *Sequoiadendron giganteum*, *Sorghum bicolor*, *Spinacia* spp., *Sporobolus fimbriatus*, *Stiburus alopecuroides*, *Stylosanthes humilis*, *Tadehagi* spp., *Taxodium distichum*, *Themeda triandra*, *Trifolium* spp., *Triticum* spp., *Tsuga heterophylla*, *Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vitis vinifera*, *Watsonia pyramidata*, *Zantedeschia aethiopica*, *Zea mays*, amaranto, alcachofa, espárrago, brécol, coles de Bruselas, col, canola, zanahoria, coliflor, apio, berzas, lino, col rizada, lentejas, colza, oca, cebolla, patata, arroz, soja, paja, remolacha, caña de azúcar, girasol, tomate, té aplastado, maíz, trigo, cebada, centeno, avena, cacahuete, guisante, lenteja y alfalfa, algodón, colza, canola, pimiento, girasol, tabaco, berenjena, eucalipto, un árbol, una planta ornamental, una hierba perenne y un cultivo de forraje. Alternativamente, pueden usarse algas y otros no Viridiplantae para los métodos de la presente invención.

Según la descripción, la planta tiene un gen, que es un ortólogo del gen pH de melón identificado (p. ej., las SEQ ID NO: 1-4), y que se expresa normalmente en el fruto en desarrollo, funcionando de esta manera probablemente en la acumulación de ácido.

Según algunas realizaciones de la invención, la planta usada según algunas realizaciones de la invención es de una familia de plantas seleccionada del grupo que consiste en: Solanaceae, Cucurbitaceae, Rutaceae, Rosaceae, y Vitaceae.

5 Según algunas realizaciones de la invención, la planta usada según algunas realizaciones de la invención se selecciona del grupo que consiste en melón, tomate, manzana, uva, fresa, naranja, melocotón, y petunia.

Según algunas realizaciones de la invención, la expresión del polinucleótido exógeno de la invención en la planta se efectúa transformando una o más células de la planta con el polinucleótido exógeno, seguido de la generación de una planta madura a partir de las células transformadas y cultivo de la planta madura en condiciones adecuadas para la expresión del polinucleótido exógeno en la planta madura.

10 Según algunas realizaciones de la invención, la transformación se efectúa introduciendo en la célula de la planta una construcción de ácido nucleico que incluye el polinucleótido exógeno de algunas realizaciones de la invención y al menos un elemento regulador que actúa en cis (p. ej., promotor) para dirigir la transcripción del polinucleótido exógeno en una célula huésped (una célula de la planta). Los detalles adicionales de estrategias de transformación adecuadas se proporcionan más adelante en la presente memoria.

15 Según la descripción, se proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende el polinucleótido aislado de la invención, y un elemento regulador que actúa en cis (p. ej., una secuencia promotora) para dirigir la transcripción de la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido aislado en una célula huésped.

20 Según la descripción, se proporciona una célula de planta que expresa exógenamente el polinucleótido de algunas realizaciones de la invención, la construcción de ácido nucleico de algunas realizaciones de la invención y/o el polipéptido de algunas realizaciones de la invención.

Según algunas realizaciones de la invención, el polinucleótido aislado está unido de forma operativa a la secuencia promotora.

25 Una secuencia de ácido nucleico codificadora está "unida de forma operativa" a una secuencia reguladora (p. ej., promotor) si la secuencia reguladora es capaz de ejercer un efecto regulador sobre la secuencia codificadora unida a ella.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "promotor" se refiere a una región de ADN que se encuentra en 5' del sitio de inicio de la transcripción de un gen al que se une la ARN polimerasa para iniciar la transcripción del ARN. El promotor controla dónde (p. ej., qué porción de una planta) y/o cuándo (p. ej., en qué estadio o condición en la vida de un organismo) se expresa el gen.

30 Puede usarse cualquier secuencia promotora adecuada por la construcción de ácido nucleico de la presente invención. Según algunas realizaciones de la invención, el promotor es un promotor constitutivo, un promotor específico de tejido, un promotor inducible (p. ej., inducible por estrés abiótico), o un promotor específico del desarrollo.

Los ejemplos no limitativos de promotores adecuados se describen en Jones HD, Sparks CA. Promoter sequences for defining transgene expression. *Methods Mol Biol.* 2009; 478:171-84.

35 Los promotores constitutivos adecuados incluyen, por ejemplo, el promotor 35S de CaMV (Odell et al., *Nature* 313:810-812, 1985); Ubi 1 de maíz (Christensen et al., *Plant Sol. Biol.* 18:675-689, 1992); actina de arroz (McElroy et al., *Plant Cell* 2:163-171, 1990); pEMU (Last et al., *Theor. Appl. Genet.* 81:581-588, 1991); 19S de CaMV (Nilsson et al., *Physiol. Plant* 100:456-462, 1997); GOS2 (de Pater et al., *Plant J* nov;2(6):837-44, 1992); ubiquitina (Christensen et al., *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689, 1992); ciclofilina de arroz (Bucholz et al., *Plant Mol Biol.* 25(5):837-43, 1994); histona H3 de maíz (Lepetit et al., *Mol. Gen. Genet.* 231: 276-285, 1992); actina 2 (An et al., *Plant J.* 10(1):107-121, 1996) y Super MAS sintético (Ni et al., *The Plant Journal* 7: 661-76, 1995). Otros promotores constitutivos incluyen los de las Pat. de EE. UU. Nos. 5.659.026, 5.608.149; 5.608.144; 5.604.121; 5.569.597; 5.466.785; 5.399.680; 5.268.463; y 5.608.142.

45 Los promotores específicos de tejido adecuados incluyen, pero no están limitados a, promotores específicos de hoja [tales como los descritos, por ejemplo, por Yamamoto et al., *Plant J.* 12:255-265, 1997; Kwon et al., *Plant Physiol.* 105:357-67, 1994; Yamamoto et al., *Plant Cell Physiol.* 35:773-778, 1994; Gotor et al., *Plant J.* 3:509-18, 1993; Orozco et al., *Plant Mol. Biol.* 23:1129-1138, 1993; y Matsuoka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:9586-9590, 1993], promotores preferidos de semillas [p. ej., de nabo (originado de *Brassica napus* que se caracteriza por una actividad de promotor específico de semilla; Stuitje A. R. et al. *Plant Biotechnology Journal* 1 (4): 301-309), de genes específicos de semilla (Simon, et al., *Plant Mol. Biol.* 5. 191, 1985; Scofield, et al., *J. Biol. Chem.* 262: 12202, 1987; Baszczynski, et al., *Plant Mol. Biol.* 14: 633, 1990), albúmina de nuez de Brasil (Pearson et al., *Plant Mol. Biol.* 18: 235- 245, 1992), legúmina (Ellis, et al. *Plant Mol. Biol.* 10: 203-214, 1988), glutelina (arroz) (Takaiwa, et al., *Mol. Gen. Genet.* 208: 15-22, 1986; Takaiwa, et al., *FEBS Letts.* 221: 43-47, 1987), zeína (Matzke et al *Plant Mol Biol*, 143)323-32 1990), napA (Stalberg, et al, *Planta* 199: 515-519, 1996), SPA de trigo (Albanietal, *Plant Cell*, 9: 171- 184, 1997), oleosina de girasol (Cummins, et al., *Plant Mol. Biol.* 19: 873-876, 1992)], promotores específicos de endospermo [p. ej., LMW y HMW de trigo, glutenina-1 (*Mol Gen Genet* 216:81-90, 1989; *NAR* 17:461-2), gliadinas a, b y g de trigo (EMBO3: 1409-15, 1984), promotor ltrl de cebada, hordeína B1, C, D de cebada (*Theor Appl Gen* 98:1253-62, 1999; *Plant J* 4:343-55, 1993; *Mol*

5 Gen Genet 250:750- 60, 1996), DOF de cebada (Mena et al, The Plant Journal, 116(1): 53- 62, 1998), Biz2 (EP99106056.7), promotor sintético (Vicente-Carbajosa et al., Plant J. 13: 629-640, 1998), prolamina NRP33 de arroz, globulina Glb-1 de arroz (Wu et al, Plant Cell Physiology 39(8) 885- 889, 1998), alfa-globulina de arroz REB/OHP-1 (Nakase et al. Plant Mol. Biol. 33: 513-S22, 1997), ADP-glucosa PP de arroz (Trans Res 6:157-68, 1997), familia de genes ESR de maíz (Plant J 12:235-46, 1997), gamma-kafirina de sorgo (PMB 32:1029-35, 1996)], promotores específicos de embriones [p. ej., OSH1 de arroz (Sato et al, Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 93: 8117-8122), KNOX (Postma-Haarsma et al., Plant Mol. Biol. 39:257-71, 1999), oleosina de arroz (Wu et at, J. Biochem., 123:386, 1998)], y promotores específicos de flores [p. ej., AtPRP4, chalcona sintasa (chsA) (Van der Meer, et al., Plant Mol. Biol. 15, 95- 109, 1990), LAT52 (Twell et al Mol. Gen Genet. 217:240-245; 1989), apetala-3], y promotores de raíces tales como el promotor ROOTP.

10 La construcción de ácido nucleico puede incluir además un marcador seleccionable apropiado y/o un origen de replicación. Según algunas realizaciones de la invención, la construcción de ácido nucleico utilizada es un vector lanzadera, que puede propagarse en E. coli (en donde la construcción comprende un marcador seleccionable apropiado y origen de replicación) y ser compatible con la propagación en células. La construcción según la presente invención puede ser, por ejemplo, un plásmido, un bácmido, un fagémido, un cósmido, un fago, un virus o un cromosoma artificial.

15 Según la descripción, se proporciona una planta que comprende la construcción de ácido nucleico de algunas realizaciones de la invención o la célula de planta de algunas realizaciones de la invención.

20 Según la descripción, la planta se transforma con la construcción de ácido nucleico o se transfecta con la construcción de ácido nucleico de algunas realizaciones de la invención.

Según la descripción, la planta expresa exógenamente el polinucleótido aislado, el polipéptido aislado o la construcción de ácido nucleico de algunas realizaciones de la invención.

25 La construcción de ácido nucleico puede utilizarse para transformar de forma estable o transitoria las células de plantas. En la transformación estable, el polinucleótido exógeno se integra en el genoma de la planta y como tal representa un rasgo estable y hereditario. En la transformación transitoria, el polinucleótido exógeno se expresa por la célula transformada, pero no se integra en el genoma y como tal representa un rasgo transitorio.

Hay diversos métodos para introducir genes extraños en plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (Potrykus, I., Annu. Rev. Plant. Physiol., Plant. Mol. Biol. (1991) 42:205-225; Shimamoto et al., Nature (1989) 338:274-276).

30 Los métodos principales para causar la integración estable de ADN exógeno en el ADN genómico de una planta incluyen dos estrategias principales:

35 (i) Transferencia génica mediada por Agrobacterium: Klee et al. (1987) Annu. Rev. Plant Physiol. 38:467-486; Klee y Rogers en Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 6, Molecular Biology of Plant Nuclear Genes, eds. Schell, J., y Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) p. 2-25; Gatenby, en Plant Biotechnology, eds. Kung, S. y Arntzen, C. J., Butterworth Publishers, Boston, Mass. (1989) p. 93-112.

40 (ii) Captación directa de ADN: Paszkowski et al., en Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 6, Molecular Biology of Plant Nuclear Genes eds. Schell, J., y Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) p. 52-68; incluyendo métodos para la captación directa de ADN en protoplastos, Toriyama, K. et al. (1988) Bio/Technology 6:1072-1074. Captación de ADN inducida por un choque eléctrico breve de las células de la planta: Zhang et al. Plant Cell Rep. (1988) 7:379-384. Fromm et al. Nature (1986) 319:791-793. Inyección de ADN en células o tejidos de plantas por bombardeo de partículas, Klein et al. Bio/Technology (1988) 6:559-563; McCabe et al. Bio/Technology (1988) 6:923- 926; Sanford, Physiol. Plant. (1990) 79:206-209; por el uso de sistemas de micropipetas: Neuhaus et al., Theor. Appl. Genet. (1987) 75:30-36; Neuhaus y Spangenberg, Physiol. Plant. (1990) 79:213-217; transformación de cultivos celulares, embriones o tejido de callo por fibras de vidrio o filamento de carburo de silicio, Pat de EE. UU. No. 5.464.765 o por incubación directa del ADN con polen en germinación, DeWet et al. en Experimental Manipulation of Ovule Tissue, eds. Chapman, G. P. y Mantell, S. H. y Daniels, W. Longman, Londres, (1985) p. 197-209; y Ohta, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83:715-719.

50 El sistema de Agrobacterium incluye el uso de vectores plasmídicos que contienen segmentos definidos de ADN que se integran en el ADN genómico de una planta. Los métodos para inocular el tejido de una planta varían dependiendo de la especie de planta y el sistema de administración de Agrobacterium. Una estrategia ampliamente usada es el procedimiento de disco de hoja que puede realizarse con cualquier explante de tejido que proporcione una buena fuente para el inicio de la diferenciación de la planta completa. Véase, p. ej., Horsch et al. en Plant Molecular Biology Manual A5, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1988) p. 1-9. Una estrategia suplementaria emplea el sistema de administración de Agrobacterium en combinación con infiltración en vacío. El sistema de Agrobacterium es especialmente viable en la creación de plantas dicotiledóneas transgénicas.

55 Hay diversos métodos para la transferencia directa de ADN en células de plantas. En la electroporación, los protoplastos se exponen brevemente a un campo eléctrico fuerte. En la microinyección, el ADN se inyecta

mecánicamente directamente en las células usando micropipetas muy pequeñas. En el bombardeo de micropartículas, el ADN se adsorbe en microproyectiles tales como cristales de sulfato de magnesio o partículas de tungsteno, y los microproyectiles se aceleran físicamente en células o tejidos de la planta.

5 Después de la transformación estable, se ejecuta la propagación de la planta. El método más común de propagación de plantas es por semilla. La regeneración por propagación de semillas, sin embargo, tiene la deficiencia de que, debido a la heterocigosidad, hay una ausencia de uniformidad en el cultivo, ya que las semillas son producidas por las plantas según las variaciones genéticas gobernadas por las reglas mendelianas. Básicamente, cada semilla es genéticamente diferente y cada una crecerá con sus propios rasgos específicos. Por lo tanto, se prefiere que la planta transformada se produzca de manera que la planta regenerada tenga los rasgos y características idénticos de la planta transgénica parental. Por lo tanto, se prefiere que la planta transformada se regenere por micropropagación, lo que proporciona una reproducción rápida, consistente, de las plantas transformadas.

10 La micropropagación es un proceso para crecer plantas de nueva generación a partir de una única pieza de tejido que se ha escindido de una planta o variedad cultivada parental seleccionada. Este proceso permite la reproducción en masa de plantas en las que el tejido preferido expresa la proteína de fusión. Las plantas de nueva generación que se producen son genéticamente idénticas a, y tienen todas las características de, la planta original. La micropropagación permite la producción en masa de material de planta de calidad en un periodo corto de tiempo y ofrece una rápida multiplicación de variedades cultivadas seleccionadas con la preservación de las características de la planta transgénica o transformada original. Las ventajas de clonar plantas son la velocidad de la multiplicación de las plantas y la calidad y uniformidad de las plantas producidas.

15 La micropropagación es un procedimiento con múltiples etapas que requiere la alteración del medio de cultivo o de las condiciones de crecimiento entre etapas. Así, el proceso de micropropagación implica cuatro etapas básicas: Etapa uno, cultivo inicial del tejido; etapa dos, multiplicación del cultivo de tejido; etapa tres, diferenciación y formación de la planta; y etapa cuatro, cultivo en invernadero y endurecimiento. Durante la etapa uno, cultivo inicial del tejido, el cultivo del tejido se establece y se certifica que está libre de contaminantes. Durante la etapa dos, el cultivo inicial del tejido se multiplica hasta que se produce un número suficiente de muestras de tejido para cumplir con los objetivos de producción. Durante la etapa tres, las muestras de tejido crecidas en la etapa dos se dividen y se crecen en plántulas individuales. En la etapa cuatro, las plántulas transformadas se transfieren a un invernadero para el endurecimiento, donde la tolerancia de las plantas a la luz se incrementa gradualmente, de manera que puedan crecerse en el entorno natural.

20 Según algunas realizaciones de la invención, las plantas transgénicas se generan por la transformación transitoria de células de la hoja, células meristemáticas o la planta completa.

La transformación transitoria puede efectuarse por cualquiera de los métodos de transferencia directa de ADN descritos anteriormente o por infección viral usando virus de plantas modificados.

25 Los virus que se ha mostrado que son útiles para la transformación de plantas huéspedes incluyen CaMV, virus del mosaico del tabaco (TMV), virus del mosaico del bromo (BMV) y virus del mosaico común del frijol (BV o BCMV). La transformación de plantas usando virus de plantas se describe en la Pat. de EE. UU. No. 4.855.237 (virus del mosaico dorado del frijol; BGV), EP-A 67.553 (TMV), Solicitud Publicada Japonesa No. 63-14693 (TMV), EPA 194.809 (BV), EPA 278.667 (BV); y Gluzman, Y. et al., *Communications in Molecular Biology: Viral Vectors*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, p. 172-189 (1988). Las partículas de pseudovirus para uso en la expresión de ADN extraño en muchos huéspedes, incluyendo plantas, se describen en WO 87/06261.

30 Según algunas realizaciones de la invención, el virus usado para las transformaciones transitorias es avirulento y así es incapaz de causar síntomas graves tales como tasa de crecimiento reducida, mosaico, manchas anulares, enrollamiento de hojas, amarilleamiento, rayado, formación de pústulas, formación de tumores y hendiduras. Un virus avirulento adecuado puede ser un virus avirulento natural o un virus atenuado artificialmente. La atenuación de virus puede efectuarse usando métodos muy conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitado a, calentamiento subletal, tratamiento químico o por técnicas de mutagénesis dirigida tales como se describen, por ejemplo, por Kurihara y Watanabe (*Molecular Plant Pathology* 4:259-269, 2003), Galon et al. (1992), Atreya et al. (1992) y Huet et al. (1994).

35 Las cepas de virus adecuadas pueden obtenerse de fuentes disponibles tales como, por ejemplo, la American Type Culture Collection (ATCC) o por el aislamiento de plantas infectadas. El aislamiento de virus de tejidos de plantas infectadas puede efectuarse por técnicas muy conocidas en la técnica tales como las descritas, por ejemplo, por Foster y Tatlor, Eds. "Plant Virology Protocols: From Virus Isolation to Transgenic Resistance (Methods in Molecular Biology (Humana Pr), Vol 81)", Humana Press, 1998. Brevemente, los tejidos de una planta infectada que se cree que contienen una alta concentración de un virus adecuado, preferiblemente hojas jóvenes y pétalos de flores, se muelen en una disolución tampón (p. ej., disolución de tampón fosfato) para producir una savia infectada con virus que puede usarse en inoculaciones posteriores.

40 La construcción de virus de ARN de plantas para la introducción y expresión de secuencias de polinucleótido exógenas no virales en plantas se demuestra por las referencias anteriores, así como por Dawson, W. O. et al, *Virology* (1989)

172:285-292; Takamatsu et al. EMBO J. (1987) 6:307-311; French et al. Science (1986) 231:1294-1297; Takamatsu et al. FEBS Letters (1990) 269:73-76; y la Pat. de EE. UU. No. 5.316.931.

5 Cuando el virus es un virus de ADN, las modificaciones adecuadas pueden hacerse al virus en sí mismo. Alternativamente, el virus puede clonarse en primer lugar en un plásmido bacteriano para facilitar la construcción del vector viral deseado con el ADN extraño. El virus puede escindirse entonces del plásmido. Si el virus es un virus de ADN, puede unirse un origen de replicación de bacteriano al ADN viral, que se replica entonces por las bacterias. La transcripción y traducción de este ADN producirá la proteína de la cubierta que encapsidará el ADN viral. Si el virus es un virus de ARN, el virus se clona generalmente como un ADNc y se inserta en un plásmido. El plásmido se usa entonces para preparar todas las construcciones. El virus de ARN se produce entonces transcribiendo la secuencia viral del plásmido y la traducción de los genes virales para producir la o las proteínas de la cubierta que encapsidará el ARN viral.

15 Se describe un polinucleótido viral de plantas en el que la secuencia codificadora de la proteína de la cubierta nativa se ha delecionado de un polinucleótido viral, se ha insertado una secuencia codificadora de la proteína de la cubierta viral de la planta no nativa y un promotor no nativo, preferiblemente el promotor subgenómico de la secuencia codificadora de la proteína de la cubierta no nativa, capaz de la expresión en la planta huésped, empaquetamiento del polinucleótido viral de planta recombinante, y de asegurar una infección sistémica del huésped por el polinucleótido viral de la planta recombinante. Alternativamente, el gen de la proteína de la cubierta puede inactivarse por inserción de la secuencia de polinucleótido no nativa en el mismo, de manera que se produce una proteína. El polinucleótido viral de la planta recombinante puede contener uno o más promotores subgenómicos no nativos adicionales. Cada promotor subgenómico no nativo es capaz de transcribir o expresar genes o secuencias de polinucleótidos adyacentes en la planta huésped y es incapaz de recombinación entre sí y con promotores subgenómicos nativos. Las secuencias de polinucleótidos no nativas (extrañas) pueden insertarse adyacentes al promotor subgenómico viral de la planta nativo o los promotores subgenómicos virales de la planta no nativos si se incluye más de una secuencia de polinucleótido. Las secuencias de polinucleótidos no nativas se transcriben o expresan en la planta huésped bajo el control del promotor subgenómico para producir los productos deseados.

20 Puede proporcionarse un polinucleótido viral de planta recombinante como anteriormente excepto porque la secuencia codificadora de la proteína de la cubierta nativa se pone adyacente a uno los promotores subgenómicos de la proteína de la cubierta no nativa en lugar de una secuencia codificadora de la proteína de la cubierta no nativa.

30 Puede proporcionarse un polinucleótido viral de planta recombinante en el que el gen de la proteína de la cubierta nativo está adyacente a su promotor subgenómico y se han insertado uno o más promotores subgenómicos no nativos en el polinucleótido viral. Los promotores subgenómicos no nativos insertados son capaces de transcribir o expresar genes adyacentes en una planta huésped y son incapaces de recombinación entre sí y con promotores subgenómicos nativos. Las secuencias de polinucleótidos no nativas pueden insertarse adyacentes a los promotores virales de planta subgenómicos no nativos de manera que las secuencias se transcriben o expresan en la planta huésped bajo el control de los promotores subgenómicos para producir el producto deseado.

35 Puede proporcionarse un polinucleótido viral de planta recombinante como en la tercera realización, excepto que la secuencia codificadora de la proteína de la cubierta nativa se reemplaza por una secuencia codificadora de la proteína de la cubierta no nativa.

40 Los vectores virales se encapsidan por las proteínas de la cubierta codificadas por el polinucleótido viral de planta recombinante para producir un virus de planta recombinante. El polinucleótido viral de planta recombinante o el virus de planta recombinante se usa para infectar plantas huésped apropiadas. El polinucleótido viral de planta recombinante es capaz de replicarse en el huésped, diseminarse sistémicamente en el huésped, y de transcribir o expresar gen(es) extraño(s) (polinucleótido exógeno) en el huésped para producir la proteína deseada.

45 Las técnicas para la inoculación de virus en plantas pueden encontrarse en Foster y Taylor, eds. "Plant Virology Protocols: From Virus Isolation to Transgenic Resistance (Methods in Molecular Biology (Humana Pr), Vol 81)", Humana Press, 1998; Marmorosh y Koprowski, eds. "Methods in Virology" 7 vols, Academic Press, Nueva York 1967-1984; Hill, S.A. "Methods in Plant Virology", Blackwell, Oxford, 1984; Walkey, D.G.A. "Applied Plant Virology", Wiley, Nueva York, 1985; y Kado y Agrawa, eds. "Principles and Techniques in Plant Virology", Van Nostrand-Reinhold, Nueva York.

50 Además de lo anterior, el polinucleótido también puede introducirse en el genoma de un cloroplasto permitiendo de esta manera la expresión en el cloroplasto. Se conoce una técnica para introducir secuencias de polinucleótidos exógenos en el genoma de los cloroplastos. Esta técnica implica los siguientes procedimientos. En primer lugar, las células de la planta se tratan químicamente para reducir el número de cloroplastos por célula hasta aproximadamente uno. Entonces, el polinucleótido exógeno se introduce mediante bombardeo de partículas en las células con el objetivo de introducir al menos una molécula de polinucleótido exógeno en los cloroplastos. Los polinucleótidos exógenos se seleccionan de manera que se puedan integrar en el genoma de los cloroplastos mediante recombinación homóloga que se efectúa fácilmente por enzimas inherentes al cloroplasto. Para este fin, el polinucleótido exógeno incluye, además de un gen de interés, al menos una cadena de polinucleótido que deriva del genoma del cloroplasto. Además, el polinucleótido exógeno incluye un marcador seleccionable, que sirve por procedimientos de selección secuencial,

para asegurar que todas o sustancialmente todas las copias de los genomas de los cloroplastos después de dicha selección incluirán el polinucleótido exógeno. Los detalles adicionales respecto a esta técnica se encuentran en las Pat. de EE. UU. Nos. 4.945.050; y 5.693.507. Puede producirse así un polipéptido por el sistema de expresión de proteínas del cloroplasto e integrarse en la membrana interna del cloroplasto.

5 El polinucleótido aislado puede expresarse junto con un gen de interés adicional. La expresión de una pluralidad de polinucleótidos exógenos en una única planta huésped puede efectuarse mediante la coinroducción de múltiples construcciones de ácidos nucleicos, incluyendo cada una un polinucleótido exógeno diferente, en una única célula de la planta. La célula transformada puede regenerarse entonces en una planta madura usando los métodos descritos en la presente memoria anteriormente.

10 Alternativamente, la expresión de una pluralidad de polinucleótidos exógenos en una única planta huésped puede efectuarse mediante la coinroducción en una única célula de la planta de una única construcción de ácido nucleico que incluye una pluralidad de diferentes polinucleótidos exógenos. Dicha construcción puede diseñarse con una única secuencia promotora que puede transcribir un ARN mensajero policistrónico incluyendo todas las secuencias de polinucleótidos exógenos diferentes. Para permitir la cotraducción de los diferentes polipéptidos codificados por el
15 ARN mensajero policistrónico, las secuencias de polinucleótidos pueden estar interconectadas mediante una secuencia de sitio de entrada a ribosoma interno (IRES) que facilita la traducción de secuencias de polinucleótidos posicionadas en 3' de la secuencia IRES. En este caso, una molécula de ARN policistrónico transcrito que codifica los diferentes polipéptidos descritos anteriormente se traducirá desde tanto el extremo 5' protegido como las dos
20 secuencias IRES internas de la molécula de ARN policistrónico para producir de esta manera en la célula todos los polipéptidos diferentes. Alternativamente, la construcción puede incluir varias secuencias promotoras unida cada una a una secuencia de polinucleótido exógeno diferente.

La célula de la planta transformada con la construcción que incluye una pluralidad de diferentes polinucleótidos exógenos, puede regenerarse en una planta madura, usando los métodos descritos en la presente memoria anteriormente.

25 Alternativamente, la expresión de una pluralidad de polinucleótidos exógenos en una única planta huésped puede efectuarse introduciendo diferentes construcciones de ácidos nucleicos, incluyendo diferentes polinucleótidos exógenos, en una pluralidad de plantas. Las plantas transformadas regeneradas pueden cruzarse entonces y la progenie resultante puede seleccionarse para rasgos de superior tolerancia al estrés abiótico, eficiencia en el uso del agua, eficiencia en el uso de fertilizantes, crecimiento, biomasa, rendimiento y/o vigor, usando técnicas convencionales de reproducción y cultivo de plantas.
30

Según algunas realizaciones de la invención, la célula de la planta forma una parte de una planta.

Así, la invención engloba plantas que expresan exógenamente el o los polinucleótidos, las construcciones de ácidos nucleicos y/o el o los polipéptidos de la invención. Una vez expresado en la célula de la planta o en la planta completa, puede determinarse el nivel del polipéptido codificado por el polinucleótido exógeno por métodos muy conocidos en la
35 técnica, tales como, ensayos de actividad, transferencias Western usando anticuerpos capaces de unirse específicamente al polipéptido, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayos (RIA), inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, inmunofluorescencia y similares.

Los métodos para determinar el nivel en la planta del ARN transcrito a partir del polinucleótido exógeno son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, análisis por transferencia Northern, análisis por reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) (incluyendo RT-PCR cuantitativa, semicuantitativa o en tiempo
40 real) e hibridación de ARN *in situ*.

La identificación del gen y la proteína pH descritos en la presente memoria, junto con el polimorfismo responsable de su ausencia de función y ausencia posterior de acumulación de ácido, puede usarse para la producción transgénica de melones u otros tipos de frutos con una acidez del fruto alterada, bien por la sobreexpresión o la expresión reducida
45 por las tecnologías conocidas de biología molecular.

Por ejemplo, como se muestra en la Tabla 8 (Ejemplo 7 de la sección de Ejemplos que sigue) y en la Tabla 9 (Ejemplo 8 de la sección de Ejemplos que sigue) mediante la regulación a la baja o la regulación al alza del nivel de expresión del gen pH en la planta, la acidez del tejido de la planta (p. ej., fruto) puede disminuirse (es decir, valores mayores de pH) o incrementarse (es decir, valores menores de pH), respectivamente, en comparación con plantas nativas de la
50 misma especie que se crecen en las mismas condiciones de crecimiento y que no están modificadas con las biomoléculas (polinucleótido o polipéptidos) de algunas realizaciones de la invención.

Según la descripción, se proporciona un método para regular la acidez de una planta. El método se efectúa modulando un nivel de expresión de un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 61%, al menos aproximadamente un 62%, al menos aproximadamente un 63%, al menos aproximadamente un 64%,
55 al menos aproximadamente un 65%, al menos aproximadamente un 66%, al menos aproximadamente un 67%, al menos aproximadamente un 68%, al menos aproximadamente un 69%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 71%, al menos aproximadamente un 72%, al menos aproximadamente un 73%, al menos aproximadamente un 74%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 76%, al menos

aproximadamente un 77%, al menos aproximadamente un 78%, al menos aproximadamente un 79%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 81%, al menos aproximadamente un 82%, al menos aproximadamente un 83%, al menos aproximadamente un 84%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 86%, al menos aproximadamente un 87%, al menos aproximadamente un 88%, al menos aproximadamente un 89%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 91%, al menos aproximadamente un 92%, al menos aproximadamente un 93%, al menos aproximadamente un 94%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99%, p. ej., un 100% de identidad u homología con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO:2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 28 y 29, modulando de esta manera la acidez de la planta.

Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "acidez de una planta" se refiere a la acidez (valor de pH, concentración de protones) de al menos una porción de una planta.

Según algunas realizaciones de la invención, la porción de la planta es una porción hidrática.

Según algunas realizaciones de la invención, la porción de la planta puede ser, pero no está limitada a, fruto, raíz, hoja, tallo, flor y pétalo.

La acidez de una planta puede determinarse en valores de pH detectados por un medidor de pH. La escala global de los valores de pH varía entre 0-14, en donde un valor menor de pH indica una mayor acidez; y en donde un valor mayor de pH indica una menor acidez [p. ej., más neutro (alrededor de pH 7) o básico].

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "regular" se refiere bien a "incrementar" o "disminuir" la acidez de la planta al menos aproximadamente 0,1 del valor del pH, p. ej., al menos aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,4, aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,6, aproximadamente 0,7, aproximadamente 0,8, aproximadamente 0,9, aproximadamente 1,0, aproximadamente 1,1, aproximadamente 1,2, aproximadamente 1,3, aproximadamente 1,4, aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,6, aproximadamente 1,7, aproximadamente 1,8, aproximadamente 1,9, aproximadamente 2, aproximadamente 2,5, aproximadamente 3, aproximadamente 3,5, aproximadamente 4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 5, aproximadamente 5,5, aproximadamente 6, aproximadamente 6,5, o aproximadamente 7 o más valores del pH en comparación con una planta nativa [es decir, una planta no modificada con las biomoléculas (polinucleótido o polipéptidos) de algunas realizaciones de la invención, p. ej., una planta no transformada de la misma especie que se crece en las mismas condiciones de crecimiento].

Según algunas realizaciones de la invención, regular comprende incrementar la acidez de la planta, y modular comprende regular al alza el nivel de expresión del polipéptido.

Según algunas realizaciones de la invención, la regulación al alza del nivel de expresión del polipéptido se realiza expresando en la planta un polinucleótido exógeno que codifica el polipéptido de algunas realizaciones de la invención como se describe en la presente memoria anteriormente.

Según algunas realizaciones de la invención, regular comprende disminuir la acidez de la planta, y modular comprende regular a la baja el nivel de expresión del polipéptido que se realiza transformando una célula de planta de la planta con un polinucleótido capaz de regular a la baja el nivel de expresión del polipéptido.

La regulación a la baja (silenciamiento génico) del producto de la transcripción o de la traducción de un gen endógeno (p. ej., el gen pH) puede conseguirse por cosupresión, supresión antisentido, interferencia de ARN y moléculas de ribozima.

Cosupresión (supresión con sentido) - La inhibición del gen endógeno puede conseguirse por cosupresión, usando una molécula de ARN (o un vector de expresión que codifica la misma) que está en la orientación con sentido con respecto a la dirección de la transcripción del gen endógeno. El polinucleótido usado para la cosupresión puede corresponder a toda o parte de la secuencia que codifica el polipéptido endógeno y/o a toda o parte de la región no traducida en 5' y/o 3' del transcrito endógeno; también puede ser un ARN no poliadenilado; un ARN que carece de una estructura de cubierta en 5'; o un ARN que contiene un intrón no sometido a corte y empalme. En algunas realizaciones, el polinucleótido usado para la cosupresión se diseña para eliminar el codón de inicio del polinucleótido endógeno, de manera que no se traducirá el producto proteico. Los métodos de cosupresión usando una secuencia de ADNc de longitud completa, así como una secuencia de ADNc parcial son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Pat. de EE. UU. No. 5.231.020).

Según algunas realizaciones de la invención, la regulación a la baja del gen endógeno se realiza usando un vector de expresión amplicón que comprende una secuencia derivada de un virus de planta que contiene todo o parte del gen diana, pero generalmente no todos los genes del virus nativo. Las secuencias virales presentes en el producto de transcripción del vector de expresión permiten que el producto de la transcripción dirija su propia replicación. Los transcritos producidos por el amplicón pueden ser bien con sentido o antisentido respecto a la secuencia diana [véase, por ejemplo, Angell y Baulcombe, (1997) *EMBO J.* 16:3675-3684; Angell y Baulcombe, (1999) *Plant J.* 20:357-362, y la Pat. de EE. UU. No. 6.646.805].

Supresión antisentido - La supresión antisentido puede realizarse usando un polinucleótido antisentido o un vector de expresión que se diseña para expresar una molécula de ARN complementaria a todo o parte del ARN mensajero (ARNm) que codifica el polipéptido endógeno y/o a toda o una parte de la región no traducida en 5' y/o 3' del gen endógeno. La sobreexpresión de la molécula de ARN antisentido puede dar lugar a la expresión reducida del gen nativo (endógeno). El polinucleótido antisentido puede ser completamente complementario a la secuencia diana {es decir, 100% idéntico al complemento de la secuencia diana) o parcialmente complementario a la secuencia diana (es decir, menos del 100% idéntico, p. ej., menos del 90%, menos del 80% idéntico al complemento de la secuencia diana). La supresión antisentido puede usarse para inhibir la expresión de múltiples proteínas en la misma planta (véase. ej., la Pat. de EE. UU. No. 5.942.657). Además, pueden usarse porciones de los nucleótidos antisentido para interrumpir la expresión del gen diana. Generalmente, pueden usarse las secuencias de al menos aproximadamente 50 nucleótidos, al menos aproximadamente 100 nucleótidos, al menos aproximadamente 200 nucleótidos, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 400, al menos aproximadamente 450, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 550, o más. Los métodos para usar la supresión antisentido para inhibir la expresión de genes endógenos en plantas se describen, por ejemplo, en Liu, et al., (2002) *Plant Physiol.* 129:1732-1743 y en las Pat. de EE. UU. Nos. 5.759.829 y 5.942.657. La eficiencia de la supresión antisentido puede incrementarse incluyendo una región poli-dT en el casete de expresión en una posición 3' respecto a la secuencia antisentido y 5' respecto a la señal de poliadenilación [Véase la Publicación de Patente de EE. UU. No. 20020048814].

Interferencia de ARN - La interferencia de ARN puede conseguirse usando un polinucleótido, que pueda hibridar consigo mismo y formar un ARN bicatenario que tiene una estructura de tallo-bucle (también denominada estructura en horquilla), o usando dos polinucleótidos, que forman un ARN bicatenario.

Para la interferencia de ARN en horquilla (ARNhp), el vector de expresión se diseña para expresar una molécula de ARN que hibrida consigo misma para formar una estructura en horquilla que comprende una región de bucle monocatenaria y un tallo con emparejamiento de bases.

En algunas realizaciones de la invención, la región del tallo con emparejamiento de bases de la molécula de ARNhp determina la especificidad de la interferencia de ARN. En esta configuración, la secuencia con sentido de la región del tallo con emparejamiento de bases puede corresponder a todo o parte del ARNm endógeno que se quiere regular a la baja o a una porción de una secuencia promotora que controla la expresión del gen endógeno que se quiere inhibir; y la secuencia antisentido de la región del tallo con emparejamiento de bases es completamente o parcialmente complementaria a la secuencia con sentido. Dichas moléculas de ARNhp son altamente eficientes para inhibir la expresión de genes endógenos, de una manera que se hereda por las generaciones posteriores de plantas [Véase, p. ej., Chuang y Meyerowitz, (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:4985-4990; Stoutjesdijk, et al., (2002) *Plant Physiol.* 129:1723-1731; y Waterhouse y Helliwell, (2003) *Nat. Rev. Genet.* 4:29-38; Chuang y Meyerowitz, (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:4985-4990; Pandolfini et al., *BMC Biotechnology* 3:7; Panstruga, et al., (2003) *Mol. Biol. Rep.* 30:135-140; y la Publicación de Patente de EE. UU. No. 2003/0175965].

Según algunas realizaciones de la invención, la secuencia con sentido del tallo con emparejamiento de bases tiene una longitud de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 2.500 nucleótidos, p. ej., de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 500 nucleótidos, p. ej., de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 300 nucleótidos, p. ej., de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, p. ej., o de aproximadamente 25 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos.

Según algunas realizaciones de la invención, la secuencia antisentido del tallo con emparejamiento de bases puede tener una longitud que es menor, igual que, o mayor que la longitud de la secuencia con sentido correspondiente.

Según algunas realizaciones de la invención, la porción de bucle del ARNhp puede tener una longitud de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 500 nucleótidos, por ejemplo, una longitud de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 300 nucleótidos o de aproximadamente 25 nucleótidos a aproximadamente 400 nucleótidos.

Según algunas realizaciones de la invención, la porción de bucle del ARNhp puede incluir un intrón (ARNihp), que es capaz de ser cortado y empalmado en la célula huésped. El uso de un intrón minimiza el tamaño del bucle en la molécula de ARN en horquilla después del corte y empalme e incrementa así la eficiencia de la interferencia [Véase, por ejemplo, Smith, et al., (2000) *Nature* 407:319-320; Wesley, et al., (2001) *Plant J.* 27:581-590; Wang y Waterhouse, (2001) *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:146-150; Helliwell y Waterhouse, (2003) *Methods* 30:289-295; Brummell, et al. (2003) *Plant J.* 33:793-800; y la Publicación de Patente de EE. UU. No. 2003/0180945; WO 98/53083; WO 99/32619; WO 98/36083; WO 99/53050; US 20040214330; US 20030180945; Pat. de EE. UU. No. 5.034.323; Pat. de EE. UU. No. 6.452.067; Pat. de EE. UU. No. 6.777.588; Pat. de EE. UU. No. 6.573.099 y Pat. de EE. UU. No. 6.326.527].

En algunas realizaciones de la invención, la región de bucle del ARN en horquilla determina la especificidad de la interferencia de ARN frente a su ARN endógeno diana. En esta configuración, la secuencia del bucle corresponde a todo o parte del ARN mensajero endógeno del gen diana. Véase, por ejemplo, WO 02/00904; Mette, et al., (2000) *EMBO J* 19:5194-5201; Matzke, et al., (2001) *Curr. Opin. Genet. Devel.* 11:221-227; Scheid, et al., (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 99:13659-13662; Aufsatz, et al., (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99(4): 16499-16506; Sijen, et al., *Curr. Biol.* (2001) 11:436-440).

5 Para la interferencia de ARN bicatenario (ARNds), las moléculas de ARN con sentido y antisentido pueden expresarse en la misma célula a partir de un único vector de expresión (que comprende secuencias de ambas cadenas) o a partir de dos vectores de expresión (que comprende cada uno la secuencia de una de las cadenas). Los métodos para usar interferencia de ARNds para inhibir la expresión de genes de plantas endógenos se describen en Waterhouse, et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13959-13964; y WO 99/49029, WO 99/53050, WO 99/61631, y WO 00/49035.

10 Según algunas realizaciones de la invención, la interferencia de ARN se efectúa usando un vector de expresión diseñado para expresar una molécula de ARN que está modelada sobre un gen de microARN endógeno (miARN). Los micro ARN (miARN) son agentes reguladores que consisten en aproximadamente 22 ribonucleótidos y son altamente eficientes para inhibir la expresión de genes endógenos [Javier, et al., (2003) Nature 425:257-263]. El gen de miARN codifica un ARN que forma una estructura de horquilla que contiene una secuencia de 22 nucleótidos que es complementaria al gen endógeno diana.

15 Ribozima - Las moléculas de ARN catalíticas, ribozimas, se diseñan para escindir transcritos de ARNm particulares, previniendo así la expresión de sus polipéptidos codificados. Las ribozimas escinden el ARNm en secuencias de reconocimiento específicas de sitio. Por ejemplo, las "ribozimas de cabeza de martillo" (véase, por ejemplo, la Pat. de EE. UU. No. 5.254.678) escinden los ARNm en localizaciones dictadas por regiones flanqueantes que forman pares de bases complementarias con el ARNm diana. El único requerimiento es que el ARN diana contenga una secuencia de nucleótidos 5'-UG-3'. Las secuencias de las ribozimas de cabeza de martillo pueden incluirse en un ARN estable tal como ARN de transferencia (ARNt) para incrementar la eficiencia de la escisión *in vivo* [Perriman et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92(13):6175-6179; de Feyter y Gaudron Methods in Molecular Biology, Vol. 74, Capítulo 43, "Expressing Ribozymes in Plants", Editado por Turner, P. C, Humana Press Inc., Totowa, N.J.; Pat. de EE. UU. No. 6.423.885]. Las ARN endorribonucleasas tales como las encontradas en *Tetrahymena thermophila* también son ribozimas útiles (Pat. de EE. UU. No. 4.987.071).

25 Las líneas de plantas transformadas con cualquiera de las moléculas de regulación a la baja descritas en la presente memoria anteriormente se criban para identificar aquellas que muestran la mayor inhibición del polipéptido endógeno de interés, y de esta manera el incremento del rasgo deseado de la planta (p. ej., cambio en la acidez de la planta).

Según algunas realizaciones de la invención, la planta comprende un fruto.

Según algunas realizaciones de la invención, el fruto es un fruto maduro.

Según algunas realizaciones de la invención, la regulación del nivel de expresión del polinucleótido o del polipéptido codificado de esta manera se efectúa usando un promotor específico de fruto.

30 Según algunas realizaciones de la invención, la regulación se efectúa usando un promotor específico del desarrollo para modular la expresión del polipéptido antes de la maduración del fruto.

Por ejemplo, la modificación de la acidez de un fruto de pepino puede realizarse antes de la maduración del fruto.

35 Como se describe en la sección de Antecedentes, el pH del fruto afecta la calidad del fruto después de la recolección. Así, la reducción del pH (acidez incrementada) ejerce probablemente un efecto positivo en el almacenamiento del fruto y en la inhibición de los ataques de patógenos.

40 Según un aspecto de algunas realizaciones de la invención, se proporciona un método para afectar el almacenamiento del fruto después de la recolección. El método se efectúa regulando la acidez del fruto según el método de algunas realizaciones de la invención, en donde cuando la regulación comprende incrementar la acidez del fruto entonces se incrementa el almacenamiento del fruto después de la recolección, y en donde cuando la regulación comprende disminuir la acidez del fruto entonces se disminuye el almacenamiento del fruto después de la recolección.

Según algunas realizaciones de la invención, la planta comprende una porción distinta de fruto.

Según algunas realizaciones de la invención, la parte distinta de fruto comprende raíces.

45 Debe indicarse que el pH de las raíces de la planta afecta el pH de la rizosfera, y de esta manera puede incrementar o disminuir la captación de nutrientes. Así, una acidez incrementada de las raíces de la planta puede incrementar la captación de nutrientes a través de las raíces ya que la acidez incrementa la solubilidad de los nutrientes tales como hierro (Fe), manganeso (Mn), y cobre (Cu), metales tóxicos tales como aluminio, o metales pesados tales como Cadmio (Cd), Plomo (Pb) y cinc (Zn) en el suelo. Así, la reducción de la acidez de las raíces puede aliviar la toxicidad del aluminio o de los metales pesados.

50 Según la descripción, se proporciona un método para afectar la captación de nutrientes, químicos tóxicos o metales pesados de una planta, que comprende regular la acidez de las raíces según el método de algunas realizaciones de la invención, en donde cuando la regulación comprende incrementar la acidez de las raíces entonces se incrementa la captación de nutrientes, químicos tóxicos o metales pesados, y en donde cuando la regulación comprende disminuir la acidez de las raíces entonces se disminuye o permanece inalterada la captación de nutrientes, químicos tóxicos o metales pesados.

Debe indicarse que el incremento de la acidez de las raíces de la planta es deseable cuando existe una necesidad de incrementar la captación de nutrientes tales como hierro, magnesio y cobre. Además, la captación incrementada de nutrientes también puede incrementar la eficiencia en el uso de fertilizantes (p. ej., nitrógeno, micronutrientes) de una planta, especialmente cuando se crece en concentraciones limitantes de fertilizante (p. ej., nitrógeno).
 5 Alternativamente, en suelos con metales pesados, el incremento del pH de las raíces (es decir, disminución de la acidez de las raíces) puede reducir la captación de los metales pesados, que son tóxicos para la planta.

Según algunas realizaciones de la invención, la planta con una acidez incrementada de las raíces no es un árbol de pino.

El efecto del transgén (el polinucleótido exógeno que codifica el polipéptido) en la eficiencia en el uso de fertilizantes (p. ej., eficiencia en el uso de nitrógeno) puede determinarse usando métodos conocidos tal como se detalla más adelante y en la sección de Ejemplos que sigue.

15 Eficiencia en el uso de fertilizantes - Para analizar si las plantas transgénicas responden mejor a los fertilizantes, las plantas se crecen en placas de agar o macetas con una cantidad limitada de fertilizante, como se describe, por ejemplo, en Yanagisawa et al (Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101:7833-8). Las plantas se analizan para determinar su tamaño global, tiempo hasta la floración, rendimiento, contenido de proteínas del brote y/o grano. Los parámetros evaluados son el tamaño global de la planta madura, su peso húmedo y seco, el peso de las semillas producidas, el tamaño promedio de las semillas y el número de semillas producidas por planta. Otros parámetros que pueden ensayarse son: el contenido de clorofila de las hojas (ya que el estado de nitrógeno de la planta y el grado de verdor de las hojas están altamente correlacionados), contenido de aminoácidos y de proteína total de las semillas u otras partes de la planta
 20 tales como hojas o brotes, contenido de aceite, etc. De forma similar, en lugar de proporcionar nitrógeno en cantidades limitantes, pueden añadirse fosfato o potasio a concentraciones crecientes. De nuevo, los mismos parámetros medidos son los mismos que los listados anteriormente. De esta manera, se evalúan la eficiencia en el uso de nitrógeno (NUE), la eficiencia en el uso de fosfato (PUE) y la eficiencia en el uso de potasio (KUE), evaluando la capacidad de las plantas transgénicas para prosperar en condiciones de restricción de nutrientes.

25 Eficiencia en el uso de nitrógeno - Para analizar si las plantas transgénicas (p. ej., plantas de Arabidopsis) responden mejor al nitrógeno, las plantas se crecen en 0,75-3 milimolar (mM, condiciones deficientes de nitrógeno) o 6-10 mM (concentración óptima de nitrógeno). Se deja que las plantas crezcan durante 25 días adicionales o hasta la producción de semillas. Las plantas se analizan entonces para determinar su tamaño global, tiempo hasta la floración, rendimiento, contenido de proteínas del brote y/o grano/producción de semillas. Los parámetros evaluados pueden ser el tamaño global de la planta, peso húmedo y seco, el peso de las semillas producidas, el tamaño promedio de las semillas y el número de semillas producidas por planta. Otros parámetros que pueden ensayarse son: el contenido de clorofila de las hojas (ya que el estado de nitrógeno de la planta y el grado de verdor de las hojas están altamente correlacionados), contenido de aminoácidos y de proteína total de las semillas u otras partes de la planta tales como hojas o brotes, y el contenido de aceite. Las plantas transformadas que no presentan efectos fisiológicos y/o morfológicos sustanciales o que presentan parámetros medidos más altos que las plantas de tipo salvaje, se identifican como plantas eficientes en el uso de nitrógeno.

35 Ensayo de eficiencia en el uso de nitrógeno usando plántulas - El ensayo se hace según Yanagisawa-S. et al. con modificaciones menores ("Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants: Improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 7833-7838). Brevemente, las plantas transgénicas que se crecen durante 7-10 días en 0,5 x MS [Murashige-Skoog] suplementado con un agente de selección se transfieren a dos condiciones limitantes de nitrógeno: el medio MS en el que la concentración de nitrógeno combinada (NH₄NO₃ y KNO₃) era 0,75 mM (condiciones deficientes de nitrógeno) o 6-15 mM (concentración óptima de nitrógeno). Se deja que las plantas crezcan durante 30-40 días adicionales y se fotografían entonces, se retiran individualmente del Agar (el brote sin las raíces) y se pesan inmediatamente (peso fresco) para análisis estadísticos
 45 posteriores. Las construcciones para las que solo están disponibles las semillas T1 se siembran en medio selectivo y se transfieren cuidadosamente al menos 20 plántulas (representando cada una un evento de transformación independiente) al medio con nitrógeno limitante. Para las construcciones para las que están disponibles las semillas T2, se analizan diferentes eventos de transformación. Habitualmente, se transfieren 20 plantas seleccionadas aleatoriamente de cada evento al medio con nitrógeno limitante y se dejan crecer durante 3-4 semanas adicionales y se pesan individualmente al final de ese periodo. Las plantas transgénicas se comparan con las plantas control
 50 crecidas en paralelo en las mismas condiciones. Las plantas transgénicas simuladas que expresan el gen informador uidA (GUS) bajo el mismo promotor o las plantas transgénicas que portan el mismo promotor pero que carecen de un gen informador se usan como control.

55 Determinación del nitrógeno - El procedimiento para la determinación de la concentración de N (nitrógeno) en las partes estructurales de las plantas implica el método de digestión con persulfato de potasio para convertir el N orgánico en NO₃⁻ (Purcell y King 1996 *Argon. J.* 88:111-113, la reducción de NO₃⁻ a NO₂⁻ mediada por Cd²⁺ modificada (Vodovotz 1996 *Biotechniques* 20:390-394) y la medición de nitrito por el ensayo de Griess (Vodovotz 1996, supra). Los valores de absorbancia se miden a 550 nm frente a una curva estándar de NaNO₂. El procedimiento se describe con detalle en Samonte et al. 2006 *Argon. J.* 98:168-176.

60 Según algunas realizaciones de la invención, la parte distinta de fruto comprende pétalo de flor.

Como se describe en el Ejemplo 9 de la sección de Ejemplos que sigue, se espera que el color de los pétalos de las flores de petunia con una expresión silenciada del gen pH endógeno (es decir, regulación a la baja del gen pH) de como resultado una tonalidad más azul en comparación con las plantas no infectadas control.

5 Según la descripción, se proporciona un método para afectar el color de los pétalos de las flores, que comprende regular la acidez de los pétalos de las flores según el método de algunas realizaciones de la invención, para cambiar de esta manera el color de los pétalos de las flores.

10 Según la descripción, en donde cuando la regulación comprende incrementar la acidez de los pétalos de las flores entonces el color de los pétalos de las flores es más rojo que en una planta no transgénica o en una no transformada de la misma especie en condiciones de crecimiento idénticas, y en donde cuando la regulación comprende disminuir la acidez de los pétalos de las flores entonces el color de los pétalos de las flores es más azul que en una planta no transgénica o en una no transformada de la misma especie en condiciones de crecimiento idénticas.

15 Como se muestra adicionalmente en las Figuras 1E y 4A-D y en las Tablas 5-6 y se describe en los Ejemplos 2 y 4 de la sección de Ejemplos que sigue, la presencia o ausencia de la mutación de duplicación LIVA en el genoma de una variedad de melón indica si la variedad de melón presenta menos o más acidez en el fruto, respectivamente. Estos resultados sugieren el uso de la mutación de duplicación LIVA para seleccionar una variedad de melón para reproducción y cultivo.

20 La identificación del gen y proteína pH descrita en la presente memoria, junto con el polimorfismo responsable de su ausencia de función y la ausencia posterior de acumulación de ácido, pueden usarse en la reproducción y cultivo para el fruto de melón bien con un contenido de ácido bajo o alto. Como el polimorfismo está en el gen en sí mismo, el marcador basado en el polimorfismo es más fiable que los marcadores ligados usados previamente, que tienen como desventaja la probabilidad de recombinaciones y genotipado incorrecto.

25 Según la descripción, se proporciona un método para seleccionar una planta de melón para reproducción y cultivo, que comprende determinar en un tejido de la planta una presencia o una ausencia de una duplicación LIVA (SEQ ID NO:27) en los aminoácidos 107-110 de la SEQ ID NO:4, en donde la presencia de la duplicación LIVA indica que se espera que un fruto de la planta de melón no sea agrio, y en donde la ausencia de la duplicación LIVA indica que se espera que un fruto de la planta de melón sea agrio, seleccionando de esta manera la planta de melón para reproducción y cultivo.

30 La información de secuencia y las anotaciones descubiertas por las presentes enseñanzas pueden aprovecharse a favor de la reproducción y cultivo clásicos. Así, los datos de subsecuencias de los polinucleótidos descritos anteriormente, pueden usarse como marcadores para la selección asistida por marcador (MAS), en la que se usa un marcador para la selección indirecta de un determinante o determinantes genéticos de un rasgo de interés [p. ej., acidez incrementada o disminuida de la planta; cambio (incremento o disminución) de la captación de nutrientes; o cambio en el color de los pétalos]. Los datos de ácidos nucleicos de las presentes enseñanzas (secuencia de ADN o ARN) pueden contener o estar ligados a sitios polimórficos o marcadores genéticos en el genoma tal como un polimorfismo de longitud del fragmento de restricción (RFLP), microsatélites y polimorfismo de nucleótido único (SNP), huella de ADN (DFP), polimorfismo de longitud del fragmento amplificado (AFLP), polimorfismo del nivel de expresión, polimorfismo del polipéptido codificado y cualquier otro polimorfismo en la secuencia de ADN o ARN.

40 Debe indicarse que una vez que se ha identificado el gen que controla la acidez en el melón (el gen pH), y se ha caracterizado la mutación de pérdida de función responsable de cambiar un melón agrio (SEQ ID NO:2) a un melón no agrio (SEQ ID NO:4), dicha información de secuencia puede usarse para seleccionar las variaciones de ácido nucleico en genes homólogos de otras plantas y para identificar mutaciones de pérdida de función que controlan la acidez en plantas adicionales.

45 Según un aspecto de algunas realizaciones de la invención, se proporciona un método para identificar una variación de ácido nucleico asociada con la acidez disminuida de una planta, que comprende identificar en al menos una planta de una pluralidad de plantas una mutación de pérdida de función en un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 81%, al menos aproximadamente un 82%, al menos aproximadamente un 83%, al menos aproximadamente un 84%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 86%, al menos aproximadamente un 87%, al menos aproximadamente un 88%, al menos aproximadamente un 89%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 91%, al menos aproximadamente un 92%, al menos aproximadamente un 93%, al menos aproximadamente un 94%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99%, p. ej., un 100% de identidad u homología con un polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO:2, en donde el polipéptido modula la acidez de una planta, identificando de esta manera la variación de ácido nucleico asociada con una acidez disminuida de la planta.

55 Según algunas realizaciones de la invención, el método comprende además someter a una pluralidad de plantas a mutagénesis antes de identificar la mutación de pérdida de función en el polipéptido, para inducir de esta manera una variación de ácido nucleico que da lugar a una mutación de pérdida de función en el polipéptido que tiene al menos

aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 61%, al menos aproximadamente un 62%, al menos aproximadamente un 63%, al menos aproximadamente un 64%, al menos aproximadamente un 65%, al menos aproximadamente un 66%, al menos aproximadamente un 67%, al menos aproximadamente un 68%, al menos aproximadamente un 69%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 71%, al menos aproximadamente un 72%, al menos aproximadamente un 73%, al menos aproximadamente un 74%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 76%, al menos aproximadamente un 77%, al menos aproximadamente un 78%, al menos aproximadamente un 79%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 81%, al menos aproximadamente un 82%, al menos aproximadamente un 83%, al menos aproximadamente un 84%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 86%, al menos aproximadamente un 87%, al menos aproximadamente un 88%, al menos aproximadamente un 89%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 91%, al menos aproximadamente un 92%, al menos aproximadamente un 93%, al menos aproximadamente un 94%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99%, p. ej., un 100% de identidad u homología con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO:2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 28 y 29.

Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "variación de ácido nucleico" se refiere a cualquier mutación en la secuencia de ADN de una planta (p. ej., de la célula de una planta) que puede dar lugar a la regulación a la baja del nivel de expresión y/o actividad del polipéptido aislado de algunas realizaciones de la invención (p. ej., el polipéptido codificado por el polinucleótido aislado de la invención). Los ejemplos no limitativos de dichas variaciones de ácido nucleico incluyen mutación con cambio de sentido, es decir, una mutación que cambia un residuo de aminoácido en la proteína por otro residuo de aminoácido y de esta manera suprime la actividad enzimática de la proteína; una mutación sin sentido, es decir, una mutación que introduce un codón de parada en una proteína, p. ej., un codón de parada temprano que da lugar a una proteína más corta que carece de la actividad enzimática; una mutación de desplazamiento de marco, es decir, una mutación, habitualmente, deleción o inserción de ácido o ácidos nucleicos que cambia el marco de lectura de la proteína, y puede dar lugar a una terminación temprana mediante la introducción de un codón de parada en un marco de lectura (p. ej., una proteína truncada, que carece de la actividad enzimática), o en una secuencia de aminoácidos más larga (p. ej., una proteína con translectura) que afecta la estructura secundaria o terciaria de la proteína y da lugar a una proteína no funcional, que carece de la actividad enzimática del polipéptido "de tipo salvaje" o no mutado; una mutación de translectura debida a una mutación de desplazamiento de marco o una mutación de codón de parada modificado (es decir, cuando el codón de parada se muta en un codón de aminoácido), con una actividad enzimática suprimida; una mutación de promotor, es decir, una mutación en una secuencia promotora, habitualmente en 5' del sitio de inicio de la transcripción de un gen, que da lugar a la regulación a la baja de un producto génico específico; una mutación reguladora, es decir, una mutación en una región en 5' o 3', o en un gen, que afecta la expresión del producto génico; una mutación de deleción, es decir, una mutación que delecciona ácidos nucleicos codificadores en una secuencia génica y que puede dar lugar a una mutación de desplazamiento de marco o a una mutación en marco (en la secuencia codificadora, deleción de uno o más codones de aminoácidos); una mutación de inserción, es decir, una mutación que inserta ácidos nucleicos codificadores o no codificadores en una secuencia génica, y que puede dar lugar a una mutación de desplazamiento de marco o a una inserción en marco de uno o más codones de aminoácidos; una inversión, es decir, una mutación que da lugar a una secuencia codificadora o no codificadora invertida; una mutación de corte y empalme, es decir, una mutación que da lugar a un corte y empalme anormal o a un corte y empalme pobre y una mutación de duplicación, es decir, una mutación que da lugar a una secuencia codificadora o no codificadora duplicada, que puede estar en marco o puede causar un desplazamiento de marco.

Tal y como se usa en la presente memoria la expresión "mutación de pérdida de función" se refiere a una mutación que suprime al menos una actividad de un polipéptido. Debe indicarse que la mutación puede detectarse a nivel de ADN y/o a nivel de proteína. Los expertos en la técnica pueden traducir el efecto de una variación de ácido nucleico en un polinucleótido de interés en el polipéptido codificado usando la Tabla del Código Genético.

Están disponibles diversos programas informáticos para predecir el efecto de una variación en la secuencia de aminoácidos en la estructura-función predicha del polipéptido. Estos incluyen, por ejemplo, software de modelado de proteínas tal como TMhMM [Protocolo de Transferencia de Hipertexto://World Wide Web (punto) cbs (punto) dtu (punto) dk/services/TMhMM-2.0/] (véanse, por ejemplo, las Figuras 4A-D, Ejemplo 4 de la sección de Ejemplos que sigue), y PDBeXplore, PDBePISA y PDBeMotif, que pueden encontrarse en el Protocolo de Transferencia de Hipertexto://World Wide Web (punto) ebi (punto) ac (punto) uk/Tools/structural (punto) html. También pueden usarse alineamientos por pares o de secuencias múltiples para identificar mutaciones en aminoácidos conservados y pueden encontrarse en el Protocolo de Transferencia de Hipertexto://World Wide Web (punto) ebi (punto) ac (punto) uk/Tools/.

Como se describe en el Ejemplo 4 de la sección de Ejemplos que sigue, los presentes inventores han descubierto que el polipéptido codificado por el gen pH es una proteína transmembrana que probablemente transporta protones a las vacuolas de la planta e incrementa de esta manera la acidez de la planta.

Según algunas realizaciones, la mutación de "pérdida de función" suprime al menos aproximadamente un 10%, al menos aproximadamente un 20%, al menos aproximadamente un 30%, al menos aproximadamente un 40%, un 50%, al menos aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, p. ej., al menos aproximadamente un 96%,

97%, 98%, 99% o 100% de la actividad enzimática del polipéptido según se mide usando un ensayo adecuado tal como un ensayo de actividad enzimática, o un ensayo de expresión de proteínas (que refleja indirectamente la actividad).

5 Los métodos para calificar el grado de la actividad de transporte del polipéptido de algunas realizaciones de la invención son conocidos en la técnica e incluyen clonar la secuencia codificadora mutada en un vector de expresión (p. ej., pYES) y transfectar células de levadura. Las células pueden someterse además a diversos ensayos que determinan la actividad de transferencia dependiente de protones de la proteína mutada en comparación con el polipéptido no mutado (p. ej., de tipo salvaje), como se describe, por ejemplo, para el transportador de nucleótidos dependiente de pH de Arabidopsis en Wormit et al., 2004 [Characterization of three novel members of the Arabidopsis thaliana equilibrative nucleoside transporter family. Biochem. J. 383:19-26].

Según algunas realizaciones de la invención, la mutación de pérdida de función ocurre en el tercer dominio transmembrana del polipéptido aislado de algunas realizaciones de la invención.

Según algunas realizaciones de la invención, la mutación de pérdida de función está en un dominio transmembrana y puede afectar la localización de la proteína, la interacción proteína-proteína, la transducción de señales y similares.

15 Según algunas realizaciones de la invención, la mutación de pérdida de función ocurre en una secuencia de aminoácidos del polipéptido aislado de la invención que es homóloga a los aminoácidos 107-110 de la SEQ ID NO:4.

Según algunas realizaciones de la invención, la mutación de pérdida de función se identifica en el ADN de la pluralidad de plantas.

20 Según algunas realizaciones de la invención, la mutación de pérdida de función se selecciona del grupo que consiste en una mutación sin sentido, una mutación de desplazamiento de marco, una inserción, una mutación de duplicación o una mutación de delección.

Para determinar las alteraciones en la secuencia de ácido nucleico o aminoácidos [p. ej., un polimorfismo de nucleótido único (SNP)] en el *gen pH*, se obtiene en primer lugar el ADN de un tejido de la planta. Los ejemplos no limitativos de tejidos de la planta adecuados incluyen hojas, raíces, pétalo, flor, fruto, semilla, y raíces.

25 Una vez se ha obtenido la muestra de la planta, el ADN se extrae usando métodos que son muy conocidos en la técnica, tales como por picado de los tejidos, lisis celular, extracción de proteínas y precipitación del ADN usando 2 a 3 volúmenes de etanol al 100%, lavando en etanol al 70%, sedimentando, secando y resuspendiendo en agua o cualquier otro tampón adecuado (p. ej., Tris-EDTA). Según algunas realizaciones de la invención, después de dicho procedimiento, se determina la concentración de ADN tal como midiendo la densidad óptica (DO) de la muestra a 260 nm (en donde 1 unidad de DO = 50 µg/ml de ADN). Para determinar la presencia de proteínas en la disolución de ADN, se determina la relación de DO a 260/DO a 280. Preferiblemente, solo se usan las preparaciones de ADN que tienen una relación de DO a 260/DO a 280 entre 1,8 y 2 en los procedimientos siguientes descritos en la presente memoria más adelante.

30 Debe indicarse que para los métodos de detección basados en PCR, no es necesaria una purificación adicional del ADN comprendido en el tejido de la planta y una vez que el tejido se hierve, puede someterse adicionalmente a digestión de proteínas (p. ej., usando fosfatasa alcalina), después de lo cual el ADN se muestrea y usa directamente en una reacción de amplificación por PCR.

35 La alteración en la secuencia de ácido nucleico (p. ej., SNP) de algunas realizaciones de la invención puede identificarse usando una variedad de métodos. Una opción es determinar la secuencia génica completa de un producto de la reacción de PCR (véase el análisis de secuencias, en la presente memoria más adelante). Alternativamente, un segmento dado de un ácido nucleico puede caracterizarse en varios otros niveles. A la resolución más baja, el tamaño de la molécula puede determinarse por electroforesis por comparación con un estándar conocido operado en el mismo gel. Una visión más detallada de la molécula puede conseguirse por escisión con combinaciones de enzimas de restricción antes de la electroforesis, para permitir la construcción de un mapa ordenado. La presencia de secuencias específicas en el fragmento puede detectarse por hibridación de una sonda marcada, o la secuencia de nucleótidos precisa puede determinarse por degradación química parcial o por extensión con cebadores en la presencia de análogos de nucleótidos de terminación de cadena.

40 Adicionalmente o alternativamente, la variación en la secuencia de ácido nucleico puede detectarse por polimorfismo de longitud del fragmentos de restricción (RFLP); determinación directa de la identidad del nucleótido en el sitio de la alteración por un ensayo de secuenciación, un ensayo de detección de falta de concordancia basado en enzima, o un ensayo de hibridación; análisis de microsecuenciación; ensayos de detección de falta de concordancia basados en polimerasas y ligasas (el "Oligonucleotide Ligation Assay" (OLA, Nickerson et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:8923-8927); Análisis de Bit Genético™ mediado por ligasa/polimerasa; métodos de ensayo de hibridación tales como PCR, RT-PCR, protección de ARNasa, hibridación in-situ, extensión de cebadores, transferencia Southern, transferencia Northern y análisis de hibridación sobre mancha; hibridación en matrices de oligonucleótidos [véase, Hacia et al., (1996) Nat Genet 1996;14(4):441-447; Shoemaker et al., (1996) Nat Genet 1996;14(4):450-456; Kozal et al., (1996) Nat Med 1996;2(7):753-759]; sistemas integrados (p. ej., como se describe en la Pat. de EE. UU. No.

5.589.136, que describe la integración de la amplificación por PCR y electroforesis capilar en chips); oligonucleótido específico de alelo (ASO; como se describe p. ej., en Conner et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 80:278-282, 1983); electroforesis en gel con gradiente de temperatura desnaturizante (DGGE/TGGE); polimorfismo de conformación de una cadena (SSCP) revisado por Hayashi, PCR Meth. Appl., 1:34-38, 1991.); huella didesoxi (ddF) (p. ej., como se describe en Liu y Sommer, PCR Methods Appl., 4:97, 1994.); análisis por pirosecuenciación™ (Pyrosequencing, Inc. Westborough, MA, EE. UU.); análisis de Acycloprime™ (Perkin Elmer, Boston, Massachusetts, EE. UU.); e hibridación sobre mancha inversa.

Se apreciará que los avances en el campo de la detección de los SNP han proporcionado técnicas de genotipado de SNP a gran escala adicionales exactas, fáciles y no costosas, tales como hibridación dinámica específica de alelo (DASH, Howell, W.M. et al., 1999. Dynamic allele-specific hybridization (DASH). Nat. Biotechnol. 17: 87-8), electroforesis en gel diagonal en matriz de microplacas [MADGE, Day, I.N. et al., 1995. High-throughput genotyping using horizontal polyacrylamide gels with wells arranged for microplate array diagonal gel electrophoresis (MADGE). Biotechniques. 19: 830-5], el sistema TaqMan (Holland, P.M. et al., 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A. 88: 7276-80), así como diversas tecnologías de "chip" de ADN tales como las micromatrices GeneChip (p. ej., chips Affymetrix SNP) que se describen en la Solic. de Pat. de EE. UU. No. 6.300.063 de Lipshutz, et al. 2001, análisis de bit genético (GBA™) que se describe por Goelet, P. et al. (Solic. PCT No. 92/15712), ácido nucleico peptídico (PNA, Ren B, et al., 2004. Nucleic Acids Res. 32: e42) y sondas de ácidos nucleicos bloqueados (LNA, Latorra D, et al., 2003. Hum. Mutat. 22: 79-85), balizas moleculares (Abravaya K, et al., 2003. Clin Chem Lab Med. 41: 468-74), tinte intercalante [Germer, S. y Higuchi, R. Single-tube genotyping without oligonucleotide probes. Genome Res. 9:72-78 (1999)], cebadores FRET (Solinas A et al., 2001. Nucleic Acids Res. 29: E96), AlphaScreen (Beaudet L, et al., Genome Res. 2001, 11(4): 600-8), SNPstream (Bell PA, et al., 2002. Biotechniques. Supl.: 70-2, 74, 76-7), minisequenciación múltiple (Curcio M, et al., 2002. Electrophoresis. 23: 1467-72), SnaPshot (Turner D, et al., 2002. Hum Immunol. 63: 508-13), MassEXTEND (Cashman JR, et al., 2001. Drug Metab Dispos. 29: 1629-37), ensayo GOOD (Sauer S, y Gut IG. 2003. Rapid Commun. Mass. Spectrom. 17: 1265-72), minisequenciación en micromatrices (Liljedahl U, et al., 2003. Pharmacogenetics. 13: 7-17), extensión de cebadores en matrices (APEX) (Tonisson N, et al., 2000. Clin. Chem. Lab. Med. 38: 165-70), extensión de cebadores en micromatrices (O'Meara D, et al., 2002. Nucleic Acids Res. 30: e75), matrices Tag (Fan JB, et al., 2000. Genome Res. 10: 853-60), incorporación dirigida por molde (TDI) (Akula N, et al., 2002. Biotechniques. 32: 1072-8), polarización de fluorescencia (Hsu TM, et al., 2001. Biotechniques. 31: 560, 562, 564-8), ensayo colorimétrico de ligación de oligonucleótidos (OLA, Nickerson DA, et al., 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 8923-7), OLA codificado por secuencia (Gasparini P, et al., 1999. J. Med. Screen. 6: 67-9), ligación en micromatrices, reacción en cadena de la ligasa, sondas Padlock, amplificación por círculo rodante, ensayo invasor (revisado en Shi MM. 2001. Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. Clin Chem. 47: 164-72), microesferas codificadas (Rao KV et al., 2003. Nucleic Acids Res. 31: e66) MassArray (Leushner J, Chiu NH, 2000. Mol Diagn. 5: 341-80), análisis de heterodúplex, detección de escisión de falta de concordancia, y otras técnicas convencionales como se describe en Sheffield et al. (1991), White et al. (1992), Grompe et al. (1989 y 1993), derivado de nucleótido resistente a exonucleasa (Pat. de EE. UU. No. 4.656.127).

Las alteraciones de la secuencia también pueden determinarse a nivel de proteínas. Aunque los métodos cromatográficos y electroforéticos se usan preferiblemente para detectar grandes variaciones en el peso molecular del polipéptido de algunas realizaciones de la invención, tales como detección de la proteína truncada generada por una alteración de secuencia de desplazamiento de marco, delecionada o sin sentido, se usan preferiblemente ensayos de inmunodetección tales como análisis por ELISA y transferencia western, inmunohistoquímica y similares, que pueden efectuarse usando anticuerpos específicos para alteraciones de secuencia para detectar mutaciones puntuales y cambios sutiles en el peso molecular.

Los polinucleótidos y polipéptidos descritos en la presente memoria anteriormente pueden usarse en un rango amplio de plantas económicas, de una manera segura y rentable.

Las líneas de plantas que expresan exógenamente el polinucleótido o el polipéptido de la invención se criban para identificar aquellas que muestran el mayor incremento del rasgo deseado de la planta.

Según la descripción, se proporciona un alimento o pienso que comprende la planta de algunas realizaciones de la invención o una parte de la misma.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "que incluye pero no está limitado a".

El término "que consiste en" significa "que incluye y está limitado a".

El término "que consiste esencialmente en" significa que la composición, método o estructura puede incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solo si los ingredientes, etapas y/o partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y nuevas de la composición, método o estructura reivindicada.

Tal y como se usa en la presente memoria, la forma singular "un", "uno" y "el/la" incluye referencias plurales a no ser que el contexto dicte claramente otra cosa. Por ejemplo, el término "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos. A lo largo de esta solicitud, diversas realizaciones de esta invención pueden presentarse en un formato de rango. Debe entenderse que la descripción en formato de rango es meramente por conveniencia y brevedad y no debe considerarse como una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, la descripción de un rango debe considerarse que ha descrito específicamente todos los subrangos posibles, así como valores numéricos individuales en ese rango. Por ejemplo, la descripción de un rango tal como de 1 a 6 debe considerarse que ha descrito específicamente subrangos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., así como números individuales en ese rango, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del rango.

Siempre que se indica un rango numérico en la presente memoria, se pretende que incluya cualquier numeral citado (fraccionado o integral) en el rango indicado. Las expresiones "que varía/varía entre" un primer número indicado y un segundo número indicado y "que varía/varía de" un primer número indicado "a" un segundo número indicado se usan en la presente memoria indistintamente y se pretende que incluyan el primer y segundo números indicados y todos los numerales fraccionados e integrales entre ellos.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "método" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para conseguir una tarea dada incluyendo, pero no limitado a, aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos bien conocidos para, o fácilmente desarrollados a partir de las maneras, medios, técnicas y procedimientos por, expertos en las técnicas químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

Se aprecia que determinadas características de la invención, que, por claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. A la inversa, diversas características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse separadamente o en cualquier subcombinación adecuada o como sea adecuado en cualquier otra realización descrita de la invención. Determinadas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no deben considerarse características esenciales de esas realizaciones, a no ser que la realización sea inoperativa sin esos elementos.

Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención, como se delinean en la presente memoria anteriormente y como se reivindican en la sección de reivindicaciones más adelante, encuentran un soporte experimental en los siguientes ejemplos.

30 Ejemplos

Se hace ahora referencia a los siguientes ejemplos, que, junto con las descripciones anteriores, ilustran algunas realizaciones de la invención de una forma no limitativa.

Generalmente, la nomenclatura usada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican concienzudamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I- III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se muestra en las Pat. de EE. UU. No. 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen extensamente en la bibliografía de patentes y científica, véanse, por ejemplo, las Pat. de EE. UU. No. 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods and Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Maliga P. et al., (1995) Methods in Plant Molecular Biology: A Laboratory Course Manual (A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual); Clark, M. (1996) Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual (Springer Lab Manuals). Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de este documento. Se cree que los procedimientos que aparecen en el mismo son muy conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.

Ejemplo 1

Identificación del gen pH usando clonación basada en mapeo

5 Los presentes inventores han mapeado el gen responsable de controlar la acidez (pH) en una planta usando una estrategia de mapeo fina (véase, p. ej., Peters J. et al., 2003, Trends in Plant Science, 8:484-491). El nuevo gen se clonó usando poblaciones segregadas de melón, que derivaban de cruces entre genotipos agrio y no agrio. Las poblaciones se seleccionaron a partir de una población de la Línea de Introgresión Aleatoria derivada de un cruce de la variedad no agria Dulce y un genotipo agrio PI414723, así como líneas casi isogénicas derivadas de un cruce de la variedad agria Faqqus y de la variedad no agria Noy Yizre'el. La técnica usada para abarcar la introgresión se seleccionó de paseo BAC (cromosoma bacteriano artificial) y desarrollo de marcadores y una combinación de técnicas de los mismos. Mediante la identificación de los polimorfismos y correlacionándolos con el fenotipo de acidez del fruto, se limitó la introgresión que controlaba la acidez del fruto a ~ 40 kb de la secuencia genómica. Esta introgresión contenía un gen candidato para el rasgo de acidez del fruto, que codifica un transportador de membrana indefinido.

Resultados experimentales

15 Mapeo del gen que controla el pH en las plantas - Se generaron líneas endogámicas recombinantes (RIL) cruzando las líneas de melón parental Dulce (no agrio) y PI414723 (agrio) y por autofecundación posterior de las generaciones F2, F3, F4 y F5 de las mismas, como se describe en Harel-Beja et al., 2010, Theor Appl Genet., 121:511-33. Epub 2010 abr 17. Los niveles de acidez de los frutos de las RIL se ensayaron para análisis de ligación con marcadores polimórficos mapeados sobre los genomas de las diversas RIL, como se describe en Harel-Beja et al. Los valores de pH de las RIL y de las líneas parentales se proporcionan en la Tabla 1, a continuación, en la presente memoria. Cada línea RIL se analizó en hasta cuatro réplicas.

Tabla 1

20 Tabla 1. Se proporcionan los números de RIL y los valores de pH de cada una de las RIL y líneas parentales 'Dulce' y "PI 414723" ensayadas.

<i>RIL</i>	<i>pH</i>	<i>RIL</i>	<i>pH</i>	<i>RIL</i>	<i>pH</i>	<i>RIL</i>	<i>pH</i>
1	6,39	31	4,65	62	6,13	93	4,8
1	6,32	31	4,7	63	6,0	93	4,9
1	6,54	31	4,8	63	6,2	94	5,9
1	6,55	31	5,29	63	6	94	5,97
2	5,1	31	5,30	63	5,9	94	4,8
2	5,2	31	5,30	64	4,63	94 5,	97
2	6,35	32	6,3	64	4,65	95	5,08
2	6,1	32	6	64	4,83	95	5,10
3	6,59	32	6,1	64	4,71	95	5,2
3	4,8	32	6	65	6,1	95	4,9
4	6,3	34	6,1	65	6,02	96	5,00
4	6,2	34	6	65	6,09	96	5,30
5	6,73	34	6,1	65	5,7	96	5,45
6	5,7	35	5,6	66	5,08	97	6,61
6	5,7	35	5,6	66	4,8	97	6,37
6	5,2	35	5,6	66	4,7	97	6,30
6	5	35	5,2	68 6,	2	97	6,30
6	4,7	36	6,1	68	6,3	98	4,70
7	5,6	36	5,7	68	6,3	98	4,50
7	6,1	36	6,06	68	6,1	98	4,9
7	5,7	36	6,01	69	6,55	98	4,9

ES 2 817 780 T3

<i>RIL</i>	<i>pH</i>	<i>RIL</i>	<i>pH</i>	<i>RIL</i>	<i>pH</i>	<i>RIL</i>	<i>pH</i>
9	5,7	37	4,5	69	5,7	99	5,00
9	6,32	37	4,77	69	6,3	99	5
9	6,04	37	4,9	69	6,2	99	5,30
10		37	5	69	6,5	99	4,84
10	4,9	38	6,08	71	4,72	100	4,80
10	4,8	38	6,4	71	4,6	100	4,60
11	6,24	38	6,3	71	4,85	100	4,7
11	6,4	38		71	5	101	4,8
11	6,6	39	6,23	72	6,2	101	4,8
11	6,4	39	6,24	72	6,4	102	5,22
12	6,05	39	6,18	72	6,51	102	5,35
12	5,79	39	5,8	72	6,47	102	5,15
13	5,2	40	6,35	73	6	102	5
13	5,0	40	6,23	73	6,2	103	6,40
13	5,0	40	6,16	73	6,32	103	5,13
13	5	40	6,25	73	6,2	103	5,08
13	4,8	41	5,7	74	6	107	5,00
14	5,6	41	5,6	74	5,9	107	5,00
14	5,8	41	5,9	76	4,7	107	5,13
14	6,1	41	5,8	76	5	107	4,84
15	4,5	41	5,7	76	4,9	108	5,13
15	5,0	41	5,8	76	4,8	108	4,56
15	4,65	41	5,8	77	6,3	108	4,9
15	4,8	42	4,98	77	6,3	108	4,86
16	5,1	42	4,9	77	5,9	110	6,51
16	4,9	42	4,94	77	5,7	110	6,21
16	5,1	42	5,1	79	5,4	111	6,33
16	4,8	43	5,7	79	5,2	111	6,1
17	4,8	43	5,8	79	4,92	111	6,18
17	5,2	43	5,8	79	5,3	111	6,70
17	4,7	44	4,5	79	5,25	113	4,77
17	4,9	44	4,8	79	5,4	113	4,85
18	6,18	44	4,8	79	5,2	114	4,9
18	6,1	44	4,7	80	5,8	114	4,7

ES 2 817 780 T3

<i>RIL</i>	<i>pH</i>	<i>RIL</i>	<i>pH</i>	<i>RIL</i>	<i>pH</i>	<i>RIL</i>	<i>pH</i>
18	6,3	44	4,60	80	5,6	114	4,6
18	6,41	45	5,0	80	5,2	115	4,9
19	4,45	45	5,2	80	5,79	115	5,3
19	5,85	45	5,32	81	5,12	115	5,0
19	4,9	45	4,93	81	5	115	4,8
19	5,9	46	5,0	81	5,07	115	5
20	4,8	46	4,75	81	4,88	115	4,9
20	5,3	46	5,1	82	6,3	117	5,12
20	4,8	48	5,5	82		117	4,76
20	4,8	48	5,4	83	4,9	117	4,7
20	4,8	48	5,6	83	4,6	117	5,06
21	6,0	48	5,5	83	4,7	117	4,7
21	6,2	49	5,84	83	4,88	media	5,5
21	6,3	49	5,91	84	6,0	SDEV	0,6
21	6,1	49	5,74	84	6,1	máx	6,7
22	5,07	49	5,86	84	5,9	mín	4,5
22	5,2	50	5,9	84	6		
22	5,26	50	5,9	84	5,9	D1	6,00
23	4,88	50	5,8	85	5,80	D1	6,40
23	5	50	5,8	85	5,65	D1	6,3
23	4,8	50	6	85	5,7	D1	6,1
23	4,95	51	5,0	85	4,8	D1	6,00
24	6	51	5,1	87	5,06	D2	6,44
24	6	51	4,89	87	4,9	D2	6,50
24	5,92	52	6,3	87	5	D2	6,20
24	6,07	52	6,21	89	6,30	D2	6,25
25	4,8	53	4,72	89	5,90	D2	6,69
25	4,85	53	4,73	89	6,11	D3	6,3
25	4,9	53	4,65	91	5,33	D3	6,0
26	6,3	53	4,63	91	4,80	D3	6,2
26	6,08	54	4,85	91	5,20	D3	6,4
26	6,3	54	4,74	91	4,8	media	6,3
26	6,4	54	4,93	91	5,1	SDEV	0,2
27	5,9	54	4,8	92	4,50		

ES 2 817 780 T3

<i>RIL</i>	<i>pH</i>	<i>RIL</i>	<i>pH</i>	<i>RIL</i>	<i>pH</i>	<i>RIL</i>	<i>pH</i>
27	6,18	54	4,8	92	4,90	P1	5
27	6,1	55	5,0	92	4,50	P1	
27	5,9	55	5,12	92	4,80	P2	4,80
28	6	55	4,9	92	4,6	P2	5,10
28	6	55	4,94	92	4,6	P3	4,80
28	6,6	61	6,3	92	5	P3	4,70
29	4,8	61	5,7	92	4,6	P3	4,9
29	4,6	61	5,5	93	5,20	media	4,9
29	4,7	61	5,6	93	4,65	SDEV	0,1
30	6,0	62	5,8	93	4,80	P2	4,9
30	5,6	62	6,28	93	4,70	P3	4,85
30	5,3	62	6,43	93	4,65	"Dulce' media ± SD	6,3 ± 0,2
30	5,9	62	6,4	93	4,65	PI 414723 media ± SD	4,9 ± 0,1

5 Clonación del gen pH - El gen responsable de controlar la acidez (pH) del fruto se había mapeado en una posición entre los marcadores CMAT141 y CMCTTN181, a una distancia genética de 2 y 3 centimorgan (cM), respectivamente, del rasgo pH (Harel-Beja et al. 2010). El gen pH se clonó por una estrategia de clonación basada en mapeo usando la estrategia de paseo cromosómico (véase, p. ej., Peters J. et al., 2003, Trends in Plant Science, 8:484-491). Para el mapeo físico el gen *pH*, se cribaron filtros de una biblioteca BAC (cromosoma bacteriano artificial) genómico de melón CM_MBaB (Clemson University Genomic Institute, EE. UU.) con sondas radiactivas marcadas usando el kit NEBlot™ (#N1500S) (New England BioLabs, Inc.) según las instrucciones del proveedor. Las colonias de BAC marcadas en los filtros se detectaron usando un phosphoimager Fuji Film (FLA-5000). Para el desarrollo de la serie de BAC contiguos, los BAC seleccionados se sometieron a secuenciación terminal usando los cebadores SP6 y T7 y se desarrolló un producto de PCR a partir de estas secuencias terminales. El producto de PCR purificado se marcó como anteriormente y se usó como una sonda para la identificación de los BAC contiguos. El análisis de polimorfismos entre las dos líneas parentales para cada nueva secuencia obtenida junto con la comparación de los polimorfismos con aquellos de las líneas RIL permitió la limitación de la introgresión a BAC CM_MBaB 69P20 que portaba el posible gen pH, como se determina por secuenciación.

20 Con el fin de comparar las secuencias del gen pH de melones agrios y no agrios, se extrajo el ARN de dos líneas parentales de melón: la variedad de melón agrio *C. melo* var. PI414723 y la variedad de melón no agrio *C. melo* var. Dulce (descrito en Harel-Beja et al. 2010, Theor Appl Genet., 121:511-33) y se usó para producir ADNc y clonar el gen pH usando los siguientes cebadores: transportador de melón Directo: 5-ATG GAC ATG GAA AGA TTT CTC T (SEQ ID NO:7); y transportador de melón Inverso: 5'-TTAGAAGAGTATCCTGAAGTAGA (SEQ ID NO: 11). El ADN se secuenció usando el secuenciador ABI (Hylabs, Inc., Rehovot, Israel). Las secuencias de ADN clonadas se analizaron y tradujeron en aminoácidos usando el programa DNAMAN (versión 4.20). Las secuencias de ADN clonadas de las variedades agria y no agria se presentan en las Figuras 1A y 1C, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las variedades agria y no agria se presentan en las Figuras 1B y 1D, respectivamente. La secuencia genómica del gen pH de melón no agrio se identificó sobre la base de la secuenciación de BAC CM_MBaB 69P20 (SEQ ID NO: 14). Esta secuencia no se anotó antes, y solo estaba disponible una secuencia parcial del mismo [Melón ID de Unigene: MU46248; World Wide Web (punto) icugi (punto) org], todavía sin ninguna anotación específica.

30 Identificación de homólogos en tomates y pepinos - El análisis genómico posterior reveló que se encuentran homólogos del gen pH en tomates y pepino y se encuentran en las localizaciones cromosómicas SL2.40ch10: 57831763...57835784 en tomates [mediante Protocolo de Transferencia de Hipertexto://solgenomics (punto) net/] y en el cromosoma No. 4: 12462425.... 12456602 en pepinos [mediante Protocolo de Transferencia de Hipertexto://World Wide Web (punto) icugi (punto) org/].

Ejemplo 2

Identificación de una mutación de duplicación que modifica el pH de los frutos de melón

La secuenciación comparativa del nuevo gen pH de los genotipos ácido y no ácido indicó que la secuencia no ácida contenía una duplicación de 12 pb, que codificaba una duplicación de cuatro aminoácidos en la proteína derivada.

Resultados experimentales

5 Los presentes inventores han comparado la secuencia del genotipo agrio con la de un genotipo cultivado dulce (Dulce) y observaron una duplicación de cuatro aminoácidos en parte del dominio transmembrana hidrófobo no. 3, como sigue.

10 Identificación de una mutación de duplicación presente en los melones no agrios - El alineamiento de secuencias entre la secuencia de aminoácidos codificada por el gen pH de variedades de melón agrio (SEQ ID NO:2) y no agrio (SEQ ID NO:4) reveló que las secuencias son idénticas excepto por la presencia de una duplicación de cuatro aminoácidos "LIVA" (SEQ ID NO:27) en las posiciones de aminoácidos 107-110 de la SEQ ID NO:4, que aparece en la variedad de melón no agrio y que está ausente en la variedad de melón agrio (Figura 1E).

Ejemplo 3

Similitud e identidad del gen pH entre diversas plantas

Análisis bioinformático

15 Comparación de la secuencia de la proteína codificada por el gen pH de melón con homólogos de plantas adicionales - Se realizó un alineamiento de secuencias múltiples en las secuencias derivadas de Tomate TC200226 (SEQ ID NO:5; Figura 2A), Pepino Csa01116 (SEQ ID NO:6; Figura 2B), manzana TC80539 (SEQ ID NO:8, Figura 2D), Álamo EEF05451 (SEQ ID NO:9; Figura 2E), y Arabidopsis NP_195819 (SEQ ID NO: 10, Figura 2F) y las secuencias de proteínas de estas especies se compararon con la de los melones agrios y no agrios usando el programa de alineamiento Clustal 2W. Como se muestra en la Figura 3 y en las Tables 2-3 en la presente memoria más adelante,
20 las secuencias del gen pH de todas las especies de plantas presentan una alta homología con el gen pH del melón agrio. Además, la duplicación LIVA se encontró solo en el gen pH del melón no agrio (Figura 3).

Las secuencias, que se usaron para alineamientos múltiples, se proporcionan en la Tabla 2, en la presente memoria más adelante.

Tabla 2

25 Tabla 2. Tipo de secuencia ajustado explícitamente a Proteína. El formato de las secuencias es Pearson.

Secuencia 1: Melón_Agrio	411 aa SEQ ID NO:2
Secuencia 2: Tomate_TC200226	424 aa SEQ ID NO:5
Secuencia 3: Pepino_Csa01116	453 aa SEQ ID NO:6
Secuencia 4: Álamo_EEF05451	414 aa SEQ ID NO:9
Secuencia 5: manzana TC84138	432 aa SEQ ID NO:28
Secuencia 7: melón	419 aa SEQ ID NO: 4
Secuencia 9: uva TC118456	376 aa SEQ ID NO: 29

Las Tablas 3 y 4 representan el porcentaje (%) de similitud (Tabla 3) y de identidad (Tabla 4) entre las 6 secuencias de aminoácidos completas usando el programa de alineamiento por pares BLOSSUM NEEDLE [Protocolo de Transferencia de Hipertexto://World Wide Web (punto) ebi (punto) ac (punto) uk/Tools/psa/emboss_needle/].

30 Table 3, porcentaje de similitud

Tabla 3: porcentaje de similitud (derivado del programa de alineamiento por pares EMBOSS NEEDLE

	<i>melón agrio</i>	<i>tomate</i>	<i>pepino</i>	<i>álamo</i>	<i>manzana</i>	<i>uva</i>
melón agrio	100	82,3	89,6	86,7	81,6	81
tomate		100	75,3	83,8	80,4	76,9
pepino			100	78,3	77,8	73,7
álamo				100	85,1	81,9
manzana					100	77,5
uva						100

Tabla 4, porcentaje de identidad

Tabla 4: Porcentaje de identidad (derivado del programa de alineamiento por pares EMBOSS NEEDLE).

	<i>melón agrio</i>	<i>tomate</i>	<i>pepino</i>	<i>álamo</i>	<i>manzana</i>	<i>uva</i>
melón agrio	100	69,1	87,9	79	70,8	69,8
tomate		100	62,7	70,7	66,6	62
pepino			100	70,9	66	62,5
álamo				100	77,8	72,9
manzana					100	66
uva						100

5 La identidad y similitud se midieron usando el programa EMBOSS NEEDLE usando los parámetros por defecto: Matriz: BLOSUM62; APERTURA DE HUECO: 10; Extensión de HUECO: 0,5; Formato de salida: par; penalización por HUECO TERMINAL: falso; APERTURA DE HUECO TERMINAL: 10; Extensión DE HUECO TERMINAL: 0,5.

Se indica que el% identidad y el% de similitud entre el pepino y el tomate son 62,7 y 75,3, respectivamente.

Ejemplo 4

Se predice que la duplicación LIVA cambia la conformación de la proteína pH

10 El análisis de modelado de proteínas TMHMM [Protocolo de Transferencia de Hipertexto://World Wide Web (punto) cbs (punto) dtu (punto) dk/services/TMHMM-2.0/], que compara entre la proteína pH de melones agrios y no agrios, reveló que el gen pH de melón agrio codifica una proteína de membrana con 10 dominios transmembrana helicoidales (THD) (Figuras 4A y B), lo que es indicativo de transportadores de membrana. Por el contrario, el modelado de proteínas de la secuencia derivada de melón no agrio (que tiene la duplicación LIVA) revela la presencia solo de 9 THD, con una dirección invertida de la proteína (hacia dentro y hacia fuera) en comparación con la secuencia del melón agrio (Figuras 4C y D), que daría lugar a una proteína defectuosa.

Ejemplo 5

Correlación entre la presencia de la mutación de duplicación "LIVA" y el pH de los frutos en variedades de melón adicionales

20 Resultados experimentales

Determinación del genotipo del gen pH entre variedades de melón agrio y no agrio - Se extrajo el ADN de 52 variedades de C. melon de las hojas de plántulas jóvenes. El genotipado se basó en el análisis de ADN-PCR usando los siguientes cebadores: Cebador directo: 5'-CTCGGCAAGCTATTACT (SEQ ID NO:12); y Cebador inverso: 5'-GTATGGAGGACGAACAAT (SEQ ID NO: 13), que distinguen entre los dos alelos del gen pH que incluyen o no la duplicación de 12 pares de bases (pb) como se muestra en un gel representativo en la Figura 5 y en la Table 5 más adelante que resume los resultados de genotipado para las 20 muestras mostradas en la Figura 5.

Tabla 5, genotipado para la duplicación LIVA en variedades de melón

Tabla 5: resultados de genotipado de las muestras mostradas n la Figura 5. Los genotipos se puntuaron como "1" (banda pequeña, 125 pb) o "2" (banda grande, 137 pb).

	<u>Nombre de la Variedad de Melón</u>	<u>pH del Fruto</u>	<u>Genotipo del gen pH</u>
1	PSR	6,1	2
2	TVT	6,1	2
3	HBJ	6,6	2
4	PI 157080	5,7	2
5	INB	6	2

ES 2 817 780 T3

	Nombre de la Variedad de Melón	pH del Fruto	Genotipo del gen pH
6	PDS	5,9	2
7	ESL	5,9	2
8	PI 157071	6,2	1
9	KRY	7,3	2
10	CHT	6,3	2
11	CHF	6,8	2
12	DUD2	5,9	2
13	DUD3	6,2	2
14	MAK	7,1	2
15	OGE	5,9	2
16	PH406	6	2
17	Carril blanco		
18	Rochet	6,7	2
19	Dulce control		2
20	PI414723 control		1

Clasificación de los frutos como agrios o no agrios sobre la base de los niveles de pH - Se midió el pH del fruto maduro (promedio de 3 frutos) de cada variedad en zumo extraído de la pulpa del fruto maduro y se midió usando un medidor de pH de laboratorio estándar que se calibró usando disoluciones comerciales de pH 4 y pH 7.

- 5 Correlación entre el genotipo y el fenotipo en variedades de melón - Un sondeo de 42 accesiones de *C. melo*, que representan el amplio espectro de las especies, mostró que todos los genotipos de melón no agrio se caracterizan por la mutación idéntica independientemente del origen geográfico o clasificación sistemática. Los genotipos agrios se caracterizan todos por la ausencia de la duplicación, de forma similar independientemente del origen geográfico o clasificación sistemática. La Tabla 6, en la presente memoria más adelante, proporciona los datos de genotipado para 10 42 variedades de melón junto con la correlación con la acidez del fruto (valores de pH).

Tabla 6

Tabla 6: Se proporcionan genotipos de melón y la correlación entre la duplicación genotípica y el pH del fruto. Los genotipos se puntúan como "1" (banda pequeña, 125 pb) o "2" (banda grande, 137 pb).

<i>Subespecie</i>	<i>Grupo de Variedad</i>	<i>Clase comercial</i>	<i>Nombre de la Variedad</i>	<i>Nombre de la Variedad de Melón</i>	<i>pH del fruto</i>	<i>Genotipo del gen pH</i>
melo	Flexuosus	Melón serpiente, Melón decapado	Faqqous Doya	DOYA	4,6	1
agrestis	Conomon	?	Pepino Freeman	FRC 37	4,9	1
melo	Flexuosus	Melón serpiente, Melón decapado	Faqqous	FAQ	4,8	1
agrestis	Momordica	?	PI 414723	PI 414	4,8	1

ES 2 817 780 T3

<i>Subespecie</i>	<i>Grupo de Variedad</i>	<i>Clase comercial</i>	<i>Nombre de la Variedad</i>	<i>Nombre de la Variedad de Melón</i>	<i>pH del fruto</i>	<i>Genotipo del gen pH</i>
agrestis	Conomon	?	Gigante Tokio	TOG	4,3	1
melo	Flexuosus	Melón serpiente, Melón decapado	Armenio Yard Largo	AYL	4,8	1
melo	Inodorus	Casaba (Piel de Sapo)	Piel de Sapo Redon	PSR	6,1	2
melo	Inodorus	Casaba (Tendral negro)	Tendral Verde Tardío	TVT	6,1	2
melo	Reticulatus	Cantalupo de EE. UU.	Hale's Best Jumbo	HBJ	6,6	2
agrestis	Makuwa	?	PI 157080	157080	5,7	2
melo	Chandalak	?	Indian Best	INB	6	2
melo	Inodorus	Casaba (Piel de Sapo)	Piel de Sapo	PDS	5,9	2
agrestis	Makuwa	?	Línea de Plata Temprana	ESL	5,9	2
melo	Reticulatus	Galia	Krymka	KRY	7,3	2
melo	Cantalupensis	Charentais	Charentais	CHT	6,3	2
melo	Cantalupensis	Charentais	Charentais F2	CHF	6,8	2
melo	Dudaim	Dudaim	Dudaim2	DUD2	5,9	2
melo	Dudaim	Dudaim	Dudaim3	DUD3	6,2	2
melo	Reticulatus	Galia	Magiar Kines	MAK	7,1	2
melo	Cantalupensis	Ha'Ogen	Ogen	OGE	5,9	2
melo	Cantalupensis	Ha'Ogen	PH406	PH406	6	2
melo	Inodorus	Casaba (Rochet)	Rochet	Rochet	6,7	2
melo	Cantalupensis	Charentais	Vedrantais	VEP	7	2
melo	Inodorus	Casaba	Belleza Dorada	GOB	5,6	2
melo	Cantalupensis	Charentais	Doublon	DOU	7,2	2
melo	Inodorus	Casaba (kirkagac)	Kirkagac	33410	5,8	2
melo	Inodorus	Casaba (Amarillo canario)	Gold King	GOK	5,8	2
melo	Cantalupensis	Ha'Ogen	Bellegarde	BEL	5,9	2

Subespecie	Grupo de Variedad	Clase comercial	Nombre de la Variedad	Nombre de la Variedad de Melón	pH del fruto	Genotipo del gen pH
melo	Inodorus	Casaba (Amarillo canario)	Amarillo Oro	AROC	6	2
melo	Reticulatus	Cantalupo americano	PMR45	PMR45	6,7	2
melo	Inodorus	Casaba (Amarillo canario)	Amarillo Pipa Blanca	AMP	5,5	2
melo	Reticulatus	Cantalupo americano	Dulce	Dulce	5,9	2
melo	Reticulatus	Ananas	Ein Dor	ED	6	2
melo	Cantalupensis	Ha'Ogen	Noy Yizre'el	NY	5,6	2
melo	Reticulatus	Ananas	Ananas Yoqne'am	AY	6,3	2
melo	Inodorus	Casaba (kirkagac)	kirkagac	201581	5,4	2
melo	Reticulatus	Cantalupo americano	Sorpresa de Bender	BES	5,8	2
agrestis	Makuwa	?	Dulce Sakata	SAS	6,2	2
agrestis	Conomon	Melón decapado	Piel Negra	BSK	5,7	2
agrestis	Chinensis	?	PI 161375	161375	5,8	2
melo	Reticulatus	Cantalupo americano	Fordhook Gem	FOG	5,8	2
melo	Reticulatus	Cantalupo de EE. UU.	Top Mark	TPM	6,9	2

Texto en negrita - variedades de melón que tienen un pH en el fruto por debajo de 5 (acidez; que tienen genotipo "1");
 Texto normal: variedades de melón que tienen un pH en el fruto por encima de 5 (menos ácido o neutro; que tienen genotipo "2"). Las interrogaciones indican tipo comercial no caracterizado.

- 5 Estos resultados demuestran que la presencia o ausencia de la mutación de duplicación LIVA puede usarse para predecir los niveles de pH del fruto del melón, incluso cuando se ensaya material de hojas jóvenes. Además, los resultados muestran que la mutación de duplicación LIVA puede usarse para la reproducción y cultivo de variedades de melón dulce y agrio. Además, como se expresa un gen parálogo en la mayor parte de los frutos es probable que contribuya a la acidez del fruto. Por lo tanto, la modulación de este gen en otros frutos por medios biotecnológicos
- 10 afectará también a la acidez de frutos adicionales.

Ejemplo 6

Relaciones filogenéticas entre proteínas homólogas al gen pH

- 15 Relaciones filogenéticas entre proteínas homólogas al gen pH - La comparación de secuencia con las bases de datos sitúa al transportador en una familia desconocida descrita como familia presuntamente de transportadores de auxina-protón [proteínas predichas o hipotéticas (XP_002326270; CBI31149 o XP_002267734) o en proteínas que tienen una actividad presunta simporte auxina:protón (XP_002531815) o componente vehicular del eflujo de auxina de la proteína de transporte de auxina (XP_002323690)]. Las secuencias de aminoácidos de proteínas con similitud al gen *CmpH* (pH de melón) se identificaron buscando en bases de datos públicas secuencias génicas usando el programa BLAST. Las bases de datos públicas usadas fueron NCBI, ICuGI (una base de datos de genes expresado en cucurbitáceas) y
- 20 TIGR (secuencias expresadas de numerosas plantas). Además, la anotación de genes para las secuencias con

similitud con el gen *CmpH* se describe como "transportador del eflujo de auxina" y miembros de la familia de transportadores de membrana [pFAM 03547, (Protocolo de Transferencia de Hipertexto://pfam (punto) sanger (punto) ac (punto) uk/family/PF03547 (punto) 12), y también se incluye la Clase de Transportador 2.A.69 (Protocolo de Transferencia de Hipertexto://World Wide Web (punto) tadb (punto) org/search/result (punto) php?tc=2.A.69) incluyendo los miembros de las familias PIN LAX de proteínas]. Los alineamientos y árboles filogenéticos se determinaron usando un programa filogenético basado en una página de internet pública usando la opción de un clic (World Wide Web (punto) phylogeny (punto) fr). Para la determinación de las puntuaciones de similitud Clustal el programa ClustalW [Protocolo de Transferencia de Hipertexto://World Wide Web (punto) ebi (punto) ac (punto) uk/Tools/msa/clustalw2/] % de similitud y % de identidad de secuencias de aminoácidos se llevó a cabo un alineamiento por pares usando el programa NEEDLE en el Protocolo de Transferencia de Hipertexto://World Wide Web (punto) ebi (punto) ac (punto) uk/Tools/psa/emboss_needle/ y se determinaron los valores.

Como se muestra en la Figura 6, un clado de secuencias altamente similares relacionado con el gen *pH* de melón que se separa de un clado relacionado de cerca de proteínas de función indeterminada (que están parcialmente anotados como "transportadores de membrana", "transportadores de auxina" o como proteínas hipotéticas o presuntas) y están relacionados más distantemente con las familias de transportadores de auxina caracterizados de PIN y AUX. El % de similitud entre los miembros del clado relacionado de cerca de homólogos de pH es mayor del 70%. Estos resultados muestran de manera concluyente que el gen pH es distinto de los transportadores de auxina funcionales caracterizados de las familias PIN y AUX y solo puede describirse como transportadores de membrana de actividad no caracterizada que determinan el pH o la concentración de H⁺, siendo de esta manera presumiblemente una familia de transportadores de membrana de H⁺.

Algunos ejemplos de miembros de este clado relacionado de cerca que se expresan en plantas, como se indica en las diversas bases de datos de genes expresados, se presentan en la Tabla 7, más adelante, indicando la planta y los tejidos en los que se ha reportado la expresión. Los datos muestran que los homólogos del gen pH del melón se expresan en numerosas plantas, incluyendo el tejido de su fruto y también tejidos distintos de fruto tales como hojas, flores, raíces y tallos.

Tabla 7

Tabla 7: la expresión de homólogos del gen pH en los tejidos de las plantas respectivas, como se indica en las bases de datos públicas de expresión de genes listadas.

		Número TC	expresión	enlace
1	<i>Citrus sinensis</i>	TC5400	Fruto naranja dulce, estadio de desarrollo (3 de 6) floema de Citrus sinensis	Protocolo de Transferencia de Hipertexto://compbio(punto)dfci(punto)harvard(punto)edu/cgi-bin/tgi/tc_report.pl?tc=TC5400&species=orange
2	<i>Vitis vinifera</i>	TC152595	Estadio de desarrollo 8 (DS8) RDA Bayas 14mm con GA3 (VvS7) Baya de Cabernet Sauvignon Estadio I Estadio de desarrollo ocho (DS8) Envero Bayas de uva Estadio de Flor 12 (FLOu0012) CabSau Estadio de Flor 12 (FLOu0012) Cab Sauv pericarpo normalizado (WIN09) Bayas de Uva Maduras	Protocolo de Transferencia de Hipertexto://compbio(punto)dfci(punto)harvard(punto)edu/cgi-bin/tgi/tc_report.pl?tc=TC152595&species=grape
3	<i>Zea mays</i>	TC466250	primordio de la panoja	Protocolo de Transferencia de Hipertexto://compbio(punto)dfci(punto)harvard(punto)edu/cgi-bin/tgi/tc_report(punto)pl?tc=TC466250&species=maize
4	<i>Hordeum vulgare</i>	TC240224	Hoja verde de la plántula de Hordeum vulgare Hojas de estadio vegetativo Brotes en germinación	Protocolo de Transferencia de Hipertexto://compbio(punto)dfci(punto)harvard(punto)edu/cgi-bin/tgi/tc_report(punto)pl?tc=TC240224&species=barley

		Número TC	expresión	enlace
5	<i>Orzya sativa</i>	TC528572		Protocolo de Transferencia de Hipertexto://compbio(punto)dfci(punto)harvard(punto)edu/cgi-bin/tgi/tc_report(punto)pl?tc=TC528572&species=rice
6	<i>Petunia hybrida</i>	TC12450	biblioteca de ADNc normalizada de raíces Biblioteca de ADNc floral post-polinización	Protocolo de Transferencia de Hipertexto://compbio(punto)dfci(punto)harvard(punto)edu/cgi-bin/tgi/tc_report(punto)pl?tc=TC12450&species=petunia
7	<i>Solanum lycopersicum</i>	TC225290	fruto verde en desarrollo/inmaduro tricomas de raíz, radícula etiolada Fruto pintón fruto verde en desarrollo/inmaduro ovario fruto madurando	Protocolo de Transferencia de Hipertexto://compbio(punto)dfci(punto)harvard(punto)edu/cgi-bin/tgi/tc_report(punto)pl?tc=TC225290&species=tomato
8	<i>Solanum tuberosum</i>	TC208951	ojos brotando raíces y hojas Floral Mixto	Protocolo de Transferencia de Hipertexto://compbio(punto)dfci(punto)harvard(punto)edu/cgi-bin/tgi/tc_report(punto)pl?tc=TC208951&species=potato
9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC370336	plántulas de Arabidopsis de 8 días, tejidos aéreos	Protocolo de Transferencia de Hipertexto://compbio(punto)dfci(punto)harvard(punto)edu/cgi-bin/tgi/tc_report(punto)pl?tc=TC370336&species=arab
10	<i>Malus domestica</i> x	TC84138	puntas de raíces xilema hoja parcialmente senescente	Protocolo de Transferencia de Hipertexto://compbio(punto)dfci(punto)harvard(punto)edu/cgi-bin/tgi/tc_report(punto)pl?tc=TC84138&species=apple
11	<i>Medicago truncatula</i>	TC175110	tricoma glandular	Protocolo de Transferencia de Hipertexto://compbio(punto)dfci(punto)harvard(punto)edu/cgi-bin/tgi/tc_report(punto)pl?tc=TC175110&species=medicago
12	<i>Cucumis sativus</i>	CU106263	fruto, flor	Protocolo de Transferencia de Hipertexto://World Wide Web (punto)icugi (punto) org/cgi-bin/ICuGI/EST/search (punto)cgi?organism=cucumber&searchtype=unigene&unigene=CU106263
13	<i>Cucumis melo, agrio</i>	MU46248	fruto, cotiledones, raíces	Protocolo de Transferencia de Hipertexto://World Wide Web (punto)icugi (punto) org/cgi-bin/ICuGI/EST/search (punto)cgi?organism=melon&searchtype=unigene&unigene=MU46248
14	<i>Cucumis melo, no agrio</i>	MU46248	fruto, cotiledones, raíces	Protocolo de Transferencia de Hipertexto://World Wide Web (punto)icugi (punto) org/cgi-bin/ICuGI/EST/search (punto)cgi?organism=melon&searchtype=unigene&unigene=MU46248

		Número TC	expresión	enlace
15	<i>Populus sp.</i>	TC154035	mezcla de hoja, capullo, tallo, raíz	Protocolo de Transferencia de Hipertexto://compbio(punto)dfci(punto)harvard(punto)edu/cgi-bin/tgi/tc_report(punto)pl?tc=TC154035&species=poplar

Estos datos demuestran que el gen pH no está limitado a plantas de melón, y que el control de la acidez en otras plantas también se ve afectado probablemente por homólogos del gen pH.

Ejemplo 7

5 El silenciamiento del gen pH afecta la acidez del fruto

Con el fin de ensayar el papel del gen pH en la determinación de la acidez del fruto, se desarrollaron plantas transgénicas de pepino y de tomate que tenían una expresión reducida del gen pH respectivo usando la tecnología de ARNi. La tecnología de ARNi es una tecnología bien establecida de silenciamiento de la expresión génica. Brevemente, el ARNi es un proceso de silenciamiento génico dependiente de ARN que está controlado por el complejo de silenciamiento inducido por ARNi (RISC) y se inicia por moléculas de ARN bicatenarias cortas en el citoplasma de una célula. La ruta de interferencia del ARN puede explotarse para causar una disminución drástica en la expresión de un gen diana.

Resultados experimentales

15 Construcción de un polinucleótido de silenciamiento ARNi - La secuencia del gen homólogo de pepino (SEQ ID NO:30) se determinó a partir de la base de datos ICuGI y mostró un 87,4% de identidad con el gen de melón. La secuencia del gen homólogo de tomate (SEQ ID NO:31) se derivó de la base de datos sgn [World Wide Web (punto) sgn] y mostró un 70,6% de identidad con el gen de melón.

20 Los genes transportadores LIVA de melón y tomate (genes pH) se silenciaron mediante ARNi usando el vector Hannibal. Se produjeron amplicones de 524 pb de largo (melón) y 548 pb de largo (tomate) mediante PCR en ADNc añadiendo dos sitios de restricción en cada cebador. Las PCR usando los cebadores directo e inverso de melón (SEQ ID NO: 15 y 16) y tomates (SEQ ID NO: 17 y 18) generaron amplicones (polinucleótidos de ARNi) que incluyeron las secuencias de ácido nucleico mostradas en la SEQ ID NO: 19 (para ARNi de melón) y SEQ ID NO:20 (para ARNi de tomates).

25 El amplicón se cortó mediante enzimas de restricción y se ligó en la orientación directa e inversa interrumpido por el intrón del vector en una serie de dos ligaciones. La primera reacción de restricción se facilitó por *XbaI* y *ClaI* y la segunda por *XhoI* y *KpnI*. La construcción resultante (incluyendo 35-S y terminador OCS) se cortó mediante las enzimas de restricción *SacI* y *SpeI* y se ligó por consiguiente en pGreen. Se usó la transformación mediada por *Agrobacterium* para insertar las construcciones de melón y tomate en Pepino y Tomate, respectivamente.

30 El efecto del silenciamiento de la expresión del gen pH en el fruto de pepino y tomate sobre la acidez del fruto - Se desarrollaron tomates y melones transgénicos con ARNi. La presencia del transgén ARNi se ensayó usando una reacción de PCR de un cebador del intrón del vector pHannibal (SEQ ID NO:22, intrón Dir Hannibal), y el cebador directo Tom Hannib F (SEQ ID NO:21). Se crecieron las plantas transgénicas en un invernadero en condiciones estándar. Se recolectó el fruto maduro aproximadamente 50 días después de la antesis, cuando el fruto de tomate estaba rojo maduro y cuando el fruto de pepino estaba amarillo maduro. Se midió el pH en zumo extraído del fruto maduro fresco usando un medidor de pH de mesa de laboratorio (Radiometer, Copenhague).

40 Como se muestra en la Tabla 8, en la presente memoria más adelante, mientras en las plantas control (que carecen del ARNsi transgénico) el pH de los frutos maduros era 3,9 y 4,2 para pepino y tomate, respectivamente, el pH del fruto maduro de los transgénicos de ARNsi se incrementó (es decir, menos acidez) y alcanzó un nivel promedio de 4,8 y 5,0 para pepino y tomate, respectivamente.

Tabla 8

Tabla 8. Efecto del silenciamiento de la expresión del gen pH en fruto de pepino y tomate.

Especie	pH	
	Control, no transgénico	Transgénicos ARNsi
Fruto de pepino maduro (var. llan)	3,9 ± 0,2 (n =6)	4,8 ± 0,2 (n =10)
Fruto de tomate maduro (var. MP-1)	4,2 ± 0,08 (n =8)	5,0 ± 0,2 (n =7)

N representa el número de frutos maduros analizados. Los datos para los transgénicos de ARNsi de pepino son de 3 líneas transgénicas independientes. Los datos para los transgénicos de ARNsi de tomate son de 7 líneas transgénicas independientes. Se analizaron de 1 a 4 frutos por línea transformada independiente.

Ejemplo 8

5 Efecto de la sobreexpresión del gen pH de tomate y de melón agrio en el fruto del tomate

Métodos experimentales

Los transportadores LIVA de melón agrio y tomate (genes PH) se clonaron (cada uno) en el plásmido binario pGA usando una reacción de PCR que añadió los sitios de restricción *Xba*I y *Bgl*II a los siguientes cebadores directo e inverso (respectivamente):

10 Mel-pGA Dir: TCT AGA ATG GAC ATG GAA AGA TTT CTC T (SEQ ID NO:23); y Mel-PGA Inv: AGA TCT GGG AAT TCG ATT TTA GAA GAG T (SEQ ID NO:24); Tom-pGA Dir: TCT AGA ATG GATAGG GTG TCG AGG AT (SEQ ID NO:25); y Tom-PGA Inv: AGA TCT GCG GGA ATT CGA TTT TAA AAG A (SEQ ID NO:26).

15 Los amplicones de melón agrio y tomate (incluyendo los sitios de restricción *Xba*I y *Bgl*II) tuvieron una longitud de 1.300 pb y 1.278 pb, respectivamente. Se usó la transformación mediada por *Agrobacterium* para insertar el gen de tomate o melón en la línea de tomate MP.

Resultados experimentales

20 Como se muestra en la Tabla 9, en la presente memoria más adelante, la sobreexpresión del gen pH de tomate o el gen de melón agrio en plantas de tomate dio lugar a una acidez incrementada (niveles menores de pH) en comparación con las plantas de tomate de tipo salvaje, no transgénicas. Estos resultados muestran de forma concluyente que el gen pH aislado e identificado en la presente memoria controla la acidez de las plantas, mediante la reducción de los niveles de pH (acidez incrementada) en la planta (p. ej., en los frutos).

Tabla 9: Sobreexpresión en tomates

25 Tabla 9: Se presentan los niveles de pH de frutos de líneas de tomate control (tomates de tipo salvaje, no transgénicos), y de líneas de tomate que sobreexpresan bien el gen pH de tomate o el gen pH de melón agrio. Los datos para los tomates de la línea MP control son el promedio de los valores de pH de 8 frutos de 8 plantas individuales. Los valores de pH para las 5 líneas de tomate transgénicas muestran una única medición de pH de una mezcla de zumo mezclado de 2-5 frutos maduros.

Niveles de pH en plantas control o transgénicas que sobreexpresan el gen pH	
Tomate Control, no transgénica	4,2 ± 0,08
Tomate línea 51 (gen de tomate)	4,0
Tomate línea 32 (gen de tomate)	3,97
Tomate línea 34 (gen de tomate)	4,07
Tomate línea 45 (gen de melón agrio)	3,9
Tomate línea 45 (gen de melón agrio)	4,0

Ejemplo 9

30 El silenciamiento del gen pH afecta el color de los pétalos en la petunia

35 Con el fin de ensayar el papel del gen pH en la determinación del color de los pétalos, la expresión del gen pH respectivo se reduce en plantas de petunia usando la tecnología de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS), como se describe en (Spitzer et al. 2007, Plant Physiology 145:1241-1250, Reverse genetics of floral scent: application of tobacco rattle virus- based gene silencing in Petunia.). La tecnología VIGs es una tecnología bien establecida de silenciamiento transitorio de la expresión génica.

Construcción de un polinucleótido de silenciamiento VIGs - Se determinó una secuencia parcial del gen homólogo de petunia (SEQ ID NO:36) a partir de la base de datos TIGR y se encontró que presentaba un 77,6% de identidad con la secuencia de ADN del gen pH de melón.

40 Se extrajo el ARN total de petunia de una variedad comercial de petunia, usando peqGOLD TriFast TM (eqlab) y se trató con ADNasa sin ARNasa (Fermentas). El ADNc de primera cadena se sintetizó usando 1 µg (microgramo) de

ARN total, cebador oligo d(T), y Transcriptasa Inversa AMV (Native) (eurX). Se realizó PCR durante 40 ciclos (94 °C durante 15 minutos y después ciclado a 94 °C durante 10 segundos, 60 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante 20 segundos) usando Taq polimerasa y los siguientes cebadores de PCR: 5'-CTGGGcNAGCATAGTTATGT-3' (SEQ ID NO:37) y 5'-TTGAGATAGAGGGTG ATCCAT-3' (SEQ ID NO:38) produciendo un amplicón de fragmento de petunia de 223 pb (SEQ ID NO:39). El amplicón de petunia se usó como un molde para una amplificación por PCR adicional con los siguientes cebadores de pTRV2 de destino de VIGs, que incluyen la secuencia específica de VIGs (secuencia subrayada) como se describe en Liu 2002 [Liu., Schiff, M, y Dinesh- Kumar, S.P. (2002) Virus-induced gene silencing in tomato. Plant J. 31, 777-786]:

VIGs de petunia Dir: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTGGGCTTAGCATAGTTATGT-3 ' (SEQ ID NO:40); y VIGs de petunia Inv: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTGGAGATAGAGGGTGATCCAT-3' (SEQ ID NO:41).

El producto de PCR resultante con secuencias terminales attB1 y attB2 se precipita y se incuba con el vector pDONR221 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) que contiene los sitios de recombinación attP1 y attP2 y la reacción de la enzima BP CLONASA (Invitrogen). A esta construcción, se añade el vector de destino pTRV2 que contiene los sitios de recombinación attR1 y attR2 y la enzima LR CLONASA. Esta mezcla se transforma en células componentes químicos DH10B y se selecciona en placas LB que contienen kanamicina. Los clones se verifican por digestión con enzimas de restricción y por secuenciación de las uniones de vector-inserto.

Se construye el vector Gateway, y se transforma en células de Agrobacterium como se describe en Liu et al., 2002 (Supra). Las plántulas de petunia (*Petunia hybrida*) se crecen como se describe por Spitzer et al., 2007 [Ben Spitzer, et al. Reverse Genetics of Floral Scent: Application of Tobacco Rattle Virus-Based Gene Silencing in Petunia. Plant Physiology 145:1241-1250, 2007], y se lleva a cabo la Agro-infiltración en flores de 24 horas como se describe por Long et al. [Long, M.C., et al., 2009. Involvement of snapdragon benzaldehyde dehydrogenase in benzoic acid biosynthesis. Plant J. 59: 256-265].

El efecto del silenciamiento de la expresión del gen pH en flores de petunia - Las plantas de petunia se crecen y se observa el color de los pétalos de las flores y se compara con las plantas control, no infectadas. Sin pretender la vinculación a ninguna teoría, se espera que el color de los pétalos de las flores de las plantas infectadas con VIGs será de una tonalidad más azul en comparación con las plantas control, no infectadas. También se mostró un resultado similar en Verweij et al. (2008) [Verweij W, et al. 2008. An H⁺ P-ATPase on the tonoplast determines vacuolar pH and flower colour. Nat Cell Bio. 10: 1456-1462].

30 Análisis y discusión

La mutación de duplicación LIVA que causa un transportador de protones presumiblemente disfuncional identificado en la presente memoria puede haber dado lugar a la evolución en domesticación de los melones dulces. Sin pretender la vinculación a ninguna teoría particular, se asume que el cambio en la configuración puede dar lugar a un transportador disfuncional y por lo tanto los protones que causan acidez no pueden transportarse eficazmente, dando lugar a un fruto no agrio. Los frutos y vegetales tales como tomate, manzana, uva y pepino (frutos ácidos) tiene una acidez mayor que los melones dulces y un gen altamente homólogo que codifica un transportador de membrana similar. Las secuencias génicas de estos frutos ácidos codifican una proteína que carece de la duplicación/mutación que caracteriza al melón dulce y, en su lugar, tienen una secuencia del tercer dominio transmembrana similar al melón agrio.

La mutación, o una mutación similar a la misma, que modifica la función del transportador de membrana puede usarse para el desarrollo de frutos con una acidez modificada. En los melones, la secuencia del gen puede usarse para desarrollar marcadores moleculares que pueden usarse en la reproducción y cultivo de melón dulce con frutos con acidez modificada.

A la vista de la función de los genes ortólogos en otros frutos, la modificación de la expresión o la función de estos ortólogos en esos frutos también modificará la acidez de los frutos. Por lo tanto, la modulación de este gen en otros frutos por medios biotecnológicos también afectará a la acidez de frutos adicionales.

Listado de secuencias

<110> El Estado de Israel, Ministerio de Agricultura y Rural
Desarrollo, Organización de Investigación Agrícola, (A.R.O.),
50 Centro Volcani
schaffer, Arthur A.
Cohen, Shahar
Hamburguesa, Yosef
Katzir, Nurit

55 <120> POLINUCLEÓTIDOS AISLADOS Y MÉTODOS Y PLANTAS QUE UTILIZAN LOS MISMOS PARA REGULAR LA ACIDEZ DE LAS PLANTAS

<130> 51528

<150> US 61/363,291

5 <151> 12-07-2010

<160> 42

<170> PatentIn versión 3.5

10

<210> 1

<211> 1242

<212> ADN

<213> Cucumis melo

15

<400> 1

```

atggacatgg aaagatttct ctcagccatc gtctcgggaag ttcaagcggg agggaactct      60
ctgcttgca ctattaagat tgctgtgta cccatagcca aagttttcac tatgtgcttt      120
ctgggttttc ttatggcatc taaatatgtc aacatcttgc ctgcaagtgg aaggaagctt      180
ttgaatgggt tggcttttc gcttttgctt ccatgtttaa tattctctca gctcgggcaa      240
gctattactc tcgagaaaat gcttaaatgg tggtttattc ctgcaaactg tgttctggct      300
tcgatatcag gttccctaatt tggattaatt gttgcattaa ttgttcgtcc tccatacccc      360
ttcttcaagt tcacaattgt acaaattgga attgggaaca ttggaaatgt gcctctcggt      420
ctcattgcag ctctatgtag agatgatatg aatccttttg gtgatgaaga gaaatgtagc      480
actgatggga ttgcttataat ttcatatggc cagtgggttg gtgcaattat cctgtacacc      540
tatgtttatg cgatgctggc acctccacct gagggtagat ttgacatcaa agatcaaaaat      600
attccagtta agaactctgct aaaggataat acgcctgcac atgttccctt gctcattcag      660
gaggtagctt caaaatatcc ggatgctcct aagaaggaag agactaaggg cttccttatg      720
tattggtttg acaaatgaa gctcaagcaa atttttcagc ctctatcat tgcctcggtc      780
ctagctatgt tattgggtgc aactccatcc ttaaggcgat tgatctttac tcctgatgct      840
ccattgtttt tcttactgta tagctgcata atgctcgggg aggctatgat tccatgtatc      900
ctggtggcat tgggaggaaa cctcgttgaa ggtcctggaa gttcaaaact cgggctacgg      960
actaccgctg ctgttatttt tgcaagggtg gttttggttc ctctgcagg ggttggcata      1020
gtcatgtag ccgacaagct tggcttcctt cctccagatg ataaaatggt ccgattcgtt      1080
cttctctctc agcattcgat gccaacatct gtctctcoga gtgctgtggc tactttgagg      1140
ggttgggta gagaatctgc tgetattctt ttctgggttc atatatttgc cgtcatctca      1200
atggcagggt ggttcacct ctacttcagg atactcttct aa                          1242

```

20

<210> 2

<211> 411

<212> PRT

<213> Cucumis melo

<400> 2

ES 2 817 780 T3

Met Glu Arg Phe Leu Ser Ala Ile Val Ser Glu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Asn Ser Leu Leu Val Thr Ile Lys Ile Ala Val Leu Pro Ile Ala Lys
 20 25 30

Val Phe Thr Met Cys Phe Leu Gly Phe Leu Met Ala Ser Lys Tyr Val
 35 40 45

Asn Ile Leu Pro Ala Ser Gly Arg Lys Leu Leu Asn Gly Leu Val Phe
 50 55 60

Ser Leu Leu Leu Pro Cys Leu Ile Phe Ser Gln Leu Gly Gln Ala Ile
 65 70 75 80

Thr Leu Glu Lys Met Leu Lys Trp Trp Phe Ile Pro Ala Asn Val Val
 85 90 95

Leu Ala Ser Ile Ser Gly Ser Leu Ile Gly Leu Ile Val Ala Leu Ile
 100 105 110

Val Arg Pro Pro Tyr Pro Phe Phe Lys Phe Thr Ile Val Gln Ile Gly
 115 120 125

Ile Gly Asn Ile Gly Asn Val Pro Leu Val Leu Ile Ala Ala Leu Cys
 130 135 140

Arg Asp Asp Met Asn Pro Phe Gly Asp Glu Glu Lys Cys Ser Thr Asp
 145 150 155 160

Gly Ile Ala Tyr Ile Ser Tyr Gly Gln Trp Val Gly Ala Ile Ile Leu
 165 170 175

Tyr Thr Tyr Val Tyr Ala Met Leu Ala Pro Pro Pro Glu Gly Thr Phe
 180 185 190

Asp Ile Lys Asp Gln Asn Ile Pro Val Lys Asn Leu Leu Lys Asp Asn
 195 200 205

Thr Pro Ala His Val Pro Leu Leu Ile Gln Glu Val Ala Ser Lys Tyr
 210 215 220

Pro Asp Ala Pro Lys Lys Glu Glu Thr Lys Gly Phe Leu Met Tyr Trp
 225 230 235 240

Phe Asp Lys Leu Lys Leu Lys Gln Ile Phe Gln Pro Pro Ile Ile Ala
 245 250 255

Ser Val Leu Ala Met Leu Leu Gly Ala Thr Pro Phe Leu Arg Arg Leu
 260 265 270

Ile Phe Thr Pro Asp Ala Pro Leu Phe Phe Phe Thr Asp Ser Cys Ile
 275 280 285

ES 2 817 780 T3

Met Leu Gly Glu Ala Met Ile Pro Cys Ile Leu Leu Ala Leu Gly Gly
 290 295 300

Asn Leu Val Glu Gly Pro Gly Ser Ser Lys Leu Gly Leu Arg Thr Thr
 305 310 315 320

Ala Ala Val Ile Phe Ala Arg Leu Val Leu Val Pro Pro Ala Gly Val
 325 330 335

Gly Ile Val Met Leu Ala Asp Lys Leu Gly Phe Leu Pro Pro Asp Asp
 340 345 350

Lys Met Phe Arg Phe Val Leu Leu Leu Gln His Ser Met Pro Thr Ser
 355 360 365

Val Leu Ser Ser Ala Val Ala Thr Leu Arg Gly Cys Gly Arg Glu Ser
 370 375 380

Ala Ala Ile Leu Phe Trp Val His Ile Phe Ala Val Ile Ser Met Ala
 385 390 395 400

Gly Trp Phe Ile Leu Tyr Phe Arg Ile Leu Phe
 405 410

<210> 3
 <211> 1254
 <212> ADN
 <213> Cucumis melo

5

<400> 3
 atggacatgg aaagatttct ctcagccatc gtctcgggaag ttcaagcggg agggaactct 60
 ctgcttgctca ctattaagat tgctgtgtta cccatagcca aagtittcac tatgtgcttt 120
 ctgggttttc ttaggcgcatc taaatatgct aacatcttgc ctgcaagtgg aaggaagctt 180
 ttgaatgggt tggcttttc gcttttgctt ccatgtttaa tattctctca gctcgggcaa 240
 gctattactc tcgagaaaaa gcttaaatgg tggtttattc ctgcaaacgt tgttctggct 300
 tcgatatcag gttccctaatt tggattaatt gttgcattaa ttgttgcat aattgttcgt 360
 cctccatacc ccttcttcaa gttcacaatt gtacaaattg gaattgggaa cattggaaat 420
 gtgcctctcg ttctcattgc agctctatgt agagatgata tgaatccttt tggatgatgaa 480
 gagaaaatgta gcaactgatgg gattgcttat atttcatatg gccagtgggt tggtgcaatt 540
 atcctgtaca cctatgttta tgcgatgctg gcacctccac ctgaggggtac atttgacatc 600
 aaagatcaaaa atattccagt taagaatctg ctaaaggata atacgcctgc acatgttccc 660
 ttgctcattc aggaggtagc ttcaaaatat ccggatgctc ctaagaagga agagactaag 720
 ggcttcotta tgtattggtt tgacaaaatt aagctcaagc aaatthttca gectcctatc 780
 attgcttcg tctagctat gttattgggt gcaactccat tcttaaggcg attgatcttt 840
 actcctgatg ctccattgtt tttcttcaact gatagctgca taatgctcgg ggaggctatg 900
 attccatgta tctgtttggc attgggagga aacctcgttg aaggtcctgg aagtcaaaa 960
 ctcgggctac ggactaccgc tgctgttatt tttgcaaggt tggttttggt tctcctgca 1020
 ggggttgga tagtcatggt agccgacaag cttggcttcc tcccaccaga tgataaaatg 1080
 ttccgattog ttctttctc tcagcattcg atgccaacat ctgtcctctc gagtgotgtg 1140
 gctactttga ggggttggtg tagagaatct gctgctattc tttctgggt tcatatattt 1200
 gccgtcatct caatggcagg gtggttcac cctacttca ggatactctt ctaa 1254

10

<210> 4
 <211> 415
 <212> PRT
 <213> Cucumis melo

15

ES 2 817 780 T3

<400> 4

Met Glu Arg Phe Leu Ser Ala Ile Val Ser Glu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Asn Ser Leu Leu Val Thr Ile Lys Ile Ala Val Leu Pro Ile Ala Lys
 20 25 30

Val Phe Thr Met Cys Phe Leu Gly Phe Leu Met Ala Ser Lys Tyr Val
 35 40 45

Asn Ile Leu Pro Ala Ser Gly Arg Lys Leu Leu Asn Gly Leu Val Phe
 50 55 60

Ser Leu Leu Leu Pro Cys Leu Ile Phe Ser Gln Leu Gly Gln Ala Ile
 65 70 75 80

Thr Leu Glu Lys Met Leu Lys Trp Trp Phe Ile Pro Ala Asn Val Val
 85 90 95

Leu Ala Ser Ile Ser Gly Ser Leu Ile Gly Leu Ile Val Ala Leu Ile
 100 105 110

Val Ala Leu Ile Val Arg Pro Pro Tyr Pro Phe Phe Lys Phe Thr Ile
 115 120 125

Val Gln Ile Gly Ile Gly Asn Ile Gly Asn Val Pro Leu Val Leu Ile
 130 135 140

Ala Ala Leu Cys Arg Asp Asp Met Asn Pro Phe Gly Asp Glu Glu Lys
 145 150 155 160

Cys Ser Thr Asp Gly Ile Ala Tyr Ile Ser Tyr Gly Gln Trp Val Gly
 165 170 175

Ala Ile Ile Leu Tyr Thr Tyr Val Tyr Ala Met Leu Ala Pro Pro Pro
 180 185 190

Glu Gly Thr Phe Asp Ile Lys Asp Gln Asn Ile Pro Val Lys Asn Leu
 195 200 205

Leu Lys Asp Asn Thr Pro Ala His Val Pro Leu Leu Ile Gln Glu Val
 210 215 220

Ala Ser Lys Tyr Pro Asp Ala Pro Lys Lys Glu Glu Thr Lys Gly Phe
 225 230 235 240

ES 2 817 780 T3

Leu Met Tyr Trp Phe Asp Lys Leu Lys Leu Lys Gln Ile Phe Gln Pro
245 250 255

Pro Ile Ile Ala Ser Val Leu Ala Met Leu Leu Gly Ala Thr Pro Phe
260 265 270

Leu Arg Arg Leu Ile Phe Thr Pro Asp Ala Pro Leu Phe Phe Thr
275 280 285

Asp Ser Cys Ile Met Leu Gly Glu Ala Met Ile Pro Cys Ile Leu Leu
290 295 300

Ala Leu Gly Gly Asn Leu Val Glu Gly Pro Gly Ser Ser Lys Leu Gly
305 310 315 320

Leu Arg Thr Thr Ala Ala Val Ile Phe Ala Arg Leu Val Leu Val Pro
325 330 335

Pro Ala Gly Val Gly Ile Val Met Leu Ala Asp Lys Leu Gly Phe Leu
340 345 350

Pro Pro Asp Asp Lys Met Phe Arg Phe Val Leu Leu Leu Gln His Ser
355 360 365

Met Pro Thr Ser Val Leu Ser Ser Ala Val Ala Thr Leu Arg Gly Cys
370 375 380

Gly Arg Glu Ser Ala Ala Ile Leu Phe Trp Val His Ile Phe Ala Val
385 390 395 400

Ile Ser Met Ala Gly Trp Phe Ile Leu Tyr Phe Arg Ile Leu Phe
405 410 415

<210> 5

<211> 424

5

<212> PRT

<213> Lycopersicon esculentum

<400> 5

Met Asp Arg Val Ser Arg Ile Leu Phe Ser Val Leu Thr Glu Pro Gln
1 5 10 15

Arg Gly Gly Gln Ser Phe Ile Thr Ser Ile Lys Ile Ala Val Leu Pro
20 25 30

Ile Ala Lys Val Phe Thr Leu Cys Phe Leu Gly Phe Leu Met Ala Ser
35 40 45

Lys Tyr Val Asn Ile Leu Pro Ala Asn Gly Arg Lys Leu Leu Asn Gly
50 55 60

Leu Val Phe Ser Leu Leu Pro Cys Leu Ile Phe Ser Gln Leu Gly
65 70 75 80

Gln Ala Ile Thr Tyr Glu Lys Leu Leu Gln Trp Trp Phe Ile Pro Val

ES 2 817 780 T3

<212> PRT

<213> Cucumis sativus

<400> 6

```

Met Glu Asn Phe Leu Ser Ala Ile Val Ser Glu Val Gln Ala Gly Gly
1          5          10          15

Asn Ser Leu Leu Val Thr Ile Lys Ile Ala Val Leu Pro Ile Ala Lys
          20          25          30

Val Phe Thr Met Cys Phe Leu Gly Phe Leu Met Ala Ser Lys Tyr Val
          35          40          45

Asn Ile Leu Pro Ala Ser Gly Arg Lys Leu Leu Asn Gly Leu Val Phe
          50          55          60

Ser Leu Leu Leu Pro Cys Leu Ile Phe Ser Gln Leu Gly Gln Ala Ile
65          70          75          80

Thr Leu Glu Lys Met Leu Lys Trp Trp Phe Ile Pro Ala Asn Val Val
          85          90          95

Leu Ala Ser Ile Ser Gly Ser Leu Ile Gly Leu Ile Val Ala Ser Ile
          100          105          110

Val Arg Pro Pro Tyr Pro Phe Phe Lys Phe Thr Ile Val Gln Ile Gly
          115          120          125

Ile Gly Asn Ile Gly Asn Val Pro Leu Val Leu Ile Ala Ala Leu Cys
          130          135          140

Arg Asp Asp Met Asn Pro Phe Gly Asp Glu Glu Lys Cys Ser Thr Asp
145          150          155          160

Gly Ile Ala Tyr Ile Ser Tyr Gly Gln Trp Val Gly Ala Ile Ile Leu
          165          170          175

Tyr Thr Tyr Val Tyr Ala Met Leu Ala Pro Pro Pro Glu Gly Thr Phe
          180          185          190

Asp Ile Lys Asp Gln Asn Ile Ser Val Lys Asn Leu Leu Lys Asp Asn
          195          200          205

Thr Pro Ala His Val Pro Leu Leu Ile Gln Glu Val Pro Ser Thr Tyr
          210          215          220

```

5

ES 2 817 780 T3

Pro Asp Ala Pro Lys Lys Glu Glu Lys Tyr Asp Met Glu Tyr Glu Lys
 225 230 235 240

Cys Asn Asn Asp Asn Lys Thr Ser Thr Tyr Phe His Asn Gly Ile Ile
 245 250 255

Leu Ser Thr Leu Gly Ile Phe Pro His Ser Leu Thr Phe Gly Ile Thr
 260 265 270

Gln Lys Thr Lys Gly Phe Leu Ile Tyr Trp Phe Asp Lys Leu Lys Leu
 275 280 285

Lys Gln Met Phe Gln Pro Pro Ile Val Ala Ser Val Leu Ala Met Leu
 290 295 300

Leu Gly Ala Thr Pro Phe Leu Arg Arg Leu Ile Phe Thr Pro Asp Ala
 305 310 315 320

Pro Leu Phe Phe Phe Thr Asp Ser Cys Ile Met Leu Gly Glu Ala Met
 325 330 335

Ile Pro Cys Ile Leu Leu Ala Leu Gly Gly Asn Leu Val Glu Gly Pro
 340 345 350

Gly Ser Ser Lys Leu Gly Leu Arg Thr Thr Ala Ala Ile Ile Phe Ala
 355 360 365

Arg Leu Val Leu Val Pro Pro Ala Gly Leu Gly Ile Val Met Leu Ala
 370 375 380

Asp Lys Leu Gly Phe Leu Pro Pro Asp Asp Lys Met Phe Arg Phe Val
 385 390 395 400

Leu Leu Leu Gln His Ser Met Pro Thr Ser Val Leu Ser Ser Ala Val
 405 410 415

Ala Thr Leu Arg Gly Cys Gly Lys Asp Ser Ala Ala Ile Leu Phe Trp
 420 425 430

Val His Ile Phe Ser Val Ile Ser Met Ala Gly Trp Phe Ile Leu Tyr
 435 440 445

Phe Arg Ile Leu Phe
 450

<210> 7

<211> 22

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

10

<400> 7

atggacatgg aaagatttct ct 22

<210> 8

15 <211> 422

<212> PRT

<213> Malus domestica

<400> 8

ES 2 817 780 T3

Met Glu Arg Ile Leu Ala Ala Val Glu Val Val Asn Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Glu Ser Leu Leu Gly Thr Ile Lys Ile Ala Val Leu Pro Ile Ala Lys
 20 25 30
 Val Phe Thr Val Cys Ser Leu Gly Leu Leu Met Ala Ser Lys Tyr Val
 35 40 45
 Asn Ile Phe Pro Ala Ser Gly Arg Lys Leu Leu Asn Gly Leu Val Phe
 50 55 60
 Ser Leu Leu Leu Pro Cys Leu Ile Phe Ser Gln Leu Gly Gln Ala Ile
 65 70 75 80
 Thr Leu Gln Lys Met Leu Glu Trp Trp Phe Ile Pro Val Asn Val Val
 85 90 95
 Ile Gly Ser Thr Thr Gly Ser Ile Ile Gly Tyr Ile Val Ala Ser Leu
 100 105 110
 Val His Pro Pro Tyr Pro Phe Phe Lys Phe Thr Ile Val Gln Ile Gly
 115 120 125
 Ile Gly Asn Ile Gly Asn Val Pro Leu Val Leu Ile Ser Ala Leu Cys
 130 135 140
 Arg Asp Lys Ser Asn Pro Phe Gly Asp Ser Thr Thr Cys Lys Thr Asp
 145 150 155 160
 Gly Thr Ala Tyr Ile Ser Phe Gly Gln Trp Val Gly Ala Ile Ile Leu
 165 170 175
 Tyr Thr Tyr Val Phe Gln Met Leu Ser Pro Pro Pro Glu Gly Thr Phe
 180 185 190
 Asp Val Glu Glu Lys Glu Leu Pro Ile Lys Ser Pro Arg Asn Gly Thr
 195 200 205
 Thr Pro Asp Gln Val Pro Leu Leu Thr Pro Asp Glu Asn Glu Glu Glu
 210 215 220
 Thr Ala Arg Lys Glu Glu Val Ala Glu Thr Glu Ser Asn Ala Ser Asn
 225 230 235 240
 Lys Pro Lys Ile Thr Lys Phe Phe Leu Phe Ile Tyr Glu Lys Leu Lys
 245 250 255
 Leu Lys Gln Val Leu Gln Pro Pro Ile Ile Ala Ser Ile Leu Ala Met
 260 265 270

ES 2 817 780 T3

Val Leu Gly Thr Ile Pro Phe Leu Lys Lys Leu Ile Phe Thr Ser Asp
 275 280 285

Gly Pro Leu Phe Phe Phe Thr Asp Ser Cys Ile Ile Leu Gly Glu Ala
 290 295 300

Met Ile Pro Cys Ile Leu Leu Ala Leu Gly Gly Asn Leu Val Asp Gly
 305 310 315 320

Pro Gly Ser Ser Lys Leu Gly Leu Arg Thr Thr Ala Ala Ile Ile Phe
 325 330 335

Ala Arg Leu Val Leu Val Pro Pro Val Gly Leu Gly Val Val Met Leu
 340 345 350

Ala Asp Lys Leu Gly Phe Leu Pro Pro Asn Asp Gln Met Phe Arg Phe
 355 360 365

Val Leu Leu Leu Gln His Thr Met Pro Thr Ser Val Leu Ala Gly Ala
 370 375 380

Val Ala Asn Leu Arg Gly Cys Gly Arg Glu Ala Ala Ala Val Leu Phe
 385 390 395 400

Trp Val His Ile Phe Ala Ile Phe Ser Met Ala Gly Trp Ile Val Leu
 405 410 415

Tyr Leu Asn Ile Leu Phe
 420

<210> 9

<211> 414

5 <212> PRT

<213> Populus trichocarpa

<400> 9

Met Glu Arg Phe Leu Leu Ala Val Asp Thr Met Gly Ala Asn Gln Val
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Gln Thr Leu Leu Gly Thr Ile Lys Ile Ala Val Leu Pro
 20 25 30

Ile Ala Lys Val Phe Thr Met Cys Phe Leu Gly Phe Leu Met Ala Ser
 35 40 45

Lys Tyr Val Asn Ile Leu Pro Ala Ser Gly Arg Lys Leu Leu Asn Gly
 50 55 60

Leu Val Phe Ser Leu Leu Leu Pro Cys Leu Ile Phe Ser Gln Leu Gly
 65 70 75 80

Gln Ala Val Thr Leu Gln Lys Met Leu Glu Trp Trp Phe Ile Pro Val
 85 90 95

Asn Val Val Leu Ser Ser Ile Cys Gly Ser Leu Ile Gly Phe Ile Val
 100 105 110

ES 2 817 780 T3

Ala Ser Ile Val Arg Pro Pro Tyr Pro Phe Phe Lys Phe Ser Ile Val
 115 120 125

Gln Ile Gly Ile Gly Asn Ile Gly Asn Val Pro Leu Val Leu Ile Ala
 130 135 140

Ala Leu Cys Arg Asp Thr Ser Asn Pro Phe Gly Asp Ser Glu Lys Cys
 145 150 155 160

Ser Thr Asp Gly Thr Ala Tyr Ile Ser Phe Gly Gln Trp Val Gly Ala
 165 170 175

Ile Ile Leu Tyr Thr Tyr Val Phe Asn Met Leu Ala Pro Pro Pro Glu
 180 185 190

Gly Thr Phe Asp Ile Asp Glu Pro Asn Leu Pro Ile Lys Lys Pro Ala
 195 200 205

Lys Asp Ala Pro Met Glu Gln Val Pro Leu Leu Ala Gln Glu Glu Ala
 210 215 220

Pro Ala Glu Pro Asp Ala Pro Lys Arg Gly Lys Ile Lys Gln Ile Leu
 225 230 235 240

Val Phe Leu Tyr Asp Lys Leu Lys Leu Lys Gln Ile Leu Gln Pro Pro
 245 250 255

Ile Ile Ala Ser Ile Leu Ala Met Phe Leu Gly Ala Val Pro Phe Leu
 260 265 270

Lys Gln Leu Ile Phe Thr Thr Asp Ser Pro Leu Phe Phe Phe Thr Asp
 275 280 285

Ser Cys Asn Ile Leu Gly Glu Ala Met Ile Pro Cys Ile Leu Leu Ala
 290 295 300

Leu Gly Gly Asn Leu Val Asp Gly Pro Gly Ser Ser Lys Leu Gly Phe
 305 310 315 320

Arg Thr Thr Ala Ala Ile Ile Phe Gly Arg Leu Val Leu Val Pro Pro
 325 330 335

Thr Gly Leu Gly Ile Val Met Leu Ala Asp Lys Leu Gly Phe Leu Pro
 340 345 350

Ala Gly Asp Lys Met Phe Arg Phe Val Leu Leu Leu Gln His Thr Met
 355 360 365

Pro Thr Ser Val Leu Ser Gly Ala Val Ala Asn Leu Arg Gly Cys Gly
 370 375 380

Arg Glu Ala Ala Ala Val Leu Phe Trp Val His Ile Phe Ala Ile Phe
 385 390 395 400

Ser Met Ala Gly Trp Ile Val Leu Tyr Leu Asn Ile Leu Phe
 405 410

<210> 10

5 <211> 431

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 10

ES 2 817 780 T3

Met Ile Ala Arg Ile Leu Ala Ala Leu Ala Asp Ser Met Glu Met Pro
 1 5 10 15
 Val Ala Ala Gly Gly Gly Ser Val Leu Gly Thr Ile Lys Ile Ala Val
 20 25 30
 Met Pro Ile Ala Lys Val Phe Thr Met Cys Phe Leu Gly Leu Leu Met
 35 40 45
 Ala Ser Lys Tyr Val Asn Ile Leu Pro Pro Ser Gly Arg Lys Leu Leu
 50 55 60
 Asn Gly Leu Val Phe Ser Leu Leu Leu Pro Cys Leu Ile Phe Ser Gln
 65 70 75 80
 Leu Gly Gln Ala Val Thr Leu Gln Lys Met Leu Gln Trp Trp Phe Ile
 85 90 95
 Pro Val Asn Val Val Leu Gly Thr Ile Ser Gly Ser Ile Ile Gly Phe
 100 105 110
 Ile Val Ala Ser Ile Val Arg Pro Pro Tyr Pro Tyr Phe Lys Phe Thr
 115 120 125
 Ile Ile Gln Ile Gly Val Gly Asn Ile Gly Asn Val Pro Leu Val Leu
 130 135 140
 Leu Ala Ala Leu Cys Arg Asp Thr Ser Asn Pro Phe Gly Asp Ser Glu
 145 150 155 160
 Lys Cys Ser Ile Asp Gly Thr Ala Tyr Ile Ser Phe Gly Gln Trp Val
 165 170 175
 Gly Ala Ile Ile Leu Tyr Thr Tyr Val Tyr Gln Met Phe Ala Pro Pro
 180 185 190
 Pro Glu Gly Phe Asp Ala Glu Glu Glu Asn Leu Ala Leu Lys Thr Leu
 195 200 205
 Pro Val Asp Ala Ala Pro Glu Gln Val Pro Leu Leu Thr Gln Asn Phe
 210 215 220
 Pro Lys Asp Phe Ser Pro Thr Gln Asp Leu Leu Pro Val Gln Ser Thr
 225 230 235 240
 Glu Pro Arg Gly Arg Gly Val Ser Arg Lys Gly Lys Ile Ala Gln Ile
 245 250 255

ES 2 817 780 T3

Phe Val Phe Leu Tyr Glu Lys Leu Lys Leu Lys Gln Ile Val Gln Pro
 260 265 270

Ala Ile Val Ala Ser Ile Leu Ala Met Ile Leu Gly Ala Ile Pro Phe
 275 280 285

Thr Lys Lys Leu Ile Phe Thr Asn Gly Ala Pro Leu Phe Phe Phe Thr
 290 295 300

Asp Ser Cys Met Ile Leu Gly Asp Ala Met Ile Pro Cys Ile Leu Leu
 305 310 315 320

Ala Leu Gly Gly Asn Leu Ile Asn Gly Pro Gly Ser Ser Lys Leu Gly
 325 330 335

Phe Lys Thr Thr Ala Ala Ile Ile Ile Gly Arg Leu Val Leu Val Pro
 340 345 350

Pro Val Gly Leu Gly Ile Val Thr Val Ala Asp Lys Leu Gly Phe Leu
 355 360 365

Pro Ala Asp Asp Lys Met Phe Arg Phe Val Leu Leu Leu Gln His Thr
 370 375 380

Met Pro Thr Ser Val Leu Ser Gly Ala Val Ala Asn Leu Arg Gly Cys
 385 390 395 400

Gly Arg Glu Ser Ala Ala Val Leu Phe Trp Val His Ile Phe Ala Ile
 405 410 415

Phe Ser Met Ala Gly Trp Met Val Leu Tyr Ile Asn Ile Leu Phe
 420 425 430

- 5 <210> 11
- <211> 23
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

- <400> 11
- ttagaagagt atcctgaagt aga 23

- 15 <210> 12
- <211> 18
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

- <400> 12
- ctcgggcaag ctattact 18

- 25 <210> 13
- <211> 18
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 30 <220>
- <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

- <400> 13
- gtatggagga cgaacaat 18
- 35

<210> 14
 <211> 7962
 <212> ADN
 <213> Cucumis melo
 5
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (2)..(2)
 <223> n es a, c, g o t
 10
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (26)..(26)
 <223> n es a, c, g o t
 15
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (32)..(34)
 <223> n es a, c, g o t
 20
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (38)..(38)
 <223> n es a, c, g o t
 25
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (41)..(41)
 <223> n es a, c, g o t
 30
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (45)..(45)
 <223> n es a, c, g o t
 35
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (49)..(49)
 <223> n es a, c, g o t
 40
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (57)..(57)
 <223> n es a, c, g o t
 45
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (65)..(65)
 <223> n es a, c, g o t
 50
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (76)..(76)
 <223> n es a, c, g o t
 55
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (79)..(79)
 <223> n es a, c, g o t
 60
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (85)..(85)
 <223> n es a, c, g o t
 65
 <220>

- <221> característica_misc
 - <222> (94)..(95)
 - <223> n es a, c, g o t
- 5

 - <220>
 - <221> característica_misc
 - <222> (107)..(107)
 - <223> n es a, c, g o t
- 10

 - <220>
 - <221> característica_misc
 - <222> (109)..(110)
 - <223> n es a, c, g o t
- 15

 - <220>
 - <221> característica_misc
 - <222> (116)..(116)
 - <223> n es a, c, g o t
- 20

 - <220>
 - <221> característica_misc
 - <222> (119)..(119)
 - <223> n es a, c, g o t
- 25

 - <220>
 - <221> característica_misc
 - <222> (154)..(154)
 - <223> n es a, c, g o t
- 30

 - <220>
 - <221> característica_misc
 - <222> (156)..(156)
 - <223> n es a, c, g o t
- 35

 - <220>
 - <221> característica_misc
 - <222> (160)..(160)
 - <223> n es a, c, g o t
- 40

 - <220>
 - <221> característica_misc
 - <222> (189)..(189)
 - <223> n es a, c, g o t
- 45

 - <220>
 - <221> característica_misc
 - <222> (239)..(239)
 - <223> n es a, c, g o t
- 50

 - <220>
 - <221> característica_misc
 - <222> (253)..(253)
 - <223> n es a, c, g o t
- 55

 - <220>
 - <221> característica_misc
 - <222> (262)..(262)
 - <223> n es a, c, g o t
- 60

 - <220>
 - <221> característica_misc
 - <222> (283)..(283)
 - <223> n es a, c, g o t
- 65

 - <220>
 - <221> característica_misc

- <222> (292)..(292)
<223> n es a, c, g o t
- <220>
5 <221> característica_misc
<222> (316)..(316)
<223> n es a, c, g o t
- <220>
10 <221> característica_misc
<222> (327)..(327)
<223> n es a, c, g o t
- <220>
15 <221> característica_misc
<222> (341)..(341)
<223> n es a, c, g o t
- <220>
20 <221> característica_misc
<222> (4305)..(4305)
<223> n es a, c, g o t
- <220>
25 <221> característica_misc
<222> (5729)..(5729)
<223> n es a, c, g o t
- <220>
30 <221> característica_misc
<222> (6118)..(6118)
<223> n es a, c, g o t
- <220>
35 <221> característica_misc
<222> (6232)..(6232)
<223> n es a, c, g o t
- <220>
40 <221> característica_misc
<222> (6571)..(6571)
<223> n es a, c, g o t
- <220>
45 <221> característica_misc
<222> (6631)..(6631)
<223> n es a, c, g o t
- <220>
50 <221> característica_misc
<222> (7797)..(7797)
<223> n es a, c, g o t
- <220>
55 <221> característica_misc
<222> (7822)..(7822)
<223> n es a, c, g o t
- <220>
60 <221> característica_misc
<222> (7838)..(7838)
<223> n es a, c, g o t
- <220>
65 <221> característica_misc
<222> (7872)..(7872)

<223> n es a, c, g o t

<220>

5 <221> característica_misc
<222> (7907)..(7908)
<223> n es a, c, g o t

<220>

10 <221> característica_misc
<222> (7931)..(7932)
<223> n es a, c, g o t

<220>

15 <221> característica_misc
<222> (7941)..(7941)
<223> n es a, c, g o t

<220>

20 <221> característica_misc
<222> (7948)..(7949)
<223> n es a, c, g o t

<220>

25 <221> característica_misc
<222> (7958)..(7958)
<223> n es a, c, g o t

<400> 14

ES 2 817 780 T3

angggttcgc gttggccgat tcattnatgc annnggcncg ncagntttnc cgactgnaaa	60
gcggncaagtg agegcnacnc aattnatgtg agtnngctca ctcattngnn accccnggnc	120
tttacacttt atgcttcocg ctcgtatgtt gtgngnaatn gtgagcggat aacaatttca	180
cacaggaanc agctatgacc atgattacgc caagctattt aggtgacact atagaatant	240
caagccttga tgnctgcagg tngactctag aggatccccg ggnaccgagc tngaattcaa	300
gaacataatc gaaatnttct tcaactntcg tagctaaatt ngtaattcca ccattaaatt	360
cgttgttact ttgtggcata tgaatgtcaa aacttgctgt ccttttcaat ctacggattt	420
gtgcggtgaa atattccact tcaacgacga acagtaggaa ttgagcagcg caatatttgg	480
cgcgcagttg ctttactagc aggctctcac aaatcgccat tgccaaacct cagagctgct	540
tttcaactct ttatcttcat cctcttcac ctttttcaat tttttttct ttttttga	600
atttcagatt aggatctgtt cttgtttctc tgtaagtgtt ttctcgttaa ttctctcttt	660
ttatcgtat aatttgttgt tatggcttct ggggtttgtt ttgtgggtt tttttttt	720
ttatgaagct ttattgttag tattcagtc atgaacgttt ttcaagaaat ttgtgtcgt	780
atcagcattt ctttttcgac attctatttc tggatttagt tttatattt tgttgctttg	840
attgtgatgc tacttccggt tctgaaatga tttcattgtt ctacttctt gtttttgctt	900
ctgattctta attattcttt ttttttttt ttggattgtt cttgttttgt aaagttttaa	960
ttatgtttt tgcacaggaa aactgagaag caaaatttcc cgaacttcat gttttgatga	1020
ttaagtccga gtgctgagat ttagtccgtt tggaaatttg tgggtttaca aaggaacccc	1080
tatttcatat agaacgagtt tcagattttg agttttgtt ggtggtgatc agaagattga	1140
gtgacaaaga ggagatggac atggaaagat ttctctcagc catcgtctcg gaagttcaag	1200
cgggagggaa ctctctgctt gtcactatta agattgctgt gttaccata gccaaagttt	1260
tcactatgtg ctttctgggt tttcttatgg catctaaata tgcaacatc ttgcctgcaa	1320
gtggaaggaa gcttttgaat ggggtatgtt tgcataaatt tcatctaac tgtacactga	1380
acagactctg tattgttttc tgatttgatg ttttgatgga cctatctaaa cacgatgact	1440
agtattttga tgggttcaaa atgatttttc atttttgctt cttgtgctgc agttggtctt	1500
ttcgctttt cttccatggt taatattctc tcagctcggg caagctatta ctctcgagaa	1560
aatgcttaa tgggtggagc taaataact ttacacgtgt tcctgtttt atttgaatct	1620
tgtatacaga gaacagtcac ctaatttcat ttgtggcctt attatgtagg tggtttatc	1680
ctgcaaactg tgttctggct tcgatatac gttccctaat tggattaatt gttgcattaa	1740
ttgttcgtcc tccatcccc ttcttcaagt tcacaattgt acaaattgga attggtaaac	1800
cacttgatct tggaaataga cttgcacata gtttgtctgt atgatgatg agttgttcc	1860

ES 2 817 780 T3

tgtttgctac ttgattggct ggtcatttca gatatactggt aatggccatc agtttataac	1920
tccttatggc ctgtcagttt ttagttcaaa aactagaata gtatttctct tttccggatt	1980
gtgcatcaat tctttgcaact aattgaatgg cactgtgagg tttgtgctgc atgtgacaca	2040
aaccaatcat gttggccgga cattgatcca caattgcaga caataaatt aggagagctg	2100
ttcaaatgaa tatacgttgt caataactta atggatcaag gaacgaatca gagggttcca	2160
aacttgctaa ttcaacaacg cagacctagt ttaaataggg aattttcaat gatttggcct	2220
tatgtgatgg atgctagcat atgtatctct tctgatacat ttcccttacc tacctaaact	2280
caagatgagt ttattcattt cttgtttttg tagtattttt cttttgaata atcctgtatt	2340
gagagcccca ctcccaacta attcaggtac ccatgcctat gcaggccctg aactcagtct	2400
tatttttgta agtcttttag ctgactgta gtttgattag aagtaataac tagttctaact	2460
taagcctgcc aaagccagtg tgctactggt ataatcata tcattaatat tatggaaata	2520
acgatgattg aataataaag atgagtttcc tttcccactt cctctgttg gaaggtacat	2580
tgtacttgca ttttagagta agtttcaagt aaacacttcc tgtagtgtca aacgaattgc	2640
aatatccttg acctgtgtgc ttaattcacc cgtttttttt ttttctctt tctgtgtgaa	2700
agatgaagaa ttgattaaac aaataatag gtttctgtac tttaaatgc agtagctgta	2760
gatatgctgt gaaaatattt acttgaactt catgatttgg ttttctcata tgaacgtatt	2820
atztatgcat ccttgttctt attctatggt ttgatgttg cattcagga acattggaaa	2880
tgtgcctctc gttctcattg cagctctatg tagagatgat atgaatcctt ttggtgatga	2940
agagaaatgt agcactgatg ggattgctta tatttcatat ggccagtggtg tgggttttcc	3000
tgcgtttttg gctcaactca tttggacttg tgcatttttc tgaagtggga ttttttttt	3060
ttaaattttt aattactctt catcatatat catttcaaat accaattatt ccatccatga	3120
cttgcttctt attcattcct aagtaacatg ttctttttat aatttaggcc ccatggcttg	3180
aagcgaacaa tatacacttt aatgaaaaag agagtggag aagtatttga taaatacgt	3240
ccattattct aattggattt cactattcac aatcaaat ttttttaag tactctcct	3300
tgcaattaac tcaagatggg gtgcatcttt gtgactcctt caggaaattt ttaccctatc	3360
aatggctttg ttattaagaa aagaataat aaataaataa aaaattaaac atttgttact	3420
agcaaacac ctaactctaa tttactaata cctacgtgat tttttttta tgcoaagggt	3480
ggtgcaatta tctgtacac ctatgtttat gcgatgctgg cacctccacc tgagggtaca	3540
tttgacatca aagatcaaaa tattccagtt aagaatctgc taaaggataa tacgctgca	3600
catgttccct tgcctaatca ggaggtagct tcaaaatato cggatgctcc taagaaggaa	3660
gagtgagag actttatttt tctttattgt aagcattgcc atattcagtt taatggattc	3720
atggcgaggt tcatttctat taatcaactt ataatagcat attttatatt tttctagaag	3780
actaatatga cattctttta tagaagtatg atatggaata tgaaaaatgt aataacgata	3840
acaagacctc cacctatttt cataatagta taatattgtc cactttggat ataaatctc	3900
gtagccttac ttttgaatc acccaaaagg tctcatataa atggagataa ttgttcttcg	3960
cttaccatag atctctcctt tcctaacca acatgggact ttatttacac cagaacataa	4020
tggatgtaa tggttatcac ttcaattttt agcagcttct ctgtgttttg ggttatcat	4080

ES 2 817 780 T3

tagttaattt atcttgccctt agttatggtt ttgaactagt ctactctttg taatgaaaac	4140
taagctctgt tttcggatta tgcattagtt aatttctggt gccttagttt tggttttatg	4200
aaaacaaatc tactcttagt tgtgaaacta gtatgttaaa ttgtcagaag attttttagat	4260
cagttgtgtc aatattcttg gcttcatggt tcttttttgc tttcnagcta agcagtgga	4320
aatcattctt tctaaaatta tgaagatttg gatgacttct tggctttatt aggttagcta	4380
acttatctta agtggcagtt tgttcattca tccctacttc tgaaggaaa tacaaaattg	4440
gggctgtctg tcacaatttt tctttggatg cagactaagg gcttccttat gtattggttt	4500
gacaaattga agctcaagca aatttttcag cctcctatca ttgcttcggt tagtatatat	4560
ttgtgtttta atgtgctgta gtcttatcat ttgttttatg gatcatacta taactagtga	4620
atgctagata aatttcgtgg gagcatatgt ttcacctctt ttgaaattg taaactgaaa	4680
tgttgttttc gaaaaaaat tgagtttgggt ttgttctctt gaaaagaaa gaaaacaatg	4740
ggttgggttt aggttttgggt ctcttcatga acatctgata tgtatcccca aagttaaagt	4800
gatgtttttt attcatctaa ttatgctttt ggggttcatg ttaattgatg aggtttctga	4860
actccagat tcagatatct ttccaagttc ttttgcacc tttcgttaatt gattatgcaa	4920
catgttcag gtccctagcta tgttattggg tgcaactcca ttcttaaggc gattgatctt	4980
tactcctgat gtccattgt ttttcttcac tgatagctgc ataagctcg ggtaaatcct	5040
ggaaattttt taagagcaat gttgcttttt atttagaatt ataattcttt cgctttgctc	5100
attgatgggc ttgcaactgag gttgttttct tgggaagttt ctttttagtcc atttttaaga	5160
atggctgcta gatgcctaca cttaaatctt tgtataccta aatatttgat cttaaggtta	5220
tctttgggtt tctgtttcaa gtcaagagct caaatctgta gagtttggta tgatcatgtc	5280
atgaagattc aaattagccg ttaacagagg gttccacata tctctttggc tttttgttct	5340
ctggcctttg ttgaggatgc cagcatagtt ccaaatcaca atcaggttga cgtggagagg	5400
gcttttggtt aaggcaacat ttttgggtgt ataaggattc ttgtggaaaa tccaaaagca	5460
aaaccatgtg ggttcatgaa ggggtcaata taatctcgag agatctactg tccatgaccc	5520
ttcttctagc ctcaattgtt tttttgggtt gtgatgggtc tgtttaagtt ataagtctct	5580
ccttgggtct ctgaaattat aatttttgca gccatcaggt taaaaacaaa atcttcaagg	5640
tggcatttga agaaaaatat agagcagctg gtatttagat ttcaaattct taaaaacaaga	5700
gatccttctt tctttttttg ggtcttggna tctgcgtttt gattttgtgg caatttctgg	5760
gaatatttcc tactctctaa cgtttgcctt ttgagaattt aaggcgtgct atctgtgtct	5820
tccaggttga agagattgaa aagaaagtcc taagatagtg tgttttttaa ccttcaagaa	5880
ccagataaga acctacaag aatgcttgaa ttagtacaag attcttaaaa gatattacat	5940
cactcctaag atagtgtgtt ttttaacatt gagtttagatt tcatgacgga tatggacctg	6000
taatctttaa aaataggtta tggatgagtt gatttcataa aactagaatg tgggaaattt	6060
aaagggatat atacttataa aatttccatt accaatataa tctaacacct tttgttgntc	6120
aggggagcta tgattccatg tctctgttg gcattgggag gaaacctcgt tgaaggttag	6180
tgctgttcca atgacaataa ttttctgtcg tagttgtaga gatatatagc tngactgcaa	6240
atcaagaaca aatcttctt gaatgacttg acacatttct gctaaaattt tgatatattt	6300

ES 2 817 780 T3

aaattcccat cgcccagcag cataaatttt tgtatcggtg atttaacatg atggcaaatt 6360
 gtaatgtcat ttctccccga ttcattttgt tttctatggt gggcctttca caaaactttc 6420
 aaagcacaag tggagaagc agaatgctaa ggtttgggta taattatatt tcttgtttgc 6480
 tgtcccatca gctcaagttt gtgggtggtt tacctgtcag cttaaagcga ttggtgattt 6540
 aactatttct ttagtttagt agaatcatgt naaactacc aaaagtcctt ttattttcaa 6600
 gacagcttac caaataacaa tgtctcactt ngcttgaggg tcctggaagt tcaaaactcg 6660
 ggctacggac taccgtgct gttatttttg caaggttggt tttggtgctt cctgcagggg 6720
 ttggcatagt catgttagcc gacaagctt gcttccttc tccagatgat aaaatgttcc 6780
 gatttgttct tcttctcag cattcgtgc caacatctgt cctctcagat aagttccaat 6840
 cttgacaaac aactaagaac aaacaaacga gtactcaaat tgatcagtaa tcttcacctc 6900
 attattcatt tcttgaatg aaagaattga agcttgttta agtcaaagta gatgtcattt 6960
 aaggctttta actcatgaag caaattattt tctgtagggt ctgtggctac ttgaggggt 7020
 tgtgtagag aatctgctgc tattcttttc tgggttcata tatttgccgt catctcaatg 7080
 gcagggtggt tcactcctca cttcaggata ctcttctaaa gaaattgcaa ccttgtgaat 7140
 aagtttcata ttccaatact tctccttatt ctttgttaaa tatgggtgct atctgttact 7200
 tgtagagaag accagtatcg tttagaaata gtattttttt tgtttgagat gattatgtat 7260
 cctaaagcta ataagcgaat tagttgcttc aatacgggtg gtgtgaacaa gagatattct 7320
 attaatgaat aatccatgct tcgtagatca catggaaaaa gacattatgg agagatgaat 7380
 aaagagatta tgttaattgt actttggtat agattttcct cgatatatgt ttttgagggt 7440
 agctgtccat atttttatgg attttccgtt taggcaagga aaggggacgg agtcgggatt 7500
 ttttttcggt taogaagat gagaatgcat ttcttgccc attgcctctt aataatgttt 7560
 tgtaataaat tttaggagtt ctaacctaca taagcttgac ttcaaattta cacacaata 7620
 aggtttaata ttacttaaaa aaataaaaaga agttcgtaat aatacaatta taaataaaaa 7680
 tgaaaataat ttaggatattt attattcatt ttagtttga gcatthaata tgagataata 7740
 catataattt tatttttttt taattgtatg agatttaatg tgagatagta tatattnatt 7800
 tttaatogta aatgtttgat tnatttcttt tctatatnag tttcattcat tttcattttt 7860
 taattgtatt gntatatggc tttctacgtg atctttttct ttttttnntt ctctatgttt 7920
 ttatgttgtt nnaattttgt ncagaaannt ttaatggnga ta 7962

<210> 15

<211> 32

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

10

<400> 15

ctcgagtcta gaccagtggg ttggtgcaat ta 32

<210> 16

15 <211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 16

ggtaccatcg atcgctaac atgactatgc ca 32

25 <210> 17

<211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 17
 ctcgagtcta gacagccgac tctagtagtt ca 32

10 <210> 18
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 18
 20 ggtaccatcg atccatccag ccatagagat ca 32

<210> 19
 <211> 524
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Amplicones derivados de melón, ADNc transportador

30 <400> 19
 ccagtgggtt ggtgcaatta tctgtacac ctatgtttat gcgatgctgg cacctccacc 60
 tgagggtaca ttgacatca aagatcaaaa tattccagtt aagaatctgc taaaggataa 120
 tacgcctgca catgttcctt tgctcattca ggaggtagct tcaaaatc cggatgctcc 180
 taagaaggaa gagactaagg gcttccttat gtattggtt gacaaattga agctcaagca 240
 aatttttcag cctcctatca ttgcttcggt cctagctatg ttattgggtg caactccatt 300
 cttaaggcga ttgatcttta ctctgatgc tccattgttt ttcttactg atagctgat 360
 aatgctcggg gaggetatga ttccatgtat cctggtggca ttgggaggaa acctcgttga 420
 aggtcctgga agttcaaac tcgggctacg gactaccgct gctgttattt ttgcaaggtt 480
 ggttttggtt cctcctgcag ggggtggcat agtcatgta gccg 524

<210> 20
 <211> 548
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Amplicón derivado de tomate

40 <400> 20
 cagccgactc tagtagttca aataaagaga aggttaaaca gttctttaa tttctctatg 60
 agacactgaa gctcaagcaa cttattcaac ctcccattat agcttctatc atagcgatta 120
 tcataggatg tgtgccggtc ctgaaacgcc tcatctttac ttctgatgct ccactttact 180

ES 2 817 780 T3

	tcttcaactga cagctgttta attcttgggg atgcatgat tcctgcata ttgttgcct	240
	taggaggcaa tctcgttgac gggccaggac ctggaagttc aaaaattggt cttaaagaaa	300
	ctgttgcgat tgtgtttgca cggttgtgtt tggttcctcc aactggactc agtattgtca	360
	tgtagctga taagcttggc ttccttctct ctgatgataa aatgttcaga ttcgttcttc	420
	ttcttcagta ttcaatgcc acatccatac ttgctggtgc ggttgccaac ttgagagggt	480
	gtgggaagga ggcagcttca atcttgtttt gggttcatat atttgctgtg atctctatgg	540
	ctggatgg	548
	<210> 21	
	<211> 32	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 21	
	ctcgagtcta gacagccgac tctagtagtt ca 32	
	<210> 22	
15	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 22	
	cgtcttacac atcactgtc a 21	
25	<210> 23	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 23	
35	tctagaatgg acatggaag atttctct 28	
	<210> 24	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 24	
45	agatctggga attcgattt agaagagt 28	
	<210> 25	
	<211> 26	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
55	<400> 25	

tctagaatgg ataggggtgc gaggat 26

<210> 26
 <211> 28
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

10 <400> 26
 agatctgctgg gaattcgatt taaaaga 28

<210> 27
 <211> 4
 15 <212> PRT
 <213> Cucumis melo

<400> 27
 20 Leu Ile Val Ala
 1

<210> 28
 <211> 432
 25 <212> PRT
 <213> Malus domestica

<220>
 <221> característica_misc
 30 <222> (15)..(16)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misc
 35 <222> (328)..(329)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 28
 Met Glu Arg Val Leu Met Ala Val His Leu Ala Asn Gln Val Xaa Xaa
 1 5 10 15

Gly Gly Glu Ser Leu Leu Gly Thr Ile Lys Ile Ala Val Leu Pro Ile
 20 25 30

Ala Lys Val Phe Thr Val Cys Ala Leu Gly Leu Leu Met Ala Ser Lys
 35 40 45

Tyr Val Asn Ile Phe Pro Ala Ser Gly Arg Lys Leu Leu Asn Gly Leu
 50 55 60

Val Phe Ser Leu Leu Leu Pro Cys Leu Ile Phe Ser Gln Leu Gly Gln
 65 70 75 80

Ala Ile Thr Leu Lys Lys Met Leu Glu Trp Trp Phe Ile Pro Val Asn
 85 90 95

Val Val Ile Gly Ser Thr Thr Gly Ser Met Ile Gly Tyr Ile Val Ala
 100 105 110

Ser Ile Val Arg Pro Pro Tyr Pro Phe Phe Lys Phe Thr Ile Ile Gln
 115 120 125

ES 2 817 780 T3

Ile Gly Ile Gly Asn Ile Gly Asn Val Pro Leu Val Leu Ile Ala Ala
 130 135 140

Leu Cys Arg Asp Lys Ser Asn Pro Phe Gly Asp Thr Cys Lys Ala Asp
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Tyr Ile Ser Phe Gly Gln Trp Val Gly Ala Ile Ile Leu
 165 170 175

Tyr Thr Tyr Val Phe Gln Met Leu Ser Pro Pro Pro Glu Gly Thr Phe
 180 185 190

Asp Ile Glu Glu Lys Asp Leu Pro Ile Lys Ser Pro Gln Asn Ser Thr
 195 200 205

Ser Met Thr Pro Glu Gln Ile Pro Leu Leu Thr Asn Asp Glu Asn Asn
 210 215 220

Glu Glu Thr Thr Arg Gln Glu Glu Val Ala Glu Thr Lys Glu Asp Ala
 225 230 235 240

Glu Thr Asn Ser Asn Asp Thr Asp Lys Pro Lys Ile Thr Lys Phe Phe
 245 250 255

Val Phe Ile Tyr Glu Lys Leu Lys Leu Lys Gln Val Leu Gln Pro Pro
 260 265 270

Ile Ile Ala Ser Ile Leu Ala Met Val Leu Val Ala Ile Pro Phe Leu
 275 280 285

Lys Lys Leu Ile Phe Thr Ser Asp Gly Pro Leu Phe Phe Phe Thr Asp
 290 295 300

Ser Cys Ser Ile Leu Gly Glu Ala Met Ile Pro Cys Ile Leu Leu Ala
 305 310 315 320

Leu Gly Gly Asn Leu Ile Asp Xaa Xaa Gly Pro Gly Ser Ser Lys Leu
 325 330 335

Gly Leu Arg Thr Thr Ala Ala Ile Ile Phe Ala Arg Leu Val Leu Val
 340 345 350

Pro Pro Val Gly Leu Gly Ile Val Met Leu Ala Asp Lys Leu Gly Phe
 355 360 365

Leu Pro Ala Asn Asp Lys Met Phe Arg Phe Ile Leu Leu Leu Gln Asn
 370 375 380

Thr Met Pro Thr Ser Val Leu Ala Gly Ala Val Ala Asn Leu Arg Gly
 385 390 395 400

Cys Gly Arg Glu Ala Ala Ala Val Leu Phe Trp Val His Ile Phe Ala
 405 410 415

Ile Phe Ser Met Ala Gly Trp Ile Val Leu Tyr Leu Asn Leu Leu Phe
 420 425 430

<210> 29
 <211> 376
 <212> PRT
 <213> Vitis vinifera

5

<400> 29

ES 2 817 780 T3

Met Cys Phe Leu Gly Phe Leu Met Ala Ser Lys Tyr Val Asn Ile Leu
 1 5 10 15
 Pro Ala Ser Gly Arg Lys Leu Leu Asn Gly Leu Val Phe Ser Leu Leu
 20 25 30
 Leu Pro Cys Leu Ile Phe Ser Gln Leu Gly Gln Ala Val Thr Leu Gln
 35 40 45
 Lys Met Ile Glu Trp Trp Phe Ile Pro Thr Asn Val Ile Cys Gly Thr
 50 55 60
 Ile Ala Gly Ser Leu Ile Gly Leu Val Val Ala Thr Ile Ile Arg Pro
 65 70 75 80
 Pro Tyr Pro Phe Phe Lys Phe Thr Val Ile His Val Gly Ile Gly Asn
 85 90 95
 Ile Gly Asn Val Pro Leu Val Leu Leu Thr Ala Leu Cys Arg Asp Gln
 100 105 110
 Asn Asn Pro Phe Gly Asp Val Asp Thr Cys Thr Lys Gln Gly Thr Ala
 115 120 125
 Tyr Ile Ser Phe Gly Gln Trp Val Gly Ala Ile Val Leu Tyr Thr Tyr
 130 135 140
 Val Phe Gln Met Leu Ala Pro Pro Pro Glu Gly Thr Phe Asp Leu Asp
 145 150 155 160
 Glu Gln His Leu Pro Ile Lys Gly Cys Pro Lys Asp Gly Ser Pro Glu
 165 170 175
 Gln Val Pro Leu Ile Thr Gln Glu Val Leu Ser Ser Asp Leu Asn Ala
 180 185 190
 Ser Lys Gln Gly Lys Ile Lys Asp Phe Leu Val Tyr Met Tyr Asp Lys
 195 200 205
 Leu Lys Ile Lys Gln Ile Leu Gln Pro Pro Ile Ile Ala Ser Ile Leu
 210 215 220
 Ala Leu Ala Ile Gly Ala Ile Pro Phe Leu Lys Lys Leu Ile Phe Thr
 225 230 235 240
 Pro Asn Ala Pro Leu Phe Phe Phe Thr Asp Ser Leu Ile Ile Leu Gly
 245 250 255
 Glu Ala Met Ile Pro Cys Ile Leu Leu Ala Leu Gly Gly Asn Leu Val

ES 2 817 780 T3

260 265 270

Asp Gly Pro Gly Ser Ser Lys Leu Gly Leu Arg Thr Thr Thr Ala Ile
 275 280 285

Ile Phe Gly Arg Leu Val Leu Val Pro Pro Ala Gly Ile Gly Ile Val
 290 295 300

Leu Leu Ala Asp Lys Leu Gly Phe Leu Pro Pro Asp Asp Lys Met Phe
 305 310 315 320

Arg Phe Val Leu Leu Leu Gln His Ser Met Pro Thr Ser Val Leu Ser
 325 330 335

Gly Ala Ile Ala Asn Leu Arg Gly Cys Gly Arg Glu Ser Ala Ala Val
 340 345 350

Leu Phe Trp Val His Ile Phe Ala Ile Phe Ser Met Ala Gly Trp Ile
 355 360 365

Val Leu Tyr Leu His Ile Leu Phe
 370 375

<210> 30
 <211> 1362
 <212> ADN
 <213> Cucumis sativus

5

<400> 30
 atggaaaact ttctctcagc catcgtctcg gaagttcaag cgggaggaa ctctctgctt 60
 gtcaccatta agattgctgt gttaccata gccaaagttt tcactatgtg tttctgggt 120
 tttcttatgg catctaaata tgtcaacatc ttgcctgcaa gtggaaggaa gcttttgaat 180
 gggttggtct tttcgtttt gcttccatgt ttaatattct ctcagctcgg gcaagctatt 240
 actctcgaga aaatgcttaa atggtggttt attccggcaa atgttgttct ggcttcgata 300
 tcaggttccc taattggatt aattgttgca tcaattgttc gtctccata cccattcttc 360
 aagttcacga tgtacaaat tggaattggg aacattggaa atgtgcctct cgttctcatt 420
 gcagctctat gtagagatga tatgaatcct ttgggtgatg aagagaagtg tagcactgat 480
 gggattgctt atatttcata tggccagtgg gttggtgcaa ttatcctcta cacctatgtt 540
 tatgcatgtg tggcaacctc acctgagggg acatttgaca tcaaagatca aaatatttca 600
 gttaagaacc ttctaaagga taatacacct gcgcattgtc ccttgctcat tcaggaggta 660
 ccttcaacat atccggatgc tcttaagaag gaagagaagt atgatatgga atatgaaaaa 720
 tgtaataacg acaacaaaaa ctccacctat ttccacaacg gtataatact ttccactttg 780
 ggcataattc ctcatagcct tacttttgga atcaccocaa agactaaggg ctttcttatt 840
 tattggtttg acaaattgaa gctcaagcaa atgtttcagc ctctatttgt tgcttcggtc 900
 ctatgatgtg tattgggtgc aactccattc ttaaggcggg tgatttttac tctgatgct 960
 ccattgtttt tcttactgta tagctgcata atgctcgggg aggctatgat tccatgcac 1020
 ctgttggcat tgggaggaaa cctcgttgaa ggtcctggaa gttcaaaact tgggctacgg 1080
 actaccgctg ctattatttt tgcacggttg gttttggtgc ctctgcagg acttggcata 1140
 gtcagttag ctgacaagct tggcttcctt cctccagatg ataaaatgtt ccgattcgtt 1200
 cttcttcttc agcattcgat gccaacgtct gtcctctcaa gtgctgtggc tactttgagg 1260
 ggttgggta aagattctgc tgctattctt ttctgggttc atatatttct tgcatctca 1320
 atggcagggt ggttcactct ctatttcagg atactcttct aa 1362

10

<210> 31
 <211> 1276

ES 2 817 780 T3

<212> ADN

<213> *Lycopersicon esculentum*

<400> 31

```

atggataggg tgcgaggat tctttttagt gttctgacag aaccgcaacg aggaggacag      60
tctttcatca cgtcgattaa gattgctggt ttaccgattg cgaaagtgtt tacactatgc      120
ttcttgggat ttttgatggc ctccaagtat gtcaatattc ttccagcaaa tggacggaag      180
cttttaaagt ggttgggtgt ttcacttttg ctgoccatgct tgatattctc tcaacttggg      240
caagccatta cgtatgagaa attgcttcag tggtggttca tcctgttaa cattgttttg      300
gccaccatat ttggttctat tattgggtta attgttgcta cgatagtccg tccgccatac      360
ccttatttca agtttaccat tatacagatt ggcattggga acataggaaa tgttccactt      420
gttctgatag ctgcgttatg tctgtaccca tcaaactcct ttggtgactc tgagatatgt      480
gctgcgagatg gaaatgcata catctctttt ggacagtggg ttggtgcaat taccctctac      540
acctttgat  tccaaatgct ctcacctcct cctgaagggt ccttcgatgt tgaagatgca      600
aaccttcta  tcaaggttcc taacaaagaa agattaccga gtcacccatc aggtagtctt      660
gcagagcaag ttocattact tgcaacaaat gttgcaccag ccgactctag tagttcaaat      720
aaagaaaagg ttaaacagtt ctttaaattt ctctatgaga cactgaagct caagcaactt      780
attcaacctc ccattatago ttctatcata gcgattatca taggatgtgt gcoggtcctg      840
aaacgcctca tctttacttc tgatgctcca ctttacttct tcaactgacag ctgtttaatt      900
cttggggatg ccattgattc ctgcatattg ttggccttag gaggcaatct cgttgacggg      960
ccaggaccctg gaagtcaaaa aattggtcct aagacaactg ttgcgattgt gtttgcaccg     1020
gttggttttg gttcctccaa ctggactcag tattgtcatg ttagctgata agcttggtt     1080
ccttctgct  gatgataaaa tgttcagatt cgttcttctt cttcagtatt caatgcccac     1140
atccatactt gctggtgcgg ttgccaactt gagaggggtg ggaaggagg cagcttcaat     1200
cttgtttttg gttcatatat ttgctgtgat ctctatggct ggatggatca tctctacct     1260
5 caacatactc ttttaa                                     1276

```

<210> 32

<211> 1296

<212> ADN

10 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 32

```

atgattgctc ggatccttgc cgccttagcc gattccatgg agatgccggt ggtgcgctg      60
ggtggatcag tgctcggtac catcaaaatc gctgtgatgc caattgcaaa ggtattcacc     120
atgtgcttct tgggtcttct catggcctcc aagtaagtta acatcttgcc tccctctggc     180
cgcaaaactc tgaacgggtt ggtcttctcg cttttgcttc cctgcttgat cttttccag     240

```

ES 2 817 780 T3

ctcggacaag ccgtcactct ccaaaaaatg cttcagtggt ggttcattcc cgtaaagtc 300
 gttcttggca coactctctgg ctccataatc ggtttcatcg ttgcttccat cgttcgtccg 360
 ccttacccctt acttcaagtt tacaatcata caaattggag ttggcaacat tggcaatgtg 420
 cctottgttt tacttgcggc tctttgtagg gacacttcca acccttttgg tgactcogaa 480
 aaatgtagca ttgatggcac tgcttatatc tcctttggtc aatgggttgg tgccatcatc 540
 ctctatacat atgtgtacca gatgtttgct cctcctccag aagggttga tgctgaagaa 600
 gaaaatcttg ctttaaaaac ccttccagta gatgctgctc cagagcaagt ccccttgctt 660
 actcagaatt tcccgaagga cttttgcgag actcaagatc ttttgctgt acagagcacc 720
 gaacctaggg gaagaggggt ttcaagaaa ggcaagattg cacagatctt tgttttctc 780
 tatgagaagc tgaactgaa gcaaattgct cagcctgcaa ttgttgcttc gatccttgcc 840
 atgatactcg gagcaatacc ttccacaaag aagtgtatat tcacaaatgg tgcacctcta 900
 ttcttcttca cagacagctg catgattctt ggggacgca tgataccgtg tatcttactg 960
 gcaactgggg gaaatctcat taacggacca ggaagttcaa aacttggtt caagacaaca 1020
 gcagctatta taattggacg gttggtgta gtgccaccag taggactagg aatcgtgaca 1080
 gtacgagaca aacttggtt ccttctgct gatgataaga tgttccgatt tgtgttactc 1140
 cttcagcaca caatgctac atcagtgctc tcaggagctg ttgccaacct tagaggctgt 1200
 ggaaggaat cagctgctgt gctcttctgg gtccacattt tcgccatctt ctcaatggt 1260
 ggatggatgg tactctacat taacatactc ttctga 1296

<210> 33
 <211> 1131
 <212> ADN
 <213> Vitis vinifera

5

<400> 33
 atgtgctttc tgggctttct gatggcttcc aagtatgtca atattttgcc tgccagtgga 60
 aggaaacttt tgaatgggtt ggttttttca cttttgcttc cgtgtttgat attctctcaa 120
 ctgggtcaag ccgttacttt gcagaaaatg attgagtggt ggtttattcc tactaatggt 180
 atttgcggca coatagcagg gtcgctaata gggttagtgc tagctacat tattcgtccg 240
 ccatacccat tctttaagtt tacagttata catgttgaa tcgggaacat cgggaatgtg 300
 cctcttgctc tgcttacagc tttatgcaga gaccagaaca acccttttgg tgatgtagac 360
 acttgacca aacaagggc tgcctatata tcattcggcc aatgggttgg tgcaattggt 420
 ttgtacacct atgtatttca aatgcttga cctctctctg aaggtaacct tgaccttgat 480
 gaacaacatc ttccatcaa gggctgtcca aaggatggct cccctgagca agttccgtta 540
 attacacagg aggttttatc atctgatcta aatgcctcaa aacaagggaa gattaaagat 600
 tttttggtt atatgtatga taaattgaag atcaagcaaa ttcttcaacc gctattatt 660
 gcttctatcc tagcattggc aattggtgca attccatttt tgaagaagct gatctttaca 720
 cccaatgctc cgcttttctt cttcactgac agcctcatta ttcttgggga ggccatgatt 780
 coatgcattt tgttggcatt gggaggcaac ttggtcgtat gaccaggaag tcaaaaactt 840
 ggtctacgga cgactactgc tattatttcc gggcggttgg ttttggttcc tcctgctgga 900
 attggcatag tcttgcggc tgataagctt ggctttctcc ccctgatga caagatgttc 960
 cgatttctc tcctctcca acattccatg cccacatctg tgcttctggt tgctatcgcc 1020
 aatttaagag ggtgcggaag agagtacgt gctgtcctct tctgggttca tatctttgca 1080
 atcttctcca tggctggatg gatcgttctt tatctccata tccttctctg a 1131

10

<210> 34
 <211> 1287
 <212> ADN
 <213> Malus domestica

15

ES 2 817 780 T3

<400> 34
atggagaggg ttttgatggc ggtgcatctg gcgaatcaag tccgagggga atcgttactt 60
gggacgatca agatcgcggg gcttcccata gcaaaggttt ttactgtgtg cgccttgggg 120
cttctaattgg ctccaagta tgtcaacatc ttcccagcca gtggaagaaa actcttgaat 180
gggttggtct tctcgtatt gcttccatgt ttgatatttt ctccagcttg acaagccatc 240
accctaaga aaatgctcga gtggtggtt attcccgta atgctgtgat tggtagcact 300
acaggctcca tgataggta tatcgttgca tcaattgtcc gaccaccgta cccctcttc 360
aagtttaca ttatacagat tggaatagga aacatcggga atgtgccact ggttctaatt 420
gcagcttgt gtgagacaa atcaaacctc ttcggtgata cgtgtaaagc agatgggact 480
gcctatattt catttgcca gtgggttgg gcaatcattc tatacacgta tgtatttcaa 540
atgotgtccc cccctcctga aggtacctt gacattgagg agaaagatct cccaatcaaa 600
agccctcaaa acagcacgag catgacacct gaacaaatc cgttgcttac aaatgatgaa 660
aataatgaag agacaacacg tcaagaagag gttgcagaaa ctaaagagga tgcagaaact 720
aactcaaatg atacagataa acctaaagatt acaaagtctc tcgtatttat atacgaaaag 780
ttgaagctca aacaagttct ccaaccacct ataatagctt ctatcctggc catggtactt 840
gtagcgatac catttttaa gaaattgatc ttacatctg atggccact tttcttcttc 900
accgatagct gcagatcctc tggggaagcc atgattccgt gcattctggt ggcattaggt 960
ggcaacctta ttgatggtcc ggaagtcca aaacttggtc tacggacaac tgctgcaatt 1020
atatttgac gactagtctt ggtgccccg gtaggacttg gcattgtaat gtagccgat 1080
aagcttggct tctcctcgc caatgacaaa atgtttcgat ttatcctgct gctccagaac 1140
acaatgcta catctgtcct tgctggtgct gttgcaaatt taagaggctg tggtagagag 1200
gcagctgccg tctgttctg ggtgcacata ttcgccatct tctccatggc cgggtggatc 1260
gtcttgtacc tcaacctact cttctga 1287

- 5 <210> 35
- <211> 1245
- <212> ADN
- <213> *Populus trichocarpa*

10 <400> 35
atggagagat ttttattagc tgtggacacc atgggagcaa atcaggtggg aggaggacag 60
actctcttgg gcaccatcaa aattgctggt ctgccattg ccaaagttt taccatgtgc 120
ttcttgggat ttctcatgac ctccaagtat gttaacatct tgctgctag tggaaagaaa 180
ctcttaaatg ggttgggtgt ttcacttttg ctctctggt tgatattttc tcaacttgg 240

ES 2 817 780 T3

```

caagctgtca ctttacagaa aatgttggag tgggtggtta ttcccgtgaa tgttgttctt    300
agctccatct gtggctcgcct aataggtttt attgttgcac ccattgtccg gccaccttac    360
ccattcttca aattttcoaat tgtacaaatc ggaattggga atattgggaa tgtgccactt    420
gtcttgattg cagctttatg tagagataca tccaaccctt ttggtgactc ggaaaaatgt    480
agcacagatg ggactgctta catctcgttt gcccagtggg ttggtgcaat cattctatac    540
acatatgtat ttaacatggt gccacctcca ccggaaggtta cctttgatat tgatgaaccg    600
aatcttccca tcaagaagcc agccaaagat gctcccatgg agcaagtccc cttgcttgcc    660
caggaggagg caccggcaga accagatgct ccaaagagag ggaagatcaa acagattcct    720
gtctttctct atgacaagtt gaagctcaag caaattcttc agccccctat cattgcttcg    780
atcctageta tgttccttgg tgcagtaccg ttcttgaagc aattgatctt tacaactgat    840
tctccctttt tctttttcac tgacagctgc aatattcttg gggaggccat gattccatgc    900
atthtgttgg cgctaggagg caatctcgtt gatggacctg gaagttctaa acttgggttt    960
cggacaactg ctgctattat ttttggctcg ttggttttgg tgccacctac tggacttggc   1020
attgttatgt tggctgataa gcttggcttc cttcctgctg gtgataagat gttccggttt   1080
gttctgcttc tgcagcatac gatgcctaca tctgtccttt ctggtgctgt ggccaacctc   1140
agaggatgtg gaagagaagc tgcgtctgtc ctattctggg ttcatattht tgctatthtc   1200
tcaatggctg gatggattgt cctttatctc aacatactct tctga                       1245

```

<210> 36
 <211> 506
 <212> ADN
 <213> Petunia hybrida

5

```

<400> 36
caactgggct tagcatagtt atgtagctg ataagcttgg ctctctccc cctgatgata    60
aaatgttcag atthtthtta cttctgcagc atacaatgcc cacatccgta cttctctggtg   120
ctgttgccaa cttagagaggc tgtgggaagg aagcagcttc tgtcttgctc tgggttcata   180
tctttgctat gttctctatg gccggatgga tcaccctota tctcaagatt ctcttttgag   240
ttagaatcag cgggtgttga gccaaagcaa ggatctcgtg ggagaaatth tgttcctctt   300
ccaagatcgt gcctgtctgt ccaaagttgc ttttggcttc aattccaagc cattgttctc   360
tatagtacaa aacagatgta ttgattatgt aggatgacca actacaacta taaataatth   420
ttgatagtga agaattgatc ttattgcttg ttcaaaacta aaaaaaaaaa aaaccaaaaa   480
actacgacaa gtgagtagac aggacc                                           506

```

10

<210> 37
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

20

<400> 37
 ctgggcttag catagttatg t 21

25

<210> 38
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 38

ttgagataga ggggatcca t 21

5 <210> 39
 <211> 223
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Amplicón derivado de petunia

<400> 39
 ctgggcttag catagttatg ttagctgata agcttggtt ccttccccct gatgataaaa 60
 tgttcagatt tgttttactt ctgcagcata caatgcccac atccgtactt tctggtgctg 120
 ttgccaaactt gagaggctgt gggaaggaag cagcttctgt cttgttctgg gttcatatct 180
 ttgctatggt ctctatggcc ggatggatca ccctctatct caa 223

15 <210> 40
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 40
 ggggacaagt ttgacaaaa aagcaggctc tgggcttagc atagttatgt 50

25 <210> 41
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 41
 ggggaccact ttgacaaga aagctgggtt tgagatagag gggatccat 50

35 <210> 42
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Cucumis melo

40 <220>
 <221> característica_misc
 <223> Duplicado en melón no amargo

45 <400> 42
 ttaattgtg ca 12

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula de planta o una planta que comprende una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad con un polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO:2 y un elemento regulador que actúa en cis para dirigir la transcripción de dicha secuencia de ácido nucleico en dicha planta, en donde dicho polipéptido modula la acidez de la planta y en donde la planta es de una familia de plantas seleccionada del grupo que consiste en Solanaceae, Cucurbitaceae, Rutaceae, Rosaceae, y Vitaceae.
- 10 2. La célula de planta o la planta de la reivindicación 1, en donde una planta de dicha familia de plantas se selecciona del grupo que consiste en melón, tomate, manzana, uva, fresa, naranja, melocotón, y petunia.
- 15 3. Un método para generar una planta transgénica, que comprende expresar en la planta una construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad con un polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO:2 y un elemento regulador que actúa en cis para dirigir la transcripción de dicha secuencia de ácido nucleico en dicha planta, en donde dicho polipéptido modula la acidez de la planta, generando de esta manera la planta transgénica, en donde la planta transgénica es de una familia de plantas seleccionada del grupo que consiste en Solanaceae, Cucurbitaceae, Rutaceae, Rosaceae, y Vitaceae.
- 20 4. Un método para incrementar la acidez de una planta, que comprende expresar en la planta una construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad con un polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO:2 y un elemento regulador que actúa en cis para dirigir la transcripción de dicha secuencia de ácido nucleico en dicha planta, en donde dicho polipéptido regula al alza la acidez de la planta, incrementado de esta manera la acidez de la planta, en comparación con plantas no transformadas de la misma especie que se crecen en las mismas condiciones de crecimiento.
- 25 5. Un método para disminuir la acidez de una planta, que comprende regular a la baja el nivel de expresión de un polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad con un polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO:2, disminuyendo de esta manera la acidez de la planta, en comparación con plantas no transformadas de la misma especie que se crecen en las mismas condiciones de crecimiento, en donde dicha regulación a la baja se realiza transformando una célula de la planta de la planta con un polinucleótido capaz de regular a la baja el nivel de expresión del polipéptido.
- 30 6. Un método para identificar una variación de ácido nucleico asociada con acidez disminuida de una planta, que comprende identificar en al menos una planta de una pluralidad de plantas una mutación de pérdida de función en a polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad con un polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO:2, en donde dicho polipéptido modula la acidez de una planta, identificando de esta manera la variación de ácido nucleico asociada con la acidez disminuida de la planta.
- 35 7. La célula de la planta, planta o método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho polipéptido es como se muestra en la SEQ ID NO:2.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en donde la planta es de una familia de plantas seleccionada del grupo que consiste en Solanaceae, Cucurbitaceae, Rutaceae, Rosaceae, y Vitaceae.
9. El método de la reivindicación 8, en donde una planta de dicha familia de plantas se selecciona del grupo que consiste en melón, tomate, manzana, uva, fresa, naranja, melocotón, y petunia.

FIG. 1A

> melón agrio

ATGGACATGG AAAGATTTCT CTCAGCCATC GTCTCGGAAG TTCAAGCGGG AGGGA ACTCT
 CTGCTTGTC CTATTAAGAT TGCTGTGTTA CCCATAGCCA AAGTTTTAC TATGTGCTTT
 CTGGGTTTTT TTATGGC ATC TAAATATGTC AACATCTTGC CTGCAAGTGG AAGGAAGCTT
 TTGAATGGGT TGGTCTTTTC GCTTTTGCTT CCATGTTTAA TATTCTCTCA GCTCGGGCAA
 GCTATTACTC TCGAGAAAAT GCTTAAATGG TGGTTTATTC CTGCAAACGT TGTTCTGGCT
 TCGATATCAG GTTCCCTAAT TGGATTAATT GTTGCAATTA TTGTTCTGTC TCCATACCCC
 TTCTTCAAGT TCACAATTGT ACAAATTGGA ATTGGGAACA TTGAAATGT GCCTCTCGTT
 CTCATTGCAG CTCTATGTAG AGATGATATG AATCCTTTG GTGATGAAGA GAAATGTAGC
 ACTGATGGGA TTGCTTATAT TTCATATGGC CAGTGGGTTG GTGCAATTAT CCTGTACACC
 TATGTTTATG CGATGCTGGC ACCTCCACCT GAGGGTACAT TTGACATCAA AGATCAAAAT
 ATTCCAGTTA AGAATCTGCT AAAGGATAAT ACGCCTGCAC ATGTTCCCTT GCTCATTCAG
 GAGGTAGCTT CAAAATATCC GGATGCTCCT AAGAAGGAAG AGACTAAGGG CTCCTTATG
 TATTGGTTTG ACAAATTGAA GCTCAAGCAA ATTTTTTCAG CTCCTATCAT TGCTTCGGTC
 CTAGCTATGT TATTGGGTGC AACTCCATTC TTAAGGCGAT TGATCTTTAC TCCTGATGCT
 CCATTGTTTT TCTTCACTGA TAGCTGCATA ATGCTCGGGG AGGCTATGAT TCCATGTATC
 CTGTTGGCAT TGGGAGGAAA CCTCGTTGAA GGTCTTGAA GTTCAAACT CGGGCTACGG
 ACTACCGCTG CTGTTATTTT TGCAAGGTTG GTTTTGGTTC CTCCTGCAGG GGTTGGCATA
 GTCATGTTAG CCGACAAGCT TGGCTTCCTT CCTCCAGATG ATAAAATGTT CCGATTCGTT
 CTTCTTCTTC AGCATTCGAT GCCAACATCT GTCCTCTCGA GTGCTGTGGC TACTTTGAGG
 GGTTGTGGTA GAGAATCTGC TGCTATTCTT TTCTGGGTTT ATATATTTGC CGTCATCTCA
 ATGGCAGGGT GGTTTCATCCT CACTTTCAGG AACTCTTCT AA (SEQ ID NO:1)

FIG. 1B

> melón agrio

MERFLSAIVS EVQAGGNSLL VTIKIAVLPI AKVFTMCFLG FLMASKYVNI LPASGRKLLN
 GLVFSLLLPC LIFSQLGQAI TLEKMLKWWF IPANVVLASI SGSLIGLIVA LIVRPPYPFF
 KFTIVQIGIG NIGNVPLVLI AALCRDDMNP FGDEEKSTD GIAYISYGQW VGAIILYTYV
 YAMLAPPPEG TFDIKDQNI VKNLLKDNT AHVPLLIQEV ASKYPDAPK EETKGFMYW
 FDKLKLKQIF QPPIIASVLA MLLGATPFLR RLIFTPDAPL FFFTDSCIML GEAMIPCILL
 ALGGNLVEGP GSSKLGLRRT AAVIFARLVL VPPAGVGIVM LADKLGFLPP DDKMFRVLL
 LQHSMPSTVL SSAVATLRGC GRESAAILFW VHIFAVISMA GWFILYFRIL F (SEQ ID
 NO:2)

FIG. 1C

> melón no agrio

```

ATGGACATGG AAAGATTTCT CTCAGCCATC GTCTCGGAAG TTCAAGCGGG AGGGAACTCT
CTGCTTGTC CTATTAAGAT TGCTGTGTTA CCCATAGCCA AAGTTTTAC TATGTGCTTT
CTGGGTTTTT TTATGGCATC TAAATATGTC AACATCTTGC CTGCAAGTGG AAGGAAGCTT
TTGAATGGGT TGGTCTTTTC GCTTTTGCTT CCATGTTTAA TATTCTCTCA GCTCGGGCAA
GCTATTACTC TCGAGAAAAT GCTTAAATGG TGGTTTATTC CTGCAAACGT TGTTCCTGGCT
TCGATATCAG GTTCCCTAAT TGGATTAATT GTTGCATTAA TTGTTGCATT AATTGTTTCGT
CCTCCATACC CCTTCTTCAA GTTCACAATT GTACAAATTG GAATTGGGAA CATTGGAAAT
GTGCCTCTCG TTCTCATTGC AGCTCTATGT AGAGATGATA TGAATCCTTT TGGTGATGAA
GAGAAATGTA GCACTGATGG GATTGCTTAT ATTTTCATATG GCCAGTGGGT TGGTGCAATT
ATCCTGTACA CCTATGTTTA TGCATGCTG GCACCTCCAC CTGAGGGTAC ATTTGACATC
AAAGATCAAA ATATTCCAGT TAAGAATCTG CTAAAGGATA ATACGCCTGC ACATGTTCCC
TTGCTCATTG AGGAGGTAGC TTCAAATAT CCGGATGCTC CTAAGAAGGA AGAGACTAAG
GGCTTCCTTA TGTATTGGTT TGACAAATTG AAGCTCAAGC AAATTTTCA GCCTCCTATC
ATTGCTTCGG TCCTAGCTAT GTTATTGGGT GCAACTCCAT TCTTAAGGCG ATTGATCTTT
ACTCCTGATG CTCCATTGTT TTTCTTCACT GATAGCTGCA TAATGCTCGG GGAGGCTATG
ATTCCATGTA TCCTGTTGGC ATTGGGAGGA AACCTCGTTG AAGGTCCTGG AAGTTCAAAA
CTCGGGCTAC GGACTACCGC TGCTGTTATT TTTGCAAGGT TGGTTTTGGT TCCTCCTGCA
GGGGTTGGCA TAGTCATGTT AGCCGACAAG CTTGGCTTCC TTCCTCCAGA TGATAAAATG
TTCCGATTCG TTCTTCTTCT TCAGCATTCG ATGCCAACAT CTGTCTCTC GAGTGCTGTG
GCTACTTTGA GGGGTTGTGG TAGAGAATCT GCTGCTATTC TTTTCTGGGT TCATATATTT
GCCGTCATCT CAATGGCAGG GTGGTTCATC CTCTACTTCA GGATACTCTT CTA (SEQ ID
NO:3)

```

FIG. 1D

> melón no agrio

```

MERFLSAIVS EVQAGGNSLL VTIKIAVLPI AKVFTMCFLG FLMASKYVNI LPASGRKLLN
GLVFSLLLPC LIFSGLGQAI TLEKMLKWWF IPANVVLASI SGSLIGLIVA LIVALIVRPP
YPFKFTIVQ IGIGNIGNVP LVLIAALCRD DMNPFGDEEK CSTDGIAYIS YGQWVGAILL
YTYVYAMLAP PPEGTFDIKD QNIPVKNLLK DNTPAHVPLL IQEVASKYPD APKKEETKGF
LMYWFDKLLK KQIFQPPIIA SVLAMLLGAT PFLRRLIFTP DAPLFFFTDS CIMLGEAMIP
CILLALGGNL VEGPGSSKLG LRTTAAVIFA RLVLVPPAGV GIVMLADKLG FLPPDDKMFR
FVLLLQHSMP TSVLSSAVAT LRGCGRESAA ILFWVHIFAV ISMAGWFILY FRILF (SEQ ID
NO:4)

```

FIG. 1E

Variedad no agría	MDMERFLSAIVSEVQAGGNSLLVTIKIAVLPIAKVFTMCFLGFLMASKYV	50
Variedad agría	MDMERFLSAIVSEVQAGGNSLLVTIKIAVLPIAKVFTMCFLGFLMASKYV	50
Variedad no agría	NILPASGRKLLNGLVFSLLLPCLIQSGLGQAITLEKMLKWWFIPANVVLA	100
Variedad agría	NILPASGRKLLNGLVFSLLLPCLIQSGLGQAITLEKMLKWWFIPANVVLA	100
Variedad no agría	SISGSLIG LIVAL LIVALIVRPPYPFFKFTIVQIGIGNIGNVPLVLIAALC	150
Variedad agría	SISGSLIG...LIVALIVRPPYPFFKFTIVQIGIGNIGNVPLVLIAALC	146
Variedad no agría	RDDMNPFGDEEKCS TDGIAYISYGQWVGAIILYTYVYAMLAPPPEGTFDI	200
Variedad agría	RDDMNPFGDEEKCS TDGIAYISYGQWVGAIILYTYVYAMLAPPPEGTFDI	196
Variedad no agría	KDQNI PVKNLLKDNTPAHVPLLIQE VASKYPDAPKKEETKGFLMYWFDKL	250
Variedad agría	KDQNI PVKNLLKDNTPAHVPLLIQE VASKYPDAPKKEETKGFLMYWFDKL	246
Variedad no agría	KLKQIFQPPIIASVLAMLLGATPFLRRLIFT PDAPLFFFTDSCIMLGEAM	300
Variedad agría	KLKQIFQPPIIASVLAMLLGATPFLRRLIFT PDAPLFFFTDSCIMLGEAM	296
Variedad no agría	IPCILLALGGNLVEGPGSSKLGLRRTTAAVIFARLVLPVPPAGVGIVMLADK	350
Variedad agría	IPCILLALGGNLVEGPGSSKLGLRRTTAAVIFARLVLPVPPAGVGIVMLADK	346
Variedad no agría	LGFLPPDDKMFREFVLLLQHSMPSTVLSSAVATLRGCGRESAAILFWVHIF	400
Variedad agría	LGFLPPDDKMFREFVLLLQHSMPSTVLSSAVATLRGCGRESAAILFWVHIF	396
Variedad no agría	AVISMAGWFILYFRILF (SEQ ID NO:4)	417
Variedad agría	AVISMAGWFILYFRILF (SEQ ID NO:2)	

FIG. 2A

>Tomate TC200226

MDRVSRI LFSVLTEPQRGGQSFITSIKIAVLPIAKVFTLCFLGFLMASKYVNILPANGRK
 LLNGLVFSLLLPCLI FSQLGQAITTEKLLQWVFI PVNIVLATIFGSI IGLIVATIVRPPY
 PYFKFTIIQIGIGNIGNVPLVLI AALCRDPSNPFQDSEICARDGNAYISFGQWVGAILLY
 TFVFMQLSPPPEGSFDVEDANLPIKVPNKERLPSHPSGSSAEQVPLLATNVAPADSSSSN
 KEKVKQFFKFLYETLKLKQLIQPPIIASIIAIIIGCVPLKRLIFTSDAPLYFFTDSCLI
 LGDAMI PCILLALGNNLVDGPGPGSSKIGLKTVAIVFAPVVFSSNWTQIVMLADKLGFL
 LPADDKMFRFVLLQYSMPTSILAGAVANLRGCGKEAASILFWVHIFAVISMAGWII LYL
 NILF (SEQ ID NO:5)

FIG. 2B

>Pepino Csa01116

MENFLSAIVSEVQAGNSLLVTIKIAVLPIAKVFTMCFLGFLMASKYVNILPASGRKLLNGLVFSLLLPCLI FSQLGQAI
 TLEKMLKWWFIPANVVLASISGSLIGLIVASIVRPPYPFFKFTIVQIGIGNIGNVPLVLI AALCRDDMNPFGDEEKSTD
 GIAYISYGQWVGAILLYTYVYAMLAPPEGTFDIKDQNI SVKNLLKDNTPAHVPLLIQEV PSTYPDAPKKEEYDMEYK
 CNNDNKTSTYFHNGIILSTLGI FPHSLTFGITQKTKGFLIYWFDKLKLKQMFOPPIVÄSVLAML LGATPFLRRLIFT PDA
 PLFFFTDSCIMLGEAMIPCI LLALGNNLVEGPGSSKLGRLRTAAIIFARLVLVPPAGLGIVMLADKLGFLPPDDKMFRFV
 LLLQHSMPSTVLS SAVATLRGCGKDSAILFWVHIFSVISMAGWFILYFRILF (SEQ ID NO:6)

FIG. 2C

>Melón dulce

MERFLSAIVSEVQAGNSLLVTIKIAVLPIAKVFTMCFLGFLMASKYVNILPASGRKLLNGLVFSLLLPCLI FSQLGQAI
 TLEKMLKWWFIPANVVLASISGSLIGLIVALIVALIVRPPYPFFKFTIVQIGIGNIGNVPLVLI AALCRDDMNPFGDEEK
 CSTDGIAYISYGQWVGAILLYTYVYAMLAPPEGTFDIKDQNI PVKNLLKDNTPAHVPLLIQEVASKY PDAPKKEETKGF
 LMYWFDKLLKQIFQPPPIIASVLAMLLGATPFLRRLIFT PDAPLFFFTDSCIMLGEAMIPCI LLALGNNLVEGPGSSKLG
 LRTTAAVIFARLVLVPPAGVGVMLADKLGFLPPDDKMFRFVLLQHSMPSTVLS SAVATLRGCGRESAAILFWVHIFAV
 ISMAGWFILYFRILF (SEQ ID NO:4)

FIG. 2D

>manzana TC80539

MERILAAVEVVNQAGGESLLGTIKIAVLPIAKVFTVCSLGLLMASKYVNI FPASGRKLLNGLVFSLLLPCLI FSQLGQAI
 TLQKMLEWVFI PVNVVIGSTGSI IGYIVASLVHPPYPFFKFTIVQIGIGNIGNVPLVLI SALCRDKNPFGDSTCKTD
 GTÄYISFGQWVGAILLYTYVFQMLSPPEGTFDVEEKELPIKSPRNQTT PDQVPLLPDENEETARKEEVAETESNASN
 KPKITKFFLFIYEKLLKQVLQPPPIIASILAMVLGTIPFLKLI FTSDGPLFFFTDSCII LGEAMIPCI LLALGNNLVDG
 PGSSKLGRLRTAAIIFARLVLVPPVGLGVVMLADKLGFLPPNDQMF RFVLLQHTMPTSVLAGAVANLRGCGREAAAVLF
 WVHIFAI FISMAGWIVLYLNILF (SEQ ID NO:8)

FIG. 2E

>Álamo EEF05451

MERFLLAVDTMGANQVGGGOTLLGTIKIAVLPIAKVFTMCFLGFLMASKYVNILPASGRKLLNGLVFSLLLPCLI FSQLG
 QAVTLQKMLEWVFI PVNVVLSICGSLIGFIVASIVRPPYPFFKFSIVQIGIGNIGNVPLVLI AALCRDTSNPFQDSEKC
 STDGTÄYISFGQWVGAILLYTYVFNMLAPPEGTFDIDPNLPIKPKADAPMEQVPLLAQEEAPAE PDAPKRGKIKQIL
 VFLYDKLKLKQILQPPPIIASILAMFLGAVPFLKQLIFTTDSPLFFFTDSCNII LGEAMIPCI LLALGNNLVDGPGSSKLGFL
 RTTAAIIFGRVLVLPPTGLGIVMLADKLGFLPAGDKMFRFVLLQHTMPTSVLSGAVANLRGCGREAAAVLFWVHIFAI F
 SMAGWIVLYLNILF (SEQ ID NO:9)

FIG. 2F

>Arabidopsis NP_195819

MIARILAA LADSMEMPVAAGGGSVLGTIKIAVMP IAKVFTMCFLGFLMASKYVNILPPSGRKLLNGLVFSLLLPCLI FSQLG
 LQAVTLQKMLEWVFI PVNVVLTISGSI IGFIVASIVRPPYPYFKFTIIQIGVGNIGNVPLVLI AALCRDTSNPFQDSE
 KCSIDGTÄYISFGQWVGAILLYTYVYQMFAPPPEGFDAEENLALKTL PVDAAPEQVPLLTQNFKDFSP TQDLLPVQST
 EPRGRGVS RKGKIAQIFVFLYEKLLKQIVQPAIVASILAMILGAI PFTKLI FTNGAPLFFFTDSCMILGDAMI PCILL
 ALGNNLNGPGSSKLGFKTTAAI IIGRVLVPPVGLGIVTVADKLGFLPADDKMFRFVLLQHTMPTSVLSGAVANLRGCG
 RESAAVLFVWHIFAI FISMAGWVLYINILF (SEQ ID NO:10)

Proteína de melón agrio

Longitud de la secuencia: 411
 # Número de TMH predichos en la secuencia: 10
 # Número esperado de AA de la secuencia en TMH: 206,37398
 # Número esperado en la secuencia, primeros 60 AA: 25,36188
 # Prob total en la secuencia de N-en: 0,63207
 # Secuencia señal N-term POSIBLE en la secuencia

Secuencia	TMHMM2.0	interior	1	20
Secuencia	TMHMM2.0	héliceTM	21	43
Secuencia	TMHMM2.0	exterior	44	57
Secuencia	TMHMM2.0	héliceTM	58	77
Secuencia	TMHMM2.0	interior	78	89
Secuencia	TMHMM2.0	héliceTM	90	112
Secuencia	TMHMM2.0	exterior	113	121
Secuencia	TMHMM2.0	héliceTM	122	144
Secuencia	TMHMM2.0	interior	145	162
Secuencia	TMHMM2.0	héliceTM	163	185
Secuencia	TMHMM2.0	exterior	186	251
Secuencia	TMHMM2.0	héliceTM	252	274
Secuencia	TMHMM2.0	interior	275	280
Secuencia	TMHMM2.0	héliceTM	281	303
Secuencia	TMHMM2.0	exterior	304	322
Secuencia	TMHMM2.0	héliceTM	323	342
Secuencia	TMHMM2.0	interior	343	354
Secuencia	TMHMM2.0	héliceTM	355	377
Secuencia	TMHMM2.0	exterior	378	386
Secuencia	TMHMM2.0	héliceTM	387	409
Secuencia	TMHMM2.0	interior	410	411

FIG. 4A

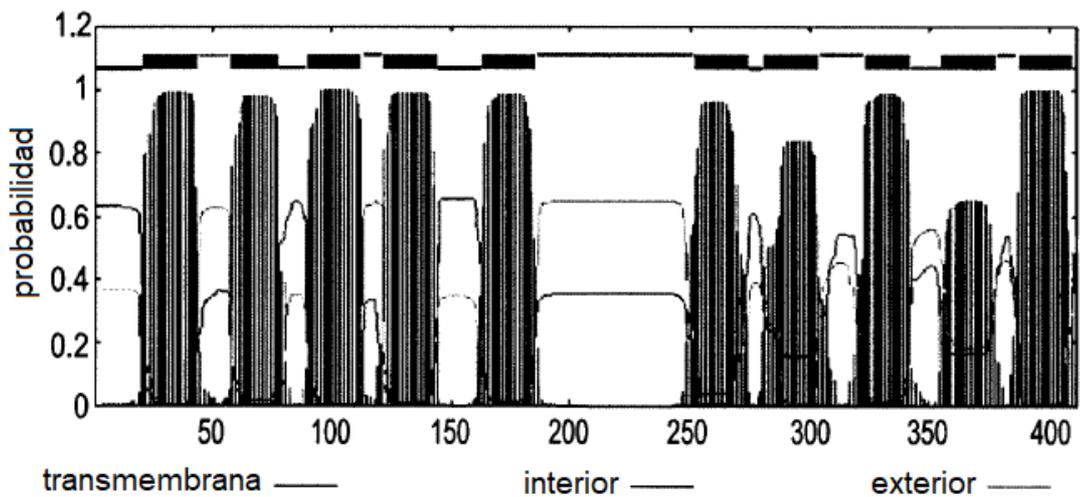


FIG. 4B

Proteína de melón no agrio

Longitud de la secuencia: 415
 # Número de TMH predichos en la secuencia: 9
 # Número esperado de AA de la secuencia en TMH: 209,1751
 # Número esperado en la secuencia, primeros 60 AA: 24,97444
 # Prob total en la secuencia de N-en: 0,29853
 # Secuencia señal N-term POSIBLE en la secuencia

Secuencia	TMHMM2.0	exterior	1	19
Secuencia	TMHMM2.0	héliceTM	20	42
Secuencia	TMHMM2.0	interior	43	57
Secuencia	TMHMM2.0	héliceTM	58	80
Secuencia	TMHMM2.0	exterior	81	94
Secuencia	TMHMM2.0	héliceTM	95	117
Secuencia	TMHMM2.0	interior	118	123
Secuencia	TMHMM2.0	héliceTM	124	146
Secuencia	TMHMM2.0	exterior	147	165
Secuencia	TMHMM2.0	héliceTM	166	188
Secuencia	TMHMM2.0	interior	189	257
Secuencia	TMHMM2.0	héliceTM	258	277
Secuencia	TMHMM2.0	exterior	278	291
Secuencia	TMHMM2.0	héliceTM	292	311
Secuencia	TMHMM2.0	interior	312	323
Secuencia	TMHMM2.0	héliceTM	324	346
Secuencia	TMHMM2.0	exterior	347	388
Secuencia	TMHMM2.0	héliceTM	389	411
Secuencia	TMHMM2.0	interior	412	415

FIG. 4C

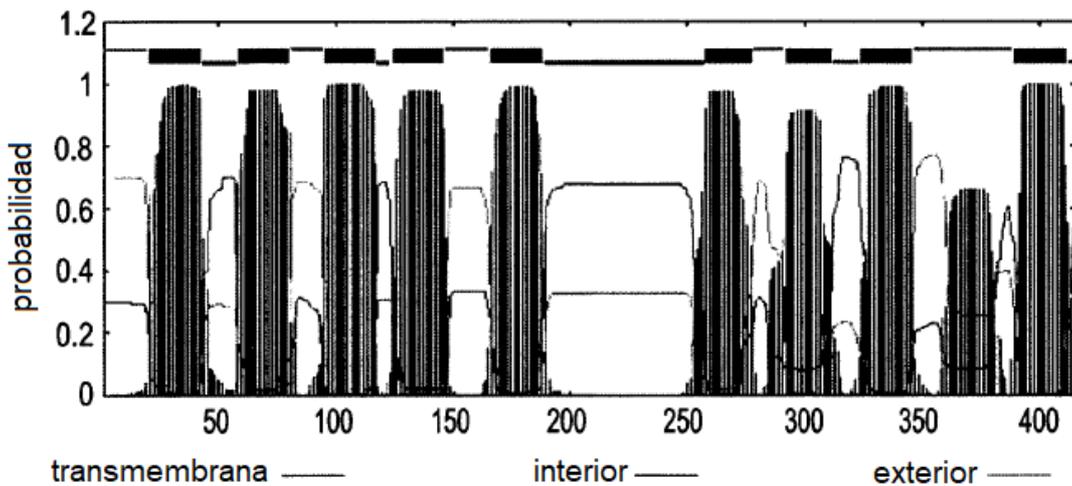


FIG. 4D

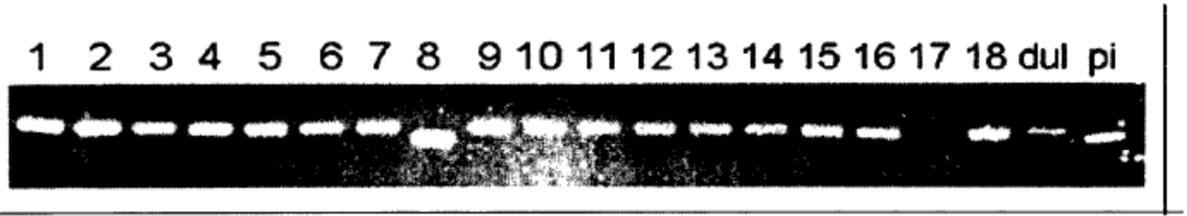


FIG. 5

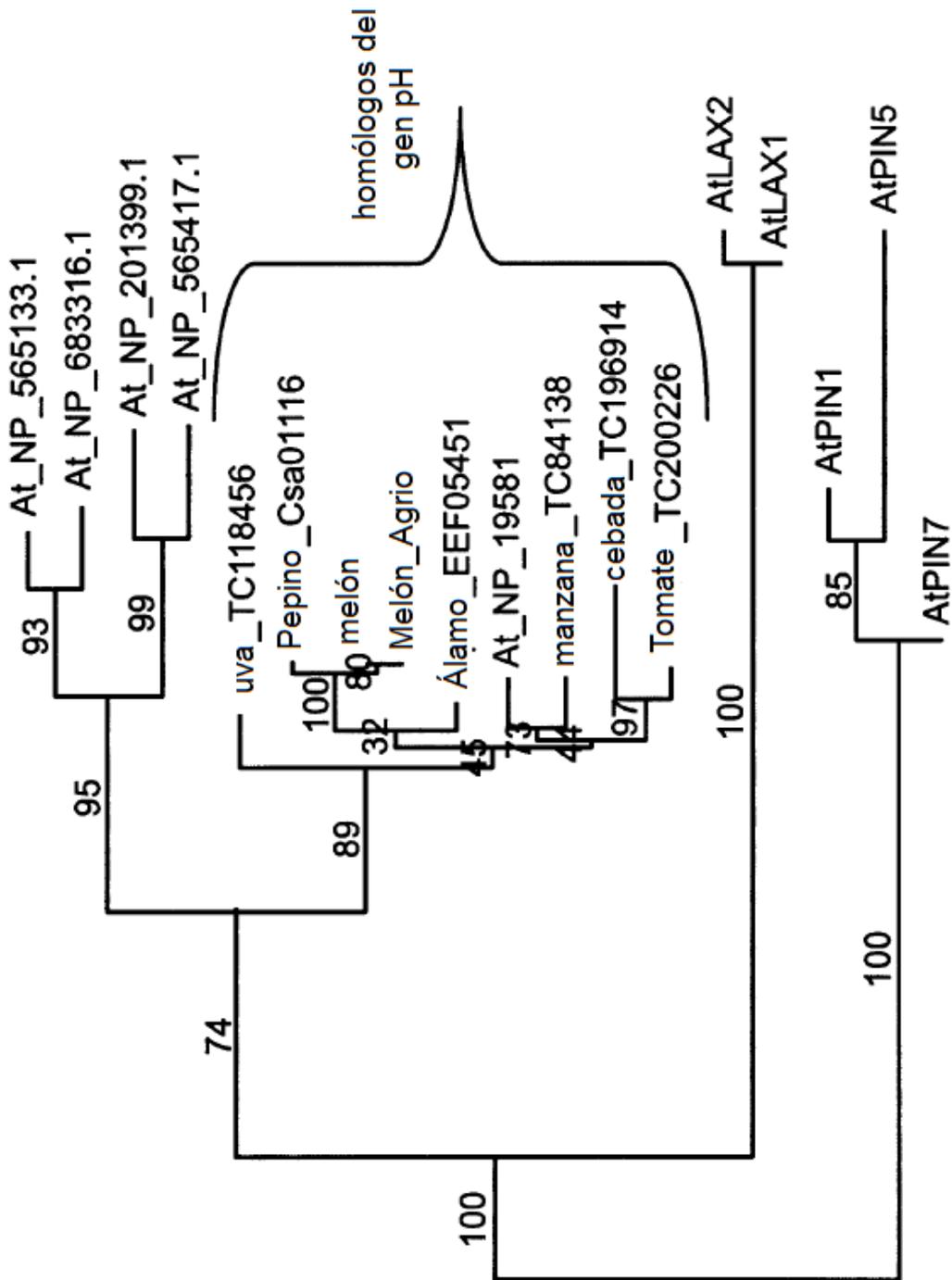


FIG. 6