

MÉTODO PARA PREDECIR EL FENOTIPO DE LA CÁSCARA DE PALMA
MEDIANTE LA DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL EXÓN 1 DEL GEN
SHELL

REFERENCIAS CRUZADAS A APLICACIONES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 62 / 180.042, presentada el de junio de 2015, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia en su totalidad a todos los efectos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] La palma de aceite (*E. guineensis* y *E. oleifera*) se puede clasificar en grupos separados en función de las características de su fruta, y tiene tres tipos de frutas naturales que varían en grosor de membrana y rendimiento de aceite. Las palmas tipo Dura son homocigóticas para un alelo de tipo silvestre del gen de la membrana (sh+/ sh+), tienen una capa gruesa de semilla o membrana (2-8 mm) y producen aproximadamente 5.3 toneladas de aceite por hectárea por año. Las palmas tipo Tenera son heterocigotas para un tipo silvestre y un alelo mutante del gen de la membrana (sh+/ sh-), tienen una capa relativamente delgada rodeada por un anillo de fibra distinto, y producen aproximadamente 7.4 toneladas de aceite por hectárea por año. Finalmente, las palmas tipo *pisífera* son homocigotas para un alelo mutante del gen de la membrana (sh-/ sh-), no tienen cubierta de semilla o membrana, y generalmente son femeninas estériles (Hartley, 1988) (Tabla 1). Por lo tanto, la herencia del gen único que controla el fenotipo de la membrana es un contribuyente principal al rendimiento del aceite de palma.

[0003] Las palmas *Tenera* son híbridos entre los *dura* y palmas *pisífera*. Whitmore (1973) describió las diversas formas de fruta como diferentes variedades de palma de aceite. Sin embargo, Latiff (2000) estuvo de acuerdo con Purseglove (1972) en que las variedades o cultivares propuestos por Whitmore (1973) no ocurren en sentido estricto en esta especie. Como tal, Latiff (2000) propuso el término "raza" para diferenciar *dura*, *pisífera* y *tenera*. La raza fue considerada un término apropiado ya que refleja una microespecie permanente, donde las diferentes razas son capaces de intercambiar genes entre sí, lo que se ha demostrado adecuadamente en las diferentes formas de fruta observadas en la palma de aceite (Latiff, 2000). De hecho, las características de las tres razas diferentes se controlan simplemente por la herencia de un solo gen. Los estudios genéticos revelaron que el gen de la *membrana* muestra una herencia monogénica co-dominante, que es explotable en programas de mejoramiento (Beirnaert y Vanderweyen, 1941).

[0004] El gen de la *membrana* responsable de este fenotipo se informó por primera vez en el Congo belga en la década de 1940 (Beirnaert y Venderweyan, 1941). Sin embargo, las formas de *frutatenara* fueron reconocidas y explotadas en África mucho antes (Devuyst, 1953; Godding, 1930; Sousa et al., 2011). Dado el papel central desempeñado por el gen de la *membrana*, la reproducción de palma aceitera utiliza una selección recurrente recíproca de grupos maternos (*dura*) y paternos (*pisífera*) utilizando el diseño de reproducción de maíz Modelo 1 de Carolina del Norte (Rajanaidu et al. 2000). La población Deli *dura*, descendientes directos de las cuatro palmas africanas originales plantadas en el Jardín Botánico de Bogor, Indonesia (1848), tiene una excelente capacidad de combinación con el

AVROS (Algemene Vereniging van Rubberplanters ter Oostkust van Sumatra) y otras palmas parentales *pisífera*. Las palmas AVROS *pisífera* se derivaron de la famosa palma "Djongo" del Congo, pero más recientemente varias accesiones diferentes de *dura* y *pisífera* también se han obtenido de África (Rajanaidu et al. 2000).

[0005] Los tipos de fruta *Tenera* tienen una proporción más alta de mesocarpio a fruto, lo que se traduce directamente en un rendimiento de aceite significativamente más alto que la 10 palma *dura* o *pisífera* (como se ilustra en la Tabla 1).

Tabla 1: Comparación de formas de frutadura, *tenera* y *pisífera*

Forma de fruta	<i>Dura</i>	<i>Tenera</i>	<i>Pisífera</i> *
Característica			
Espesor de la membrana (mm)	2-8	0.5-3	Ausencia de membrana
Anillo de fibra **	Ausente	Presente	Ausente
Contenido de mesocarpio	35-55	60-96	95
(% de peso del fruto)	7-20	3-15	3-5
Contenido Kernel	16	26	-
(% de peso del fruto)	5.3	7.4	-
Aceite por manojo (%)			
Rendimiento de aceite (t/ha/año)			

* generalmente hembra estéril, los racimos se pudren prematuramente

** el anillo de fibra está presente en el mesocarpio y a menudo se utiliza como herramienta de diagnóstico para diferenciar palmas *dura* y *tenera*. (Fuente: Hardon et al., 1985; Hartley, 1988)

[0006] Dado que el quid de los programas de cría en la palma de aceite es producir materiales de siembra con mayor rendimiento de aceite, la palma *tenera* es la opción preferida para la siembra comercial. Es por esta razón que recursos sustanciales son invertidos por los productores comerciales de semillas para cruzar palmas seleccionadas *dura* y *pisífera* en la producción de semillas híbridas. Y a pesar de los muchos avances que se han logrado en la producción de semillas de aceite de palma híbridas, quedan dos problemas importantes en el proceso de producción de semillas. Primero, lotes de semillas *tenera*, que producirán la alta producción de aceite del tipo de palma *tenera*, a menudo están contaminados con semillas *dura* (Donough and Law, 1995). Hoy, se estima que la contaminación de *dura* de semillas de *tenera* pueden alcanzar tasas de aproximadamente 5% (reducidas de hasta 20-30% a principios de la década de 1990 como resultado de mejores prácticas de control de calidad). La contaminación de semillas se debe en parte a las dificultades de producción pura de semillas *tenera* en condiciones de plantación abierta, donde los trabajadores usan escaleras para polinizar manualmente árboles altos, y donde las flores de palma para un grupo determinado maduran durante un período de tiempo, lo que dificulta la polinización de todas las flores en un racimo con un único evento de polinización manual. Algunas flores del racimo pueden haber madurado antes de la polinización manual y, por lo tanto, pueden haber tenido la oportunidad de ser polinizadas por el viento de un árbol desconocido, produciendo así semillas contaminantes en el racimo. Alternativamente, pueden existir flores prematuras en el racimo en el momento de la polinización manual, y pueden madurar después de la polinización, lo que permite que sean polinizadas por el viento de un árbol desconocido, produciendo así semillas contaminantes

en el racimo. Antes de la invención descrita aquí, no fue posible identificar el tipo de fruta de una semilla dada o una planta dada que surge de una semilla hasta que la planta maduró lo suficiente como para producir un primer lote de fruta, que típicamente toma aproximadamente seis años después de la germinación. En particular, en el intervalo de cuatro a cinco años desde la germinación hasta la producción de fruta, se invierten recursos significativos de tierra, mano de obra, financieros y energéticos en lo que se cree que es árboles de *tenera*, algunos de los cuales finalmente serán de los tipos de fruta contaminante de bajo rendimiento no deseados. En el momento en que se identifican estos árboles subóptimos, no es práctico eliminarlos del campo y reemplazarlos por árboles de *tenera*, y por lo tanto los productores logran rendimientos más bajos de aceite de palma para la vida de producción de 25 a 30 años de los árboles contaminantes. Por lo tanto, la cuestión de la contaminación de lotes de semillas *tenera* con semillas *dura* o *pisífera* es un problema para la reproducción de la palma de aceite, lo que subraya la necesidad de un método para predecir el tipo de fruta de las semillas y las plántulas de vivero con gran precisión.

[0007] Un segundo problema en el proceso de producción de semillas es la inversión que los productores de semillas hacen para mantener líneas de *dura* y *pisífera*, y en los demás gastos incurridos en el proceso de producción de semillas híbridas. Tradicionalmente, no existía una forma conocida de producir un árbol con un fenotipo de membrana óptimo que, al cruzarse consigo mismo o con otro árbol con un fenotipo de membrana óptimo, produjera semillas que solo generarían fenotipos de membrana óptimos. Por lo tanto, existe la necesidad de diseñar árboles para que se reproduzcan de una generación a otra para

obtener un fenotipo de membrana óptimo. También es necesario separar las plantas predichas de *tenera* (p.ej, semillas o plántulas) de cualquier contaminante de plantadura y / o *pisífera* producidas durante el proceso de producción híbrido. Del mismo modo, existe la necesidad de separar las plantas predichas de *dura* de las de *pisífera* y / o plantas predichas de *tenera* de las de *pisífera* de plantas de *dura* y / o *tenera* para mantener existencias reproductoras para producción híbrida.

[0008] El mapeo genético del gen SHELL fue inicialmente intentado por Mayes *et al.* (1997). Un segundo grupo en Brasil, utilizando una combinación de análisis de segregación voluminosa (BSA) y mapeo genético, informó de dos marcadores de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) que flanquean el locus de la membrana (Moretzsohn). *et al.*, 2000). Más recientemente, Billotte *et al.*, (2005) reportó un mapa de ligamiento de alta densidad basado en la repetición de secuencia simple (SSR) para la palma de aceite, involucrando un cruce entre una palma de membrana delgada *E. Guineensis* (*tenera*) y una palma de *E. guineensis* (*dura*) de membrana gruesa. Una solicitud de patente presentada por el Malaysian Palm Oil Board (MPOB) describe la identificación de un marcador utilizando tecnología de fragmentos de restricción, en particular un marcador de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) vinculado al gen de la membrana para la identificación y cría de plantas (RAJINDER SINGH, LESLIE OOI CHENG-LI, RAHIMAH A. RAHMAN Y LESLIE LOW ENG TI. 2008. Método para la identificación de un marcador molecular vinculado al gen de la membrana de palma de aceite, Solicitud de Patente No. PI 20084563. Patente presentada el 13 de noviembre de 2008). El marcador RFLP (SFB 83) se identificó

mediante la generación o construcción de un mapa genético para un tipo de fruta de palma *tenera*. Las publicaciones de solicitud de patente US 2013/024729 y US 2015/0037793, presentadas por MPOB, describen la identificación del gen SHELL, dos alelos *pisífera* (*shAVROS* y *shMPOB*) y métodos para predecir el fenotipo de forma de fruta mediante la detección de tipo silvestre y alelos *pisífera* del gen SHELL.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0009] Aquí describimos la identificación de nuevos alelos del gen SHELL responsables de diferentes fenotipos de formas de frutos y métodos para predecir o determinar el fenotipo de membrana de una planta de palma (que incluye, pero no se limita a una planta de palma entera o semilla de palma). El gen SHELL es un gen MADS-box de palma de aceite sustancialmente similar a *Arabidopsis* SEEDSTICK (STK), también conocido como AGAMOUS-like 11 (AGL11), así como para *Arabidopsis* SHATTERPROOF (SHP1), también conocido como 30 AGAMOUS-like 1 (AGL1).

[0010] Dos alelos SHELL, *shMPOB* y *shAVROS*, han sido identificados previamente ya sea como resultado en la forma de fruto preferida de *tenera* cuando está presente en una palma de aceite que tiene una copia de un alelo mutante y un alelo de tipo silvestre. Por ejemplo, palmas oleosas heterocigotas incluyendo el alelo SHELL de tipo silvestre, *ShDeliDura*, en un cromosoma y cualquiera de los dos alelos mutantes SHELL en el otro cromosoma muestra un fenotipo *tenera*.

[0011] Aquí se describen nueve mutaciones adicionales en el exón uno del gen SHELL, denominadas alelos SHELL tres (3), cuatro (4), cinco (5), seis (6), siete (7), ocho (8), nueve

(9), diez (10) y once (11). Las secuencias de aminoácidos del producto del gen SHELL resultante de los alelos 3-11 se representan en las SEQ ID NOs: 3-11, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos para el exón 1 del gen SHELL para los alelos 3-11 se representan en las SEQ ID NOs: 13-21, respectivamente. Como con los alelos *shMPOB* y *shAVROS*, la presencia de estos alelos SHELL puede dar como resultado un fenotipo *tenera* cuando es heterocigoto con un alelo natural o un fenotipo *pisífera* cuando es homocigoto o heterocigoto con otro alelo SHELL no funcional.

[0012] En referencia a la SHELL de tipo silvestre (*ShDeliDura*) gen, el polimorfismo del alelo 3 es una adenosina a la mutación de citosina (A→C) en la posición de nucleótido 67 del exón 1 del gen SHELL. El alelo 3 da como resultado una sustitución de lisina a glutamina dentro del dominio de MADS box conservado de SHELL. Como se diagrama en la FIG. 1, todo el dominio de la MADS box de SHELL está codificado por el exón 1 del gen SHELL. La variante de aminoácidos se produce en 6 aminoácidos N-terminal a la sustitución de aminoácidos que surgen del alelo *sh^{MPOB}*, 8 aminoácidos N-terminal a la sustitución de aminoácidos que surgen del alelo *shAVROS*, y en la posición 23 del marco de lectura abierto traducido del exón 1 (Figuras 2 y 3).

[0013] Del mismo modo, el polimorfismo del alelo 4 es una citosina a la mutación de la adenosina (C→A) en la posición de nucleótidos 122 del exón 1 del gen SHELL. El alelo 4 da como resultado una sustitución de alanina por aspartato dentro del dominio de MADS box conservado de SHELL. La variante de aminoácido se produce en la posición 41 del marco de lectura abierto traducido del exón 1 (Figuras 2 y 3).

[0014] El polimorfismo del alelo 5 es una adenosina a la mutación de la timina (A→T) en la posición de nucleótido 69 del exón 1 del gen SHELL. El alelo da como resultado una mutación de lisina a asparagina en la posición 23 del marco de lectura abierto traducido del exón 1 (Figuras 2 y 3). El polimorfismo del alelo 6 es una guanósina a la mutación de la citosina (G→C) en la posición 34 del exón 1 del gen SHELL. El alelo 6 da como resultado una mutación de glutamato a glutamina en la posición 12 del marco de lectura abierto traducido del exón 1 (Figuras 2 y 3). El polimorfismo del alelo 7 es una delección de quince nucleótidos en las posiciones 23-37 del exón 1 del gen SHELL (o nucleótidos 22-25 36 porque la alineación del espacio es ambigua). El alelo 7 da como resultado una eliminación en marco de cinco aminoácidos en las posiciones 8 a 12 del marco de lectura abierto traducido del exón 1 (Figuras 2 y 3). Las posiciones de aminoácidos 8 a 12 del gen SHELL están codificadas por los nucleótidos 22-36. El polimorfismo del alelo 8 es una guanósina a la mutación de la adenosina (G→A) en la posición 71 del exón 1 del gen SHELL. El alelo 8 da como resultado una mutación de arginina a histidina en la posición 24 del marco de lectura abierto traducido del exón 1 (Figuras 2 y 3).

[0015] El polimorfismo del alelo 9 es una citosina de la mutación de la guanósina (C→G) en la posición 70 del exón 1 del gen SHELL. El alelo 9 da como resultado una mutación de arginina a glicina en la posición 24 del marco de lectura abierto traducido del exón 1. El polimorfismo del alelo 10 es una timina a la mutación de la adenosina (T→A) en la posición 110 del exón 1 del gen SHELL. El alelo 10 da como resultado una mutación de valina a aspartato en la posición 37 del marco de lectura abierto traducido del exón 1 (Figuras 2 y 3).

[0016] El polimorfismo del alelo 11 es una timina a la mutación de la citosina (T→C) en la posición 114 del exón 1 del gen SHELL. El alelo 11 es una mutación silenciosa ya que no afecta a la secuencia de aminoácidos resultante del producto del gen SHELL (Figuras 2 y 3). Esta mutación se puede detectar para confirmar o predecir la presencia o ausencia de un producto del gen SHELL de tipo silvestre y, por lo tanto, predecir un fenotipo *dura* cuando es homocigotos o heterocigotos con otro alelo de tipo silvestre en una planta de palma y un fenotipo *tenera* cuando es heterocigoto con un alelo SHELL inactivo. Alternativamente, en algunas realizaciones, esta mutación puede afectar la expresión génica y / o la regulación transcripcional o traduccional del gen SHELL. Por consiguiente, en tales realizaciones, la 30 mutación puede correlacionarse con un *pisífera* cuando es homocigoto o heterocigoto con un alelo SHELL inactivo en una presencia del fenotipo *pisífera* de membrana. En algunos casos, el genotipo del marcador polimórfico puede comprender uno o más de los pronosticados genotipos de alelos *pisífera* representados en SEQ ID NOs: 13-21.

[0017] También se describe aquí una mutación en el intrón 1 del gen SHELL que se ha descubierto en un subconjunto de plantas de palma de aceite que tienen la mutación del alelo 3. Esta mutación se denomina aquí alelo 12 y se representa en SEQ ID NO: 12. La mutación da como resultado la eliminación de cuatro nucleótidos en las posiciones 43-46 del intrón 1 de gen SHELL de tipo silvestre (Sh^{DeliDura}). La mutación puede ser silenciosa ya que puede no contribuir por sí misma a la presencia o ausencia de un fenotipo de forma de fruta SHELL (p.ej, *dura*, *tenera*, o *pisífera*) Sin embargo, debido a la distancia física

cercana (*es decir*, vinculación genética) entre la mutación del intrón 1 y el exón 1, la contribución del plasma germinal parental que se sabe que tiene un alelo SHELL particular (de tipo silvestre o mutante) dentro del exón 1 y el marcador del intrón 1 puede rastrearse con un alto grado de confianza en la progenie mediante la detección de la mutación del alelo 12 en lugar de una mutación en el exón 1. Además, en algunos casos, la mutación en el intrón 1 puede estar en desequilibrio de ligamiento con el exón 1 o una parte del mismo. Alternativamente, el alelo puede alterar la regulación transcripcional o empalme y así exhibir un fenotipo *pisífera* SHELL cuando es homocigoto o fenotipo *tenera* cuando es heterocigoto con un alelo SHELL de tipo silvestre.

[0018] Las proteínas nucleares, como los factores de transcripción, deben ser transportadas activamente y retenidas dentro del núcleo para que sean funcionales. El mecanismo de localización nuclear implica la unión de señales de proteínas de localización nuclear en la proteína nuclear para importin α y subunidades de importin β en el citoplasma. Importin α se une a la señal de localización nuclear (NLS), mientras que importin β interactúa con la importin α así como el poro nuclear. En las proteínas de la MADS box de la planta, el motivo de aminoácidos NLS prominente es KR [K o R] X4KK (SEQ ID NO: 29), donde X puede ser cualquier aminoácido (Gramzow y Theissen, 2010). El dominio de MADS box SHELL incluye este motivo (KRRNGLLKK, SEQ ID NO: 30) en los aminoácidos 23-31. Las proteínas MADS box también pueden tener un NLS bipartito que involucra aminoácidos hacia arriba adicionales. Un ejemplo es el NLS bipartito de petunia PROTEINA FLORAL DE UNION 11 (FBP11) que incluye la secuencia

MGRGRAMOKIEIKRIENNTNRQVTFCKRRNGLLKK (SEQ ID NO: 31). El NLS bipartito se compone de aminoácidos NLS (subrayados), así 15 como de aminoácidos básicos conservados (en cursiva), todos los cuales contribuyen al mecanismo de localización nuclear (Immink). *et al.*, 2002).

[0019] El dominio de MADS box de SHELL incluye un NLS bipartito muy similar que incluye los aminoácidos 3, 5, 9-10 y 21-31 (MGRGRAMOKIEIKRIENTTSRQVTFCKRRNGLLKK; SEQ ID NO: 32) (Figuras 2 y 3). Es digno de mención que de los diez cambios de secuencia que resultan en sustituciones o deleciones de aminoácidos que se informan aquí (*sh^{AVROS}*, *sh^{MPOB}* alelos 3-10), seis cambian uno o más de estos aminoácidos NLS altamente conservados (*sh^{AVROS}*, *sh^{MPOB}*, alelo 3, alelo 5, alelo 7, alelo 8 y alelo 9), y un 7^{mo} (*sh^{MPOB}*) introduce una sustitución de prolina en una posición variable dentro del NLS prominente que se esperaría que alterara significativamente la estructura secundaria de la proteína dentro del dominio NLS (Figuras 2 y 3). Estos hallazgos sugieren que un mecanismo común que imparte la *pisífera* (cuando es homocigoto o heterocigoto con otro alelo SHELL no funcional) o el fenotipo *tenera* (cuando es heterocigótico con un alelo SHELL silvestre) puede ser la reducción o prevención de la localización nuclear de proteínas SHELL no funcionales o dímeros de proteínas SHELL con otros factores de transcripción de MADS box. Por lo tanto, es probable que la mutación de cualquiera de los aminoácidos de NLS conservados (encuadrados en la figura 2 y 3), o cualquier mutación que interrumpa la función de SHELL NLS, pueda asociarse con el 10 fenotipo *pisífera* o *tenera*.

[0020] De acuerdo con un aspecto, los métodos para determinar o predecir el fenotipo de membrana de una palma (*p.ej*, planta

de palma aceitera) (que incluye, entre otros, una planta de palma entera o semilla de palma). En algunas realizaciones, el método comprende proporcionar una muestra de la planta o semilla; y determinar a partir de la muestra el genotipo de un marcador polimórfico en una posición en el exón 1 del gen SHELL seleccionado del grupo que consiste en nucleótidos:

(i) 7, 8, 9, 13, 14, 15, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 109, 110, 111, 114, 121, 122, and 123;

(ii) 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 67, 69, 70, 71, 110, 114 y 122; o

(iii) 7-9, 13-15, 25-30, 61-75 y 88-92.

En algunos casos, heterocigosidad en uno o más de los marcadores polimórficos para un alelo *pisífera* y un *dura* predice la presencia del fenotipo *tenera* de membrana. En algunos casos, homocigosidad para un genotipo de un alelo predicho *pisífera* en uno o más de los marcadores polimórficos predice la presencia del fenotipo *pisífera* de membrana. En algunos casos, el genotipo del marcador polimórfico puede comprender uno o más de los pronosticados genotipos de alelos *pisífera* representados en SEQ ID NOs: 13-21.

[0021] En algunos casos, una mutación con respecto a la SHELL de gen tipo silvestre (*Sh^{DeliDura}*) en una o más de las posiciones de nucleótidos que da como resultado una sustitución de aminoácido (p.ej, sustitución no conservativa), eliminación, inserción o desplazamiento de marco puede predecir un fenotipo *pisífera* cuando es homocigoto o heterocigoto con una mutación diferente con respecto a la SHELL de gen de tipo silvestre (*Sh^{DeliDura}*), o un fenotipo *tenera* cuando es heterocigoto con

respecto al alelo silvestre. Por ejemplo, una mutación con respecto a la SHELL de gen tipo silvestre (*Sh^{DeliDura}*) en una o más de las posiciones de nucleótidos que da como resultado una sustitución de aminoácido (*p.ej*, sustitución no conservativa), eliminación, inserción o desplazamiento de marco puede predecir un fenotipo *pisífera* cuando es heterocigoto con una mutación diferente que da como resultado un gen SHELL no funcional, como una mutación que produce una sustitución diferente (*p.ej*, sustitución no conservativa), eliminación, inserción o desplazamiento de marco.

[0022] En algunas realizaciones, el genotipo del marcador polimórfico comprende una delección o mutación de uno o más nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en nucleótidos: (i) 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 30 33, 34, 35, 36 y 37; (ii) 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 y 36; o (iii) 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 y 37 del exón 1 del gen SHELL. En algunas realizaciones, el genotipo del marcador polimórfico comprende una delección de uno o más, o todos, de los nucleótidos 23-37 (o 22-36) del exón 1 del gen SHELL. En algunas realizaciones, el genotipo del marcador polimórfico comprende una mutación del nucleótido 34 del exón 1 del gen SHELL (*p.ej*, una mutación relativa a *ShDeliDura*) En algunas realizaciones, la mutación comprende un sentido erróneo (*p.ej*, sustitución no conservativa), sin sentido, inserción, eliminación o mutación del marco de lectura. En algunas realizaciones, el genotipo del marcador polimórfico comprende una citosina (C) en el nucleótido 34 del exón 1 del gen SHELL.

[0023] En algunas realizaciones, el genotipo del marcador polimórfico comprende una mutación del nucleótido 67 del exón

1 del gen SHELL (p.ej, una mutación relativa a *Sh^{DeliDura}*) En algunas realizaciones, la mutación comprende un sentido erróneo (p.ej, sustitución no conservativa), sin sentido, inserción, eliminación o mutación del marco de lectura. En algunas realizaciones, el genotipo del marcador polimórfico comprende una citosina (C) en el nucleótido 67 del exón 1 del gen SHELL. En algunas realizaciones, el genotipo del marcador polimórfico comprende una mutación del nucleótido 69 del exón 1 del gen SHELL (p.ej, una mutación relativa a *Sh^{DeliDura}*) En algunas realizaciones, la mutación comprende un sentido erróneo (p.ej, sustitución no conservativa), sin sentido, inserción, eliminación o mutación del marco de lectura. En algunas realizaciones, el genotipo del marcador polimórfico comprende una timina (T) en el nucleótido 69 del exón 1 del gen SHELL.

[0024] En algunas realizaciones, el genotipo del marcador polimórfico comprende una mutación del nucleótido 70 del exón 1 del gen SHELL (p.ej, una mutación relativa a *Sh^{DeliDura}*) En algunas realizaciones, la mutación comprende un sentido erróneo (p.ej, sustitución no conservativa), sin sentido, inserción, eliminación o mutación del marco de lectura. En algunas realizaciones, el genotipo del marcador polimórfico comprende una guanosina (G) en el nucleótido 70 del exón 1 del gen SHELL. En algunas realizaciones, el genotipo del marcador polimórfico comprende una mutación del nucleótido 71 del exón 1 del gen SHELL (p.ej, una mutación relativa a *Sh^{DeliDura}*) En algunas realizaciones, la mutación comprende un sentido erróneo (p.ej, sustitución no conservativa), sin sentido, inserción, eliminación o mutación del marco de lectura. En algunas realizaciones, el genotipo del marcador polimórfico comprende una adenosina (A) en el nucleótido 71 del exón 1 del gen SHELL. En algunas realizaciones, el genotipo del marcador polimórfico

comprende una mutación del nucleótido 110 del exón 1 del gen SHELL (p.ej, una mutación relativa a *Sh^{DeliDura}*) En algunas realizaciones, la mutación comprende un sentido erróneo (p.ej, sustitución no conservativa), sin sentido, inserción, eliminación o mutación del marco de lectura. En algunas realizaciones, el genotipo del marcador polimórfico comprende una adenosina (A) en el nucleótido 110 del exón 1 del gen SHELL.

[0025] En algunas realizaciones, el genotipo del marcador polimórfico comprende una mutación del nucleótido 114 del exón 1 del gen SHELL (p.ej, una mutación relativa a *Sh^{DeliDura}*) En algunas realizaciones, la mutación comprende un sentido erróneo (p.ej, sustitución no conservativa), sin sentido, inserción, eliminación o mutación del marco de lectura. En algunas realizaciones, el genotipo del marcador polimórfico comprende una citosina (C) en el nucleótido 114 del exón 1 del gen SHELL. En algunas realizaciones, el genotipo del marcador polimórfico comprende una mutación del nucleótido 122 del exón 1 del gen SHELL (p.ej, una mutación relativa a *Sh^{DeliDura}*) En algunas realizaciones, la mutación comprende un sentido erróneo (p.ej, sustitución no conservativa), sin sentido, inserción, eliminación o mutación del marco de lectura. En algunas realizaciones, el genotipo del marcador polimórfico comprende una adenosina (A) en el nucleótido 122 del exón 1 del gen SHELL.

[0026] En cualquiera de las realizaciones anteriores, el método puede comprender, proporcionar una muestra de la planta o semilla; y determinar a partir de la muestra el genotipo de un marcador polimórfico en una posición en el exón 1 del gen SHELL seleccionado del grupo que consiste en nucleótidos:

(i) 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 20 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 110, 114 y 122;
(ii) 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 67, 69, 70, 71, 110, 114 y 122; o
(iii) 67, 69, 70 y 71. En algunos casos, heterocigosidad en uno o más de los marcadores polimórficos para un alelo *pisífera* y un *dura* predice la presencia del fenotipo *tenera* de membrana. En algunos casos, homocigosidad para un genotipo de un alelo predicho *pisífera* en uno o más de los marcadores polimórficos predice la presencia del fenotipo *pisífera* de membrana. En algunos casos, heterocigosidad para un genotipo de un alelo primer predicho *pisífera* en uno o más de los marcadores polimórficos y un segundo alelo predicho *pisífera* en uno o más de los marcadores polimórficos predice la presencia del fenotipo *pisífera* de membrana. En algunos casos, el genotipo del marcador polimórfico puede comprender uno o más de los genotipos predichos de alelos *pisífera* representados en las SEQ ID NOs: 13, 15, 17, 18 y 19.

[0027] En algunas realizaciones, el método comprende proporcionar una muestra de la planta o semilla; y determinar a partir de la muestra el genotipo de un marcador polimórfico en una posición en el intrón 1 del gen SHELL seleccionado del grupo que consiste en los nucleótidos 43, 44, 45 y 46. En algunos casos, heterocigosidad en uno o más de los marcadores polimórficos para un alelo *pisífera* y un *dura* predice la presencia del fenotipo *tenera* de membrana. En algunos casos, homocigosidad para un genotipo de un alelo predicho *pisífera* en uno o más de los marcadores polimórficos predice la presencia del fenotipo *pisífera* de membrana. En algunos casos, heterocigosidad para un genotipo de un alelo primero predicho

pisífera en uno o más de los marcadores polimórficos y un genotipo de un segundo alelo predicho *pisífera* en uno o más de los marcadores polimórficos predice la presencia del fenotipo *pisífera* de membrana. En algunos casos, el genotipo del marcador polimórfico puede comprender uno o más, o todos, de los delecionados de los nucleótidos del intrón 1 representado en la SEQ ID NO: 12.

[0028] En algunas realizaciones, el método comprende proporcionar una muestra de la planta o semilla; y detectar en la muestra un genotipo de un marcador polimórfico que codifica una mutación en el producto del gen SHELL en una o más posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones de aminoácidos 3, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 37 y 41 seleccionados del grupo que consiste en las posiciones de aminoácidos 3, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 37 y 41, seleccionados del grupo que consiste en las posiciones de aminoácidos 8, 9, 10, 11, 12, 23, 24, 37 y 41 o seleccionado del grupo que consiste en las posiciones de aminoácidos 8, 9, 10, 11, 12, 23, 24, 31, 37 y 41. En algunos casos, el genotipo del marcador polimórfico comprende una delección de uno o más, o todos, de los aminoácidos en las posiciones 8-12 del producto del gen SHELL de tipo silvestre. En algunos casos, heterocigosidad en uno o más de los marcadores polimórficos para un alelo *pisífera* y un *dura* predice la presencia del fenotipo *tenera* de membrana. En algunos casos, homocigosidad para un genotipo de un alelo predicho *pisífera* en uno o más de los marcadores polimórficos predice la presencia del fenotipo *pisífera* de membrana. En algunos casos, heterocigosidad para un genotipo de un primer alelo predicho *pisífera* en uno o más de los marcadores 20 polimórficos y un segundo alelo predicho

pisífera en uno o más de los marcadores polimórficos predice la presencia del fenotipo *pisífera* de membrana. En algunos casos, el genotipo del marcador polimórfico puede comprender uno o más de los alelos pronosticados *pisífera* de los productos del gen SHELL representados en SEQ ID NOs: 3-10, o uno o más de los alelos predichos *pisífera* de los productos del gen SHELL representados en las SEQ ID NOs: 3, 5, 7, 8 y 9.

[0029] En algunas realizaciones, el genotipo del marcador polimórfico comprende una mutación en la posición de aminoácido 23 en comparación con el producto del gen SHELL de tipo silvestre. En algunos casos, la mutación comprende una mutación de lisina a glutamina o una mutación de lisina a asparagina en la posición de aminoácido 23. En algunas realizaciones, el genotipo del marcador polimórfico comprende una mutación en la posición de aminoácido 24 en comparación con el producto del gen SHELL de tipo silvestre. En algunos casos, la mutación comprende una mutación de arginina a histidina o una de arginina a glicina en la posición de aminoácido 24. En algunas realizaciones, el genotipo del fabricante polimórfico comprende una mutación en la posición de aminoácido 37 del producto del gen SHELL de tipo silvestre. En algunos casos, la mutación comprende una mutación de valina a aspartato en el aminoácido 37. En algunas realizaciones, el genotipo del marcador polimórfico comprende una mutación en la posición de aminoácido 41 del producto del gen SHELL de tipo silvestre. En algunos casos, la mutación comprende una mutación de alanina a aspartato en el aminoácido 41.

[0030] En algunas realizaciones, el método comprende proporcionar una muestra de la planta o semilla; y detectar en la muestra un genotipo de un marcador polimórfico que codifica

una mutación en el producto del gen SHELL en una posición en la señal de localización nuclear (NLS) del producto del gen SHELL, en donde la mutación en la posición 25 en el NLS comprende una mutación en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en las posiciones de aminoácidos 3, 5, 9, 10, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 y 30; o la posición de aminoácido 23, 24, 25, 26, 27, 28 y 30 del producto del gen SHELL. En algunos casos, la mutación está en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en las posiciones de aminoácidos 23 y 24 del producto del gen SHELL. En algunos casos, la mutación en la posición de aminoácido 23 comprende una mutación de lisina a glutamina. En algunos casos, la mutación en la posición de aminoácido 23 comprende una mutación de lisina a asparagina. En algunos casos, la mutación en la posición de aminoácido 24 comprende una mutación de arginina a histidina. En algunos casos, la mutación en la posición de aminoácido 24 comprende una mutación de arginina a glicina.

[0031] En algunas realizaciones, la planta o semilla se genera a partir de i) un cruce entre una planta que tiene el fenotipo *dura* de membrana y una planta que tiene el fenotipo *pisífera* de membrana, ii) la autopolinización de una palma *tenera*, iii) un cruce entre dos plantas que tienen un fenotipo *tenera* de membrana, iv) un cruce entre una planta que tiene un fenotipo *dura* de membrana y una planta que tiene un fenotipo *tenera* de membrana, o v) un cruce entre una planta que tiene un fenotipo *tenera* de membrana y una planta que tiene un fenotipo *pisífera* de membrana. En algunas realizaciones, la planta tiene menos de 5 años. En algunas realizaciones, la planta tiene menos de un año. En algunas realizaciones, el marcador polimórfico es,

o es al menos, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 97, 98 o 99% predictivo del fenotipo *tenera*.

[0032] En algunas realizaciones, el método comprende además seleccionar la semilla o planta para el cultivo si la planta es heterocigótica para el marcador polimórfico (*p.ej*, heterocigoto para un marcador *dura* y un *pisífera* que predice un fenotipo *tenera*). En algunas realizaciones, el método comprende además seleccionar la semilla o planta para el cultivo si la planta es homocigótica para el marcador polimórfico (*p.ej*, indicar un fenotipo *dura* y un *pisífera*). En algunas realizaciones, las plantas o semillas se descartan, almacenan (por ejemplo, se almacenan por separado de plantas o semillas *tenera*) o cultivadas (*p.ej*, cultivado por separado de plantas o semillastenera) si las plantas o semillas no tienen un genotipo predictivo del fenotipo *tenera* de membrana, como si las plantas o semillas tuvieran un genotipo predictivo de fenotipo *pisífera* o tuvieran un genotipo predictivo de un fenotipo *dura*.

[0033] También se proporciona un método para segregar una pluralidad de plantas de palmas (*p.ej*, palma de aceite) en diferentes categorías basadas en el fenotipo de membrana predicho. En algunas realizaciones, el método comprende, proporcionar una muestra de cada planta en la pluralidad de plantas; determinar a partir de las muestras el genotipo de al menos un marcador polimórfico en una posición en el exón 1 del gen SHELL seleccionado del grupo que consiste en: (i) nucleótidos 7, 8, 9, 13, 14, 15, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 20, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 109, 110, 111, 114,

121, 122 y 123; (ii) nucleótidos 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 y 37; (iii) nucleótido 34; (iv) nucleótidos 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 25 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 87, 88, 89, 90, 91 y 92; (v) nucleótidos 67, 69, 70 y 71; (vi) nucleótido 67; (vii) nucleótido 69; (viii) nucleótido 70; (ix) nucleótido 71; (x) nucleótido 110; (xi) nucleótido 114; o (xii) nucleótido 122; y segregando las plantas en grupos basados en el genotipo del marcador polimórfico, en donde los grupos corresponden a las plantas que se predice que tienen el fenotipo *tenera* de membrana, plantas predichas para tener el fenotipo *dura* de membrana, y las plantas predichas tener el fenotipo *pisífera* de membrana.

[0034] También se proporcionan kits para determinar el 5 fenotipo de membrana de una semilla o planta de palma. En algunas realizaciones, el kit comprende, uno o más cebadores o sondas de oligonucleótidos que comprenden independientemente:

una secuencia de al menos, por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 10 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 (o 20, 22, 24, 30 o más) nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 27; o;

una secuencia 100% complementaria al menos, por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 (o 20, 22, 24, 30 o más) consecutivos nucleótidos de SEQ ID NO: 27,

en el que uno o más cebadores o sondas se hibridan independientemente con una secuencia que está dentro, o dentro de aproximadamente, 5,000; 2,500; 1,000; 750; 500; 250; 200; 150; 100; 75; 50; 25, o 1 pb de una posición en el exón 1 del gen SHELL seleccionado del grupo que consiste en:

(i) nucleótidos 7, 8, 9, 13, 14, 15, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80,

81, 82, 83, 84, 85, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 109, 110, 111, 25
114, 121, 122, and 123;

(ii) nucleótidos 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33,
34, 35, 36 y 37;

(iii) nucleótido 34;

(iv) nucleótidos 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77,
30 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 87, 88, 89, 90, 91 y 92

(v) nucleótidos 67, 69, 70 y 71; 24

(vi) nucleótido 67;

(vii) nucleótido 69;

(viii) nucleótido 70;

(ix) nucleótido 71;

(x) nucleótido 110;

(xi) nucleótido 114; o

(xii) nucleótido 122.

[0035] En algunas realizaciones, el uno o más cebadores o sondas se hibridan independientemente con una secuencia que es adyacente a, o contiene, una posición en el exón 1 del gen SHELL seleccionado del grupo que consiste en uno o más de los grupos de nucleótidos anteriores (i) - (xii).

[0036] En algunas realizaciones, el uno o más cebadores o sondas hibridan específicamente con ADN o ARN de plantas de palma.

[0037] En algunas realizaciones, se une una etiqueta detectable (p.ej, unido covalentemente) al oligonucleótido. En algunas realizaciones, el marcador detectable es fluorescente.

[0038] En algunas realizaciones, el kit comprende además un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una

secuencia sustancialmente (por ejemplo, al menos 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99%) idéntica o idéntica a al menos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o 21, en donde el polinucleótido comprende una mutación representada en SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 en relación con el tipo silvestre, *sh^{AVROS}*, o *sh^{MPOB}* SHELL.

[0039] También se proporciona un ácido nucleico aislado que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia sustancialmente (por ejemplo, al menos 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99%) idéntica o idéntica a al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11, en donde el polinucleótido comprende una mutación representada en SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 en relación con tipo silvestre, *sh^{AVROS}*, o *sh^{MPOB}* SHELL.

[0040] También se proporciona una célula o semilla o planta que comprende un casete de expresión heterólogo, comprendiendo el casete de expresión un promotor heterólogo unido operablemente a un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia sustancialmente (p.ej, al menos 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99%) idénticos o idénticos a SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11, p.ej, en donde el polinucleótido comprende una mutación representada en la SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 en relación con el tipo silvestre, *sh^{AVROS}*, o *sh^{MPOB}* SHELL. En algunas

realizaciones, la semilla o planta es una semilla de palma (p.ej, palma aceitera) o planta de palma (p.ej, palma de aceite). En algunas realizaciones, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 4, 5, 30 6, 7, 8, 9, 10 u 11. En algunas realizaciones, el promotor heterólogo da como resultado un nivel de expresión de un ARN que codifica el polipéptido en la semilla o planta que es menor, igual o mayor que la expresión de un ARN de SHELL endógeno en la semilla o planta. En algunas realizaciones, la semilla o planta comprende dos alelos *dura* de un gen SHELL endógeno. En algunas realizaciones, la semilla o planta produce fruta que tiene membranas maduras que tienen en promedio menos de 2 mm de grosor, menos de 3 mm de grosor, o tienen entre 0,5 y 3 mm de grosor.

[0041] También se proporciona una célula o semilla o planta que comprende un casete de expresión heterólogo, comprendiendo el casete de expresión un promotor unido operativamente a un polinucleótido que tiene al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 15 47, 48, 49 o 50 nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21, o un complemento del mismo, cuyo polinucleótido, cuando se expresa en la semilla o planta, reduce la expresión de un polipéptido SHELL endógeno en la semilla o planta (en comparación con una planta de control que carece del casete de expresión), en donde la expresión reducida del polipéptido SHELL da como resultado un grosor de membrana reducido de las futuras semillas producidas por la planta. En algunas realizaciones, el polinucleótido codifica un siRNA, un polinucleótido antisentido, un microRNA, o un ácido nucleico de supresión de los sentidos, suprimiendo de este modo la

expresión de un gen SHELL endógeno. En algunas realizaciones, la semilla o planta produce membranas maduras que tienen, en promedio, menos de 2 mm de grosor, menos de aproximadamente 3 mm de 30 grosor, o tienen entre 0,5 y 3 mm de grosor.

[0042] También se proporciona un método para fabricar una planta como se describió anteriormente o en otro lugar en el presente documento, que comprende introducir el casete de expresión en una planta.

[0043] También se proporciona un método para cultivar las plantas descritas aquí.

[0044] Otras realizaciones serán evidentes por leer el resto de la descripción.

DEFINICIONES

[0045] Un "fenotipo de membrana" se refiere a las tres formas de fruta de *E. guineensis* - *dura*, *tenera* y *pisífera*. La forma de frutadura (tipo silvestre) se ejemplifica por la presencia de una membrana que tiene un espesor promedio de al menos 2-8 mm y se encuentra típicamente en plantas de palma que tienen un genotipo SHELL de tipo silvestre homocigoto. La forma de fruta *pisífera* se ejemplifica por la ausencia de una membrana y se encuentra típicamente en plantas de palma que carecen de un gen SHELL funcional. Por ejemplo, una planta de palma *pisífera* puede tener dos genes SHELL no funcionales (*p.ej*, homocigoto para un genotipo SHELL no funcional o heterocigoto para dos genotipos diferentes de SHELL no funcional). La forma del fruto *tenera* se ejemplifica por la presencia de una capa delgada que tiene un espesor promedio de menos de aproximadamente 3 mm

(p.ej, aproximadamente 0,5-3 mm) y se encuentra típicamente en plantas de palma que son heterocigóticas para un gen SHELL funcional y no funcional. Las plantas de palma heterólogas que sobreexpresan o subexpresan el gen SHELL o producto génico o que interfieren parcial o completamente con la actividad de un producto de gen SHELL endógeno también pueden exhibir un fenotipo de la forma de la fruta *dura*, *tenera*, o *pisífera*.

[0046] Un "marcador polimórfico" se refiere a un marcador genético que distingue entre dos alelos. El marcador polimórfico puede ser una sustitución, inserción, delección o redistribución de nucleótidos, o una combinación de los mismos.

[0047] Como se usa en este documento, "detectar un genotipo" se refiere a: (i) analizar un ácido nucleico para determinar un genotipo realizando una secuencia, hibridación, polimerización o reacción de digestión de endonucleasa específica de secuencia o detectando la masa del ácido nucleico, o una porción del mismo; o (ii) analizar un polipéptido, o una porción del mismo, codificado por el ácido nucleico realizando una secuenciación, detección (p.ej, ELISA), o reacción de digestión proteolítica específica de la secuencia, o detectando la masa del polipéptido, o una porción del mismo.

[0048] Como se usa en el presente documento, los términos "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido" se refieren a regiones de ácido nucleico, segmentos de ácido nucleico, cebadores, sondas, amplicones y fragmentos de oligómeros. Los términos no están limitados por la longitud y son genéricos para polímeros lineales de polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa),

polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa) y cualquier otro N-glucósido de una base de purina o pirimidina o purina modificada o bases de pirimidina. Estos términos incluyen ADN de doble cadena y monocatenario, así como ARN de cadena doble y única.

[0049] Un ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido puede comprender, por ejemplo, enlaces fosfodiéster o enlaces modificados que incluyen, pero no se limitan a fosfotriéster, fosforamidato, siloxano, carbonato, éster carboximetílico, acetamidato, carbamato, tioéter, fosforamidato puenteado, fosfonato de metileno puenteado, fosforotioato, metilfosfonato, enlaces fosforoditioato, fosforotioato puenteado o sulfona, y combinaciones de tales enlaces.

[0050] Un ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido puede comprender las cinco bases de origen biológico (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo) y / o bases distintas de las cinco bases de origen biológico.

[0051] La alineación óptima de las secuencias para la comparación se puede realizar mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman. *Añadir. APL. Math.* 2: 482 (1981), por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci. (ESTADOS UNIDOS)* 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

[0052] "Porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas en una ventana de comparación, donde la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, espacios) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico o residuo de aminoácido idéntico se produce en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

[0053] El término "identidad sustancial" de secuencias polipeptídicas significa que un polipéptido comprende una secuencia que tiene al menos un 75% de identidad de secuencia. Alternativamente, el porcentaje de identidad puede ser cualquier número entero del 75% al 100%. Las realizaciones a modo de ejemplo incluyen al menos: 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% en comparación con una secuencia de referencia que usa los programas descritos en este documento; preferiblemente BLAST utilizando parámetros estándar o por defecto, como se describe a continuación. Un experto reconocerá que estos valores pueden ajustarse apropiadamente para determinar la identidad correspondiente de las proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degeneración de los codones, la similitud de los aminoácidos, el posicionamiento del marco de lectura y similares. Los polipéptidos que son "sustancialmente similares" comparten secuencias como se indicó anteriormente, excepto que las posiciones de los

residuos que no son idénticas pueden diferir por cambios de aminoácidos conservativos. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales de hidroxilo alifático es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas es ácido aspártico y ácido glutámico; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos conservadores preferidos de sustitución de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, ácido aspártico-ácido glutámico y asparagina-glutamina.

[0054] Una indicación de que las secuencias de nucleótidos son sustancialmente idénticas es si dos moléculas se hibridan entre sí, o un tercer ácido nucleico, en condiciones rigurosas. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5°C menor que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y un pH definidos) a la que el 50% de la secuencia diana se hibrida con una sonda perfectamente adaptada. Típicamente, las

condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es de aproximadamente 0,02 molar a pH 7 y la temperatura es de al menos aproximadamente 60°C.

[0055] El término "promotor" o "elemento regulador" se refiere a una región o secuencia determinantes localizados cadena arriba o cadena abajo del inicio de la transcripción y que están implicados en el reconocimiento y unión de la ARN polimerasa y otras proteínas para iniciar la transcripción. Los promotores no necesitan ser de origen vegetal, por ejemplo, pueden usarse promotores derivados de virus de plantas, tales como el promotor CaMV35S.

[0056] El término "planta" incluye plantas enteras, brotes, órganos / estructuras vegetativas (p.ej hojas, tallos y tubérculos), raíces, flores y órganos / estructuras florales (p.ej brácteas, sépalos, pétalos, estambres, carpelos, anteras y óvulos), semillas (incluidos embriones, endospermas y semillas) y frutos (el ovario maduro), tejidos vegetales (p.ej. tejido vascular, tejido de semilla, tejido triturado y similares) y células (p.ej células protectoras, óvulos, tricomas y similares) y progenie de las mismas. La clase de plantas que pueden usarse en el método de la invención es generalmente tan amplia como la clase de plantas superiores e inferiores susceptibles de las técnicas de transformación, que incluyen angiospermas (plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas), gimnospermas, helechos y algas multicelulares. Incluye plantas de una variedad de niveles de ploidía, incluidos aneuploides, poliploides, diploides, haploides y hemicigóticos. En una realización ejemplar, la planta es una planta de palma aceitera (*E. guineensis* o *E.*

oleifera, o un híbrido de los mismos). En algunos casos, la planta es *E. guineensis*.

[0057] Un "casete de expresión" se refiere a una construcción de ácido nucleico, que cuando se introduce en una célula huésped, da como resultado la transcripción y / o traducción de un ARN o polipéptido, respectivamente. Las construcciones antisentido o constructos de sentido que no se pueden traducir o no se incluyen expresamente en esta definición. El casete de expresión puede contener un promotor heterólogo.

[0058] El término "operativamente unido" se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de control de expresión de ácido nucleico (tal como un promotor, o una matriz de sitios de unión de factor de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, donde la secuencia de control de expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

[0059] Una secuencia de polinucleótidos o secuencia de aminoácidos es "heteróloga a" un organismo o una segunda secuencia de polinucleótidos si se origina a partir de una especie foránea, o si es de la misma especie, se modifica a partir de su forma original. Por ejemplo, un promotor heterólogo ligado operativamente a una secuencia codificante se refiere a un promotor de una especie diferente de aquella de la que se derivó la secuencia codificante, o, si de la misma especie, un promotor que es diferente de cualquier variante alélica natural, o un promotor que no se encuentra naturalmente conectado de forma operativa a la secuencia de codificación especificada en la planta especificada.

[0060] Como se usa en el presente documento, el término "posición de nucleótido" y similares, en el contexto de una posición de nucleótido del exón 1 del gen SHELL se refiere a la posición de un nucleótido con respecto a la adenosina del iniciador del gen SHELL de tipo silvestre (*es decir*, amino terminal) codón triplete de metionina ("ATG"). Así, *p.ej*, la posición de nucleótido 1 se refiere a la adenosina del codon triple triplete de metionina del iniciador ATG del gen SHELL de tipo silvestre; y, la posición 2 se refiere al siguiente nucleótido (*es decir*, "T" del codón triplete triplete de metionina iniciador ATG), y así sucesivamente. De forma similar, en el contexto de una posición de nucleótido del intrón 1 del gen SHELL, el término "posición de nucleótido" y similares se refiere a la posición de un nucleótido con respecto al primer nucleótido del intrón 1 del gen SHELL de tipo silvestre. Por lo tanto, el primer nucleótido del intrón 1 del gen SHELL está en la posición 1, el segundo en la posición 2, y así sucesivamente.

[0061] De forma similar, el término "posición de aminoácido" en el contexto de un aminoácido particular, o grupo de aminoácidos, del gen SHELL se refiere a una posición de aminoácido relativa al iniciador metionina (*es decir*, amino terminal) del gen SHELL. Así, por ejemplo, la posición de aminoácido 1 se refiere a la metionina amino terminal, la posición de aminoácido 2 se refiere a la glicina adyacente de la SHELL de tipo silvestre o un aminoácido o delección alternativo encontrado en un alelo mutante de SHELL en la misma posición. Se apreciará que estas posiciones son independientes de cualquier degradación o conjugación N-terminal u otro procesamiento postraducciona. Por ejemplo, en un polipéptido SHELL en el que el aminoácido metionina N-terminal se elimina

postraduccionalmente, la posición 2 todavía se refiere al aminoácido de glicina previamente adyacente y la posición 3 se refiere al aminoácido de arginina adyacente de la SHELL natural o un aminoácido alternativo o delección encontrado en un alelo SHELL mutante en la misma posición.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIAGRAMAS

[0062] La FIG. 1 Modelo del gen SHELL. Los exones (cajas/boxes) y los intrones (líneas horizontales) fueron validados por RNA-seq. Un diagrama de los dominios proteicos codificados por los exones indicados se proporciona debajo del diagrama de genes. Están indicados los dominios MADS box, I, K y C de la proteína SHELL.

[0063] La FIG. 2. Variantes de nucleótidos en el gen SHELL. La secuencia de ADN del tipo silvestre (*Sh^{DeliDura}*) el exón 1 que codifica el dominio de la MADS box de SHELL (SEQ ID NO: 25) se muestra en la línea superior de la alineación de la secuencia de ADN. Secuencias de *AVROS*, *MPOB*, *alelo 3*, *alelo 4*, *alelo 5*, *alelo 6*, *alelo 7*, *alelo 8*, *alelo 9*, *alelo 10* y *Alelo 11* (SEQ ID NO: 22, 23, 13-21, respectivamente) los alelos se muestran alineados con la secuencia *dura*. Las variantes de nucleótido único están indicadas por recuadros. las bases eliminadas (*Alelo 7*) están indicadas por guiones.

[0064] La FIG. 3. Variantes de aminoácidos en el gen SHELL. La secuencia peptídica del dominio tipo silvestre (*Sh^{DeliDura}* de MADS box (SEQ ID NO: 24) se muestra en la línea superior de la alineación peptídica. Se muestran Secuencias de *AVROS*, *MPOB*, *alelo 3*, *alelo 4*, *alelo 5*, *alelo 6*, *alelo 7*, *alelo 8*, *alelo 9*, *alelo 10* y *Alelo 11* (SEQ ID NO: 1-11, respectivamente) de los

péptidos alineados con la secuencia peptídica dura Los aminoácidos variantes causados por variantes de un solo nucleótido de sentido erróneo están indicados por el código de aminoácidos de una sola letra apropiado. Los aminoácidos eliminados (Alelo 7) están indicados por asteriscos. Los aminoácidos que no se modifican en relación con la secuencia peptídica *dura* se indican mediante guiones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE EL INVENTO

I. Introducción

[0065] La presente descripción describe el descubrimiento de los alelos 3-10 del gen SHELL que se predice que modulan el fenotipo de la forma de la fruta de las plantas de palma (*p.ej*, palma de aceite). De manera similar, los alelos 11 (representados en SEQ ID NOs: 11 y 21) y 12 (representados en SEQ ID NO: 12) se predice que modulan directamente el fenotipo de la forma de la fruta o pueden usarse para inferir el genotipo del gen SHELL debido a su estrecha vinculación física con los polimorfismos del alelo 3-10. Un marcador polimórfico estrechamente relacionado con el gen SHELL, o la identificación de la presencia, ausencia o número de copias de los alelos 3-11 en una planta de palma de aceite puede ser utilizado por los productores de semillas como una herramienta de control de calidad para i) reducir o eliminar contaminación de semilla o plántulas de *dura* o *pisífera* de *tenera*, ii) reducir o eliminar contaminación de semilla o plántulas de *dura* o de *tenera* a *pisífera* , iii) reducir o eliminar contaminación de *semilla* o *plántulas* *pisífera* o *tenera* *dura* , iv) identificar positivamente semillas o plántulas *tenera* que luego se seleccionan como material de siembra adecuado para la producción comercial de

aceite de palma, v) identificar positivamente semillas o plántulas *dura* que luego pueden seleccionarse como material de siembra adecuado para la producción comercial de germoplasma de *dura* , o vi) identificar positivamente semillas o plántulas *pisífera* que luego pueden seleccionarse como material de siembra adecuado para la producción comercial de germoplasma de *pisífera*

[0066] La identificación del gen SHELL o un marcador genéticamente relacionado con el rasgo de la membrana también 10 es importante en los programas de reproducción. El marcador o los alelos del gen responsable del rasgo se pueden usar para separar las plantas de *dura*, *tenera* y *pisífera* en el vivero; la ventaja aquí es que podrían plantarse por separado basándose en el fenotipo de la forma de la fruta de membrana. Esto es de interés ya que las palmas de *pisífera* generalmente muestran un crecimiento vegetativo muy vigoroso, por lo que en un ensayo que consta de los tres tipos, la distorsión de los resultados podría ocurrir debido a la competencia intracruzada. Además, separando las palmas *pisífera* y plantarlas en alta densidad alienta la inflorescencia masculina y esto facilita la producción de polen que se utiliza en los programas de cría (Jack *et al.*, 1998). Por consiguiente, tras la detección de la presencia o ausencia de un genotipo SHELL, se predice que dará como resultado un fenotipo *dura*, *pisífera*, o *tenera*, o un marcador vinculado como se describe a continuación, un paso adicional de: (1) eliminación de reducción de *dura* o *pisífera* contaminación de *tenera* semilla o plántulas, (2) identificación positiva de semillas o plántulas de *tenera* que luego se seleccionan como material de siembra adecuado para la producción comercial de aceite de palma, o (3) separación de plantas *dura*, *tenera* y *pisífera* en dos o más grupos (*p.ej*, las

plantas predican ser *tenera* en un grupo y se predice que las plantas serán *dura* o *pisífera* en un segundo grupo; plantas predichas para ser *dura* en un grupo y se predice que las plantas serán *tenera* o *pisífera* en un segundo grupo; plantas predichas para ser *pisífera* en un grupo y se predice que las plantas serán *dura* o *tenera* en un segundo grupo, o separándolo en tres grupos: *dura*, *pisífera* y *tenera*).

[0067] Cualquier marcador que existe que es polimórfico entre los padres árboles *dura* y *pisífera* en una cruz y está vinculado al locus de la membrana tiene el potencial de servir como una señal molecular para identificar árboles *tenera* en una cruz. Por ejemplo, si un árbol *dura*, que es homocigoto para "T" (es decir., T / T) en una posición de SNP dada cerca del locus del membrana se cruza con un árbol *pisífera* que es homocigoto para "A" (es decir., A / A) en la misma posición de SNP, entonces uno podría genotipificar las semillas de la cruz, o podría genotipificar las plántulas que surgen de las semillas de la cruz, en la posición de SNP para rastrear e identificar semillas o plántulas contaminantes. Semillas que se determina que son heterocigotas en la posición SNP, (es decir., A / T) es muy probable que sean *tenera*, a menos que se haya producido una recombinación entre el marcador y el gen de la cubierta en el individuo genotipo. Del mismo modo, las semillas que son homocigóticas en la posición de SNP para "A" o "T", (es decir., A / A o T / T), son árboles contaminantes *pisífera* o *dura*, y cuando estos árboles maduran sexualmente en varios años, producirán tipos de fruta subóptimos. Además, las semillas o plántulas que tienen una "C" o "G" en la posición SNP, ninguna de las cuales está presente en la palma paterna de la cruz, son árboles probables que provienen de un donante de polen diferente del que se pretende en la cruz, y por lo tanto,

pueden descartarse como semillas o plántulas contaminantes. Los marcadores que están más cerca del locus SHELL tendrían una mayor precisión predictiva que los marcadores que están más alejados del locus de la membrana, porque cuanto más cerca esté el marcador del gen de la membrana, es menos probable que se produzca una recombinación que rompería el vínculo entre el marcador y el gen de la membrana. Consecuentemente, se espera que los marcadores polimórficos dentro del gen de la membrana en sí tengan el poder predictivo más fuerte, y el análisis de múltiples marcadores estrechamente ligados al gen de la cubierta o dentro del mismo puede ser ventajoso.

ii. Determinación del fenotipo de membrana basado en la detección de ácidos nucleicos

[0068] En vista del descubrimiento de que el genotipo SHELL segrega con el fenotipo de membrana *tenera* / *pisífera* / *dura*, el genotipado de una planta o semilla en el locus SHELL o en regiones genómicas adyacentes puede usarse para predecir el fenotipo de membrana de una planta de palma.

[0069] SEQ ID NO: 24 representa la secuencia de aminoácidos predicha de los 181 aminoácidos N-terminales de la proteína expresada en la palma de aceite del tipo de fruta *dura* (*Sh^{DeliDura}*). La proteína endógena incluye aminoácidos C-terminales adicionales no incluidos en la SEQ ID NO: 24. En la palma de aceite de la *dura*, las proteínas derivadas de ambos alelos del gen incluyen: (i) una isoleucina (I), lisina (K), arginina (R), isoleucina (I) y glutamato (E) en las posiciones 8-12, respectivamente, que se eliminan en el pronóstico de alelo *pisífera* 7; (ii) un glutamato (E) en la posición 12, que está mutado a una glutamina (Q) en la predicción de

alelo *pisífera* 6; (iii) una lisina (K) en la posición 23 que está mutada a una glutamina (Q) en la predicción de un alelo *pisífera* 3 y una asparagina (N) en el pronóstico alelo *pisífera* 5; (iv) una arginina (R), que está mutada a una histidina (H) en la predicción alelo *pisífera* 8 y una glicina (G) en el pronóstico alelo *pisífera* 9; (v) una leucina (L) en la posición 29, que está mutada a una prolina en el alelo *pisífera sh^{MPOB}*; (vi) una lisina (K) en la posición 31, que está mutada a una asparagina en el alelo *pisífera sh^{AVROS}*; (vii) una valina (V) en la posición 37, que está mutada a un aspartato (D) en la predicción alelo *pisífera* 10; y (viii) una alanina (A) en la posición 41, que está mutada a un aspartato (D) en la predicción de alelo *pisífera* 4.

[0070] SEQ ID NO: 1 representa la secuencia de aminoácidos predicha de los 181 aminoácidos N-terminales de la proteína expresada en la palma de aceite del *pisífera* tipo de fruta que se deriva de la línea de Zaire (*sh^{AVROS}*). La proteína endógena incluye aminoácidos C-terminales adicionales no incluidos en la SEQ ID NO: 1. Este polipéptido incluye una asparagina (N) aminoácido en el 31^a posición de aminoácido. Una secuencia de nucleótidos que codifica el exón 1 de la *sh^{AVROS}* el alelo se proporciona en la SEQ ID NO: 22.

[0071] SEQ ID NO: 2 representa la secuencia de aminoácidos predicha de los 181 aminoácidos N-terminales de la proteína expresada en la palma aceitera del tipo de fruto *pisífera* que se deriva de la línea nigeriana (*sh^{MPOB}*) La proteína endógena incluye aminoácidos C-terminales adicionales no incluidos aquí. Este polipéptido incluye un aminoácido prolina (P) en la 29^{ava} posición de aminoácido. Una secuencia de nucleótidos que

codifica el exón 1 del alelo *sh*^{MPOB} se proporciona en la SEQ ID NO: 23.

[0072] La SEQ ID NO: 3 representa la secuencia de aminoácidos predicha de los 181 aminoácidos N-terminales de la proteína expresada en la palma aceitera del valor predicho tipo de fruta *pisífera* SHELL alelo 3. La proteína endógena incluye aminoácidos C-terminales adicionales no incluidos aquí. Este polipéptido incluye un aminoácido glutamina (Q) a la 23^{ava} posición de aminoácido. Una secuencia de nucleótidos que codifica el exón 1 del alelo 3 se proporciona en la SEQ ID NO: 13.

[0073] La SEQ ID NO: 4 representa la secuencia de aminoácidos predicha de los 181 aminoácidos N-terminales de la proteína expresada en la palma aceitera del valor predicho del tipo de fruta *pisífera* del alelo SHELL 4. La proteína endógena incluye aminoácidos C-terminales adicionales no incluidos aquí. Este polipéptido incluye un aminoácido aspartato (D) en la posición de aminoácido 41^a. Una secuencia de nucleótidos que codifica el exón 1 del alelo 4 se proporciona en la SEQ ID NO: 14.

[0074] La SEQ ID NO: 5 representa la secuencia de aminoácidos predicha de los 181 aminoácidos N-terminales de la proteína expresada en la palma de aceite del valor predicho del tipo de fruta *pisífera* del alelo SHELL 5. La proteína endógena incluye aminoácidos C-terminales adicionales no incluidos aquí. Este polipéptido incluye una asparagina (N) aminoácido en el 23^{ava} posición de aminoácido. Una secuencia de nucleótidos que codifica el exón 1 del alelo 5 se proporciona en la SEQ ID NO: 15.

[0075] La SEQ ID NO: 6 representa la secuencia de aminoácidos predicha de los 181 aminoácidos N-terminales de la proteína expresada en la palma aceitera del predicho del tipo de fruta *pisífera* del alelo SHELL 6. La proteína endógena incluye aminoácidos C-terminales adicionales no incluidos aquí. Este polipéptido incluye un aminoácido glutamina (E) en la 12^{ava} posición de aminoácido. Una secuencia de nucleótidos que codifica el exón 1 del alelo 6 se proporciona en la SEQ ID NO: 16.

[0076] La SEQ ID NO: 7 representa la secuencia de aminoácidos predicha de los 181 aminoácidos N-terminales de la proteína expresada en la palma aceitera del predicho del tipo de fruta *pisífera* del alelo SHELL 7. La proteína endógena incluye aminoácidos C-terminales adicionales no incluidos aquí. Este polipéptido tiene una delección de aminoácidos lisina (K), arginina (R), isoleucina (I) y glutamato (E), en las posiciones 8-12, respectivamente, en comparación con el alelo de tipo silvestre *Sh^{DeliDura}*. Una secuencia de nucleótidos que codifica el exón 1 del alelo 7 se proporciona en la SEQ ID NO: 17.

[0077] La SEQ ID NO: 8 representa la secuencia de aminoácidos predicha de los 181 aminoácidos N-terminales de la proteína expresada en la palma aceitera del predicho del tipo de fruta *pisífera* alelo SHELL 8. La proteína endógena incluye aminoácidos C-terminales adicionales no incluidos aquí. Este polipéptido incluye un aminoácido histidina (H) a la 24^{ava} posición de aminoácido. Una secuencia de nucleótidos que codifica el exón 1 del alelo 8 se proporciona en la SEQ ID NO: 18.

[0078] La SEQ ID NO: 9 representa la secuencia de aminoácidos predicha de los 181 aminoácidos N-terminales de la proteína expresada en la palma aceitera predicha del tipo de fruta *pisífera* SHELL alelo 9. La proteína endógena incluye aminoácidos C-terminales adicionales no incluidos aquí. Este 10 polipéptido incluye un aminoácido de glicina (G) a la 24^{ava} posición de aminoácido. Una secuencia de nucleótidos que codifica el exón 1 del alelo 9 se proporciona en la SEQ ID NO: 19.

[0079] La SEQ ID NO: 10 representa la secuencia de aminoácidos predicha de los 181 aminoácidos N-terminales de la proteína expresada en la palma de aceite del valor predicho del tipo de fruta *pisífera* del alelo SHELL. La proteína endógena incluye aminoácidos C-terminales adicionales no incluidos aquí. Este polipéptido incluye un aminoácido aspartato (D) a la 37^{ava} posición de aminoácido. Una secuencia de nucleótidos que codifica el exón 1 del alelo se proporciona en la SEQ ID NO: 20.

[0080] La SEQ ID NO: 11 representa la secuencia de aminoácidos predicha de los 181 aminoácidos N-terminales de la proteína expresada en la palma aceitera del valor predicho del tipo de fruta *pisífera* del alelo SHELL 11. La proteína endógena incluye aminoácidos C-terminales adicionales no incluidos aquí. El alelo codifica una mutación silenciosa con respecto a un gen SHELL de tipo silvestre (*Sh^{Delidura}*). Una secuencia de nucleótidos que codifica el exón 1 del alelo 11 se proporciona en la SEQ ID NO: 21. Como se describe en el presente documento, esta mutación silenciosa puede afectar la regulación transcripcional o translacional y, por lo tanto, proporcionar un fenotipo *pisífera* a pesar de la codificación de una

secuencia de proteína de tipo silvestre. Alternativamente, la secuencia de nucleótidos que codifica esta mutación silenciosa se puede usar para inferir la presencia o ausencia de un genotipo en uno o más de los nucleótidos polimórficos anteriores (p.ej, uno o más de los marcadores polimórficos relativos a tipo silvestre ejemplificados en las SEC ID Nos: 13-20, 13-20 y 23, 13-20 y 22, o 13-20 y 22-23) o marcadores de aminoácidos (p.ej, uno o más de los marcadores polimórficos en relación con el tipo silvestre ejemplificado en las SEC ID Nos: 3-10, 2-10, 1 y 3-15, o 1-10).

[0081] SEQ ID NO: 12 representa la secuencia de nucleótidos de los primeros 56 nucleótidos del intrón 1 del alelo 12 de SHELL en el que los nucleótidos 43, 44, 45 y 46 están delecionados con relación al intrón 1 de un alelo SHELL de tipo silvestre (*Sh^{DeliDura}*). Como este polimorfismo está dentro de una región no codificante del gen SHELL, es una mutación silenciosa. Como se describe en el presente documento, esta mutación silenciosa puede afectar la regulación transcripcional o traslacional, o el empalme, y por lo tanto proporcionar un fenotipo *pisífera*. Alternativamente, la presencia o ausencia del alelo 12 puede usarse para inferir la presencia o ausencia de un genotipo en uno o más de los nucleótidos polimórficos anteriores (p.ej, uno o más de los marcadores polimórficos relativos a tipo silvestre ejemplificados en las SEC ID Nos: 13-20, 13-21, 13-20 y 22, 13-20 y 23, o 13-23) o marcadores de aminoácidos (p.ej, uno o más de los marcadores polimórficos relativos al tipo silvestre ejemplificados en las SEC ID Nos: 3-10, 3-11, 2-10, 2-11, 1-10, 1 y 3-10, 1 y 3-11 , o 1-11).

[0082] Las palmeras de aceite del tipo de fruto *pisífera* es el resultado de una de al menos cuatro posibilidades: i) dos

alelos SHELL homocigóticos que tienen una secuencia de nucleótidos que codifica una de las siguientes secuencias de proteínas: SEQ ID NOs: 3-10; ii) dos alelos de SHELL heterocigotos que tienen dos secuencias de nucleótidos diferentes que codifican independientemente una de las siguientes secuencias de proteína: SEQ ID NOs: 3-10, o iii) un alelo SHELL que codifica el *Sh^{AVROS}* o *Sh^{MPOB}* de secuencia de proteína y el otro alelo que codifica una mutación relativa al tipo silvestre representado en una o más de las siguientes secuencias de proteína: SEQ ID NOs: 3-10. En algunos casos, las secuencias de nucleótidos que comprenden SEQ ID NO: 12 y/o 21 se predicen de manera similar en alelos *pisífera*. En tales casos, un tipo de fruta *pisífera* puede dar como resultado plantas homocigóticas para la SEC ID N°: 12 o 21 o heterocigotas para la SEC ID N°: 12 o 21 y un alelo diferente seleccionado del grupo que consiste en una cualquiera de las SEC ID N° 13-23 (p.ej, cualquiera de SEQ ID NOs: 13-20) o que codifica cualquiera de SEQ ID NOs: 1-10 (p.ej, cualquiera de SEQ ID NOs: 3-10).

[0083] Las Palmeras de aceite del tipo de fruto *tenera* son el resultado de un alelo que codifica uno o más de los alelos *pisífera* descritos en este documento y un alelo que codifica un tipo silvestre (*Sh^{DeLiDura}*) de Proteína SHELL. Se apreciará que las SEQ ID NOs: 1-11 y 24 son secuencias representativas y que diferentes palmas individuales pueden tener una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o más cambios de aminoácidos con respecto a SEQ ID NOS: 1- 11 y 24, debido, por ejemplo, a la variación natural. De forma similar, las SEQ ID NOs: 12-23 y 25 son secuencias representativas y diferentes palmas individuales pueden tener una secuencia de nucleótidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o más cambios de nucleótidos

con respecto a SEQ ID NOs: 12-23 y 25 debido a, por ejemplo, una variación natural.

[0084] Uno o más polimorfismos entre alelos *pisífera* y *dura* SHELL pueden usarse para determinar el fenotipo de membrana de una palma u otra planta. Por ejemplo, cuando el polimorfismo es codominante (detectable independientemente del otro alelo), entonces:

la presencia de solo un alelo *dura* SHELL indica que la planta tiene o tendrá un fenotipo *dura* de membrana;

la presencia de solo un alelo *pisífera* SHELL indica que la planta tiene o tendrá un fenotipo *pisífera* de membrana; y

la presencia de un alelo *pisífera* SHELL y un alelo *dura* SHELL indica que la planta tiene o tendrá un fenotipo *tenera* de membrana.

[0085] Sin embargo, las regiones genómicas adyacentes al gen SHELL también son útiles para determinar si una planta de palma probablemente manifestará un fenotipo de membrana particular. Debido a la vinculación genética con el gen SHELL, polimorfismos adyacentes al locus SHELL que es predictivo del fenotipo de la membrana, aunque con una precisión reducida en función de la distancia incrementada desde el locus SHELL. La SEQ ID NO: 27 proporciona una región genómica de aproximadamente 3,4 MB del genoma de la palma que comprende el gen SHELL. La Tabla A de la Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2013/0247249 describe 8217 SNP identificados dentro de la SEQ ID NO: 27. Una selección de estos SNP se ha mapeado genéticamente en relación con el locus SHELL. Los valores predictivos estimados de estos SNP también se describen en la Tabla A del documento US 2013/0247249. Por lo tanto, como un ejemplo, el SNP enumerado en la fila 1 del

documento US 2013/0247249, Tabla A, que tiene un éxito de predicción estimado de 83, representa un SNP que es exacto en la predicción del fenotipo de membrana el 83% del tiempo. Dicho de otra manera, al usar este SNP como marcador genético, uno puede predecir correctamente el fenotipo de membrana de las plantas de palma 83 de 100 veces. Por lo tanto, incluso a una distancia física significativa del locus SHELL en el cromosoma de la palma, los marcadores polimórficos permiten una predicción relativamente precisa del fenotipo de las membranas de las plantas. En algunas realizaciones, el marcador polimórfico está dentro de 1, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 kb del gen SHELL (p.ej, el gen correspondiente a la SEQ ID NO: 28).

[0086] Por consiguiente, se proporcionan métodos para detectar uno o más marcadores polimórficos dentro de una región del genoma de la palma correspondiente a la SEQ ID NO: 27. Tales métodos son útiles para predecir el fenotipo de membrana de plantas de palma, por ejemplo. Aunque se proporcionan más de 8200 polimorfismos específicos en el documento US 2013/0247249, debe apreciarse que los polimorfismos representados son meramente un ejemplo de polimorfismos dentro de la región genómica correspondiente a la SEQ ID NO: 27. Se pueden identificar polimorfismos adicionales según se desee y también se pueden usar para predecir el fenotipo de membrana de una planta de palma. Tales polimorfismos adicionales están destinados a abarcarse en los métodos descritos en este documento. Además, se apreciará que la SEQ ID NO: 27 es una secuencia representativa y que diferentes palmas individuales pueden tener una región genómica correspondiente que tiene uno o más cambios de nucleótidos con respecto a SEQ ID NO: 27 debido, por ejemplo, a una variación natural. Como se observa

en otra parte de este documento, sin embargo, la identificación de la región de un genoma correspondiente a la SEQ ID NO: 27 se puede determinar fácilmente usando programas de alineamiento, etc.

[0087] Las secuencias de ácido nucleico proporcionadas en este documento se generaron mediante secuenciación de nucleótidos y, en ocasiones, incluyen uno o más tramos de "N". Estos tramos de N representan huecos en el ensamblaje de secuencias de un tamaño estimado. El número exacto de N en una secuencia es una estimación (por ejemplo, 100 N's solo pueden representar 30 bases). Los N pueden ser cualquier base, y es probable que sean secuencia repetitiva en el genoma.

[0088] La detección de marcadores polimórficos específicos se puede llevar a cabo mediante métodos conocidos en la técnica para detectar secuencias en sitios polimórficos. Por ejemplo, pueden usarse técnicas estándar para genotipado para la presencia de SNP y / o marcadores de microsatélites, tales como técnicas basadas en fluorescencia (Chen, X. y col., Genome Res. 9 (5): 492-98 (1999)), utilizando PCR, LCR, PCR anidada y otras técnicas para la amplificación de ácidos nucleicos. Las metodologías comerciales específicas disponibles para el genotipado de SNP incluyen, entre otras, los ensayos de genotipificación TaqMan™ y las plataformas SNPlex (Applied Biosystems), electroforesis en gel (Applied Biosystems), espectrometría de masas (p. Ej., Sistema MassARRAY de Sequenom), métodos de minisequenciación, real PCR en el tiempo, sistema Bio-Plex (BioRad), sistemas CEQ y SNPstream (Beckman), tecnología de hibridación en matriz (por ejemplo, Affymetrix GeneChip; Perlegen), BeadArray Technologies (por ejemplo, ensayos Illumina GoldenGate e Infinium), tecnología de matrices

(por ejemplo, Parallele), y la tecnología de hibridación de fluorescencia basada en 10 endonucleasa (Invader; tercera ola). Algunas de las plataformas de arreglos disponibles, incluidas Affymetrix SNP Array 6.0 e Illumina CNV370-Duo y 1M BeadChips, incluyen SNP que etiquetan ciertas variantes de número de copia.

[0089] En ciertas realizaciones, los marcadores polimórficos se detectan mediante tecnologías de secuenciación. La obtención de información de secuencia sobre una planta individual identifica nucleótidos particulares en el contexto de una secuencia. Para los SNP, la información de secuencia sobre un solo sitio de secuencia único es suficiente para identificar los alelos en ese SNP particular. Para los marcadores que comprenden más de un nucleótido, la información de la secuencia sobre los nucleótidos del individuo que contiene el sitio polimórfico identifica los alelos del individuo para el sitio particular.

[0090] Diversos métodos para obtener una secuencia de ácido nucleico son conocidos por la persona experta, y todos estos métodos son útiles para poner en práctica la invención. La secuenciación de Sanger es un método bien conocido para generar información de secuencia de ácido nucleico. Se han desarrollado métodos recientes para obtener grandes cantidades de datos de secuencia, y tales métodos también se consideran útiles para obtener información de secuencia de una planta, si se desea. Estos incluyen, pero no se limitan a, tecnología de pirosecuenciación (Ronaghi, M. *et al. Anal Biochem* 267: 65 - 71 (1999); Ronaghi, *et al., Biotecnía* 25: 876 - 878 (1998)), *p.ej.*, 454 pirosecuenciación (Nyren, P., *et al. Anal Biochem* 208: 171-175 (1993)), tecnología de secuenciamiento Illumina /

Solexa (www.illumina.com; ver también Strausberg, RL, et al. *Drug Disc Today* 13: 569-577 (2008)), tecnología soportada de Plataforma de Ligadura y Detección de Oligonucleótidos (SOLiD) (Applied Biosystems, www.appliedbiosystems.com); Strausberg, RL, et al., *Disco de drogas hoy* 13: 569-577 (2008), secuenciación en una sola molécula, en tiempo real (Pacific Biosciences), y tecnología IonTorrent (ThermoFisher).

[0091] Los métodos de detección de polimorfismo se pueden realizar en cualquier tipo de muestra biológica de la planta que contenga ácidos nucleicos (p. Ej., ADN, ARN). Como una ventaja particular de los métodos es predecir el fenotipo de membrana de las plantas jóvenes antes del cultivo en el campo, en algunas realizaciones, las muestras se obtienen de una planta que ha sido germinada menos de 1, 2, 4, 6, meses o menos de 1, 2, 3, 4 o 5 años. En algunas realizaciones, las plantas se generan a partir de i) un cruce entre palmas *dura* y *pisífera* ii) la autofecundación de una palma *tenera*, iii) un cruce entre dos plantas que tienen fenotipo *tenera* de membrana, iv) un cruce entre palmas *dura* y *tenera* , y v) un cruce entre palmas *tenera* y *pisífera* . Debido a que dichos cruces no son 100% eficientes, dichos cruces dan como resultado un porcentaje de semillas o plantas que en el futuro no producirán semillas o plantas con el fenotipo *tenera* de membrana (en el caso de i) y el número observado de las palmas *tenera* observadas no siguen la segregación mendelliana esperada (ii, iii y iv). Al probar semillas o plantas resultantes de los cruces intentados, se puede reducir o eliminar semillas o plantas *tenera* contaminantes del material plantado para el cultivo (descartando opcionalmente aquellas plantas que se predice que serán *dura* y / o *pisífera*) Alternativamente, se pueden identificar y segregar las plantas en función de su genotipo

de membrana predicho, lo que permite la selección y el cultivo de campos de árboles *pisífera* y *dura* , si se desea, por ejemplo, para fines de reproducción posterior.

II. Plantas transgénicas

[0092] Como se discutió anteriormente, el gen de membrana de palma ha sido descubierto para controlar el fenotipo de la membrana. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se proporcionan plantas que tienen una expresión modulada de un polipéptido SHELL. El fenotipo de membrana más deseable (*tenera*, que tiene una membrana de menos de 2 mm de grosor) se produce naturalmente como un heterocigoto de entre el alelo *dura* y *pisífera*.

[0093] Se ha descubierto que los alelos *pisífera* SHELL contienen mutaciones sin sentido en porciones del gen que codifica el dominio de la MADS box de la proteína, que desempeña un papel en la regulación de la transcripción. Por lo tanto, se hipotetiza que el fenotipo *tenera* puede ser el resultado de un mecanismo que involucra la interacción proteína: proteína de la unión sin ADN de tipos de proteínas *pisífera* SHELL con tipos completamente funcionales de SHELL (homodímeros) u otros miembros de la familia MADS-box (heterodímeros). Por lo tanto, en algunas realizaciones, se proporcionan plantas que expresan heterológicamente un polipéptido SHELL con un dominio funcional M, I, y K y un dominio C- (MADSbox) no funcional. Los dominios M, I, K y C se describen en, *p.ej*, Gramzow y Theissen, 2010 *Biología del Genoma* 11: 214-224 y los dominios correspondientes se pueden identificar en las secuencias de palma descritas aquí. Al expresar dicha proteína que tiene dominios de interacción proteína: proteína activa, pero un dominio de unión

a ADN no funcional, las proteínas que interactúan con la proteína SHELL modificada se eliminarán de la acción biológica, dando como resultado, de este modo, un grosor de membrana reducido. Por lo tanto, por ejemplo, uno puede expresar cualquiera de los alelos *pisífera* descritos aquí bajo control de un promotor heterólogo en la planta (*p.ej*, una planta de palma, *p.ej*, un fondo *dura*), lo que resulta en el espesor reducido de la carcasa.

[0094] Del mismo modo, se ha descubierto que muchos alelos *pisífera* SHELL contienen mutaciones en una señal de localización nuclear (NLS) dentro de un dominio de MADS box de la proteína SHELL. Por lo tanto, se hipotetiza que el fenotipo *tenera* puede ser el resultado de un mecanismo que involucra la interacción proteína: proteína entre uno o más proteínas *pisífera* de alelo SHELL que carecen de un NLS funcional y uno o más tipos completamente funcionales de SHELL (homodímeros) u otros miembros de la familia MADS-box (heterodímeros). Al expresar dicha proteína que tiene dominios de interacción de proteína activa: proteína, pero una NLS no funcional, las proteínas que interactúan con la proteína SHELL modificada pueden inhibirse (*p.ej*, evitarse) de entrar en el núcleo o eliminarse del núcleo, reduciendo así la cantidad de proteína SHELL biológicamente activa y su proteína interactuante (*p.ej*, socio de unión) en el núcleo y que da como resultado un grosor de membrana reducido. Por lo tanto, por ejemplo, uno puede expresar cualquiera de los alelos *pisífera* que contienen una mutación NLS descrita aquí, o un gen SHELL que codifica una proteína SHELL mutada en cualquiera de los (*p.ej*, conservados) aminoácidos del NLS bajo el control de un promotor heterólogo en la planta (*p.ej*, una planta de palma, *p.ej*, un fondo *dura*), lo que resulta en el espesor reducido de la membrana.

B. Uso de ácidos nucleicos de la invención para mejorar la expresión génica

[0095] Secuencias de ácido nucleico que codifican toda o una parte activa de un polipéptido SHELL (que incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos sustancialmente idénticos a uno cualquiera o más de SEQ ID NOs: 1-10 (p.ej, cualquiera de SEQ ID NOs: 3-10), polipéptidos SHELL que tienen un dominio funcional M, I, y K y un dominio C no funcional, o polipéptidos SHELL que tienen un NLS no funcional, que cuando se expresa el espesor de la corteza de control) puede usarse para preparar casetes de expresión que potencian o aumentan la expresión del gen SHELL. Cuando se desea la sobreexpresión de un gen, se puede usar el gen SHELL deseado de una especie diferente para disminuir los posibles efectos de supresión de los sentidos.

[0096] Cualquiera de una serie de medios bien conocidos en la técnica puede usarse para aumentar la actividad de SHELL en las plantas. Cualquier órgano puede ser objetivo, como disparar órganos / estructuras vegetativas (p.ej hojas, tallos y tubérculos), raíces, flores y órganos / estructuras florales (p.ej brácteas, sépalos, pétalos, estambres, carpelos, anteras y óvulos), semillas (incluidos embriones, endospermas y semillas) y frutas. Alternativamente, un gen SHELL puede expresarse constitutivamente (p.ej, usando el promotor CaMV 35S).

[0097] Un experto reconocerá que los polipéptidos codificados por los genes de la invención, como otras proteínas, tienen diferentes dominios que realizan diferentes funciones. Por lo tanto, las secuencias génicas no necesitan ser de longitud

completa, siempre que se exprese el dominio funcional deseado de la proteína.

III. Preparación de vectores recombinantes

[0098] En algunas realizaciones, para usar secuencias aisladas en las técnicas anteriores, se preparan vectores de ADN recombinante adecuados para la transformación de células vegetales. Las técnicas para transformar una amplia variedad de especies de plantas superiores son bien conocidas y se describen en la literatura técnica y científica. Ver, por ejemplo, Weising et al. *Ann. Rev. Genet.* 22: 421 - 477 25 (1988). Una secuencia de ADN que codifica el polipéptido deseado, por ejemplo, una secuencia de ADNc que codifica una proteína de longitud completa, se combinará preferiblemente con secuencias reguladoras de iniciación transcripcional y traduccional que dirigirán la transcripción de la secuencia del gen en los tejidos pretendidos de la planta transformada.

[0099] Por ejemplo, para la sobreexpresión, puede emplearse un fragmento de promotor de planta que dirigirá la expresión del gen en todos los tejidos de una planta regenerada. Tales promotores se denominan aquí promotores "constitutivos" y son activos en la mayoría de las condiciones ambientales y 5 estados de desarrollo o diferenciación celular. Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen la región de iniciación de la transcripción 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el promotor 1'- o 2'- derivado de T-ADN de *Agrobacterium tumefaciens* y otras regiones de iniciación de la transcripción de diversos genes vegetales conocidos por los expertos.

[0100] Alternativamente, el promotor de planta puede dirigir la expresión del polinucleótido de la invención en un tejido específico (promotores específicos de tejido) o puede estar de otro modo bajo un control ambiental más preciso (promotores inducibles). Los ejemplos de promotores específicos de tejido bajo control de desarrollo incluyen promotores que inician la transcripción solo en ciertos tejidos, tales como frutas, semillas o flores. Los ejemplos de condiciones ambientales que pueden afectar la transcripción por promotores inducibles incluyen condiciones anaeróbicas, temperatura elevada o la presencia de luz.

[0101] Si se desea una expresión polipeptídica adecuada, debe incluirse una región de poliadenilación en el extremo 3' de la región codificante. La región de poliadenilación puede derivarse del gen natural, de una variedad de otros genes vegetales, o del T-ADN.

[0102] El vector que comprende las secuencias (p. Ej., Promotores o regiones codificantes) de los genes de la invención puede comprender opcionalmente un gen marcador que confiere un fenotipo seleccionable en las células vegetales. Por ejemplo, el marcador puede codificar resistencia a biocidas, particularmente resistencia a antibióticos, tal como resistencia a kanamicina, G418, bleomicina, higromicina o resistencia a herbicidas, tales como resistencia a clorosluforon o Basta.

[0103] Se proporciona un ácido nucleico de SHELL operativamente unido a un promotor que, en algunas realizaciones, es capaz de conducir la transcripción de la secuencia de codificación de SHELL en las plantas. El promotor puede ser, por ejemplo,

derivado de fuentes vegetales o virales. El promotor puede ser, por ejemplo, constitutivamente activo, inducible o específico de tejido. En la construcción de casetes de expresión recombinante, vectores, transgénicos, de la invención, se pueden elegir y emplear diferentes promotores para dirigir diferencialmente la expresión génica, por ejemplo, en algunos o todos los tejidos de una planta o animal. En algunas realizaciones, como se discutió anteriormente, los promotores deseados se identifican analizando las secuencias 5' de un clon genómico correspondiente a un gen SHELL como se describe aquí.

V. Producción de plantas transgénicas

[0104] Las construcciones de ADN de la invención se pueden introducir en el genoma del huésped vegetal deseado mediante una variedad de técnicas convencionales. Por ejemplo, la construcción de ADN puede introducirse directamente en el ADN genómico de la célula vegetal usando técnicas tales como electroporación y microinyección de protoplastos de células vegetales, o las construcciones de ADN pueden introducirse directamente al tejido vegetal utilizando métodos balísticos, tales como bombardeo de partículas de ADN. Alternativamente, las construcciones de ADN se pueden combinar con regiones flanqueantes de T-ADN adecuadas y se pueden introducir en una región de vector de anfitrión convencional *Agrobacterium tumefaciens*. Las funciones de virulencia del anfitrión *Agrobacterium tumefaciens* dirigirá la inserción de la construcción y el marcador adyacente en el ADN de la célula vegetal cuando la célula está infectada por la bacteria.

[0105] Se han descrito diversos métodos de transformación de la palma. Ver, p.ej, Masani y Parveez, *Revista Electrónica de*

Biotecnología Vol. 11 No. 3, 15 de julio de 2008; Chowdury et al., *Informes de células vegetales*, Volumen 16, Número 5, 277 - 281 (1997).

[0106] Las técnicas de microinyección son conocidas en la técnica y están bien descritas en la literatura científica y de patentes. La introducción de construcciones de ADN usando precipitación con polietilenglicol se describe en Paszkowski et al. *EMBO J.* 3: 2717 - 2722 (1984). Las técnicas de electroporación se describen en Fromm et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 82: 5824 (1985). Las técnicas de transformación balística se describen en Klein et al. *Nature* 327:70-73 (1987).

[0107] Las técnicas de transformación mediadas *Agrobacterium tumefaciens*, incluido el desarme y el uso de vectores binarios, están bien descritas en la literatura científica. Ver, por ejemplo, Horsch et al. *Ciencia* 233: 496-498 (1984), y Fraley et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 80: 4803 (1983).

[0108] Las células vegetales transformadas que se derivan de cualquier técnica de transformación se pueden cultivar para regenerar una planta completa que posee el genotipo transformado y, por lo tanto, el fenotipo deseado. Dichas técnicas de regeneración se basan en la manipulación de ciertas fitohormonas en un medio de cultivo de cultivo tisular, dependiendo opcionalmente de un marcador de biocida y / o herbicida que se ha introducido junto con las secuencias de nucleótidos deseadas. La regeneración de plantas a partir de protoplastos cultivados se describe en Evans y col., *Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture*, páginas 124-176, MacMillan Publishing Company,

Nueva York, 1983; and Binding, *Regeneration of Plants, Plant Protoplasts*, págs. 21 - 73, CRC Press, Boca Raton, 1985. La regeneración también se puede obtener de callo de plantas, explantes, órganos o partes de los mismos. Tales técnicas de regeneración se describen generalmente en Klee et al. *Ann. Rev. of Plant Phys.* 38: 467 - 486 (1987).

[0109] Los ácidos nucleicos de la invención se pueden usar para conferir rasgos deseados en esencialmente cualquier planta. Por lo tanto, la invención tiene uso en una amplia gama de plantas, incluidas especies de los géneros *Espárragos*, *Atropa*, *Avena*, *Brassica*, *Agrios*, *Citrullus*, *Pimiento*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Daucus*, *Fragaria*, *Glicina*, *Gossypium*, *Helianthus*, *Heterocallis*, *Hordeum*, *Hyosciamus*, *Lactuca*, *Linum*, *Lolium*, *Lycopersicon*, *Malus*, *Manihot*, *Majorana*, *Medicago*, *Nicotiana*, *Oryza*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Persea*, *Pisum*, *Pyrus*, *Prunus*, *Raphanus*, *Secale*, *Senecio*, *Sinapis*, *Solanum*, *Sorgo*, *Trigonella*, *Tritio*, *Vitis*, *Vignay*, *Zea*. Las plantas que tienen una cubierta, y por lo tanto las que tienen uso en la presente invención, incluyen, pero no se limitan a, dicotiledóneas y monocotiledóneas que incluyen, pero no se limitan a, la palma.

EJEMPLOS

[0110] Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

Ejemplo 1. Identificación de los alelos 3-11, que corresponden al nucleótido SEQ ID NOs: 12-21 y polipéptido SEQ ID NOs: 3-11.

[0111] Anteriormente informamos que las mutaciones *AVROS* y *MPOB* en el exón 1 del gen *SHELL* son responsables del fenotipo de la forma de la fruta de la palma de aceite *pisífera* cuando es homocigoto (*p.ej*, *AVROS* / *AVROS*, *MPOB* / *MPOB* o *AVROS* / *MPOB*) y el fenotipo de forma de fruta de palma de aceite *tenera* cuando heterocigoto junto con un alelo de tipo silvestre *dura* (*p.ej*, *AVROS* / *dura* o *MPOB* / *dura*) Mientras la palma de aceite *tenera* es el fenotipo preferido para la producción comercial de palma aceitera, es difícil prevenir por completo la aparición del tipo silvestre de palma *dura* en poblaciones comerciales. Para estimar el grado de contaminación de *dura* dentro de las poblaciones comerciales de palma aceitera, y para buscar nuevos alelos del gen *SHELL* de palma aceitera, y para buscar nuevos alelos del gen *SHELL* que son causantes del fenotipo *pisífera* / *tenera*, probamos 5,158 palmas de aceite de 6 diferentes plantaciones de pequeños propietarios en Malasia por la presencia de alelos *AVROS* y/o *MPOB* usando un ensayo de PCR específico de alelo para cada alelo (*Dura*, *sh*^{*AVROS*} y *sh*^{*MPOB*}) Como era de esperar, la mayoría de las palmas eran heterocigotas para el alelo *sh*^{*AVROS*} o *sh*^{*MPOB*} (Tabla 2).

[0112] Sin embargo, se predijo que 504 palmas serían homocigóticas para el alelo *Sh*^{*Delidura*} en ambas posiciones de SNP. El exón 1 del gen *SHELL*, que codifica el dominio completo de la MADS box, se secuenció en cada una de estas 504 palmas. La secuenciación se realizó en amplicones amplificados por PCR usando cebadores que flanquean el exón 1. La PCR se realizó en condiciones estándar. Los amplicones se purificaron y Sanger se secuenció en una dirección usando un cebador interno para los cebadores de amplificación de PCR. Las lecturas de secuenciación se analizaron individualmente dentro de CONSED para determinar la secuencia y la cigosidad de cada posición

de nucleótido dentro del exón 1. Como se muestra en la Tabla 2, se determinó que 13 palmas eran heterocigotas para el alelo *sh^{AVROS}* (2 del sitio 1, 4 del sitio 2, 2 del sitio 3, 3 del sitio 4 y 2 del sitio 5), lo que indica que estas palmas eran de hecho genotípicamente de palmas *tenera*. Se determinó que tres palmas eran heterocigotas para el alelo *sh^{MPOB}* (1 del sitio 2, 1 del sitio 4 y 1 del sitio 5), lo que indica que estos también fueron genotípicamente palmas *tenera*. Sin embargo, las 488 palmas restantes fueron homocigóticas para el alelo *Sh^{DeliDura}* en ambas posiciones de SNP, sugiriendo que estos árboles eran genotípicamente *dura* o que portaban alelos mutantes previamente no identificados del gen SHELL.

[0113] Se descubrió que el alelo 3 (SEQ ID NO: 3 y 13) era heterocigoto en 68 palmas (Tabla 2), el alelo 4 (SEQ ID NO: 4 y 14) era heterocigótico en 66 palmas y se descubrió que el alelo era heterocigoto en 1 palma. Cada una de estas 135 palmas era independiente la una de la otra. Los aminoácidos codificados por los alelos 3 y 5 se producen dentro del NLS de SHELL, al igual que las mutaciones AVROS y MPOB (figura 3). El aminoácido codificado por el alelo 4 se encuentra en aminoácidos C-terminal del aminoácido mutado por el alelo *sh^{AVROS}*.

Tabla 2. Determinación de genotipos exon 1 de SHELL en palmas tomadas de pequeñas plantaciones

Sitio en la plantación	Probado ^a	Secuenciado ^b	AVROS	MPOB	Alelo 3	Alelo 4	Alelo 5	Alelo 6	Alelo 7	Alelo 8	Alelo 9	Alelo 10	Alelo 11
1	940	102	2	-	1	23	1	-	-	-	-	-	-
2	1,133	126	4	1	-	16	-	-	-	-	-	-	-
3	720	27	2	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-
4	1,092	36	3	1	-	11	-	-	-	-	-	-	-
5	922	145	2	1	58	11	-	-	-	-	-	-	-
6	351	68	-	-	9	1	-	-	-	-	-	-	-

^a Número de palmas independientes probado para mutaciones AVROS y MBOP por ensayo PCR de alelo específico

^b Número de palmas independientes analizadas además por secuenciamiento de ADN del exon 1 del gen SHELL

[0114] Luego, genotipificamos 3.952 palmas de siete sitios de vivero de palma de aceite en Malasia (Tabla 3). Una vez más, la mayoría eran heterocigotos para el alelo *sh^{AVROS}* o *sh^{MPOB}*, indicó que eran genotípicamente palmas *tenera*. Sin embargo, se pronosticaron 536 palmas para ser homocigotos para el alelo *Sh^{DeliDura}* en ambas posiciones de SNP. El exón 1 del gen SHELL, que codifica el dominio completo de la MADS box, se secuenció en cada una de estas 536 palmas como se describió anteriormente.

[0115] Como se muestra en la Tabla 3, se determinó que 6 palmas eran heterocigotas para el alelo *sh^{AVROS}*, lo que indica que estas palmas eran de hecho genotípicamente palmas *tenera*. Se determinó que una palma era heterocigota para el alelo *sh^{MPOB}*. Sin embargo, se determinó que las 529 palmas restantes eran homocigóticas para el alelo *Sh^{DeliDura}* en ambas posiciones de SNP, sugiriendo que estos árboles eran genotípicamente *dura* o que portaban alelos mutantes previamente no identificados del gen SHELL. Se descubrió que el alelo 3 (SEQ ID NO: 3 y 13) era heterocigoto en 36 palmas (Tabla 3), y el Alelo 4 (SEQ ID NO: 4 y 14) resultó ser heterocigoto en 2 palmas. Cada una de estas 38 palmas era independiente la una de la otra.

Tabla 3. Determinación del genotipo del exon 1 de SHELL en palmas tomadas de criaderos de palma de aceite

Sitio del criadero	Probado ^a	Secuenciado ^b	AVROS	MPOB	Alelo 3	Alelo 4	Alelo 5	Alelo 6	Alelo 7	Alelo 8	Alelo 9	Alelo 10	Alelo 11
1	539	40	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	571	134	-	1	18	-	-	-	-	-	-	-	-
3	576	147	2	-	12	2	-	-	-	-	-	-	-
4	571	94	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-
5	550	22	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	572	65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	573	34	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^aNúmero de palmas independientes probadas para mutaciones AVROS y MBOP por pruebas PCR para alelos específicos

^bNúmero de palmas independientes analizadas además por secuenciamiento del ADN del exon 1 del gen SHELL

[0116] Para identificar aún más las variantes del exón 1 de SHELL, secuenciamos el exón 1 del gen SHELL en 148 palmas de

colecciones de germoplasma recolectadas de diversas regiones geográficas (64 de Angola, 28 de Ghana, 27 de Nigeria, 27 de Tanzania y 2 de Guinea). El alelo *sh*^{AVROS} fue más común entre las poblaciones que se espera que sean de el fenotipo *tenera* (50 Angola, 10 Ghana, 6 Nigeria y 22 palmas de Nigeria), mientras que el alelo *sh*^{MPOB} se detectó en 5 Angola, 5 Ghana y 19 palmas de Nigeria (Tabla 4). El alelo 4 (también detectado en pequeñas plantaciones y viveros) se detectó en las palmas 1 Ghana y 2 Guinea.

[0117] Además, se detectaron seis nuevos alelos SHELL. El Alelo 6 fue detectado en 4 palmas de Tanzania y codifica un cambio de aspartato al aminoácido glutamina en relación con *dura* en la posición de aminoácido 12 (Figuras 2 y 3). El Alelo 7, una eliminación de inframejoras que elimina 5 aminoácidos en relación con *dura* fue detectado en 1 palma de Nigeria. Los Alelos 8 y 9 alteran el mismo aminoácido relativo a *dura*. La arginina conservada en la posición de aminoácido 24 se cambia a histidina en Alelo 8 y a la glicina en Alelo 9 (Figuras 2 y 3). El Alelo 10 se detectó en una palma de Ghana, y codifica una sustitución de aminoácido valina a glutamato en relación con *dura* en la posición de aminoácido 37. Finalmente, el Alelo 11 fue detectado en dos palmas de Angola, y codifica un polimorfismo de nucleótido único sinónimo (Figura 2). Es digno de mención que, como las mutaciones *sh*^{AVROS} y *sh*^{MPOB}, los Alelos 3, 5, 7, 8 y 9 todos afectan a los aminoácidos que son parte de la NLS altamente conservada de la proteína SHELL.

Tabla 4. Determinación de los genotipos del exon 1 de SHELL en colecciones de germoplasma

	Sequenced	AVROS	MPOB	Alelo 3	Alelo 4	Alelo 5	Alelo 6	Alelo 7	Alelo 8	Alelo 9	Alelo 10	Alelo 11
Angola	64	50	5	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Ghana	28	10	5	-	1	-	-	-	4	4	1	-
Nigeria	27	6	19	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Tanzania	27	22	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-
Guinea	2	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-

[0118] Entre las palmas secuenciadas como parte de la colección de germoplasma, 32 fueron visualmente fenotipadas para el tipo de fruto de palma de aceite (*dura*, *tenera* o *pisífera*). De tres palmas de Angola fenotipadas como *tenera*, dos eran heterocigotos para el alelo *shAVROS* y eran de tipo silvestre (*dura*) en todas las otras posiciones de nucleótidos del exón 1 dentro del exón 1. De dos palmas de Angola fenotipadas como *dura*, ambos eran heterocigotos para el Alelo 11 variante (Alelo 11 / *ShDeliDura*) y eran de tipo silvestre (*dura*) en todas las demás posiciones de nucleótidos del exón 1, de acuerdo con la expectativa de que el cambio sinónimo no está directamente involucrado en el fenotipo *tenera* / *pisífera*. Una palma de Angola fenotipada como *tenera* era de tipo silvestre (*dura*) en todas las posiciones de nucleótidos del exón 1. Ninguna de las palmas de Angola en este estudio fue fenotipada como *pisífera*.

[0119] De 10 palmas de Ghana fenotipadas como *tenera*, 1 era heterocigoto para Alelo 4 (Alelo 4 / *ShDeliDura*) y era de tipo silvestre (*dura*) en todas las otras posiciones de nucleótidos del exón 1, 4 fueron heterocigóticas para Alelo 8 (Alelo 8 / *ShDeliDura*) y eran de tipo silvestre (*dura*) en todas las otras posiciones de nucleótidos del exón 1, 4 fueron heterocigóticas para Alelo 9 (Alelo 9 / *ShDeliDura*) y eran de tipo silvestre (*dura*) en todas las otras posiciones de nucleótidos del exón 1, y 1 era heterocigoto para Alelo 10 (Alelo 10 / *ShDeliDura*) y

era de tipo silvestre (*dura*) en todas 15 las demás posiciones de nucleótidos del exón 1. Ninguna de las palmas de Ghana en este estudio fue fenotipada como *dura*.

[0120] De 8 palmas de Nigeria fenotipadas como *tenera*, 3 eran heterocigotos para el sh^{AVROS} alelo ($sh^{AVROS}/Sh^{DeliDura}$) y tipo silvestre (*dura*) en todas las otras posiciones de nucleótidos, 3 fueron heterocigotos para el sh^{MPOB} alelo ($sh^{MPOB}/Sh^{DeliDura}$) y tipo silvestre (*dura*) en todas las otras posiciones de nucleótidos del exón 1, y 1 era heterocigoto para Alelo 7 (Alelo 7 / $Sh^{DeliDura}$) y tipo silvestre (*dura*) en 25 todas las demás posiciones de nucleótidos del exón 1. Una palma Nigera fenotipada como *tenera* era de tipo silvestre (*dura*) en todas las posiciones de nucleótidos del exón 1. De dos palmas de Nigeria fenotipadas como *pisífera*, 1 era homocigoto para el sh^{AVROS} alelo y era de tipo silvestre (*dura*) 30 en todas las otras posiciones de nucleótidos del exón 1, mientras que el otro era heterocigoto para el sh^{AVROS} alelo ($sh^{AVROS}/Sh^{DeliDura}$) y era de tipo silvestre (*dura*) en todas las demás posiciones de nucleótidos del exón 1. Ninguna de las palmas de Nigeria en este estudio fue fenotipada como *dura*.

[0121] De 2 palmas de Tanzania fenotipadas como *tenera*, 1 era heterocigoto para sh^{AVROS} Alelo ($sh^{AVROS}/Sh^{DeliDura}$) y era de tipo silvestre (*dura*) en todas las otras posiciones de nucleótidos del exón 1, mientras que el otro era un heterocigoto compuesto con el sh^{AVROS} alelo en un cromosoma y Alelo 6 en el otro cromosoma ($sh^{AVROS}/Alelo\ 6$) y era de tipo silvestre (*dura*) en todas las demás posiciones de nucleótidos del exón 1. Además, 3 de 3 palmas de Tanzania fenotipadas como *dura* eran heterocigotos para Alelo 6. Esto sugiere que, aunque Alelo 6 no puede contribuir al fenotipo *tenera*, puede ser un marcador

para alelos estrechamente relacionados que contribuyen al fenotipo. Ninguna palmera de Tanzania en este estudio fue fenotipada como *pisifera*.

[0122] De 2 palmas de Guinea fenotipadas como tenera, 1 era heterocigoto para Alelo 4 (Alelo 4 / ShDeliDura) y era de tipo silvestre (*dura*) en todas las demás posiciones de nucleótidos del exón 1. El otro era homocigoto para *Alelo 4* y era de tipo silvestre (*dura*) en todas las demás posiciones de nucleótidos del exón 1. Ninguna de las palmas de Guinea en este estudio fue fenotipada como *dura* o *pisifera*.

REFERENCIAS

Beirnaert, A. y Vanderweyen, R. 1941. Contribución a l'etude genetique et biometrique des variedades d'*Elaeis guineensis* Jacq. Publs. INEAC, Serie Ser. Sci. (27):101.

Bhasker, S. y Mohankumar, C. Asociación de enzimas lignificadoras en la síntesis de conchas de la fruta de la palma aceitera (*Elaeis guineensis* - variedad dura). 2001. *Indian J Exp Biol* 39: 160-4.

Billotte, N., Marseillac, N., Risterucci, AM, Adon, B., Brotteir, P., Baurens, FC, Singh, R., Herran, A., Asmady, H., Billot, C., Amblard, P Durrand-Gasselín, T., Courtois, B., Asmono, D., Cheah, SC, Rohde, W y Charrier, A. 2005. Mapa de ligamiento de alta densidad basado en microsatélites en palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Genética Teórica y Aplicada* 110: 754-765.

Birchler, JA, Auger, DL y Riddle, NC 2003. En busca de la base molecular de la heterosis. *Célula vegetal* 15: 2236-9.

Cheah, SC 1996. Polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción (RFLP) en la palma aceitera. Informe de finalización del proyecto n. ° 0011/95, 4th Julio de 1996, Junta de aceite de palma de Malasia (MPOB), Bangi, Malasia.

Cheah, SC y Rajinder, S. 1998. Expresión génica durante el desarrollo floral en la palma de aceite. Informe de finalización del proyecto No. 0057/98, 16 de julio de 1999. Instituto de Investigación del Aceite de Palma de Malasia (PORIM), Bangi, Malasia.

Corley, RHV y Tinker, PB 2003. Cuidado y mantenimiento de palmas de aceite. En *La palma de aceite* (4ta edición), pp: 287-326. Oxford: Blackwell Science.

Danielsen, F. y col. 2009. Plantaciones de biocombustibles en tierras boscosas: doble peligro para la biodiversidad y el clima. *Conserv Biol* 23: 348-58.

Devuyt, A. 1953. Selección de la palma de aceite (*Elaeis 10 guineensis*) en África. *Naturaleza* 172: 685-686.

Dinnyeny, JR y Yanofsky, MF 2005. Dibujando líneas y bordes: cómo se modela la fruta dehiscente de *Arabidopsis*. *Bioensayos* 27: 42-9.

Donough, CR y Law, IH 1995. Reproducción y selección para la producción de semillas en Pamol Plantations Sdn Bhd y el rendimiento temprano de Pamol D x P. *Plantador* 71: 513-530.

Doyle, JJ y Doyle, JL 1990. Aislamiento de ADN de planta de tejido fresco. *FOCUS* 12:13-15.

Ferrandiz, C., Liljegren, SJ y Yanofsky, MF 2000. Regulación negativa de los genes SHATTERPROOF por FRUITFULL durante el desarrollo de la fruta de *Arabidopsis*. *Science* 289: 436-8.

Goddling, R. 1930. Observación de la producción de palmiers selectionnes a Mongana (Equateur). *Bull Arig. Congo belge* 21: 1263.

Gschwend, M. et al. 1996. Un locus para la anemia de Fanconi en 16q determinado por mapeo de homocigosis. *Am J Hum Genet* 59: 377-84.

Gu, Q., Ferrandiz, C., Yanofsky, MF y Martienssen, R. 1998. El gen FRUITFULL MADS-box media la diferenciación celular durante el desarrollo de la fruta de Arabidopsis. *Desarrollo* 125: 1509-17.

Gramzow, L. y Theissen, G. 2010. Una guía de autoestopista sobre el mundo de plantas MADS. *Biología del Genoma* 11: 214-225.

Hardon, JJ, Rao, V. y Rajanaidu, N. 1985. Una revisión de la cría de palma aceitera. En progreso en fitomejoramiento, ed GE Rusell, pp139- 163, Butterworths, Reino Unido.

Hartley, CWS 1988. La botánica de la palma de aceite. En La palma de aceite (3ra edición), pp: 47-94, Longman, Londres.

Huang, H., Tudor, M., Su, T., Zhang, Y., Hu, Y., y Ma, H. 1996. Propiedades de unión al ADN de dos proteínas del dominio MADS de Arabidopsis: Consenso vinculante y formación del dímero. *La célula de la planta* 8: 81-94.

Immink, RG, Gadella, TWJ, Ferrario, S., Busscher, M. y Angenent, G. 2002. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 2416-2421.

Immink, RG, Kaufmann, K. y Angenent, GC 2010. El 'ABC' del comportamiento e interacciones proteicas del dominio MADS. *Semin Cell Dev Biol* 21: 87-93.

Jack, PL, James, C., Price, Z., Rance, K., Groves, L., Corley, RHV, Nelson, S y Rao, V. 1998. Aplicación de marcadores de ADN en la reproducción de palma aceitera. En: Congreso Internacional de la Palma Petrolera de 1998: mercancía del pasado, hoy y futuro, del 23 al 25 de 5 septiembre de 1998, Bali, Indonesia.

Krieger, U., Lippman, ZB y Zamir, D. 2010. El gen de floración SINGLE FLOWER TRUSS impulsa la heterosis para obtener rendimiento en tomate. *Nat Genet* 42: 459-63.

Lander, ES y Botstein, D. 1987. Mapeo de homocigosidad: una forma de mapear los rasgos humanos recesivos con el ADN de los niños endogámicos. *Ciencia* 236: 1567-70.

Latiff, A. 2000. La biología del género *Elaeis*. En: *Avances en la investigación de Palm Oil*, Volumen 1, ed. Y. Basiron, BS Jalani, y KW Chan, pp: 19-38, Malaysian Palm Oil Board (MPOB).

Liljegren, SJ, Ditta, GS, Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, JL, Yanofsky, MF 2000. Los genes MADS-box SHATTERPROOF controlan la dispersión de semillas en *Arabidopsis*. *Nature* 404: 766-770.

Maria, M., Clyde, MM y Cheah, SC 1995. Análisis citológico de *Elaeis guineensis* (tenera) cromosomas. *Elaeis* 7: 122-134.

Mayes, S., Jack, PL, Marshall, DF y Corley, RHV 1997. Construcción de un mapa de ligamiento genético RFLP para 30 palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Genoma* 40: 116-122.

Moretzsohn, MC, Nunes, CDM, Ferreira, ME y Grattapaglia, D. 2000. Mapeo de ligamiento de RAPD del locus de espesor de la

membrana en la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.).
Genética teórica y aplicada 100: 63-70.

Ooijen, JWV 2006. JoinMap 4.0: Software para el cálculo de mapas de enlaces genéticos. En poblaciones experimentales. Kyazma BV, Wageningen, Países Bajos

Pinyopich, A. y col. 2003. Evaluar la redundancia de los genes MADS-box durante el desarrollo del carpelo y el óvulo. *Nature* 424: 85-8.

Purseglove, JW 1972. Cultivos tropicales. Monocotiledóneas. Longman, Londres. pp: 607.

Rajanaidu, N., Rao, V., Abdul Halim, H. y ASH, O. 1989. Recursos genéticos: Nuevos desarrollos en la reproducción de palma aceitera. *Elaeis* 1: 1-10.

Rajanaidu, N. 1990. Desarrollos principales en la palma aceitera (*Elaeis guineensis*) crianza. En los procedimientos de los 12th Reunión Plenaria de AETFAT, pp: 39-52. Hamburgo, Alemania.

Rajanaidu, N. y col. 2000. en *Avances en la investigación de Palm Oil* (editores Basiron, Y., Jalani, BS y Chan, KW) 171-237 (Junta de aceite de palma de Malasia (MPOB), Bangi, Selangor).

Sambrook, J., Fritsch, EF y Maniatis, T. 1989. Clonación molecular: Un manual de laboratorio, (2Dakota del Norte edición). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

Singh R, Tan SG, Panandam JM, Rahman RA, Ooi LCL, bajo ETL, 5 Sharma M, Jansen J y Cheah SC. 2009. Mapeo de loci de rasgos cuantitativos (QTL) para la composición de ácidos grasos en una cruz interespecífica de palma de aceite. *BMC Plant Biology* 9: 114.

Sousa, J., Barata, AV, Sousa, C., Casanova, CC y Vicente, L. 2011. Uso de aceite de palma de chimpancé en el sur del Parque Nacional de Cantanhez, Guinea-Bissau. *Am J Primatol* 73: 485-97.

Tani, E., Polidoros, AN y Tsaftaris, AS Caracterización y análisis de expresión de los genes FRUITFULL y SHATTERPROOF del melocotón (*Prunus persica*) y su papel en la formación de fosetas divididas. 2007. *Árbol Physiol* 27: 649-59.

Vrebalov, J., Pan, IL, Arroyo, AJM, McQuinn, R., Chung, M., Poole, M., Rose, J., Seymour, G., Grandillo, S., Giovannoni, J. e irlandés. , VF 2009. La expansión y maduración de la fruta carnosa están reguladas por el gen SHATTERPROOF de tomate TAGL1. *La célula de la planta* 21: 3041-3062.

Whitmore, TC 1973. Las palmas de Malaya. Longmans, Malasia, pp: 56-58.

[0123] El término "uno" o "una" significa "uno o más". El 30 término "comprender" y sus variaciones tales como "comprende" y "que comprende", cuando preceden a la enumeración de un paso o un elemento, pretenden significar que la adición de etapas o elementos adicionales es opcional y no está excluida. Todas las patentes, solicitudes de patentes y otros materiales de

referencia publicados citados en esta memoria descriptiva se incorporan aquí como referencia en su 5 totalidad.

LISTA INFORMAL DE SECUENCIAS EJEMPLARES

SEQ ID NO: 1 SHELL predijo la secuencia de la proteína, la mutación subrayada, en cursiva y en negrita

[***pisífera***, Alelo de Zaire; sh^{AVROS}]

MGRGKIEIKRIENTTSRQVTFCRRNGLLKnorteAYELSVLCDAEVALIVFSS
RGRLYEYANNSIRSTIDRYKKACANSSNSGATIEINSQYYQQESAKLRHQ
IQILQNANRHLMGALSTLTVKELKQLENRLERGITRIRSKKHELLFAEI
EYMQKREVELQNDNMYLRAKIAENERAQQAA

SEQ ID NO: 2 SHELL predijo la mutación de la secuencia proteica subrayada, en cursiva y en negrita

[***pisífera***, Alelo de Nigeria; sh^{MPOB}]

MGRGKIEIKRIENTTSRQVTFCRRNGLPAGKKAYELSVLCDAEVALIVFSS
RGRLYEYANNSIRSTIDRYKKACANSSNSGATIEINSQYYQQESAKLRHQ 15
IQILQNANRHLMGALSTLTVKELKQLENRLERGITRIRSKKHELLFAEI
EYMQKREVELQNDNMYLRAKIAENERAQQAA

SEQ ID NO: 3 SHELL predijo la mutación de la secuencia de proteínas subrayada, en cursiva y en negrita

[predicho ***pisífera***, Alelo 3]

MGRGKIEIKRIENTTSRQVTFCQRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIVFSS
RGRLYEYANNSIRSTIDRYKKACANSSNSGATIEINSQYYQQESAKLRHQ
IQILQNANRHLMGALSTLTVKELKQLENRLERGITRIRSKKHELLFAEI
EYMQKREVELQNDNMYLRAKIAENERAQQAA

SEQ ID NO: 4 SHELL predijo la mutación de la secuencia proteica subrayada, en cursiva y en negrita

[predicho ***pisífera***, Alelo 4]

MGRGKIEIKRIENTTSRQVTFCRRNGLLKKAYELSVLCDreEVALIVFSS
RGRLYEYANNSIRSTIDRYKKACANSSNSGATIEINSQYYQQESAKLRHQ
IQILQNANRHLMGALSTLTVKELKQLENRLERGITRIRSKKHELLFAEI

EYMQKREVELQNDNMYLRAKIAENERAQQAA

SEQ ID NO: 5 SHELL predijo la mutación de la secuencia de proteínas subrayada, en cursiva y en negrita

[predicho ***pisífera***, Alelo 5]

MGRGKIEIKRIENTTSRQVTFCnorteRRNGLLKAYELSVLCDAEVALIVFSS

RGRLYEYANNSIRSTIDRYKKACANSSNSGATIEINSQYYQQESAKLRHQ

IQILQNANRHLMGALSTLTVKELKQLENRLERGITRIRSKKHELLFAEI

EYMQKREVELQNDNMYLRAKIAENERAQQAA

SEQ ID NO: 6 SHELL predijo la mutación de la secuencia de proteínas subrayada, en cursiva y en negrita

[predicho ***pisífera***, Alelo 6]

MGRGKIEIKRIQNTTSRQVTFCRRNGLLKAYELSVLCDAEVALIVFSS

RGRLYEYANNSIRSTIDRYKKACANSSNSGATIEINSQYYQQESAKLRHQ

IQILQNANRHLMGALSTLTVKELKQLENRLERGITRIRSKKHELLFAEI

EYMQKREVELQNDNMYLRAKIAENERAQQAA

SEQ ID NO: 7 SHELL predijo secuencias proteicas de aminoácidos eliminados indicados por un guion ("-")

[predicho ***pisífera***, Alelo 7]

MGRGKIE - - - -NTTSRQVTFCRRNGLLKAYELSVLCDAEVALIVFSS

RGRLYEYANNSIRSTIDRYKKACANSSNSGATIEINSQYYQQESAKLRHQ

IQILQNANRHLMGALSTLTVKELKQLENRLERGITRIRSKKHELLFAEI

EYMQKREVELQNDNMYLRAKIAENERAQQAA

SEQ ID NO: 8 SHELL predijo la mutación de la secuencia de proteína subrayada, en cursiva y en negrita

[predicho ***pisífera***, Alelo 8]

MGRGKIEIKRIENTTSRQVTFCMARIDORNGLLKAYELSVLCDAEVALIVFSS

RGRLYEYANNSIRSTIDRYKKACANSSNSGATIEINSQYYQQESAKLRHQ

IQILQNANRHLMGALSTLTVKELKQLENRLERGITRIRSKKHELLFAEI

EYMQKREVELQNDNMYLRAKIAENERAQQAA

SEQ ID NO: 9 SHELL predijo la mutación de la secuencia de proteínas subrayada, en cursiva y en negrita

[predicho *pisífera*, Alelo 9]

MGRGKIEIKRIENTTSRQVTFCKGRAMORNGLLKKAYELSVLCDAEVALIVFSS

RGRLYEYANNSIRSTIDRYKKACANSSNSGATIEINSQYYQQESAKLRHQ

IQILQNANRHLMGALSTLTVKELKQLENRLERGITRIRSKKHELLFAEI

EYMQKREVELQNDNMYLRAKIAENERAQQAA

SEQ ID NO: 10 SHELL predijo la mutación de la secuencia proteica subrayada, en cursiva y en negrita

[predicho *pisífera*, Alelo 10]

MGRGKIEIKRIENTTSRQVTFCKRRNGLLKKAYELsreLCDAEVALIVFSS

RGRLYEYANNSIRSTIDRYKKACANSSNSGATIEINSQYYQQESAKLRHQ

IQILQNANRHLMGALSTLTVKELKQLENRLERGITRIRSKKHELLFAEI

EYMQKREVELQNDNMYLRAKIAENERAQQAA

SEQ ID NO: 11 SHELL predijo la secuencia de la proteína, la mutación silenciosa da como resultado la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre

[predicho *pisífera*, Alelo 11]

MGRGKIEIKRIENTTSRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIVFSS

RGRLYEYANNSIRSTIDRYKKACANSSNSGATIEINSQYYQQESAKLRHQ

IQILQNANRHLMGALSTLTVKELKQLENRLERGITRIRSKKHELLFAEI

EYMQKREVELQNDNMYLRAKIAENERAQQAA

SEQ ID NO: 12 Delección en el intrón 1 del gen SHELL, nucleótidos delecionados en referencia al tipo silvestre denotado con un guión ("-")

GTATGCTTTGATGACGCCTTCTCTTCCTTCGCTCATATCAAG - - - -

TTTTATGGCTTCA T

SEQ ID NO: 13 SHELL Exon 1 Secuencia del alelo 3, mutación
subrayada, en cursiva y negrita

ATGGGTAGAGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGAACACCACAAGCCGGCAGGTCACCTT
TCTGCdoAACGCCGAAATGGACTGCTGAAGAAAGCTTATGAGTTGTCTGTCCTTTGTGATG
CTGAGGTTGCCCTTATTGTCTTCTCCAGCCGGGGCCGCCTCTATGAGTACGCCAATAACAG

SEQ ID NO: 14 SHELL Exon 1 Secuencia del alelo 4, mutación
subrayada, en cursiva y negrita

ATGGGTAGAGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGAACACCACAAGCCGGCAGGTCACCTT
TCTGCAAACGCCGAAATGGACTGCTGAAGAAAGCTTATGAGTTGTCTGTCCTTTGTGATGU
NTGAGGTTGCCCTTATTGTCTTCTCCAGCCGGGGCCGCCTCTATGAGTACGCCAATAACAG

SEQ ID NO: 15 SHELL Exon 1 Secuencia del alelo 5, mutación
subrayada, en cursiva y negrita

ATGGGTAGAGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGAACACCACAAGCCGGCAGGTCACCTT
TCTGCAATCGCCGAAATGGACTGCTGAAGAAAGCTTATGAGTTGTCTGTCCTTTGTGATGC
TGAGGTTGCCCTTATTGTCTTCTCCAGCCGGGGCCGCCTCTATGAGTACGCCAATAACAG

SEQ ID NO: 16 SHELL Exon 1 Secuencia del alelo 6, mutación
subrayada, en cursiva y negrita

ATGGGTAGAGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCdoAGAACACCACAAGCCGGCAGGTCACCT
TTCTGCAAACGCCGAAATGGACTGCTGAAGAAAGCTTATGAGTTGTCTGTCCTTTGTGATG
CTGAGGTTGCCCTTATTGTCTTCTCCAGCCGGGGCCGCCTCTATGAGTACGCCAATAACAG

SEQ ID NO: 17 SHELL Exon 1 Secuencia del alelo 7, nucleótidos
eliminados en referencia a tipo silvestre-type denotado por
un guion ("-")

ATGGGTAGAGGAAAGATTGAGA - - - - -
ACACCACAAGCCGGCAGG
TCACTTTCTGCAAACGCCGAAATGGACTGCTGAAGAAAGCTTATGAGTTGTCTGTCCTTTG

TGATGCTGAGGTTGCCCTTATTGTCTTCTCCAGCCGGGGCCGCCTCTATGAGTACGCCAAT
AACAG

SEQ ID NO: 18 SHELL Exon 1 Secuencia del alelo 8, mutación
subrayada, en cursiva y negrita

ATGGGTAGAGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGAACACCACAAGCCGGCAGGTCACTT
TCTGCAAACUNCCGAAATGGACTGCTGAAGAAAGCTTATGAGTTGTCTGTCCTTTGTGATG
CTGAGGTTGCCCTTATTGTCTTCTCCAGCCGGGGCCGCCTCTATGAGTACGCCAATAACAG

SEQ ID NO: 19 SHELL Exon 1 Secuencia del alelo 9, mutación
subrayada, en cursiva y negrita

ATGGGTAGAGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGAACACCACAAGCCGGCAGGTCACTT
TCTGCAAAGRAMOGCCGAAATGGACTGCTGAAGAAAGCTTATGAGTTGTCTGTCCTTTGTG
ATGCTGAGGTTGCCCTTATTGTCTTCTCCAGCCGGGGCCGCCTCTATGAGTACGCCAATAA
CAG

SEQ ID NO: 20 SHELL Exon 1 Secuencia del alelo, mutación
subrayada, en cursiva y negrita

ATGGGTAGAGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGAACACCACAAGCCGGCAGGTCACTT
TCTGCAAACGCCGAAATGGACTGCTGAAGAAAGCTTATGAGTTGTCTGUNCCTTTGTGATG
CTGAGGTTGCCCTTATTGTCTTCTCCAGCCGGGGCCGCCTCTATGAGTACGCCAATAACAG

SEQ ID NO: 21 SHELL Exon 1 Secuencia del alelo 11, mutación
subrayada, en cursiva y negrita

ATGGGTAGAGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGAACACCACAAGCCGGCAGGTCACTT
TCTGCAAACGCCGAAATGGACTGCTGAAGAAAGCTTATGAGTTGTCTGTCCTdoTGTGATG
CTGAGGTTGCCCTTATTGTCTTCTCCAGCCGGGGCCGCCTCTATGAGTACGCCAATAACAG

SEQ ID NO: 22 SHELL Exon 1 Secuencia de *shAVROS* Alelo, mutación subrayada, en cursiva y negrita

ATGGGTTAGAGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGAACACCACAAGCCGGCAGGTCACCTT
TCTGCAAACGCCGAAATGGACTGCTGAAGAA TGCTTATGAGTTGTCTGTCCTTTGTGATGC
TGAGGTTGCCCTTATTGTCTTCTCCAGCCGGGGCCGCCTCTATGAGTACGCCAATAACAG

SEQ ID NO: 23 SHELL Exon 1 Secuencia de *shMPOB* Alelo, mutación subrayada, en cursiva y negrita

ATGGGTTAGAGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGAACACCACAAGCCGGCAGGTCACCTT
TCTGCAAACGCCGAAATGGACTGCdoGAAGAAAGCTTATGAGTTGTCTGTCCTTTGTGATG
CTGAGGTTGCCCTTATTGTCTTCTCCAGCCGGGGCCGCCTCTATGAGTACGCCAATAACAG

SEQ ID NO: 24 SHELL de tipo silvestre (*Sh^{DeliDura}*) secuencia de proteína predicha. Aminoácidos mutados en *sh^{AVROS}*, *sh^{MPOB}*, y los alelos 3-6 y 8-10 están subrayados, en cursiva y negrita. Los aminoácidos mutados en el alelo 7 están subrayados.

[*dura*, *Sh^{DeliDura}*]

MGRGKIEIKRimINTTSRQVTFCRRNGLLKKAYELSVLCDUNEVALIVFSS
RGRLYEYANNSIRSTIDRYKKACANSSNSGATIEINSQYYQQESAKLRHQ
IQILQ^NNANRHL^MGEALSTLT^VKELKQLENRLERGITRIRSKKHELLFAEI
EYMQKREVELQNDNMYLRAKIAENERAQQA

SEQ ID NO: 25 SHELL de tipo silvestre (*Sh^{DeliDura}*) Secuencia del exón 1, nucleótidos mutados en *sh^{AVROS}*, *sh^{MPOB}*, y los alelos 3-6 y 8-11 están subrayados, en cursiva y negrita. Los nucleótidos delecionados en el alelo 7 están subrayados

ATGGGTTAGAGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGRAMOAGAACACCACAAGCCGGCAGGTC
ACTTTCTGCUNUNACGCCGAAATGGACTGCTGAAGAAUNGCTTATGAGTTGTCTGTCCTTT
GTGATGdoTGAGGTTGCCCTTATTGTCTTCTCCAGCCGGGGCCGCCTCTATGAGTACGCCA
ATAACAG

SEQ ID NO: 26 SHELL de tipo silvestre (*ShDeliDura*) El exón 1 se fusionó con los nucleótidos 1-119 del intrón 1

ATGGGTAGAGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGAACACCACAAGCCGGCAGGTCACCTT
TCTGCAAACGCCGAAATGGACTGCTGAAGAAAGCTTATGAGTTGTCTGTCCTTTGTGATGC
TGAGGTTGCCCTTATTGTCTTCTCCAGCCGGGGCCGCCTCTATGAGTACGCCAATAACAGG
TATGCTTTGATGACGCCTTCTCTTCCTTCGCTCATATCAAGTTAATTTTATGGCTTCATTT
GTTCTATGGCCAAGCCAAATTCTTTTTAAAGTTCTAGAATGTTAATGATGGTAGTTT

Señora

María José Lamus Becerra

Directora de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

E. S. D.

Referencia: Solicitud de PCT Patente de Invención denominada **Método para Predecir el Fenotipo de la Cáscara de Palma Mediante la Detección de Polimorfismos en el Exón 1 del Gen Shell.**

Asunto: Respuesta al Requerimiento No. 2299 del 8 de mayo de 2019.

Expediente No. NC2018/0000194

Juan Carlos Cuesta Quintero, mayor de edad, identificado como aparece al pie de mi firma, obrando en mi calidad de apoderado de **Malasyan Palm Oil Board** doy respuesta al Oficio No. 2299 del 8 de mayo de 2019, bajo los siguientes términos:

1. Reivindicaciones relativas al uso:

El Examinador objeta las reivindicaciones 20-22, argumentando que las mismas se refieren al uso de la gonadotrofina coriónica equina recombinante, por lo cual no son patentables.

Con el fin de subsanar las objeciones presentadas por parte del Examinador, el solicitante elimina las reivindicaciones 20 y 22 del nuevo capítulo reivindicatorio adjunto.

2. Claridad de la solicitud

- Título

El Examinador objeta el título de la solicitud por considerar que el mismo no se ajusta al objeto de la solicitud contenido en la descripción y las reivindicaciones. El solicitante acepta la sugerencia del Examinador y modifica el título de la solicitud al siguiente:

"Método para Predecir el Fenotipo de la Cáscara de Palma Mediante la Detección de Polimorfismos en el Exón 1 del Gen Shell"

- Reivindicaciones

- El Examinador objeta la claridad de la reivindicación 1, argumentando que la redacción no es clara y las secuencias mencionadas no corresponden con las secuencias mencionadas en la descripción ni con las secuencias de la palma de aceite. Con el fin de subsanar esta objeción, el solicitante presenta un nuevo capítulo reivindicatorio en el cual se corrigen las reivindicaciones 1 y 2 para incluir las secuencias correctas.
- El Examinador objeta las reivindicaciones 1, 3, 8 y 9, argumentando que no se hace la traducción adecuada de la expresión “gen SHELL”. El solicitante presenta un nuevo capítulo reivindicatorio en el cual se corrigen los errores de traducción.
- El Examinador objeta la redacción de la reivindicación 2 por que contiene dos enlaces gramaticales que no permiten establecer las características esenciales que se pretenden reclamar. También objeta el que la reivindicación 2 comprende características que se consideran resultados a alcanzar. Con el fin de subsanar esta objeción, el solicitante presenta un nuevo capítulo reivindicatorio en el cual se corrige la reivindicación 2 para eliminar el uso errado de los enlaces gramaticales.

En cuanto a la objeción realizada por parte del Examinador relacionada con el supuesto resultado a alcanzar, el solicitante no esta de acuerdo con la misma ya que los pasos del método objetados por el Examinador son el resultado natural de los pasos anteriores, o sea, donde se detectan las secuencias genéticas de interés. Los pasos objetados por el Examinador podrían llegar a considerarse como un resultado a alcanzar si se presentaran por si solos en una reivindicación dependiente, pero en la manera en que se presentan constituyen más una característica funcional del método que un resultado a alcanzar. Por lo tanto, el solicitante considera que remover las características objetadas le quitaría claridad al método reclamado, ya que para el técnico medio con habilidad ordinaria en la materia no sería del todo claro el propósito del método reclamado.

- El Examinador objeta la reivindicación 3, argumentando que la misma no presenta características adicionales a las mencionadas en la reivindicación 1 y no define en qué consiste el marcador polimórfico. Con el fin de subsanar la objeción presentada por parte del Examinador, el solicitante presenta una nueva reivindicación 3 la cual define correctamente el marcador polimórfico.
- En cuanto a la objeción del Examinador a la reivindicación 4, el solicitante manifiesta su desacuerdo con la objeción presentada por parte del Examinador.



Sin embargo, con el fin de hacer más expedito el trámite de la solicitud se elimina dicha reivindicación del capítulo reivindicatorio.

- Por último, el solicitante elimina las reivindicaciones 8 y 9 del nuevo capítulo reivindicatorio, con lo cual se consideran subsanadas las objeciones presentadas por parte del Examinador a la claridad de las mismas.

- Descripción

Con el fin de subsanar la objeción del examinador a la claridad de la descripción debido a la traducción deficiente de las tablas 2 a 4, el solicitante presenta una nueva descripción donde se corrigen dichas tablas.

3. Examen de Patentabilidad

- Nivel Inventivo

El Examinador objeta el nivel inventivo de la presente solicitud a la luz de las enseñanzas del documento US 2013/0247249 (en adelante D1) argumentando que la materia objeto de las reivindicaciones 1, y 9 constituye una simple alternativa al método y el casete divulgados en D1, alternativa que es sugerida por el documento D1 cuyas enseñanzas motivarían el técnico con habilidad en la materia a desarrollar la materia reclamada en dichas reivindicaciones.

Esencialmente, el Examinador argumenta que la diferencia entre la presente solicitud y el documento D1 son las secuencias genéticas que se analizan del marcador genético, aduciendo que no hay ningún efecto técnico aparente que surja de la selección de las secuencias reclamadas, particularmente considerando que el documento D1 reporta un 100% de éxito con las secuencias allí divulgadas en tanto que la presente solicitud no menciona ningún porcentaje de éxito.

Al respecto, el solicitante quisiera observar que el hecho que el documento D1 sugiera que existe un sinnúmero de polimorfismos presentes en la secuencia para identificar los marcadores de los genes deseados, esto no es un indicio de que los marcadores genéticos identificados en la presente solicitud sean obvios o producto del trabajo cotidiano de un técnico medio con habilidad en la materia. En ausencia de algún otro documento que guíe a dicho técnico hacia las secuencias identificadas en la presente solicitud, las mismas solo son obvias en retrospectiva, particularmente considerando que D1 no establece claramente cuales pueden ser estos polimorfismos ni el número de los mismos.

Esto es particularmente importante considerando que las enseñanzas del documento D1 se dirigen particularmente a marcadores genéticos presentes en las especies de palma de

aceite del sudeste asiático. Como el solicitante lo explica en los párrafos [0113], [0114] y [0117] y en las tablas 3 y 4, no había certeza de que los marcadores del estado del arte permitieran identificar los genes de interés en las variedades de palma de aceite del continente africano. Por lo tanto, el solicitante de la presente invención se puso a la tarea de identificar marcadores genéticos más específicos que se pudieran identificar tanto en las especies de palma de Indonesia y Malasia, como en las de Angola, Nigeria, Tanzania y Ghana.

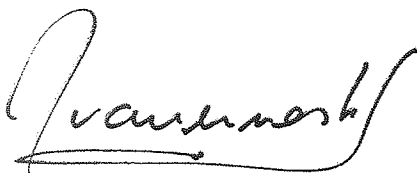
En otras palabras, las secuencias genéticas divulgadas en la presente solicitud corresponden a un conjunto reducido de marcadores genéticos que permiten identificar los genes del fenotipo SHELL de la palma de aceite en más especies que los divulgados en el documento D1. Por lo tanto, el resultado sorprendente e inesperado de la presente invención no es, como lo espera el Examinador, el porcentaje de éxito con el cual el método identifica los fenotipos sino el hecho que los genes identificados se pueden emplear para identificar el fenotipo en especies de palma de aceite que no estaban contempladas por el método o las secuencias de D1.

Por lo tanto, la presente invención puede considerarse una invención de selección, por cuanto selecciona un número limitado de genes, de todas las secuencias posibles de acuerdo con D1, y los emplea para identificar fenotipos en un grupo de especies de palma de aceite mucho más amplio. El técnico medio con habilidad ordinaria en la materia que leyera solamente las enseñanzas de D1 no tendría como anticipar la existencia de tales secuencias y, muy seguramente, no podría haber esperado que dichas secuencias funcionaran en un mayor número de especies. De hecho, un técnico medio que se basara en las enseñanzas de D1 se limitaría a identificar una secuencia particular para las especies de palma del África y otra para las de Malasia e Indonesia.

Por consiguiente, el solicitante considera que la presente invención cumple con el requisito de novedad, y de nivel inventivo y aplicación industrial, subsanando de esta forma las objeciones a la patentabilidad.

En vista de todo lo anterior, ruego a usted estudiar nuevamente la solicitud con base en las modificaciones realizadas y proceder de conformidad.

Cordialmente,



Juan Carlos Cuesta Quintero.

C.C. 79.339.809 de Bogotá

T.P. 43.273 del C.S. de la J.



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



El progreso
es de todos
Mincomercio

BANDEJA DE ENTRADA >

NC2019/0010122 - NC Modificación a las reivindicaciones - Solicitado en Patente NC2018/0000194

Datos de la solicitud

Número de solicitud	NC2019/0010122
Referencia	P/MPOB/17NP67e(CO)/tp)
Fecha de radicación	18 sep 2019
Estado	Presentada

Contacto

Apoderado	Número de identificación	Nombre(s)	Apellido(s)				
	79339809	JUAN CARLOS	CUESTA QUINTERO				
Solicitante	Número de identificación	Nombre(s)	Apellido(s)	Dirección (es)			
		MALAYSIAN PALM OIL BOARD		Dirección Física : No. 6, Persiaran Instituti Bandar Baru Bangi 43000, Kajang, Selangor 43000 (MY)			
Contacto de la solicitud	Número de identificación	Nombre	Dirección	Ciudad	Código postal	País	Tipo de dirección
	79339809	JUAN CARLOS CUESTA QUINTERO	CLL 72 # 10 -07 OFC 603	BOGOTÁ		CO	Dirección Física

1 Casos asociados

Número de solicitud	Tipo de solicitud	Tipo de enlace	Título/Denominación	Fecha de radicación	Estado(s)	Titular
NC2018/0000194	Patente PCT	Vinculado	ALELOS DE DOMINIO MADS-BOX PARA CONTROLAR EL FENOTIPO DE	11 ene 2018	Requerimiento de Examen de Fondo	MALAYSIAN PALM OIL BOARD

MEMBRANA EN LA
PALMA

Caja 13 de 25 00 pags 1, 3, 4, 5, 6, 7 y 10 PBX: (571)5870000 . Call center: (571)6920400 Línea gratuita nacional 01800 910135
www.sic.gov.co e-mail: contactenos@sic.gov.co , Bogotá D.C. - Colombia.

Política de privacidad | Política editorial | Créditos | Webmaster: contactenos@sic.gov.co :: Todos los derechos reservados 2008 - 2019

NOMBRE O RAZÓN SOCIAL: SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT
8001760892

CONCEPTO DE PAGO: SIPI PSE

A continuación encontrará el detalle de su transacción:

Número Id del Pagador	79339809
Numero de Factura	428020
Identificador de Pago	2618753
Tipo de Documento Pagador	Cédula de Ciudadanía
Nombre y Apellidos Pagador	JUAN CARLOS CUESTA QUINTERO
Numero Id Empresa R	
Tipo de Documento Empresa R	
Nombre Empresa R	MALAYSIAN PALM OIL BOARD
Tipo de Pago	
Nombre de la Solicitud	
Numero de Radicado	
Fecha Vencimiento de Cupón.	31/12/2019
Correo Electrónico del Pagador	juancuesta@cuestalawyers.com
Dirección de Residencia	Dirección Física : CLL 72 # 10 -07 OFC 603 BOGOTÁ D.C. (CO)
Número Telefónico	2113097
Numero Id Titular Cuenta	800075616
Tipo de Documento Titular Cuenta Nit	
Nombre del Titular Cuenta	Cuesta & Asociados S.A.S.
Valor del Pago	\$161,500.00
IP Origen	172.31.21.246
Nro. de Factura o Referencia de Pago	63511161
Fecha de Creación	18/09/2019 02:32:51 p.m.
Banco	BANCOLOMBIA
Número de Confirmación/CUS	496781315
Estado de la Transacción	APROBADA

Su transacción fué APROBADA en la Entidad Financiera.

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir el fenotipo de la cáscara de una planta o una semilla de palma, donde el método comprende:

a. Obtener información del genotipo para la planta o semilla de palma que indica la presencia, ausencia, o el número de alelos de *pisifera* o *dura*, en donde la información del genotipo comprende:

i. detectar el genotipo del marcador polimórfico que corresponde al nucleótido 67 del exón 1 del gen SHELL, y en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisifera*, en donde detectar una mutación A→C del marcador polimórfico correspondiente al nucleótido 67 del exón 1 del gen SHELL indica la presencia de un alelo de *pisifera*;

o

detectar el genotipo del marcador polimórfico que corresponde al nucleótido 69 del exón 1 del gen SHELL, y en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisifera*, en donde detectar una mutación A→T del marcador polimórfico correspondiente al nucleótido 69 del exón 1 del gen SHELL indica la presencia de un alelo de *pisifera*;

o

detectar el genotipo del marcador polimórfico que corresponde al nucleótido 70 del exón 1 del gen SHELL, y en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisifera*, en donde detectar una mutación C→G del marcador polimórfico correspondiente al nucleótido 70 del exón 1 del gen SHELL indica la presencia de un alelo de *pisifera*;

o

detectar el genotipo del marcado polimórfico que corresponde al nucleótido 71 del exón 1 del gen SHELL, y en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisifera*, en donde detectar una mutación G→A del marcador polimórfico correspondiente al nucleótido 71 del exón 1 del gen SHELL indica la presencia de un alelo de *pisifera*;

o

detectar el genotipo del marcado polimórfico que corresponde al nucleótido 110 del exón 1 del gen SHELL, y en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisifera*, en donde detectar una mutación T→A del marcador polimórfico correspondiente al nucleótido 110 del exón 1 del gen SHELL indica la presencia de un alelo de *pisifera*;

o

detectar el genotipo del marcado polimórfico que corresponde al nucleótido 122 del exón 1 del gen SHELL, y en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisifera*, en donde detectar una mutación A→T del marcador polimórfico correspondiente al nucleótido 122 del exón 1 del gen SHELL indica la presencia de un alelo de *pisifera*;

o

detectar el genotipo del marcado polimórfico que corresponde a los nucleótidos 23-37 del exón 1 del gen SHELL, y en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisifera*, en donde una mutación por eliminación de un par de bases 15 correspondiente a los nucleótidos 23-37 del exón 1 del gen SHELL y causar una eliminación en marco de cinco aminoácidos en las

posiciones 8 a 12 del marco de lectura abierta de la traducción del exón 1, indica la presencia de un alelo de *pisifera*; y

b. predecir el fenotipo de la cáscara de una planta de palma basado en la presencia, ausencia, o el número de alelos de *pisifera* o *dura*.

2. Un método para segregar una pluralidad de plantas de palma en diferentes categorías basado en un fenotipo de cáscara predicho, el método comprende:

a. Obtener un fenotipo predicho para una planta o semilla de palma en base a la presencia, ausencia, o número de alelos de *pisifera* o *dura*, en donde el fenotipo predicho es una predicción basada en:

i. detectar el genotipo del marcador polimórfico que corresponde al nucleótido 67 del exón 1 del gen SHELL, y en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisifera*, en donde detectar una mutación A→C del marcador polimórfico correspondiente al nucleótido 67 del exón 1 del gen SHELL indica la presencia de un alelo de *pisifera*;

o

detectar el genotipo del marcador polimórfico que corresponde al nucleótido 69 del exón 1 del gen SHELL, y en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisifera*, en donde detectar una mutación A→T del marcador polimórfico correspondiente al nucleótido 69 del exón 1 del gen SHELL indica la presencia de un alelo de *pisifera*;

o

detectar el genotipo del marcador polimórfico que corresponde al nucleótido 70 del exón 1 del gen SHELL, y

en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisifera*, en donde detectar una mutación C→G del marcador polimórfico correspondiente al nucleótido 70 del exón 1 del gen SHELL indica la presencia de un alelo de *pisifera*;

o

detectar el genotipo del marcado polimórfico que corresponde al nucleótido 71 del exón 1 del gen SHELL, y en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisifera*, en donde detectar una mutación G→A del marcador polimórfico correspondiente al nucleótido 71 del exón 1 del gen SHELL indica la presencia de un alelo de *pisifera*;

o

detectar el genotipo del marcado polimórfico que corresponde al nucleótido 110 del exón 1 del gen SHELL, y en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisifera*, en donde detectar una mutación T→A del marcador polimórfico correspondiente al nucleótido 110 del exón 1 del gen SHELL indica la presencia de un alelo de *pisifera*;

o

detectar el genotipo del marcado polimórfico que corresponde al nucleótido 122 del exón 1 del gen SHELL, y en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisifera*, en donde detectar una mutación A→T del marcador polimórfico correspondiente al nucleótido 122 del exón 1 del gen SHELL indica la presencia de un alelo de *pisifera*;

o

detectar el genotipo del marcado polimórfico que corresponde a los nucleótidos 23-37 del exón 1 del gen

SHELL, y en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisifera*, en donde una mutación por eliminación de un par de bases 15 correspondiente a los nucleótidos 23-37 del exón 1 del gen SHELL y causar una eliminación en marco de cinco aminoácidos en las posiciones 8 a 12 del marco de lectura abierta de la traducción del exón 1, indica la presencia de un alelo de *pisifera*; y

b. segregar las plantas o semillas de palma en grupos basados en el fenotipo predicho, en donde al menos un grupo contiene uno de (i) plantas o semillas para las que se predijo que tenían el fenotipo de cáscara tenera, (ii) plantas o semillas para las que se predijo que tenían el fenotipo de cáscara dura, (iii) plantas o semillas para las que se predijo que tenían el fenotipo de cáscara *pisifera*.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la presencia, ausencia, o número de alelos de *pisifera* o *dura* se determina detectando las SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde las plantas de palma tienen menos de 5 años de edad.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 que comprende además seleccionar la planta o las semillas de palma para cultivar si la planta o las semillas de palma son heterocigóticas para el marcador polimórfico.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la planta o las semillas de palma se descartan si la planta o las semillas de palma no tienen un genotipo que predice el fenotipo de cáscara *tenera*.



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



El progreso
es de todos

Mincomercio

BANDEJA DE ENTRADA >

NC2018/0000194 - Patente PCT - Discutir el asunto

Información	Discusión						
<u>NC2018/0000194</u>	<table><tr><td>Título</td><td>Examen de Fondo Patente solicitado</td></tr><tr><td>Fecha de creación</td><td>18 sep 2019</td></tr><tr><td>Estado</td><td>Cerrado</td></tr></table>	Título	Examen de Fondo Patente solicitado	Fecha de creación	18 sep 2019	Estado	Cerrado
Título	Examen de Fondo Patente solicitado						
Fecha de creación	18 sep 2019						
Estado	Cerrado						
Patente PCT							
ALELOS DE							
DOMINIO MADS-							
BOX PARA							
CONTROLAR EL							
FENOTIPO DE							
MEMBRANA EN LA							
PALMA							
Requerimiento de							
Examen de							
Fondo							
	Mensajes						
	jccuesta - 18 sep 2019						
	El Examen de Fondo de la Patente es solicitado						

Cra 33 No. 27-00 pisos 1, 3, 4, 5, 6, 7 y 10 PBX: (571)5870000 Cell center: (571)5820400 Línea gratuita nacional: 01800-070107
www.sic.gov.co e-mail: contactenos@sic.gov.co Bogotá D.C. - Colombia

Política de privacidad | Política editorial | Créditos | Webmaster: contactenos@sic.gov.co :: Todos los derechos reservados 2008 - 2019

NOMBRE O RAZÓN SOCIAL: SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT
8001760892

CONCEPTO DE PAGO: SIPI PSE

A continuación encontrará el detalle de su transacción:

Número Id del Pagador	79339809
Numero de Factura	428007
Identificador de Pago	2618748
Tipo de Documento Pagador	Cédula de Ciudadanía
Nombre y Apellidos Pagador	JUAN CARLOS CUESTA QUINTERO
Numero Id Empresa R	
Tipo de Documento Empresa R	
Nombre Empresa R	MALAYSIAN PALM OIL BOARD
Tipo de Pago	
Nombre de la Solicitud	
Numero de Radicado	
Fecha Vencimiento de Cupón.	31/12/2019
Correo Electrónico del Pagador	juancuesta@cuestalawyers.com
Dirección de Residencia	Dirección Física : CLL 72 # 10 -07 OFC 603 BOGOTÁ D.C. (CO)
Número Telefónico	2113097
Numero Id Titular Cuenta	800075616
Tipo de Documento Titular Cuenta Nit	
Nombre del Titular Cuenta	Cuesta & Asociados S.A.S.
Valor del Pago	\$1,097,600.00
IP Origen	172.31.21.246
Nro. de Factura o Referencia de Pago	63511098
Fecha de Creación	18/09/2019 02:25:04 p.m.
Banco	BANCOLOMBIA
Número de Confirmación/CUS	496777339
Estado de la Transacción	PENDIENTE

En este momento su transacción se encuentra PENDIENTE de recibir confirmación en la Entidad Financiera, por favor espere unos minutos y vuelva a consultar más tarde.
Por favor verificar si el débito fue realizado en el Banco.

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir el fenotipo de la cáscara de una planta o una semilla de palma, donde el método comprende:

a. Obtener información del genotipo para la planta o semilla de palma que indica la presencia, ausencia, o el número de alelos de *pisífera* o *dura*, en donde la información del genotipo comprende:

i. detectar el genotipo del marcador polimórfico que corresponde al nucleótido 67 del exón 1 del gen SHELL, y en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisífera*, en donde detectar una mutación A→C del marcador polimórfico correspondiente al nucleótido 67 del exón 1 del gen SHELL indica la presencia de un alelo de *pisífera*;

o

detectar el genotipo del marcador polimórfico que corresponde al nucleótido 69 del exón 1 del gen SHELL, y en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisífera*, en donde detectar una mutación A→T del marcador polimórfico correspondiente al nucleótido 69 del exón 1 del gen SHELL indica la presencia de un alelo de *pisífera*;

o

detectar el genotipo del marcador polimórfico que corresponde al nucleótido 70 del exón 1 del gen SHELL, y en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisífera*, en donde detectar una mutación C→G del marcador polimórfico correspondiente al nucleótido 70 del exón 1 del gen SHELL indica la presencia de un alelo de *pisífera*;

o

detectar el genotipo del marcador polimórfico que corresponde al nucleótido 71 del exón 1 del gen SHELL, y en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisifera*, en donde detectar una mutación G→A del marcador polimórfico correspondiente al nucleótido 71 del exón 1 del gen SHELL indica la presencia de un alelo de *pisifera*;

o

detectar el genotipo del marcador polimórfico que corresponde al nucleótido 110 del exón 1 del gen SHELL, y en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisifera*, en donde detectar una mutación T→A del marcador polimórfico correspondiente al nucleótido 110 del exón 1 del gen SHELL indica la presencia de un alelo de *pisifera*;

o

detectar el genotipo del marcador polimórfico que corresponde al nucleótido 122 del exón 1 del gen SHELL, y en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisifera*, en donde detectar una mutación A→T del marcador polimórfico correspondiente al nucleótido 122 del exón 1 del gen SHELL indica la presencia de un alelo de *pisifera*;

o

detectar el genotipo del marcador polimórfico que corresponde a los nucleótidos 23-37 del exón 1 del gen SHELL, y en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisifera*, en donde una mutación por eliminación de un par de bases 15 correspondiente a los nucleótidos 23-37 del exón 1 del gen SHELL y causar una eliminación en marco de cinco aminoácidos en las

posiciones 8 a 12 del marco de lectura abierta de la traducción del exón 1, indica la presencia de un alelo de *pisifera*; y

b. predecir el fenotipo de la cáscara de una planta de palma basado en la presencia, ausencia, o el número de alelos de *pisifera* o dura.

2. Un método para segregar una pluralidad de plantas de palma en diferentes categorías basado en un fenotipo de cáscara predicho, el método comprende:

a. Obtener un fenotipo predicho para una planta o semilla de palma en base a la presencia, ausencia, o número de alelos de *pisifera* o dura, en donde el fenotipo predicho es una predicción basada en:

i. detectar el genotipo del marcador polimórfico que corresponde al nucleótido 67 del exón 1 del gen SHELL, y en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisifera*, en donde detectar una mutación A→C del marcador polimórfico correspondiente al nucleótido 67 del exón 1 del gen SHELL indica la presencia de un alelo de *pisifera*;
o

detectar el genotipo del marcador polimórfico que corresponde al nucleótido 69 del exón 1 del gen SHELL, y en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisifera*, en donde detectar una mutación A→T del marcador polimórfico correspondiente al nucleótido 69 del exón 1 del gen SHELL indica la presencia de un alelo de *pisifera*;
o

detectar el genotipo del marcador polimórfico que corresponde al nucleótido 70 del exón 1 del gen SHELL, y

en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisifera*, en donde detectar una mutación C→G del marcador polimórfico correspondiente al nucleótido 70 del exón 1 del gen SHELL indica la presencia de un alelo de *pisifera*;

o

detectar el genotipo del marcado polimórfico que corresponde al nucleótido 71 del exón 1 del gen SHELL, y en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisifera*, en donde detectar una mutación G→A del marcador polimórfico correspondiente al nucleótido 71 del exón 1 del gen SHELL indica la presencia de un alelo de *pisifera*;

o

detectar el genotipo del marcado polimórfico que corresponde al nucleótido 110 del exón 1 del gen SHELL, y en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisifera*, en donde detectar una mutación T→A del marcador polimórfico correspondiente al nucleótido 110 del exón 1 del gen SHELL indica la presencia de un alelo de *pisifera*;

o

detectar el genotipo del marcado polimórfico que corresponde al nucleótido 122 del exón 1 del gen SHELL, y en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisifera*, en donde detectar una mutación A→T del marcador polimórfico correspondiente al nucleótido 122 del exón 1 del gen SHELL indica la presencia de un alelo de *pisifera*;

o

detectar el genotipo del marcado polimórfico que corresponde a los nucleótidos 23-37 del exón 1 del gen

SHELL, y en donde detectar la mutación relativa al tipo silvestre del marcador polimórfico indica la presencia del alelo de *pisifera*, en donde una mutación por eliminación de un par de bases 15 correspondiente a los nucleótidos 23-37 del exón 1 del gen SHELL y causar una eliminación en marco de cinco aminoácidos en las posiciones 8 a 12 del marco de lectura abierta de la traducción del exón 1, indica la presencia de un alelo de *pisifera*; y

b. segregar las plantas o semillas de palma en grupos basados en el fenotipo predicho, en donde al menos un grupo contiene uno de (i) plantas o semillas para las que se predijo que tenían el fenotipo de cáscara tenera, (ii) plantas o semillas para las que se predijo que tenían el fenotipo de cáscara dura, (iii) plantas o semillas para las que se predijo que tenían el fenotipo de cáscara *pisifera*.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la presencia, ausencia, o número de alelos de *pisifera* o *dura* se determina detectando las SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde las plantas de palma tienen menos de 5 años de edad.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 que comprende además seleccionar la planta o las semillas de palma para cultivar si la planta o las semillas de palma son heterocigóticas para el marcador polimórfico.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la planta o las semillas de palma se descartan si la planta o las semillas de palma no tienen un genotipo que predice el fenotipo de cáscara *tenera*.