

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 974 736**

51 Int. Cl.:

A01H 15/00 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2013** **E 19204816 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2024** **EP 3622810**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para prolongar la vida útil de los productos vegetales**

30 Prioridad:

24.09.2012 US 201261704602 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
01.07.2024

73 Titular/es:

**SEMINIS VEGETABLE SEEDS, INC. (100.0%)
800 North Lindbergh Boulevard
St. Louis, MO 63167, US**

72 Inventor/es:

**FEIKERT, MICHELE;
FROMAN, BYRON;
GARVEY, GRAEME S.;
KELLY, LEO y
WAYCOTT, BILL**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

ES 2 974 736 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimientos y composiciones para prolongar la vida útil de los productos vegetales

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos para mejorar la vida útil de plantas y partes de plantas.

Descripción de la técnica relacionada

Las polifenoloxidasas (PPO) son un grupo de proteínas fijadoras de cobre, ampliamente distribuidas filogenéticamente desde las bacterias hasta los mamíferos, que catalizan la oxidación de los fenoles a quinonas que producen pigmentos de color marrón en los tejidos heridos. La PPO está implicada en la formación de pigmentos, la eliminación de oxígeno y el mecanismo de defensa contra los patógenos de las plantas y los insectos herbívoros. Se cree que la oxidación de sustratos fenólicos por la PPO es la causa principal de la coloración parda de muchas frutas y verduras durante su maduración, manipulación, almacenamiento y procesamiento. Este problema tiene una importancia considerable para la industria alimentaria, ya que afecta a la calidad nutricional y al aspecto, reduce la aceptabilidad por parte del consumidor y, por lo tanto, también tiene un impacto económico significativo, tanto para los productores de alimentos como para la industria de transformación alimentaria.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para identificar plantas que tienen expresión reducida o carecen de expresión de un gen PPO11 que comprende: a) cribar una pluralidad de plantas, obtenidas por mutagénesis aleatoria, para la expresión de un gen PPO11 que tiene SEQ ID NO: 9, en la que la expresión está positivamente correlacionada con el pardeamiento o la reducción de la vida útil de un producto procesamiento de la planta; b) seleccionar una o más plantas cribadas que comprendan una expresión disminuida del gen PPO 11 en relación con la expresión del gen PPO 11 en una planta original, o una planta isogénica de otro modo, y que muestre un pardeamiento reducido o una vida útil aumentada. En realizaciones adicionales, la planta puede ser lechuga y el gen PPO11 puede estar codificado por una secuencia que comprende SEQ ID NO:9.

En otro aspecto, la invención proporciona plantas que tienen una expresión reducida o que carecen de expresión de un gen PPO11 que tiene SEQ ID NO:9 debido a una mutación en dicho gen PPO11, en las que dicha planta muestra un pardeamiento reducido o una vida útil aumentada en relación con una planta original, o una planta isogénica de otro modo.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1: Existen once genes putativos de PPO en la lechuga. Basándose en el análisis de sustitución de nucleótidos por cada 100 residuos de nucleótidos, se muestra el nivel relativo de homología entre los genes PPO.

FIG. 2: Se analizaron las abundancias de transcripción de los 11 genes PPO de la lechuga a las 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72 y 96 horas después de la cosecha para identificar qué genes PPO se correlacionan en expresión con la incidencia del pardeamiento en las nervaduras de lechuga no tratadas. Sorprendentemente, a pesar de la alta homología entre los genes PPO, PPO 11 fue identificado como el transcrito cuya expresión se correlacionaba y predecía el fenotipo de pardeamiento visual.

FIGs. 3A-B: La figura 3A muestra una fuerte correlación entre los niveles de expresión de PPO11 9 días después del procesamiento y almacenamiento en frío con los índices visuales de decoloración para dos cruces de lechuga romana crisphead y tres variedades iceberg cultivadas en San Juan Bautista. Cada punto representa la media mínima cuadrática para un único cultivar con seis réplicas biológicas tanto para la expresión génica como para las valoraciones visuales. La figura 3B es un experimento de validación con 10 cultivares cultivados en Yuma, AZ, demostrando de nuevo una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de expresión de PPO 11 9 días después del procesamiento y almacenamiento en frío con los índices visuales de decoloración para dos cruces de lechuga romana crisphead, tres iceberg y cinco cultivares de lechuga romana. Cada punto representa la media mínima cuadrática para un único cultivar con seis réplicas biológicas tanto para la expresión génica como para las valoraciones visuales. Lechuga iceberg "ICE", lechuga crisphead-romana cruzada "CRC" y lechuga romana "ROM".

FIG. 4: Gráfico de decoloración visual frente a PAL1, T₀; frente a PPO2, T₀; frente a PPO11, T₉; frente a PPO8, T₀. RQ PAL 1, T₀ = cuantificación relativa a la ubiquitina (RQ) para la fenilalanina liasa homóloga 1 (PAL1), en el tiempo 0 (T₀). Esta matriz de correlaciones elaborada en JMPv10 muestra la variable individual, es decir, las puntuaciones promedio de pardeamiento visual en el eje vertical de la fila en la que figura la variable y en el eje horizontal de la columna en la que figura. Se representa la expresión génica más correlacionada en el momento de la cosecha o 9 días después del procesamiento. PPO11 muestra el mayor intervalo de expresión (~200 a ~11000).

FIG. 5: Se muestra un histograma de la actividad total de la PPO ($\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ conversión de catecol) para una población de 23 cultivares de Romana evaluados a partir de tejido de la nervadura central en el momento del procesamiento. Los recuentos en el eje vertical son el número de cultivares con una actividad U PPO en el intervalo indicado. Esto demuestra que, a partir de una selección de cultivares de élite de romana, existe una variación de 3 veces en la actividad total de la PPO en el tejido de la nervadura central. Se eligieron subselecciones de los cultivares con mayor y menor actividad de PPO de este experimento para fenotiparlos en cuanto a decoloración visual/vida útil.

FIG. 6: Predicciones de la actividad enzimática de la PPO en la decoloración visual. Se muestra un gráfico de barras de la decoloración visual para un subconjunto de líneas previamente seleccionadas para tener la mayor o menor actividad U PPO de una selección de 23 Romana como se ha descrito (véase la figura 5). Los números más grandes en el eje vertical indicaban más decoloración. Los cultivares codificados se agrupan por actividad de PPO alta o baja determinada previamente. El nivel de actividad no fue predictivo de la vida útil, ya que dos de las líneas con mayor actividad enzimática fueron las más resistentes en el fenotipo de decoloración.

Breve descripción del listado de secuencias

SEQ ID NO:1 - Secuencia PPO11_Activadora1 (189nt).

SEQ ID NO:2 - PPO11_Activadora2 (225nt).

SEQ ID NO:3 - PPO11_Activadora3 (225nt).

SEQ ID NO:4 - PPO11_Activadora4 (226nt).

SEQ ID NO:5 - PPO11_antisentido ADNmc (25nt).

SEQ ID NO:6 - PPO11_antisentido ADNmc (25nt).

SEQ ID NO:7 - PPO11 _ARNbc (25nt).

SEQ ID NO:8 - PPO11 _ARNbc (25nt).

SEQ ID NO:9 - ARNm PPO11 deducido de Lactuca sativa (lechuga) (1922nt).

SEQ ID NO:10 - Secuencia flanqueante de PPO11 (Secuencia Chr4:185719000-185720000).

SEQ ID NO:11 - Secuencia flanqueante de PPO11 (Secuencia Chr4:1185723000-185724000).

SEQ ID NOs:12-34 - Cebadores PCR específicos de gen.

Descripción detallada de la invención

Las polifenoloxidasas (PPO) son un grupo de proteínas fijadoras de cobre, ampliamente distribuidas filogenéticamente desde las bacterias hasta los mamíferos, que catalizan la oxidación de los fenoles a quinonas y producen pigmentos de color marrón en los tejidos heridos. La presente invención supera las limitaciones de la técnica anterior proporcionando nuevos procedimientos y plantas para ampliar la vida útil de los productos vegetales mediante la reducción específica de la expresión de una PPO que se correlaciona positivamente con el pardeamiento en las plantas. La PPO11 de la lechuga proporciona un ejemplo no limitativo de una PPO que se correlaciona con el pardeamiento de la lechuga. Se reconoció que la expresión de PPO 11 aumenta con el tiempo después de la cosecha y se correlaciona con la reducción de la vida útil y el aumento del pardeamiento. Se divulgan composiciones que comprenden compuestos inhibidores selectivos de la PPO para inhibir una PPO específica que se correlaciona positivamente con el pardeamiento, tal como la PPO11, y procedimientos para reducir el pardeamiento o aumentar la vida útil. También se divulgan casetes de expresión y vectores que comprenden un ADN seleccionado cuya expresión es eficaz para suprimir la expresión de PPO11, reducir el pardeamiento y/o aumentar la vida útil de plantas o partes de plantas. También se divulgan plantas transgénicas o plantas que comprenden compuestos inhibidores de la PPO11 y procedimientos para producirlas. En la presente memoria también se divulgan plantas o variedades de plantas que albergan un gen PPO o mutaciones del promotor que dan lugar a una expresión reducida del gen PPO y procedimientos para evaluar la expresión del gen PPO como indicador del pardeamiento. En realizaciones particulares, el gen PPO que se correlaciona positivamente con el pardeamiento es un gen PPO11 de lechuga y/o el correspondiente ortólogo de manzana o patata. Además, se proporcionan procedimientos para producir genes PPO con expresión reducida.

Definiciones

En la descripción y las tablas de la presente memoria se utilizan varios términos. Con el fin de proporcionar una comprensión clara y coherente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, se proporcionan las siguientes

definiciones: A menos que se indique lo contrario, los términos deben entenderse según el uso convencional por parte de los expertos en la técnica.

5 Cuando un término se proporciona en singular, los inventores también contemplan aspectos de la invención descritos por el plural de dicho término.

10 Como se utiliza en la presente memoria, el término "compuesto inhibidor selectivo de la PPO" se refiere a un compuesto que suprime o reduce una actividad enzimática de la PPO, o la expresión de la PPO, tal como por ejemplo la síntesis de ARNm que codifica un polipéptido de PPO (transcripción) y/o la síntesis de un polipéptido de PPO a partir de ARNm de PPO (traducción). En algunas realizaciones, el compuesto inhibidor selectivo de la PPO inhibe específicamente una PPO que se correlaciona positivamente con el pardeamiento de la planta. En determinadas realizaciones, el compuesto inhibidor de la PPO es un inhibidor de la PPO11 o del gen correspondiente en manzanas o patatas.

15 Como se utiliza en la presente memoria, una PPO que se correlaciona positivamente con el pardeamiento de la planta se refiere a una PPO homóloga específica que presenta un aumento de expresión después de la cosecha cuando aumenta o se produce el pardeamiento/decoloración. En determinadas realizaciones, el aumento de la expresión se observa durante el período de 36 horas después de la cosecha. La PPO que se correlaciona positivamente con el pardeamiento de la planta (superficie de la planta o partes de una planta) también presenta un aumento de expresión que se correlaciona con la decoloración visual de la superficie de la planta. En determinadas realizaciones, tal PPO es la PPO11. En 20 determinadas realizaciones, la PPO es un homólogo de la PPO11 de la lechuga correlacionada con la presencia de pardeamiento, como la de la manzana o la patata, que por lo tanto puede ser el objetivo para la reducción del pardeamiento.

25 Como se utiliza en la presente memoria, el término "casete de expresión" se refiere a una secuencia de ADN que comprende un ADN seleccionado para ser transcrito. Además, el casete de expresión comprende al menos todos los elementos de ADN necesarios para la expresión. Tras una transformación exitosa, el casete de expresión dirige la maquinaria de la célula para producir ARN. En determinadas realizaciones, el casete de expresión es un casete de expresión ARNi o ARNpi que suprime la expresión de una PPO que se correlaciona positivamente con el pardeamiento de una planta.

30 Se pueden transformar distintos casetes de expresión en diferentes organismos, como bacterias, levaduras, plantas y células de mamíferos, siempre que se utilicen las secuencias reguladoras correctas.

35 Como se utiliza en la presente memoria, el término "abundancia de una proteína" se refiere a la cantidad de la proteína específica en relación con la cantidad de proteína total o en relación con el peso o volumen de la célula, tejido, planta o parte de la planta probada.

40 Como se utiliza en la presente memoria, el término "abundancia de un ARNm" se refiere a la cantidad del ARNm específico en relación con la cantidad de proteína total o en relación con el peso o volumen de la célula, tejido, planta o parte de la planta probada.

45 Como se utiliza en la presente memoria, el término "expresión" se refiere a la combinación de procedimientos intracelulares, incluyendo la transcripción y la traducción que sufre una molécula de ADN codificante, tal como un gen estructural, para producir un polipéptido.

50 Como se utiliza en la presente memoria, el término "transformación genética" se refiere al procedimiento de introducir una secuencia o constructo de ADN (por ejemplo, un vector o casete de expresión) en una célula o protoplasto en el que ese ADN exógeno se incorpora a un cromosoma o es capaz de replicarse de forma autónoma.

55 Como se utiliza en la presente memoria, el término "heteróloga" se refiere a una secuencia que normalmente no está presente en un genoma huésped determinado en el contexto genético en el que se encuentra actualmente la secuencia. En este sentido, la secuencia puede ser nativa del genoma hospedador, pero estar reordenada con respecto a otras secuencias genéticas dentro de la secuencia hospedadora. Por ejemplo, una secuencia reguladora puede ser heteróloga en el sentido de que está unida a una secuencia codificadora diferente en relación con la secuencia reguladora nativa.

60 Como se utiliza en la presente memoria, el término "obtención", cuando se utiliza junto con una célula vegetal transgénica o una planta transgénica, significa 1) transformar una célula vegetal o una planta no transgénica para crear la célula vegetal o la planta transgénica, o 2) plantar semillas vegetales transgénicas para producir la célula vegetal o la planta transgénica. Dicha semilla de planta transgénica puede proceder de una planta transgénica Ro o de una progenie de cualquier generación de la misma que herede una secuencia transgénica determinada de una planta original transgénica de partida.

65 Como se utiliza en la presente memoria, el término "promotor" se refiere a un sitio de reconocimiento en una secuencia de ADN o grupo de secuencias de ADN que proporciona un elemento de control de expresión para un gen estructural y al que se une específicamente la ARN polimerasa e inicia la síntesis de ARN (transcripción) de dicho gen. Como se utiliza en la presente memoria, el término "planta transgénica Ro" se refiere a una planta que ha sido transformada

genéticamente o que ha sido regenerada a partir de una célula o células vegetales que han sido transformadas genéticamente.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "regeneración" se refiere al procedimiento de crecimiento de una planta a partir de una célula vegetal (por ejemplo, protoplasto vegetal, callo o explante).

En la presente memoria, el término "constructo de transformación" se refiere a una molécula de ADN quimérico diseñada para su introducción en un genoma hospedador mediante transformación genética. Los constructos de transformación preferidos comprenderán todos los elementos genéticos necesarios para dirigir la expresión de uno o más genes exógenos. En particular, puede ser deseable introducir un constructo de transformación en una célula hospedadora en forma de casete de expresión.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "célula transformada" se refiere a una célula cuyo complemento de ADN ha sido alterado por la introducción de una molécula de ADN exógena en dicha célula.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "transgén" se refiere a un segmento de ADN que se ha incorporado a un genoma hospedador o es capaz de replicarse de forma autónoma en una célula hospedadora y es capaz de provocar la expresión de una o más secuencias codificantes. Los transgenes ejemplares proporcionarán a la célula hospedadora, o a las plantas regeneradas a partir de ella, un fenotipo novedoso en relación con la célula o planta correspondiente no transformada. Los transgenes pueden introducirse directamente en una planta mediante transformación genética, o pueden heredarse de una planta de cualquier generación anterior que haya sido transformada con el segmento de ADN. Como se utiliza en la presente memoria, el término "planta transgénica" se refiere a una planta o planta progenie de cualquier generación posterior derivada de la misma, en la que el ADN de la planta o de su progenie contiene un segmento de ADN exógeno introducido que no está presente de forma natural en una planta no transgénica de la misma cepa. La planta transgénica puede contener además secuencias nativas de la planta transformada, pero en las que el gen "exógeno" ha sido alterado para modificar el nivel o patrón de expresión del gen, por ejemplo, mediante el uso de uno o más elementos reguladores heterólogos o de otro tipo.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "vector" se refiere a una molécula de ADN diseñada para su transformación en una célula hospedadora. Algunos vectores pueden ser capaces de replicarse en una célula hospedadora. Un plásmido es un vector ejemplar, al igual que los casetes de expresión aislados a partir de este.

En la presente memoria, los términos "ADN", "molécula de ADN" y "molécula polinucleotídica de ADN" se refieren a una molécula de ADN monocatenaria o bicatenaria de origen genómico o sintético, tal como un polímero de bases desoxirribonucleotídicas o una molécula polinucleotídica de ADN.

Como se utilizan en la presente memoria, los términos "secuencia de ADN", "secuencia de nucleótidos de ADN" y "secuencia de polinucleótidos de ADN" se refieren a la secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN. ADN_{mc} se refiere a ADN monocatenario; ADN_{bc} se refiere a ADN bicatenario.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "gen" se refiere a cualquier porción de un ácido nucleico que proporciona la expresión de un transcrito o codifica un transcrito. Por tanto, un "gen" incluye, pero no se limita a, una región promotora, regiones no traducidas 5', regiones que codifican la transcripción que pueden incluir regiones intrónicas y regiones no traducidas 3'.

Como se utilizan en la presente memoria, los términos "ARN", "molécula de ARN" y "molécula polinucleotídica de ARN" se refieren a una molécula de ARN monocatenario o bicatenario de origen genómico o sintético, tal como, por ejemplo, un polímero de bases ribonucleotídicas que comprenden regiones monocatenaria o bicatenaria. ARN_{bc} se refiere específicamente a ARN monocatenario; bc se refiere a ARN bicatenario.

A menos que se indique lo contrario, las secuencias de nucleótidos en el texto de esta especificación se dan, cuando se leen de izquierda a derecha, en la dirección 5' a 3'. La nomenclatura utilizada en la presente memoria es la exigida por el Título 37 del Código de Reglamentos Federales de los Estados Unidos § 1.822 y la establecida en las tablas de la Norma ST.25 (1998) de la OMPI, Apéndice 2, Tablas 1 y 3.

Como se utiliza en la presente memoria, una "superficie vegetal" se refiere a cualquier porción exterior de una planta. Las superficies vegetales incluyen, pero no se limitan a, las superficies de flores, tallos, tubérculos, frutos, anteras, polen, hojas, raíces o semillas. Una superficie vegetal puede estar en una porción de una planta que está unida a otras porciones de una planta o en una porción de una planta que está separada de la planta.

Como se utiliza en la presente memoria, la frase "polinucleótido no está unido de forma operable a un promotor" se refiere a un polinucleótido que no está unido covalentemente a una secuencia promotora polinucleotídica que es reconocida específicamente por ya sea una proteína ARN polimerasa II dependiente de ADN o por una ARN polimerasa dependiente de ARN viral de tal forma que el polinucleótido será transcrito por la proteína ARN polimerasa II dependiente de ADN o por la ARN polimerasa dependiente de ARN viral. Un polinucleótido que no esté operablemente unido a un promotor puede ser transcrito por una ARN polimerasa dependiente de ARN vegetal.

Como se utiliza en la presente memoria, un polinucleótido puede estar en forma de ADNmc, abarcar equivalentes de ADNbc, equivalentes de ARNbc, equivalentes de ARNmc, complementos de ARNmc, ADNmc como se muestra y complementos de ADNmc.

Como se utiliza en la presente memoria, una primera secuencia de ácido nucleico, ADN seleccionado o polinucleótido está "operablemente" conectada o "enlazada" con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está unido de forma operable a un ARN y/o secuencia codificante de proteínas, o a una secuencia que codifica un ARNi, un ARNpi o un ácido nucleico que codifica un oligonucleótido antisentido si el promotor proporciona la transcripción o expresión del ARN o secuencia codificante. Por lo general, las secuencias de ADN enlazadas operablemente son contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificadoras de proteínas, se encuentran en el mismo marco de lectura. El ADN seleccionado es un segmento de ADN que se desea introducir o que se ha introducido en el genoma de una planta mediante transformación genética

En determinadas realizaciones, el ADN seleccionado es un constructo antisentido o ARNi. En otra realización, el ADN seleccionado codifica una ribozima o una proteína zinc-finger.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "preparado de organosilicona" se refiere a un líquido que comprende uno o más compuestos de organosilicona, en el que el líquido o los componentes que contiene, cuando se combinan con un polinucleótido en una composición que se aplica por vía tópica a una superficie vegetal diana, permiten que el polinucleótido penetre en una célula vegetal. Los preparados de organosilicona ejemplares incluyen, entre otros, los preparados comercializados con los nombres comerciales "Silwet®" o "BREAK-THRU®" y los preparados proporcionados en la siguiente tabla. En determinadas realizaciones, una preparación de organosilicona puede permitir que un polinucleótido entre en una célula vegetal de manera que permita una supresión mediada por el polinucleótido de la expresión del gen diana en la célula vegetal.

Como se utilizan en la presente memoria, las frases "reducción del pardeamiento", "vida útil aumentada", "mejora de la vida útil", "reducción de las pérdidas poscosecha" o "mejora de la vida útil y reducción de las pérdidas poscosecha" se refieren a cualquier aumento medible de la vida útil, reducción del pardeamiento o reducción de las pérdidas poscosecha observado en una planta o parte de la misma sometida a la presente invención en comparación con la planta o parte de la misma no sometida a la presente invención. En determinadas realizaciones, el aumento de la vida útil o la reducción de la pérdida poscosecha en una planta o parte de una planta puede determinarse en una comparación con una planta o parte de una planta de control que no ha sido tratada con una composición que comprende un polinucleótido y un agente de transferencia. Cuando se utiliza en este contexto, una planta de control es una planta que no ha sido sometida a tratamiento con un compuesto inhibidor de la PPO o un polinucleótido, plantas no transgénicas o plantas que no presentan una expresión reducida de una PPO. Tales plantas de control incluirían, pero no se limita a, plantas no tratadas o plantas con tratamiento simulado. En determinadas realizaciones, las frases se refieren a plantas no transgénicas o plantas que no comprenden un casete de expresión que suprime eficazmente la actividad de PPO.

Como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "proporciona una reducción", "eficaz para suprimir" y "suprime eficazmente", cuando se utilizan en el contexto de un transcrito o una proteína en una planta o parte de una planta, se refieren a cualquier disminución medible del nivel de transcrito o proteína en una planta o parte de una planta. Por tanto, la expresión de un gen puede suprimirse cuando se produce una reducción de los niveles de un transcrito del gen, una reducción de los niveles de una proteína codificada por el gen, una reducción de la actividad del transcrito del gen, una reducción de la actividad de una proteína codificada por el gen, una cualquiera de las condiciones anteriores o cualquier combinación de las condiciones anteriores. En este contexto, la actividad de un transcrito incluye, pero no se limita a, su capacidad de traducirse en una proteína y/o de ejercer cualquier efecto biológico o bioquímico mediado por ARN. En este contexto, la actividad de una proteína incluye, pero no se limita a, su capacidad para ejercer cualquier efecto biológico o bioquímico mediado por proteínas. En determinadas realizaciones, la supresión de la expresión génica en una planta o parte de una planta puede determinarse en una comparación de los niveles o actividades de los productos génicos en una planta tratada con respecto a una planta o parte de una planta de control que no ha sido tratada con una composición que comprende un polinucleótido y un agente de transferencia. Cuando se utiliza en este contexto, una planta o parte de planta de control es una planta o parte de planta que no ha sido sometida a tratamiento con polinucleótido y un agente de transferencia. Tales plantas o partes de plantas de control incluirían, pero no se limita a, plantas y partes de plantas no tratadas o tratadas de forma simulada. En determinadas realizaciones, puede determinarse una reducción del nivel de un transcrito o proteína en una planta o parte de una planta en comparación con una planta o parte de una planta de control que no ha sido tratada con una composición que comprende un polinucleótido y un agente de transferencia. Cuando se utiliza en este contexto, una planta o parte de planta de control es una planta o parte de planta que no ha sido sometida a tratamiento con un compuesto inhibidor de la PPO, un polinucleótido. Tales plantas o partes de plantas de control incluirían, pero no se limita a, plantas y partes de plantas no tratadas o tratadas de forma simulada. En determinadas realizaciones, las frases se refieren a plantas no transgénicas o plantas que no comprenden un casete de expresión que tiene los nucleótidos continuos de un gen PPO, o una planta que no comprende un transgén.

Como se utiliza en la presente memoria, la frase "en la que dicha planta no comprende un transgén" se refiere a una planta que carece ya sea de una molécula de ADN que comprenda un promotor que esté unido de forma operable a un polinucleótido o a un vector viral recombinante.

- 5 Como se utiliza en la presente memoria, el término "transcrito" corresponde a cualquier ARN que se produce a partir de un gen mediante el procedimiento de transcripción. Por tanto, un transcrito de un gen puede comprender un producto de transcripción primario que puede contener intrones o puede comprender un ARN maduro que carece de intrones.

10 Como se utiliza en la presente memoria, "polinucleótido" puede referirse a una molécula de ADN o ARN que contiene múltiples nucleótidos y generalmente se refiere tanto a "oligonucleótidos" (una molécula de polinucleótidos de 18-25 nucleótidos de longitud) como a polinucleótidos más largos de 26 o más nucleótidos. Las realizaciones incluyen composiciones que incluyen oligonucleótidos que tienen una longitud de 18-25 nucleótidos (18-mers, 19-mers, 20-mers, 21-mers, 22-mers, 23-mers, 24-mers, o 25-mers), y polinucleótidos más largos, o de longitud media que tengan una longitud de 26 o más nucleótidos (polinucleótidos de 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95, aproximadamente 100, aproximadamente 110, aproximadamente 120, aproximadamente 130, aproximadamente 140, aproximadamente 150, aproximadamente 160, aproximadamente 170, aproximadamente 180, aproximadamente 190, aproximadamente 200, aproximadamente 210, aproximadamente 220, aproximadamente 230, aproximadamente 240, aproximadamente 250, aproximadamente 260, aproximadamente 270, aproximadamente 280, aproximadamente 290, o aproximadamente 300 nucleótidos), o polinucleótidos largos que tengan una longitud mayor que aproximadamente 300 nucleótidos (por ejemplo, polinucleótidos de entre aproximadamente 300 y aproximadamente 400 nucleótidos, entre aproximadamente 400 y aproximadamente 500 nucleótidos, entre aproximadamente 500 y aproximadamente 600 nucleótidos, entre aproximadamente 600 y aproximadamente 700 nucleótidos, entre aproximadamente 700 y aproximadamente 800 nucleótidos, entre aproximadamente 800 y aproximadamente 900 nucleótidos, entre aproximadamente 900 y aproximadamente 1000 nucleótidos, entre aproximadamente 300 y aproximadamente 500 nucleótidos, entre aproximadamente 300 y aproximadamente 600 nucleótidos, entre aproximadamente 300 y aproximadamente 700 nucleótidos, entre aproximadamente 300 y aproximadamente 800 nucleótidos, entre aproximadamente 300 y aproximadamente 900 nucleótidos, o incluso más de aproximadamente 1000 nucleótidos de longitud, por ejemplo hasta la longitud completa de un gen de la polifenoloxidasasa (PPO) diana, tales como PPO11, incluidas las porciones codificantes o no codificantes o tanto codificantes como no codificantes del gen de la polifenoloxidasasa (PPO) diana). Cuando un polinucleótido es bicatenario, su longitud puede describirse de forma similar en términos de pares de bases.

35 Las composiciones de polinucleótidos utilizadas en la presente memoria incluyen composiciones que incluyen oligonucleótidos, polinucleótidos, o una mezcla de ambos, incluyendo: ARN o ADN o híbridos ARN/ADN u oligonucleótidos o polinucleótidos químicamente modificados o una mezcla de los mismos. En determinadas realizaciones, el polinucleótido puede ser una combinación de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos, por ejemplo, polinucleótidos sintéticos consistentes principalmente en ribonucleótidos pero con uno o más desoxirribonucleótidos terminales o polinucleótidos sintéticos consistentes principalmente en desoxirribonucleótidos pero con uno o más dideoxirribonucleótidos terminales. En determinadas realizaciones, el polinucleótido incluye nucleótidos no canónicos tales como inosina, tiouridina o pseudouridina. En determinadas realizaciones, el polinucleótido incluye nucleótidos modificados químicamente. Los ejemplos de oligonucleótidos o polinucleótidos modificados químicamente son bien conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, la Publicación de la Patente de los Estados Unidos 2011/0171287, la Publicación de la Patente de los Estados Unidos 2011/0171176, la Publicación de la Patente de los Estados Unidos 2011/0152353, la Publicación de la Patente de los Estados Unidos 2011/0152346 y la Publicación de la Patente de los Estados Unidos 2011/0160082. Ejemplos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, el esqueleto fosfodiéster natural de un oligonucleótido o polinucleótido que puede modificarse parcial o completamente con modificaciones de enlaces internucleotídicos de fosforotioato, fosforoditioato o metilfosfonato, bases de nucleósidos modificadas o azúcares modificados que pueden usarse en síntesis de oligonucleótidos o polinucleótidos, y los oligonucleótidos o polinucleótidos se pueden marcar con una unidad estructural fluorescente (por ejemplo, fluoresceína o rodamina) u otro marcador (por ejemplo, biotina).

Los polinucleótidos pueden ser ARN monocatenario o bicatenario, ADN monocatenario o bicatenario, híbridos ADN/ARN bicatenarios y análogos modificados de los mismos. En particular, los polinucleótidos que proporcionan ARN monocatenario en la célula vegetal pueden ser: (a) una molécula de ARN monocatenario (ARNmc), (b) una molécula de ARN monocatenario que se autohíbrida para formar una molécula de ARN bicatenario, (c) una molécula de ARN bicatenario (ARNbc), (d) una molécula de ADN monocatenario (ADNmc), (e) una molécula de ADN monocatenario que se autohíbrida para formar una molécula de ADN bicatenario, (f) una molécula de ADN monocatenario que incluye un gen Pol III modificado que se transcribe a una molécula de ARN, (g) una molécula de ADN bicatenario (ADNbc), (h) una molécula de ADN bicatenario que incluye un gen Pol III modificado que se transcribe a una molécula de ARN, y (i) una molécula de ARN/ADN bicatenario hibridada, o combinaciones de las mismas. En determinadas realizaciones, estos polinucleótidos pueden comprender tanto residuos de ácido ribonucleico como residuos de ácido desoxirribonucleico. En determinadas realizaciones, estos polinucleótidos incluyen nucleótidos modificados químicamente o nucleótidos no canónicos. En determinadas realizaciones de los procedimientos, los polinucleótidos incluyen ADN bicatenario formado por hibridación intramolecular, ADN bicatenario formado por hibridación intermolecular, ARN bicatenario formado por hibridación intramolecular o ARN bicatenario formado por hibridación intermolecular. En determinadas realizaciones en

las que el polinucleótido es un ARNbc, la cadena antisentido comprenderá al menos 18 nucleótidos que son esencialmente complementarios al gen de la polifenoloxidasas (PPO) diana. En determinadas realizaciones, los polinucleótidos incluyen ADN monocatenario o ARN monocatenario que se autohibridan para formar una estructura en horquilla que tenga una estructura al menos parcialmente bicatenario que incluya al menos un segmento que se hibride con el ARN transcrito del gen que se pretende suprimir. Sin pretender estar limitado por ningún mecanismo, se cree que dichos polinucleótidos son o producirán ARN monocatenario con al menos un segmento que hibridará con el ARN transcrito del gen que se pretende suprimir. En determinadas realizaciones, los polinucleótidos pueden estar enlazados operablemente a un promotor - generalmente un promotor funcional en una planta, por ejemplo, un promotor pol II, un promotor pol III, un promotor pol IV o un promotor pol V.

Las moléculas polinucleotídicas descritas en la presente memoria están diseñadas para modular la expresión induciendo la regulación o la supresión de un gen de la polifenoloxidasas (PPO) endógena, tal como PPO11, para reducir la expresión de PPO 11 en una planta y están diseñadas para tener una secuencia de nucleótidos esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a la secuencia de nucleótidos de un gen de la polifenoloxidasas (PPO) endógena de una planta o a la secuencia de ARN transcrito a partir de un gen de la polifenoloxidasas (PPO) endógena de una planta, que puede ser secuencia codificante o secuencia no codificante. Estas moléculas polinucleotídicas eficaces que modulan la expresión se denominan en la presente memoria "activador, o activadores". Por "esencialmente idénticos" o "esencialmente complementarios" se entiende que los polinucleótidos desencadenantes (o al menos una hebra de un polinucleótido bicatenario) tienen suficiente identidad o complementariedad con el gen endógeno o con el ARN transcrito del gen de la Polifenoloxidasas (PPO) endógena (por ejemplo, el transcrito) para suprimir la expresión del gen de la Polifenoloxidasas (PPO) endógena (por ejemplo, para efectuar una reducción de los niveles o de la actividad del transcrito del gen y/o de la proteína codificada). En determinadas realizaciones, los polinucleótidos desencadenantes proporcionados en la presente memoria pueden dirigirse a un transgén de polifenoloxidasas (PPO) presente en la planta. Los polinucleótidos de los procedimientos y composiciones proporcionados en la presente memoria no necesitan tener un 100 por ciento de identidad con una complementariedad con el gen de la Polifenoloxidasas (PPO) endógena o con el ARN transcrito del gen de la Polifenoloxidasas (PPO) endógena (es decir, el transcrito) para suprimir la expresión del gen de la Polifenoloxidasas (PPO) endógena (es decir, para efectuar una reducción de los niveles o de la actividad del transcrito del gen o de la proteína codificada). Por tanto, en determinadas realizaciones, el polinucleótido o una porción del mismo está diseñado para ser esencialmente idéntico a, o esencialmente complementario a, una secuencia de al menos 18 o 19 nucleótidos contiguos en ya sea el gen diana o ARN mensajero transcrito a partir del gen diana (por ejemplo, la transcripción). En determinadas realizaciones, un polinucleótido "esencialmente idéntico" tiene un 100 por ciento de identidad de secuencia o al menos un 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 por ciento de identidad de secuencia cuando se compara con la secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en ya sea el gen diana endógeno o con un ARN transcrito a partir del gen diana (por ejemplo, el transcrito). En determinadas realizaciones, un polinucleótido "esencialmente complementario" tiene un 100 por ciento de complementariedad de secuencia o al menos aproximadamente 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 por ciento de complementariedad de secuencia cuando se compara con la secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen diana o en el ARN transcrito a partir del gen diana.

En determinadas realizaciones, los polinucleótidos utilizados en los procedimientos y composiciones proporcionados en la presente memoria pueden ser esencialmente idénticos o esencialmente complementarios a cualquiera de: i) regiones conservadas de genes de polifenoloxidasas (PPO) de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas; ii) regiones conservadas de genes de polifenoloxidasas (PPO) de plantas monocotiledóneas; o iii) regiones conservadas de genes de polifenoloxidasas (PPO) de plantas dicotiledóneas. Tales polinucleótidos que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios a tales regiones conservadas pueden utilizarse para mejorar la vida útil y reducir las pérdidas poscosecha mediante la supresión de la expresión de los genes de la polifenoloxidasas (PPO) en diversas plantas dicotiledóneas y/o monocotiledóneas.

Los polinucleótidos que contienen apareamientos erróneos con respecto al gen o transcrito diana pueden utilizarse, por tanto, en determinadas realizaciones de las composiciones y procedimientos proporcionados en la presente memoria. En determinadas realizaciones, un polinucleótido puede comprender al menos 19 nucleótidos contiguos que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios a dicho gen o dicho transcrito o comprende al menos 19 nucleótidos contiguos que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios al gen diana o al transcrito del gen diana. En determinadas realizaciones, un polinucleótido de 19 nucleótidos continuos que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario al gen diana endógeno o a un ARN transcrito a partir del gen diana (por ejemplo, el transcrito) puede tener 1 o 2 apareamientos erróneos con el gen diana o el transcrito. En determinadas realizaciones, un polinucleótido de 20 o más nucleótidos que contiene un tramo contiguo de 19 nucleótidos de identidad o complementariedad con el gen diana endógeno o con un ARN transcrito a partir del gen diana puede tener 1 o 2 apareamientos erróneos con el gen o transcrito diana. En determinadas realizaciones, un polinucleótido de 21 nucleótidos continuos que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario al gen diana endógeno o a un ARN transcrito a partir del gen diana (por ejemplo, el transcrito) puede tener 1, 2 o 3 apareamientos erróneos con el gen diana o el transcrito. En determinadas realizaciones, un polinucleótido de 22 o más nucleótidos que contiene un tramo contiguo de 21 nucleótidos de identidad o complementariedad con el gen diana endógeno o con un ARN transcrito a partir del gen diana puede tener 1, 2 o 3 apareamientos erróneos con el gen o transcrito diana. Al diseñar polinucleótidos con apareamientos erróneos con un gen diana endógeno o con un ARN transcrito a partir del gen diana, se pueden utilizar apareamientos erróneos de determinados tipos y en determinadas posiciones que tienen más probabilidades de ser

toleradas. En determinadas realizaciones ejemplares, los apareamientos erróneos formados entre residuos de adenina y citosina o guanosina y uracilo se utilizan como se describe por Du et al. Nucleic Acids Research, 2005, Vol. 33, No. 5 1671-1677. En determinadas realizaciones ejemplares, los apareamientos erróneos en regiones de solapamiento de 19 pares de bases pueden estar en las posiciones de baja tolerancia 5, 7, 8 u 11 (desde el extremo 5' de una diana de 19 nucleótidos) con residuos de apareamientos erróneos de nucleótidos bien tolerados, en las posiciones de tolerancia media 3, 4 y 12-17, y/o en las posiciones de nucleótidos de alta tolerancia en cualquiera de los extremos de la región de complementariedad (es decir, posiciones 1, 2, 18 y 19), como describen Du et al. Nucleic Acids Research, 2005, Vol. 33, No. 5 1671-1677. Se prevé además que los apareamientos erróneos tolerados puedan determinarse empíricamente en ensayos en los que el polinucleótido se aplique a las plantas mediante los procedimientos proporcionados en la presente memoria y las plantas tratadas se ensayen para la supresión de la expresión del gen de la polifenoloxidasas (PPO) o la aparición de una vida útil mejorada y pérdidas poscosecha reducidas.

En determinadas realizaciones, las moléculas polinucleotídicas están diseñadas para tener un 100 por ciento de identidad de secuencia con o complementariedad con un alelo o un miembro de la familia de una determinada secuencia codificante o no codificante del gen de la polifenoloxidasas (PPO) diana. Los genes polifenoloxidasas (PPO) diana incluyen tanto los genes polifenoloxidasas (PPO) de SEQ ID NO: 1-23 así como genes polifenoloxidasas (PPO) ortólogos obtenidos de otros cultivos. En otras realizaciones, las moléculas polinucleotídicas están diseñadas para tener un 100 por cien de identidad de secuencia con o complementariedad con múltiples alelos o miembros de la familia de un gen diana determinado.

En determinadas realizaciones, las composiciones de polinucleótidos y los procedimientos proporcionados en la presente memoria por lo general efectúan la regulación o modulación (por ejemplo, supresión) de la expresión génica durante un periodo de la vida de la planta tratada de al menos 1 semana o más y por lo general de forma sistémica. Por ejemplo, a los pocos días de tratar una hoja de la planta con una composición polinucleotídica como la descrita en la presente memoria, pueden detectarse ARNpi primarios y transitivos en otras hojas laterales y por encima de la hoja tratada y en tejido apical. En determinadas realizaciones, procedimientos para suprimir sistémicamente la expresión de un gen en una planta, los procedimientos comprenden tratar dicha planta con una composición que comprende al menos un polinucleótido y un agente de transferencia, en la que dicho polinucleótido comprende al menos 18 o al menos 19 nucleótidos contiguos que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios a un gen o un transcrito que codifica un gen de la polifenoloxidasas (PPO) de la planta, por lo que la expresión del gen en dicha planta o su progenie se suprime sistémicamente en comparación con una planta de control que no ha sido tratada con la composición.

Las composiciones utilizadas para suprimir un gen diana pueden comprender uno o más polinucleótidos que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios a múltiples genes, o a múltiples segmentos de uno o más genes. En determinadas realizaciones, las composiciones utilizadas para suprimir un gen diana pueden comprender uno o más polinucleótidos que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios a múltiples segmentos consecutivos de un gen diana, múltiples segmentos no consecutivos de un gen diana, múltiples alelos de un gen diana, o múltiples genes diana de una o más especies.

En determinadas realizaciones, el polinucleótido incluye dos o más copias de una secuencia de nucleótidos (de 18 o más nucleótidos) donde las copias están dispuestas en tándem. En otra realización, el polinucleótido incluye dos o más copias de una secuencia de nucleótidos (de 18 o más nucleótidos) donde las copias están dispuestas en forma de repetición invertida (formando una cadena al menos parcialmente autocomplementaria). El polinucleótido puede incluir tanto copias en tándem como copias con repetición invertida. Ya estén dispuestas en tándem o en forma de repetición invertida, cada copia puede ser directamente contigua a la siguiente, o los pares de copias pueden estar separados por un espaciador opcional de uno o más nucleótidos. El espaciador opcional puede ser una secuencia no relacionada (es decir, no esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a las copias, ni esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos del gen diana endógeno o ARN transcrito a partir del gen diana endógeno). Alternativamente, el espaciador opcional puede incluir una secuencia complementaria a un segmento del gen diana endógeno adyacente al segmento al que se dirigen las copias. En determinadas realizaciones, el polinucleótido incluye dos copias de una secuencia de nucleótidos de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30 nucleótidos, donde las dos copias están separadas por un espaciador no más largo que la longitud de la secuencia de nucleótidos.

Traslape

Las moléculas activadoras de polinucleótidos pueden identificarse mediante "traslape" de las dianas génicas en fragmentos de longitud aleatoria, por ejemplo, de 200-300 polinucleótidos de longitud, con regiones parcialmente solapadas, por ejemplo, regiones solapadas de aproximadamente 25 nucleótidos a lo largo de la longitud del gen diana. Las secuencias de múltiples genes diana pueden alinearse y las regiones de secuencias polinucleotídicas con homología en común se identifican como potenciales moléculas activadoras de múltiples dianas. Se pueden alinear múltiples secuencias diana y se identifican las regiones de secuencia con escasa homología como posibles moléculas activadoras para distinguir selectivamente las dianas. Para suprimir selectivamente un único gen, las secuencias desencadenantes pueden elegirse de regiones que sean exclusivas del gen diana, ya sea de la región transcrita o de las regiones no codificantes, por ejemplo, regiones promotoras, regiones no traducidas 3', intrones y similares.

Los fragmentos de polinucleótidos se diseñan a lo largo de toda la longitud de las regiones codificantes y no traducidas de un gen de la polifenoloxidasasa (PPO) o de un miembro de la familia como fragmentos contiguos superpuestos de 200-300 polinucleótidos de longitud o longitudes de fragmentos que representan un porcentaje del gen de la polifenoloxidasasa (PPO) diana. Estos fragmentos se aplican por vía tópica (como ADNmc sentido o antisentido o ARNmc, ARNbc o ADNbc) para determinar la eficacia relativa a la hora de proporcionar el fenotipo de vida útil mejorada y pérdidas poscosecha reducidas. Los fragmentos que proporcionan la actividad deseada pueden subdividirse a su vez en 50-60 fragmentos polinucleotídicos que se evalúan para proporcionar el fenotipo de vida útil mejorada y pérdidas poscosecha reducidas. Los 50-60 fragmentos de base con la actividad deseada pueden subdividirse a su vez en 19-30 fragmentos de base que se evalúan para proporcionar el fenotipo de vida útil mejorada y pérdidas poscosecha reducidas. Una vez determinada la eficacia relativa, los fragmentos se utilizan individualmente, o en combinación en uno o más grupos para determinar la composición o mezcla eficaz de polinucleótidos activadores para proporcionar el fenotipo de vida útil mejorada y pérdidas poscosecha reducidas.

Se alinean las secuencias codificantes y/o no codificantes de las familias de genes de la polifenoloxidasasa (PPO) en el cultivo de interés y se evalúan 200-300 fragmentos polinucleotídicos de las regiones menos homólogas entre las secuencias alineadas utilizando polinucleótidos aplicados por vía tópica (como ADNmc sentido o antisentido o ARNmc, ARNbc o ADNbc) para determinar su eficacia relativa a la hora de proporcionar el fenotipo de vida útil mejorada y pérdidas poscosecha reducidas. Los segmentos efectivos se subdividen a su vez en 50-60 fragmentos de polinucleótidos, se priorizan por menor homología y se reevalúan mediante polinucleótidos aplicados por vía tópica. Los 50-60 fragmentos polinucleotídicos efectivos se subdividen en 19-30 fragmentos polinucleotídicos, priorizados por menor homología, y se evalúan de nuevo para inducir el fenotipo de vida útil mejorada y pérdidas poscosecha reducidas. Una vez determinada la eficacia relativa, los fragmentos se utilizan por separado, o se evalúan de nuevo en combinación con uno o más otros fragmentos para determinar la composición o mezcla de polinucleótidos activadores que proporcionan el fenotipo de rendimiento/calidad.

Se alinean las secuencias codificantes y/o no codificantes de las familias de genes de la polifenoloxidasasa (PPO) en el cultivo de interés y se evalúan 200-300 fragmentos polinucleotídicos de las regiones más homólogas entre las secuencias alineadas utilizando polinucleótidos aplicados por vía tópica (como ADNmc sentido o antisentido o ARNmc, ARNbc o ADNbc) para determinar su eficacia relativa en la inducción del fenotipo de vida útil mejorada y pérdidas poscosecha reducidas. Los segmentos eficaces se subdividen en 50-60 fragmentos de polinucleótidos, se priorizan por mayor homología y se reevalúan mediante polinucleótidos aplicados por vía tópica. Los 50-60 fragmentos polinucleotídicos efectivos se subdividen en 19-30 fragmentos polinucleotídicos, priorizados por la mayor homología, y se evalúan de nuevo para inducir el fenotipo de vida útil mejorada y pérdidas poscosecha reducidas. Una vez determinada la eficacia relativa, los fragmentos pueden utilizarse por separado o en combinación con uno o más otros fragmentos para determinar la composición o mezcla de polinucleótidos activadores que proporcionen el fenotipo de vida útil mejorada y pérdidas poscosecha reducidas.

Además, se proporcionan en la presente memoria procedimientos para identificar un polinucleótido preferido para proporcionar una vida útil mejorada y reducir las pérdidas poscosecha en una planta. Las poblaciones de polinucleótidos candidatos que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios a un gen de la polifenoloxidasasa (PPO) o a un transcrito del gen de la polifenoloxidasasa (PPO) pueden generarse mediante una variedad de enfoques, incluyendo, pero sin limitarse a, cualquiera de los enfoques de traslape, mínima homología o máxima homología proporcionados en la presente memoria. Tales poblaciones de polinucleótidos también pueden generarse u obtenerse a partir de cualquiera de los polinucleótidos o genes proporcionados en el presente listado de secuencias. Tales poblaciones de polinucleótidos también pueden generarse u obtenerse a partir de cualquier gen que sea ortólogo de los genes proporcionados en el presente listado de secuencias. Tales polinucleótidos pueden aplicarse por vía tópica a una superficie de plantas en una composición que comprenda al menos un polinucleótido de dicha población y un agente de transferencia para obtener plantas tratadas. Se identifican plantas tratadas que presentan supresión del gen de la polifenoloxidasasa (PPO) y/o muestran una mejora en la vida útil y una reducción de las pérdidas poscosecha, identificando de este modo un polinucleótido preferido que mejora la vida útil y reduce las pérdidas poscosecha en una planta. La supresión del gen de la polifenoloxidasasa (PPO) puede determinarse mediante cualquier ensayo de los niveles y/o la actividad de un producto génico de la polifenoloxidasasa (PPO) (es decir, transcripción o proteína). Los ensayos adecuados para los transcritos incluyen, pero no se limitan a, ensayos semicuantitativos o cuantitativos de PCR[®] de transcriptasa inversa (qRT-PCR). Los ensayos adecuados para proteínas incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayos semicuantitativos o cuantitativos, ensayos de actividad bioquímica o ensayos de actividad biológica. En determinadas realizaciones, los polinucleótidos pueden aplicarse solos. En otras realizaciones, los polinucleótidos pueden aplicarse en grupos de múltiples polinucleótidos. Cuando se identifica un grupo de polinucleótidos que proporciona la supresión del gen de la polifenoloxidasasa (PPO) y/o una mejora en la vida útil y una reducción de las pérdidas poscosecha, el grupo puede ser desreplicado y vuelto a probar según sea necesario o deseado para identificar uno o más polinucleótidos preferidos que mejoren la vida útil y reduzcan las pérdidas poscosecha en una planta.

Los procedimientos de fabricación de polinucleótidos son bien conocidos en la técnica. Tales procedimientos de fabricación de polinucleótidos pueden incluir la biosíntesis in vivo, la síntesis enzimática in vitro o la síntesis química. En determinadas realizaciones, las moléculas de ARN pueden fabricarse mediante síntesis in vivo o in vitro a partir de plantillas de ADN en las que un promotor adecuado está unido de forma operable al polinucleótido y se proporciona una ARN polimerasa dependiente de ADN adecuado. Las ARN polimerasas dependientes del ADN incluyen, pero no se limita

a, las ARN polimerasas de *E. coli* u otras bacterias, así como las ARN polimerasas de bacteriófagos, tales como las ARN polimerasas T7, T3 y SP6. La preparación comercial de oligonucleótidos a menudo proporciona dos desoxirribonucleótidos en el extremo 3' de la cadena sentido. Las moléculas largas de polinucleótidos pueden sintetizarse a partir de kits disponibles en el mercado, por ejemplo, los kits de Applied Biosystems/Ambion (Austin, TX) tienen ADN ligado en el extremo 5' que codifica un promotor de la polimerasa del bacteriófago T7 que produce hebras de ARN que pueden ensamblarse en un ARNbc. Alternativamente, las moléculas de ARNbc pueden producirse a partir de casetes de expresión en células bacterianas que tengan regulada o deficiente la actividad de la enzima RNasa III. Las moléculas largas de polinucleótidos también pueden ensamblarse a partir de múltiples fragmentos de ARN o ADN. En algunas realizaciones, los parámetros de diseño tales como la puntuación de Reynolds (Reynolds et al. *Nature Biotechnology* 22, 326 - 330 (2004) y las reglas de Tuschl (Pei and Tuschl, *Nature Methods* 3(9): 670-676, 2006) son conocidos en la técnica y se utilizan para seleccionar secuencias polinucleotídicas eficaces en el silenciamiento de genes. En algunas realizaciones se utiliza el diseño aleatorio o la selección empírica de secuencias polinucleotídicas para seleccionar secuencias polinucleotídicas eficaces en el silenciamiento génico. En algunas realizaciones, la secuencia de un polinucleótido se criba con el ADN genómico de la planta para minimizar el silenciamiento involuntario de otros genes.

Aunque no existe un límite superior para las concentraciones y dosificaciones de las moléculas polinucleotídicas que pueden ser útiles en los procedimientos y composiciones que se proporcionan en la presente memoria, generalmente se buscarán concentraciones y dosificaciones efectivas más bajas en aras de la eficacia. Las concentraciones pueden ajustarse en función del volumen de pulverización o tratamiento aplicado a las hojas de las plantas o a otras superficies de partes de plantas, tales como pétalos de flores, tallos, tubérculos, frutos, anteras, polen, hojas, raíces o semillas. En una realización, un tratamiento útil para plantas herbáceas utilizando moléculas de polinucleótidos 25-mer es de aproximadamente 1 nanomol (nmol) de moléculas de polinucleótidos por planta, por ejemplo, de aproximadamente 0,05 a 1 nmol de polinucleótidos por planta. Otras realizaciones para plantas herbáceas incluyen intervalos útiles de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 100 nmol, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 nmol, o de aproximadamente 1 nmol a aproximadamente 10 nmol de polinucleótidos por planta. En determinadas realizaciones, se aplica de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 nmol de un polinucleótido de ADNmc. En determinadas realizaciones, se aplica de aproximadamente 0,5 nmol a aproximadamente 2 nmol de un ARNbc. En determinadas realizaciones, se aplica una composición que contiene aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,0 mg/ml, o aproximadamente 0,14 mg/ml de ARNbc o ADNmc (21-mer). En determinadas realizaciones, se aplica una composición de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 mg/ml de un polinucleótido ARNbc largo (es decir, de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 o más nucleótidos). En determinadas realizaciones, se aplica a una planta de aproximadamente 1nmol a aproximadamente 5nmol de un ARNbc. En determinadas realizaciones, la composición de polinucleótidos aplicada por vía tópica a la planta contiene al menos un polinucleótido en una concentración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 miligramos por mililitro, o de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 2 miligramos por mililitro, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2 miligramos por mililitro. Las plantas, árboles o vides muy grandes pueden requerir cantidades correspondientemente mayores de polinucleótidos. Cuando se utilizan moléculas largas de ARNbc que se pueden procesar en múltiples oligonucleótidos, se pueden utilizar concentraciones más bajas. Para ilustrar las realizaciones descritas en la presente memoria, el factor 1X, cuando se aplica a moléculas de oligonucleótidos, se utiliza arbitrariamente para indicar un tratamiento de 0,8 nmol de molécula de polinucleótido por planta; 10X, 8 nmol de molécula de polinucleótido por planta; y 100X, 80 nmol de molécula de polinucleótido por planta.

Las composiciones de polinucleótidos descritas en la presente memoria son útiles en composiciones, tales como líquidos que comprenden moléculas de polinucleótidos, solas o en combinación con otros componentes, ya sea en el mismo líquido o en líquidos aplicados por separado que proporcionan un agente de transferencia. Como se utiliza en la presente memoria, un agente de transferencia es un agente que, cuando se combina con un polinucleótido en una composición que se aplica por vía tópica a una superficie vegetal diana, permite que el polinucleótido entre en una célula vegetal. En determinadas realizaciones, un agente de transferencia es un agente que acondiciona la superficie del tejido vegetal, por ejemplo, semillas, hojas, tallos, raíces, flores o frutos, a la permeación por las moléculas de polinucleótidos en las células vegetales. La transferencia de polinucleótidos a las células vegetales puede facilitarse mediante la aplicación previa o simultánea de un agente de transferencia de polinucleótidos al tejido vegetal. En algunas realizaciones, el agente de transferencia se aplica posteriormente a la aplicación de la composición de polinucleótidos. El agente de transferencia de polinucleótidos permite una ruta para los polinucleótidos a través de las barreras de cera de la cutícula, los estomas y/o las barreras de la pared o membrana celular hacia las células vegetales. Los agentes de transferencia adecuados para facilitar la transferencia del polinucleótido a una célula vegetal incluyen agentes que aumentan la permeabilidad del exterior de la planta o que aumentan la permeabilidad de las células vegetales a los oligonucleótidos o polinucleótidos. Tales agentes para facilitar la transferencia de la composición a una célula vegetal incluyen un agente químico, o un agente físico, o combinaciones de los mismos. Los agentes químicos para el acondicionamiento o la transferencia incluyen (a) tensioactivos, (b) un disolvente orgánico o una solución acuosa o mezclas acuosas de disolventes orgánicos, (c) agentes oxidantes, (d) ácidos, (e) bases, (f) aceites, (g) enzimas, o combinaciones de los mismos. Las realizaciones del procedimiento pueden incluir opcionalmente una etapa de incubación, una etapa de neutralización (por ejemplo, para neutralizar un ácido, una base o un agente oxidante, o para inactivar una enzima), una etapa de aclarado, o combinaciones de las mismas. Las realizaciones de agentes o tratamientos para acondicionar una planta a la permeación por polinucleótidos incluyen emulsiones, emulsiones inversas, liposomas y otras composiciones de tipo micelar. Las realizaciones de agentes o tratamientos para acondicionar una planta a la permeación por polinucleótidos incluyen contrainones u otras moléculas que se sabe que se asocian con moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, iones de amonio inorgánico, iones de alquil amonio, iones de litio, poliaminas tales como espermina, espermidina o putrescina, y otros

caciones. Los disolventes orgánicos útiles para acondicionar una planta a la permeación por polinucleótidos incluyen DMSO, DMF, piridina, N-pirrolidina, hexametilfosforamida, acetonitrilo, dioxano, polipropilenglicol, otros disolventes miscibles con agua o que disolverán los fosfonucleótidos en sistemas no acuosos (tal como se utiliza en reacciones sintéticas). Pueden utilizarse aceites derivados naturalmente o sintéticos con o sin tensioactivos o emulgentes, por ejemplo, aceites de origen vegetal, aceites de cultivos (tales como los enumerados en el 9th Compendium of Herbicide Adjuvants, disponible públicamente en la web mundial (internet) en herbicide.adjuvants.com pueden utilizarse, por ejemplo, aceites parafínicos, ésteres de ácidos grasos de poliol o aceites con moléculas de cadena corta modificadas con amidas o poliaminas como la polietilenimina o la N-pirrolidina. Los agentes de transferencia incluyen, pero no se limitan a, los preparados de organosilicona.

En determinadas realizaciones, una preparación de organosilicona que está disponible comercialmente como tensioactivo Silwet® L-77 con número CAS 27306-78-1 y número EPA: N.º REG. 5905-50073-AA, y actualmente disponible en Momentive Performance Materials, Albany, Nueva York, puede utilizarse para preparar una composición polinucleotídica. En determinadas realizaciones en las que se utiliza una preparación de organosilicona Silwet L-77 como tratamiento previo a la pulverización de hojas de plantas u otras superficies vegetales, se utilizan concentraciones recién hechas en el intervalo de aproximadamente 0,015 a aproximadamente 2 por ciento en peso (p.p.) (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,015, 0,02, 0,025, 0,03, 0,035, 0,04, 0,045, 0,05, 0,055, 0,06, 0,065, 0,07, 0,075, 0,08, 0,085, 0,09, 0,095, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,5 por ciento en peso) son eficaces para preparar una hoja u otra superficie vegetal para la transferencia de moléculas de polinucleótidos a células vegetales a partir de una aplicación tópica en la superficie. En determinadas realizaciones de los procedimientos y composiciones proporcionados en la presente memoria, se usa o proporciona una composición que comprende una molécula de polinucleótido y una preparación de organosilicona que comprende Silwet L-77 en el intervalo de aproximadamente 0,015 a aproximadamente 2 por ciento en peso (por ciento en peso) (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,015, 0,02, 0,025, 0,03, 0,035, 0,04, 0,045, 0,05, 0,055, 0,06, 0,065, 0,07, 0,075, 0,08, 0,085, 0,09, 0,095, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,5 por ciento en peso). En determinadas realizaciones de los procedimientos y composiciones proporcionados en la presente memoria, se utiliza o se proporciona una composición que comprende una molécula de polinucleótido y una preparación de organosilicona que comprende Silwet L-77 en un intervalo de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 1 por ciento en peso (porcentaje en peso) o de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1 % en peso (porcentaje en peso).

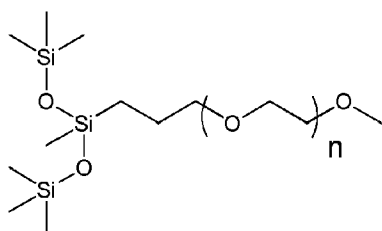
En determinadas realizaciones de los procedimientos y composiciones proporcionados en la presente memoria, se utiliza o se proporciona una composición que comprende una molécula de polinucleótido y una preparación de organosilicona que comprende Silwet L-77 en un intervalo de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 1 por ciento en peso (porcentaje en peso) o de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1 % en peso (porcentaje en peso). En determinadas realizaciones, cualquiera de las preparaciones de organosilicona disponibles comercialmente que se proporcionan en la siguiente tabla 1 puede utilizarse como agente de transferencia en una composición de polinucleótidos. En determinadas realizaciones donde una preparación de organosilicona de la tabla se utiliza como tratamiento previo a la pulverización de hojas de plantas u otras superficies, las concentraciones recién hechas en el intervalo de aproximadamente 0,015 a aproximadamente 2 por ciento en peso (por ciento en peso) (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,015, 0,02, 0,025, 0,03, 0,035, 0,04, 0,045, 0,05, 0,055, 0,06, 0,065, 0,07, 0,075, 0,08, 0,085, 0,09, 0,095, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,5 por ciento en peso) son eficaces para preparar una hoja u otra superficie vegetal para la transferencia de moléculas de polinucleótidos a células vegetales a partir de una aplicación tópica en la superficie. En determinadas realizaciones de los procedimientos y composiciones proporcionados en la presente memoria, se usa o proporciona una composición que comprende una molécula de polinucleótido y una preparación de organosilicona de la tabla 1 en el intervalo de aproximadamente 0,015 a aproximadamente 2 por ciento en peso (por ciento en peso) (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,015, 0,02, 0,025, 0,03, 0,035, 0,04, 0,045, 0,05, 0,055, 0,06, 0,065, 0,07, 0,075, 0,08, 0,085, 0,09, 0,095, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,5 (porcentaje en peso).

Tabla 1. Preparados de organosiliconas ejemplares

Nombre	Número CAS	Fabricante ^{1,2}
BREAK-THRU® S 321	na	Evonik Industries AG
BREAK-THRU® S 200	67674-67-3	Evonik Industries AG
BREAK-THRU® OE 441	68937-55-3	Evonik Industries AG
BREAK-THRU® S 278	27306-78-1	Evonik Goldschmidt
BREAK-THRU® S 243	na	Evonik Industries AG
Silwet® L-77	27306-78-1	Momentive Performance Materials
Silwet® HS 429	na	Momentive Performance Materials
Silwet® HS 312	na	Momentive Performance Materials
BREAK-THRU® S 233	134180-76, -0	Evonik Industries AG

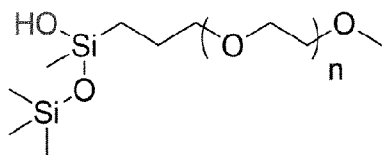
Nombre	Número CAS	Fabricante ^{1,2}
Silwet® HS 508		Momentive Performance Materials
Silwet® HS 604		Momentive Performance Materials
1 Evonik Industries AG, Essen, Alemania		
2 Momentive Performance Materials, Albany, Nueva York		

Los preparados de organosilicona utilizadas en los procedimientos y composiciones proporcionados en la presente memoria pueden comprender uno o más compuestos de organosiliconas eficaces. Como se utiliza en la presente memoria, la frase "compuesto de organosilicona eficaz" se utiliza para describir cualquier compuesto de organosilicona que se encuentre en un preparado de organosilicona que permita la entrada de un polinucleótido en una célula vegetal. En determinadas realizaciones, un compuesto de organosilicona eficaz puede permitir que un polinucleótido entre en una célula vegetal de manera que permita una supresión mediada por el polinucleótido de la expresión del gen diana en la célula vegetal. En general, los compuestos de organosilicona eficaces incluyen, pero no se limitan a, compuestos que pueden comprender: i) un grupo de cabeza de trisiloxano que está unido covalentemente, ii) un enlazante alquilo que incluye, pero no se limita a, un enlazante n-propilo, que está unido covalentemente, iii) una cadena de poliglicol, que está unida covalentemente, iv) un grupo terminal. Los grupos de cabeza trisiloxano de tales compuestos de organosiliconas eficaces incluyen, pero no se limitan a, el heptametiltrisiloxano. Los enlazantes alquílicos pueden incluir, pero no se limitan a, un enlazante n-propílico. Las cadenas de poliglicol incluyen, pero no se limitan a, el polietilenglicol o el polipropilenglicol. Las cadenas de poliglicol pueden comprender una mezcla que proporcione una longitud media de cadena "n" de aproximadamente "7,5". En determinadas realizaciones, la longitud promedio de la cadena "n" puede variar entre 5 y 14 aproximadamente. Los grupos terminales pueden incluir, entre otros, grupos alquilo, como un grupo metilo. Se cree que los compuestos de organosiliconas eficaces incluyen, pero no se limitan a otros, tensioactivos de etoxilato de trisiloxano o heptametil trisiloxano modificado con óxido de polialquileno.



(Compuesto I: polialquilenooxido de heptametiltrisiloxano, promedio $n=7,5$).

Un compuesto de organosilicona considerado ineficaz comprende la fórmula:



En determinadas realizaciones, se utiliza una preparación de organosilicona que comprende un compuesto de organosilicona que comprende un grupo de cabeza de trisiloxano en los procedimientos y composiciones proporcionados en la presente memoria. En determinadas realizaciones, en los procedimientos y composiciones proporcionados en la presente memoria se utiliza una preparación de organosilicona que comprende un compuesto de organosilicona que comprende un grupo de cabeza heptametiltrisiloxano. En determinadas realizaciones, se utiliza una composición de organosilicona que comprende el compuesto I en los procedimientos y composiciones proporcionados en la presente memoria. En determinadas realizaciones, se utiliza una composición de organosilicona que comprende el compuesto I en los procedimientos y composiciones proporcionados en la presente memoria. En determinadas realizaciones de los procedimientos y composiciones proporcionados en la presente memoria, se utiliza o proporciona una composición que comprende una molécula de polinucleótido y uno o más compuestos de organosiliconas eficaces en el intervalo de aproximadamente 0,015 a aproximadamente 2 por ciento en peso (por ciento en peso) (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,015, 0,02, 0,025, 0,03, 0,035, 0,04, 0,045, 0,05, 0,055, 0,06, 0,065, 0,07, 0,075, 0,08, 0,085, 0,09, 0,095, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,5 por ciento en peso).

En determinadas realizaciones, las composiciones de polinucleótidos que comprenden una preparación de organosilicona pueden comprender una sal como cloruro de amonio, bromuro de tetrabutilfosfonio y/o sulfato de amonio. El cloruro de amonio, el bromuro de tetrabutilfosfonio y/o el sulfato de amonio pueden proporcionarse en la composición de polinucleótidos a una concentración de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 5 % (p/v). También puede utilizarse

una concentración de cloruro de amonio, bromuro de tetrabutilfosfonio y/o sulfato de amonio de aproximadamente 1 % a aproximadamente 3 %, o aproximadamente 2 % (p/v) en las composiciones de polinucleótidos que comprenden una preparación de organosilicona. En determinadas realizaciones, las composiciones de polinucleótidos pueden comprender una sal de amonio a una concentración mayor o igual a 300 milimolar. En determinadas realizaciones, las composiciones de polinucleótidos que comprenden una preparación de organosilicona pueden comprender sulfato de amonio en concentraciones de aproximadamente 80 a aproximadamente 1200 mM o de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 600 mM.

En determinadas realizaciones, las composiciones de polinucleótidos también pueden comprender una sal de fosfato. Las sales de fosfato utilizadas en las composiciones incluyen, pero no se limita a, sales de fosfato de calcio, magnesio, potasio o sodio. En determinadas realizaciones, las composiciones de polinucleótidos pueden comprender una sal de fosfato a una concentración de al menos aproximadamente 5 milimolar, al menos aproximadamente 10 milimolar o al menos aproximadamente 20 milimolar. En determinadas realizaciones, las composiciones de polinucleótidos comprenderán una sal de fosfato en un intervalo de aproximadamente 1mM a aproximadamente 25mM o en un intervalo de aproximadamente 5mM a aproximadamente 25mM. En determinadas realizaciones, las composiciones de polinucleótidos pueden comprender fosfato de sodio en una concentración de al menos aproximadamente 5 milimolar, al menos aproximadamente 10 milimolar o al menos aproximadamente 20 milimolar. En determinadas realizaciones, las composiciones de polinucleótidos pueden comprender fosfato sódico a una concentración de aproximadamente 5 milimolar, aproximadamente 10 milimolar o aproximadamente 20 milimolar. En determinadas realizaciones, las composiciones de polinucleótidos comprenderán una sal de fosfato de sodio en un intervalo de aproximadamente 1mM a aproximadamente 25mM o en un intervalo de aproximadamente 5mM a aproximadamente 25mM. En determinadas realizaciones, las composiciones de polinucleótidos comprenderán una sal de fosfato de sodio en un intervalo de aproximadamente 10mM a aproximadamente 160mM o en un intervalo de aproximadamente 20mM a aproximadamente 40mM. En determinadas realizaciones, las composiciones de polinucleótidos pueden comprender un tampón de fosfato de sodio a un pH de aproximadamente 6,8.

En determinadas realizaciones, otros agentes de transferencia útiles o adyuvantes de los agentes de transferencia que pueden utilizarse en las composiciones de polinucleótidos proporcionadas en la presente memoria incluyen tensioactivos y/o moléculas eficaces contenidas en los mismos. Los tensioactivos y/o moléculas eficaces que contienen incluyen, pero no se limitan a, sales de sodio o litio de ácidos grasos (tales como sebo o seboaminas o fosfolípidos) y tensioactivos de organosiliconas. En determinadas realizaciones, las composiciones de polinucleótidos que comprenden un agente de transferencia se formulan con contra-iones u otras moléculas que se sabe que se asocian con moléculas de ácido nucleico. Ejemplos ilustrativos incluyen iones de tetraalquil amonio, iones de trialquil amonio, iones de sulfonio, iones de litio y poliaminas tales como espermina, espermidina o putrescina. En determinadas realizaciones, las composiciones de polinucleótidos se formulan con un herbicida no polinucleótido. Las moléculas herbicidas no polinucleótidos incluyen, pero no se limitan a, glifosato, herbicidas de ácido benzoico tipo auxina incluyendo dicamba, cloramben y TBA, glufosinato, herbicidas tipo auxina incluyendo herbicida de ácido fenoxi carboxílico, herbicida de ácido piridínico carboxílico, el herbicida de ácido carboxílico de quinolina, el herbicida de ácido carboxílico de pirimidina y el herbicida de benazolina-etilo, sulfonilureas, imidazolinonas, bromoxinilo, delapón, ciclohexanediona, inhibidores de la protoporfirinógeno oxidasa y herbicidas inhibidores de la 4-hidroxifenilpiruvato-dioxigenasa.

En determinadas realizaciones, los polinucleótidos utilizados en las composiciones que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios al gen o transcrito diana constituirán el ácido nucleico predominante en la composición. Por tanto, en determinadas realizaciones, los polinucleótidos que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios al gen o transcrito diana comprenderán al menos aproximadamente 50 %, 75 %, 95 %, 98 % o 100 % de los ácidos nucleicos proporcionados en la composición, ya sea por masa o concentración molar. Sin embargo, en determinadas realizaciones, los polinucleótidos que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios al gen o transcrito diana pueden comprender al menos de aproximadamente 1 % a aproximadamente 50 %, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 50 %, de aproximadamente 20 % a aproximadamente 50 %, o de aproximadamente 30 % a aproximadamente 50 % de los ácidos nucleicos proporcionados en la composición, ya sea en masa o en concentración molar. También se proporcionan composiciones en las que los polinucleótidos que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios al gen o transcrito diana pueden comprender al menos de aproximadamente 1 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente 20 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente 30 % a aproximadamente 50 %, o de aproximadamente 50 % a aproximadamente 100 % de los ácidos nucleicos proporcionados en la composición, ya sea en masa o en concentración molar.

Los polinucleótidos que comprenden ADNmc, ADNbc, ARNmc, ARNbc o híbridos de ARN/ADN que son esencialmente idénticos o complementarios a ciertos genes o transcritos diana de plantas y que pueden utilizarse en composiciones que contienen agentes de transferencia que incluyen, pero no se limitan a, preparaciones de organosilicona, para suprimir esos genes diana cuando se aplican por vía tópica a plantas se divulgan en la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos coasignada No.13/042856. Diversas moléculas herbicidas de polinucleótidos, composiciones que comprenden esas moléculas herbicidas de polinucleótidos y agentes de transferencia que incluyen, pero no se limitan a, preparaciones de organosilicona, y procedimientos por los que se obtienen efectos herbicidas mediante la aplicación tópica de tales composiciones a plantas también se divulgan en la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos coasignada No.13/042856. Los genes que codifican proteínas que pueden proporcionar tolerancia a un herbicida y/o que son dianas

de un herbicida se denominan colectivamente en la presente memoria "genes diana de herbicidas". Los genes diana de los herbicidas incluyen, pero no se limitan a, una 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), una glifosato oxidorreductasa (GOX), una glifosato descarboxilasa, una glifosato-N-acetil transferasa (GAT), una dicamba monooxigenasa, una fosfinotricina acetiltransferasa, un ácido 2,2-dicloropropiónico deshalogenasa, una acetohidroxiácido sintasa, una acetolactato sintasa, una haloarilnitrilasa, una acetil-coenzima A carboxilasa (ACCase), una dihidropteroato sintasa, una fitoeno desaturasa (PDS), una protoporfirina IX oxigenasa (PPO), una hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD), una paraaminobenzoato sintasa, una glutamina sintasa, una celulosa sintasa, una beta tubulina y un gen de la serina hidroximetiltransferasa. Se demostró que los efectos de aplicar determinadas composiciones que comprenden polinucleótidos que son esencialmente idénticos o complementarios a ciertos genes diana de herbicidas y agentes de transferencia en plantas que contienen los genes diana de herbicidas se potencian o mejoran mediante la aplicación posterior de un herbicida que se dirige al mismo gen que el polinucleótido en la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos coasignada No.13/042856. Por ejemplo, las composiciones que comprenden polinucleótidos dirigidos al gen diana del herbicida EPSPS fueron potenciadas por el glifosato en experimentos divulgados en la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos coasignada No.13/042856.

En determinadas realizaciones de las composiciones y procedimientos divulgados en la presente memoria, la composición que comprende un polinucleótido y un agente de transferencia puede de este modo comprender además un segundo polinucleótido que comprende al menos 19 nucleótidos contiguos que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios a un transcrito de una proteína que confiere resistencia a un herbicida. En determinadas realizaciones, el segundo polinucleótido no comprende un polinucleótido que sea esencialmente idéntico o esencialmente complementario a un transcrito que codifica una proteína de una planta diana que confiere resistencia a dicha molécula herbicida. Por tanto, en una realización ejemplar y no limitante, el segundo polinucleótido podría ser esencialmente idéntico o esencialmente complementario a un transcrito que codifica una proteína que confiere resistencia a un herbicida en una mala hierba (como un transcrito que codifica EPSPS) pero no sería esencialmente idéntico o esencialmente complementario a un transcrito que codifica una proteína que confiere resistencia a ese mismo herbicida en una planta de cultivo.

En determinadas realizaciones, las composiciones de polinucleótidos que comprenden un agente de transferencia pueden comprender glicerina. La glicerina puede suministrarse en la composición a una concentración de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 1 % (p/v o v/v). También puede utilizarse una concentración de glicerina de aproximadamente 0,4 % a aproximadamente 0,6 %, o aproximadamente 0,5 % (p/v o v/v) en las composiciones de polinucleótidos que comprenden un agente de transferencia.

En determinadas realizaciones, las composiciones de polinucleótidos que comprenden un agente de transferencia pueden comprender además disolventes orgánicos. Tales disolventes orgánicos incluyen, pero no se limitan a, DMSO, DMF, piridina, N-pirrolidina, hexametilfosforamida, acetonitrilo, dioxano, polipropilenglicol, otros disolventes miscibles con agua o que disolverán los fosfonucleótidos en sistemas no acuosos (tales como los utilizados en reacciones sintéticas).

En determinadas realizaciones, las composiciones de polinucleótidos que comprenden un agente de transferencia pueden comprender además aceites derivados naturalmente o sintéticos con o sin tensioactivos o emulsionantes. Tales aceites incluyen, pero no se limitan a, aceites de origen vegetal, aceites de cultivo (tales como los enumerados en el 9º Compendio de Adyuvantes Herbicidas, disponible públicamente en línea en www.herbicide.adjuvants.com), aceites parafinicos, ésteres de ácidos grasos de poliol o aceites con moléculas de cadena corta modificadas con amidas o poliaminas tales como polietilenimina o N-pirrolidina.

Los procedimientos descritos en la presente memoria incluyen una o más aplicaciones de la composición que comprende un polinucleótido y un agente de transferencia o uno o más componentes eficaces contenidos en la misma. En determinadas realizaciones de los procedimientos, una o más aplicaciones de un agente de transferencia o uno o más componentes eficaces contenidos en el mismo pueden preceder a una o más aplicaciones de la composición que comprende un polinucleótido y un agente de transferencia. En las realizaciones en las que un agente de transferencia y/o una o más moléculas eficaces contenidas en el mismo se utiliza por sí mismo como pretratamiento o como parte de una composición que incluye un polinucleótido, las realizaciones de las moléculas de polinucleótidos son oligonucleótidos de ARN bicatenario, oligonucleótidos de ARN monocatenario, polinucleótidos de ARN bicatenario, polinucleótidos de ARN monocatenario, oligonucleótidos de ADN bicatenario, oligonucleótidos de ADN monocatenario, polinucleótidos de ADN bicatenario, polinucleótidos de ADN monocatenario, oligonucleótidos o polinucleótidos de ARN o ADN modificados químicamente o mezclas de los mismos.

Las composiciones y procedimientos descritos en la presente memoria son útiles para modular o suprimir la expresión de un gen diana endógeno o transgénico en una célula vegetal o planta. En determinadas realizaciones de los procedimientos y composiciones proporcionados en la presente memoria, la expresión de los genes diana de la polifenoloxidasas (PPO) puede suprimirse total, parcial y/o transitoriamente para mejorar la vida útil y reducir las pérdidas poscosecha. En diversas realizaciones, un gen diana incluye una secuencia codificante (codificante de proteínas o traducible), una secuencia no codificante (no traducible) o ambas, codificante y no codificante. Las composiciones descritas en la presente memoria pueden incluir polinucleótidos y oligonucleótidos diseñados para dirigirse a múltiples genes, o a múltiples segmentos de uno o más genes. El gen diana puede incluir múltiples segmentos consecutivos de un gen diana, múltiples segmentos no consecutivos de un gen diana, múltiples alelos de un gen diana o múltiples genes diana de una o más especies. Los

ejemplos de genes diana descritos en la presente memoria incluyen genes de polifenoloxidasas (PPO) endógenos y transgenes de polifenoloxidasas (PPO).

Los genes diana de la polifenoloxidasas (PPO) y las plantas que contienen esos genes diana de la polifenoloxidasas (PPO) pueden obtenerse de i) plantas de cultivos en hileras que incluyen, pero no se limitan a, maíz, soja, algodón, canola, remolacha azucarera, alfalfa, caña de azúcar, arroz y trigo; ii) plantas hortícolas, incluidos, entre otros, tomate, patata, pimiento dulce, pimiento picante, melón, sandía, pepino, berenjena, coliflor, brécol, lechuga, espinaca, cebolla, guisantes, zanahorias, maíz dulce, col china, puerro, hinojo, calabaza, calabacín o calabaza, rábano, coles de Bruselas, tomatillo, judías de jardín, judías secas u okra; iii) plantas culinarias, incluidas, pero no se limita a, la albahaca, el perejil, el café o el té; iv) plantas frutales, incluidas, pero no se limita a, la manzana, la pera, la cereza, el melocotón, la ciruela, el albaricoque, el plátano, el plátano macho, la uva de mesa, la uva de vinificación, los cítricos, el aguacate, el mango o la baya; v) un árbol cultivado para uso ornamental o comercial, incluido, pero no limitado a, un árbol frutal o de frutos secos; o, vi) una planta ornamental (por ejemplo, una planta ornamental con flores, un arbusto o un césped). Los procedimientos y composiciones que se proporcionan en la presente memoria también pueden aplicarse a plantas producidas mediante un procedimiento de esquejado, clonación o injerto (es decir, una planta no cultivada a partir de una semilla), incluidos árboles frutales y plantas que incluyen, pero no se limita a, cítricos, manzanas, aguacates, tomates, berenjenas, pepinos, melones, sandías y uvas, así como diversas plantas ornamentales. Tales cultivos en hileras, vegetales, culinarios, frutales, árboles o plantas ornamentales que exhiben mejoras que resultan de la supresión de la expresión del gen de la polifenoloxidasas (PPO) se proporcionan en la presente memoria. Tales cultivos en hileras, vegetales, culinarios, frutales, árboles, o partes de plantas ornamentales o productos vegetales procesados que presentan una vida útil mejorada y pérdidas poscosecha reducidas que resultan de la supresión de la expresión del gen de la polifenoloxidasas (PPO) también se proporcionan en la presente memoria. Tales partes de la planta pueden incluir, pero no se limita a, flores, tallos, tubérculos, frutos, anteras, meristemas, óvulos, polen, hojas o semillas. Tales productos vegetales procesados obtenidos a partir de las partes de la planta pueden incluir, pero no se limitan a, una harina, una pulpa, un pienso o un producto alimenticio.

Un procedimiento para modular la expresión de un gen de Polifenol oxidasas (PPO) en una planta como se describe en la presente memoria incluye (a) acondicionamiento de una planta a la permeación por polinucleótidos y (b) tratamiento de la planta con las moléculas de polinucleótidos, en el que las moléculas de polinucleótidos incluyen al menos un segmento de 18 o más nucleótidos contiguos clonados a partir del gen de la polifenoloxidasas (PPO) diana o identificados de otro modo en orientación antisentido o sentido, por lo que las moléculas de polinucleótidos penetran en el interior de la planta e inducen la modulación del gen de la polifenoloxidasas (PPO) diana. El acondicionamiento y la aplicación de polinucleótidos pueden realizarse por separado o en una sola etapa. Cuando el acondicionamiento y la aplicación del polinucleótido se realizan en etapas separadas, el acondicionamiento puede preceder o seguir a la aplicación del polinucleótido en minutos, horas o días. En algunas realizaciones se puede llevar a cabo más de una etapa de acondicionamiento o más de una aplicación de moléculas polinucleotídicas en la misma planta. En las realizaciones del procedimiento, el segmento puede clonarse o identificarse a partir de (a) partes codificantes (codificación de proteínas), (b) no codificantes (promotor y otras moléculas relacionadas con el gen), o (c) tanto partes codificantes como no codificantes del gen diana de la polifenoloxidasas (PPO). Las partes no codificantes incluyen el ADN, tales como las regiones promotoras o el ARN transcrito por el ADN que proporciona moléculas reguladoras de ARN, entre las que se incluyen: intrones, regiones no traducidas 5' o 3', y microARN (miARN), ARNpi de acción trans, ARNpi naturales antisentido, y otros ARN pequeños con función reguladora o ARN con función estructural o enzimática, incluidos, pero no se limitan a: ribozimas, ARN ribosómicos, ARN-t, aptámeros y riboswitches. En determinadas realizaciones en las que el polinucleótido utilizado en la composición comprende una secuencia promotora esencialmente idéntica a, o esencialmente complementaria a, al menos 18 nucleótidos contiguos del promotor del gen de la polifenoloxidasas (PPO) diana endógena, la secuencia promotora del polinucleótido no está unida de forma operable a otra secuencia que se transcriba a partir de la secuencia promotora.

Las composiciones que comprenden un polinucleótido y un agente de transferencia proporcionados en la presente memoria pueden aplicarse por vía tópica a una planta o parte de la planta por cualquier procedimiento conveniente, por ejemplo, pulverización o recubrimiento con un polvo, o con una composición líquida que comprenda cualquiera de una emulsión, suspensión o solución. Tales pulverizaciones o recubrimientos aplicados por vía tópica pueden ser de toda la superficie de la planta o parte de la planta o de una parte de la misma. Del mismo modo, las composiciones que comprenden un agente de transferencia u otro pretratamiento pueden, en determinadas realizaciones, aplicarse a la planta o parte de la planta por cualquier procedimiento conveniente, por ejemplo, pulverizando o limpiando una solución, emulsión o suspensión. Las composiciones que comprenden un polinucleótido y un agente de transferencia proporcionados en la presente memoria pueden aplicarse por vía tópica a partes de plantas que incluyen, pero no se limitan a, flores, tallos, tubérculos, meristemas, óvulos, frutos, anteras, polen, hojas, raíces o semillas.

La aplicación de composiciones que comprenden un polinucleótido y un agente de transferencia a semillas se proporciona específicamente en la presente memoria. Las semillas pueden entrar en contacto con tales composiciones mediante pulverización, nebulización, inmersión y similares.

En determinadas realizaciones, la aplicación de composiciones que comprenden un polinucleótido y un agente de transferencia a plantas, partes de plantas o semillas en particular puede proporcionar una vida útil mejorada y reducir las pérdidas poscosecha en plantas, partes de plantas o semillas de progenie derivadas de esas plantas, partes de plantas o

semillas tratadas. En determinadas realizaciones, las plantas progenitoras, partes de plantas o semillas derivadas de esas plantas, partes de plantas o semillas tratadas mostrarán una vida útil mejorada y pérdidas poscosecha reducidas como resultado de la supresión de la expresión del gen de la polifenoloxidasasa (PPO). En determinadas realizaciones, los procedimientos y composiciones proporcionados en la presente memoria pueden mejorar la vida útil y reducir las pérdidas poscosecha en plantas o semillas de progenie como resultado de la supresión heredada epigenéticamente de la expresión del gen de la polifenoloxidasasa (PPO). En determinadas realizaciones, dichas plantas progenitoras presentan una vida útil mejorada y pérdidas poscosecha reducidas debido a la supresión heredada epigenéticamente de la expresión del gen de la polifenoloxidasasa (PPO) que no está causada por un transgén en el que el polinucleótido está unido de forma operable a un promotor, un vector viral o una copia del polinucleótido que está integrada en una ubicación no nativa en el ADN cromosómico de la planta. Sin pretender estar limitados por la teoría, las plantas progenitoras o las semillas derivadas de esas plantas, partes de plantas o semillas tratadas pueden presentar una mejora en la vida útil y una reducción de las pérdidas poscosecha a través de un mecanismo epigenético que proporciona la propagación de una condición epigenética en la que se produce la supresión de la expresión del gen de la polifenoloxidasasa (PPO) en las plantas progenitoras, partes de plantas o semillas de plantas. En determinadas realizaciones, las plantas o semillas progenitoras que presentan una vida útil mejorada y pérdidas poscosecha reducidas como resultado de la supresión heredada epigenéticamente de la expresión del gen de la polifenoloxidasasa (PPO) también pueden presentar una metilación aumentada, y en particular, una metilación aumentada de residuos de citosina, en el gen de la polifenoloxidasasa (PPO) endógena de la planta. Las partes de la planta, incluidas las semillas, de las plantas progenitoras que presentan una vida útil mejorada y pérdidas poscosecha reducidas como resultado de la supresión heredada epigenéticamente de la expresión del gen de la polifenoloxidasasa (PPO), también pueden presentar en determinadas realizaciones un aumento de la metilación, y en particular, un aumento de la metilación de los residuos de citosina, en el gen de la polifenoloxidasasa (PPO) endógena. En determinadas realizaciones, los niveles de metilación del ADN en el ADN que codifica el gen de la polifenoloxidasasa (PPO) endógena pueden compararse en plantas que presentan la vida útil mejorada y las pérdidas poscosecha reducidas y plantas de control que no presentan la vida útil mejorada y las pérdidas poscosecha reducidas para correlacionar la presencia de la vida útil mejorada y las pérdidas poscosecha reducidas con la supresión heredada epigenéticamente de la expresión del gen de la polifenoloxidasasa (PPO) y para identificar plantas que comprenden la vida útil mejorada y las pérdidas poscosecha reducidas heredadas epigenéticamente.

Pueden utilizarse diversos procedimientos de pulverización de composiciones sobre plantas o partes de plantas para aplicar por vía tópica a una superficie vegetal una composición que comprende un polinucleótido que comprende un agente de transferencia. En el campo, una composición puede aplicarse con una barra que se extienda sobre los cultivos y haga llegar la composición a la superficie de las plantas o con un pulverizador sin barra que distribuya una composición por una zona amplia. Los pulverizadores agrícolas adaptados para la pulverización direccional, al voleo o en banda también pueden utilizarse en determinadas realizaciones. También pueden utilizarse pulverizadores adaptados para pulverizar partes concretas de las plantas, incluidas, pero no se limitan a, las hojas, el envés de las hojas, las flores, los tallos, los órganos reproductores masculinos tales como las borlas, los meristemas, el polen, los óvulos y similares. Las composiciones también pueden suministrarse por vía aérea, por ejemplo mediante un avión fumigador. En determinadas realizaciones, la pulverización puede realizarse con un pulverizador de mochila presurizado calibrado para suministrar la dosis adecuada de la composición. En determinadas realizaciones, dicho pulverizador de mochila es un pulverizador presurizado de dióxido de carbono con un abanico plano 11015 o una boquilla de pulverización equivalente con un conjunto de boquilla única personalizada (para minimizar los residuos) a una presión de pulverización de aproximadamente 0,25 MPa y/o se puede utilizar cualquier pulverizador de boquilla única que proporcione una franja de pulverización efectiva de 60 cm por encima del dosel de plantas en crecimiento de 7,6 a 30,5 cm (3 a 12 pulgadas) de altura. Las plantas en un invernadero o cámara de crecimiento pueden tratarse utilizando un pulverizador de orugas o un pulverizador de laboratorio con una boquilla de pulverización 11001XR o equivalente para suministrar la solución de muestra a una velocidad determinada. Una tasa ejemplar y no limitante es de aproximadamente 140 L/ha a una presión de aproximadamente 0,25 MPa. En determinadas realizaciones, también se contempla que una parte de la planta pueda pulverizarse con la composición que comprende un polinucleótido que comprende un agente de transferencia. Tales partes de la planta pueden pulverizarse antes o después de la cosecha para mejorar la conservación y reducir las pérdidas poscosecha en la parte de la planta resultantes de la supresión de la expresión del gen de la polifenoloxidasasa (PPO). Las composiciones pueden aplicarse por vía tópica a partes de una planta mediante pulverización, tal como se ha descrito anteriormente. Las composiciones pueden aplicarse por vía tópica a las partes desprendidas de una planta mediante pulverización como se ha descrito anteriormente o mediante un procedimiento alternativo. Los procedimientos alternativos para aplicar las composiciones a las partes desprendidas incluyen, pero no se limitan a, el paso de las partes de la planta a través de un pulverizador mediante una cinta transportadora o una artesa, o la inmersión de las partes de la planta en la composición.

Las composiciones que comprenden polinucleótidos y agentes de transferencia pueden aplicarse a plantas o partes de plantas en una o más fases de desarrollo según se desee y/o sea necesario. En determinadas realizaciones, las composiciones se aplican a las semillas antes de la germinación y/o a las plántulas después de la germinación. Las semillas pueden tratarse con las composiciones de polinucleótidos proporcionadas en la presente memoria mediante procedimientos que incluyen, pero no se limitan a, la pulverización, la inmersión o cualquier procedimiento que proporcione el recubrimiento, la imbibición y/o la absorción de la composición de polinucleótidos por la semilla. Las semillas pueden tratarse con composiciones de polinucleótidos utilizando sistemas de tratamiento por lotes de semillas o sistemas de tratamiento de flujo continuo. Los sistemas de recubrimiento de semillas se describen al menos en las Patentes de los Estados Unidos Números 6,582,516, 5,891,246, 4,079,696, y 4,023,525. El tratamiento de las semillas también puede

efectuarse en equipos de tratamiento a escala de laboratorio o comercial, tal como un bombo, una mezcladora o un granulador de bandejas. Una composición de polinucleótidos utilizada para tratar semillas puede contener uno o más componentes deseables, incluidos, pero no se limitan a, diluyentes líquidos, aglutinantes para servir de matriz para el polinucleótido, cargas para proteger las semillas en condiciones de estrés y plastificantes para mejorar la flexibilidad, adhesión y/o esparcibilidad del recubrimiento. Además, para las composiciones oleosas de polinucleótidos que contienen poco o ningún relleno, pueden agregarse agentes secantes tales como carbonato cálcico, arcilla de caolín o bentonita, perlita, tierra de diatomeas o cualquier otro material adsorbente. El uso de tales componentes en tratamientos de semillas se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5,876,739. Pueden incorporarse ingredientes adicionales a las composiciones de polinucleótidos utilizadas en los tratamientos de semillas. Tales ingredientes incluyen, pero no se limitan a: agentes adherentes convencionales, agentes dispersantes tales como metilcelulosa (Methocel A15LV o Methocel A15C, por ejemplo, sirven como dispersantes/agentes adherentes combinados para su uso en tratamientos de semillas), alcohol polivinílico (por ejemplo, Elvanol 51-05), lecitina (por ejemplo, Yelkinol P), dispersantes poliméricos (por ejemplo, polivinilpirrolidona/acetato de vinilo PVPNA S-630), espesantes (por ejemplo, espesantes arcillosos tales como Van Gel B para mejorar la viscosidad y reducir la sedimentación de suspensiones de partículas), estabilizadores de emulsión, tensioactivos, compuestos anticongelantes (por ejemplo, urea), tintes, colorantes y similares que pueden combinarse con composiciones que comprenden un polinucleótido y un agente de transferencia. En McCutcheon's, vol. 1, "Emulsifiers and Detergents", MC Publishing Company, Glen Rock, N.J., U.S.A., 1996, y en McCutcheon's, vol. 2, "Functional Materials", MC Publishing Company, Glen Rock, N.J., U.S.A., 1996, pueden encontrarse ingredientes adicionales utilizados en composiciones que pueden aplicarse a las semillas. En la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos 20080092256 se describen procedimientos de aplicación de composiciones a semillas y composiciones pesticidas que pueden utilizarse para tratar semillas.

La aplicación de las composiciones en las fases vegetativas temprana, media y tardía del desarrollo de la planta se proporciona en determinadas realizaciones. La aplicación de las composiciones en fases reproductivas tempranas, medias y tardías también se proporciona en determinadas realizaciones. También se proporciona la aplicación de las composiciones a partes de la planta en diferentes fases de maduración.

En determinadas realizaciones, se proporcionan procedimientos y composiciones de polinucleótidos que pueden aplicarse a células/tejidos vegetales vivos para suprimir la expresión de un gen de la polifenoloxidasasa 11 (PPO11) y que proporcionan una vida útil mejorada, un pardeamiento reducido, pérdidas poscosecha reducidas o combinaciones de los mismos a una planta de cultivo que necesita el beneficio. También se proporcionan plantas y partes de plantas que presentan una vida útil mejorada y pérdidas poscosecha reducidas, así como productos procesados de dichas plantas o partes de plantas. En determinadas realizaciones, las composiciones pueden aplicarse por vía tópica a la superficie de una planta, tal como a la superficie de una hoja, tubérculo o fruto, y las composiciones pueden incluir un agente de transferencia. Aspectos del procedimiento pueden aplicarse a diversos cultivos, por ejemplo, entre otros, lechugas, manzanas y patatas. Los procedimientos y composiciones proporcionados en la presente memoria también pueden aplicarse a plantas producidas por un procedimiento de esquejado, clonación o injerto (es decir, una planta no cultivada a partir de una semilla) que incluyen árboles frutales y plantas. Los árboles frutales producidos mediante estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, los cítricos y los manzanos. Las plantas producidas mediante estos procedimientos incluyen, pero no se limita a, aguacates, tomates, berenjenas, pepinos, melones, sandías y uvas, así como diversas plantas ornamentales.

Sin estar limitados por la teoría, en determinadas realizaciones, se cree que las composiciones y procedimientos descritos en la presente memoria operan a través de una o más de las diversas rutas celulares naturales implicadas en la supresión génica mediada por ARN, como se describe en general en Brodersen and Voinnet (2006), Trends Genetics, 22:268-280; Tomari and Zamore (2005) Genes & Dev., 19:517-529; Vaucheret (2006) Genes Dev., 20:759-771; Meins et al. (2005) Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 21:297-318; y Jones-Rhoades et al. (2006) Annu. Rev. Plant Biol. 57:19-53. La supresión génica mediada por ARN generalmente implica un intermediario de ARN de doble cadena (ARN_{bc}) que se forma intramolecularmente dentro de una única molécula de ARN o intermolecularmente entre dos moléculas de ARN. Este ARN_{bc} intermedio más largo es procesamiento por una ribonucleasa de la familia de las ARNasas III (Dicer o ribonucleasa similar a Dicer) en uno o más ARN de doble cadena más cortos, una cadena de los cuales se incorpora al complejo de silenciamiento inducido por ARN ("RISC"). Por ejemplo, la ruta de los ARN_{pi} implica la escisión de un ARN intermedio de doble cadena más largo en pequeños ARN de interferencia ("ARN_{pi}"). Se cree que el tamaño de los ARN_{pi} oscila entre aproximadamente 19 y aproximadamente 25 pares de bases, pero las clases más comunes de ARN_{pi} en plantas incluyen los que contienen entre 21 y 24 pares de bases (véase, Hamilton et al. (2002) EMBO J., 21:4671-4679).

Constructos de transformación vegetal

Los vectores utilizados para la transformación de plantas pueden incluir, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, YAC (cromosomas artificiales de levadura), BAC (cromosomas artificiales bacterianos) o cualquier otro sistema de clonación adecuado, así como fragmentos de ADN de los mismos. Por tanto, cuando se utiliza el término "vector" o "vector de expresión", se incluyen todos los tipos de vectores anteriores, así como las secuencias de ácido nucleico aisladas de los mismos. Se contempla que la utilización de sistemas de clonación con grandes capacidades de inserción permitirá la introducción de grandes secuencias de ADN que comprendan más de un gen seleccionado. Esto podría utilizarse para introducir en una planta genes correspondientes a toda una ruta biosintética. La introducción de dichas secuencias puede facilitarse mediante el uso de cromosomas artificiales bacterianos o de levadura (BAC o YAC, respectivamente), o incluso

de cromosomas artificiales vegetales. Por ejemplo, el uso de BAC para la transformación mediada por *Agrobacterium* fue divulgado por Hamilton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(18):9975-9979, 1996.

Especialmente útiles para la transformación son los casetes de expresión que se han aislado de tales vectores. Los segmentos de ADN utilizados para transformar células vegetales comprenderán, por supuesto, el ADNc, el gen o los genes que se desea introducir y expresar en las células hospedadoras. Estos segmentos de ADN pueden incluir además estructuras tales como promotores, potenciadores, polienlaces o incluso genes reguladores, según se desee. El segmento de ADN o el gen elegido para la introducción celular a menudo codificará una proteína que se expresará en las células recombinantes resultantes, dando lugar a un rasgo cribable o seleccionable y/o que impartirá un fenotipo mejorado a la planta transgénica resultante. Sin embargo, puede que no siempre sea así, y esto también abarca a las plantas transgénicas que incorporan transgenes no expresados. Los componentes preferidos que pueden incluirse con los vectores utilizados en la presente memoria son los siguientes.

A. Elementos reglamentarios

Los promotores ejemplares para la expresión de una secuencia de ácido nucleico incluyen promotores de plantas tales como el promotor CaMV 35S (Odell et al., 1985), u otros tales como CaMV 19S (Lawton et al., 1987), nos (Ebert et al., 1987), Adh (Walker et al., 1987), sacarosa sintasa (Yang and Russell, 1990), una tubulina, actina (Wang et al., 1992), cab (Sullivan et al., 1989), PEPCasa (Hudspeth and Grula, 1989) o las asociadas al complejo génico R (Chandler et al., 1989). También se considera que son útiles los promotores específicos de tejido, tales como los promotores de células radiculares (Conkling et al., 1990) y los potenciadores específicos de tejido (Fromm et al., 1986), así como los promotores inducibles, tales como los promotores inducibles por ABA y turgencia. En particular, puede ser útil el promotor PAL2 (US 2004/0049802).

La secuencia de ADN entre el lugar de inicio de la transcripción y el comienzo de la secuencia codificante, es decir, la secuencia líder no traducida, también puede influir en la expresión génica. Por tanto, se puede desear emplear una secuencia líder particular con un constructo de transformación como la descrita en la presente memoria. Las secuencias líderes preferidas incluyen aquellas que comprenden secuencias predichas para dirigir la expresión óptima del gen adjunto, es decir, para incluir una secuencia líder consenso preferida que pueda aumentar o mantener la estabilidad del ARNm y evitar el inicio inapropiado de la traducción. La elección de tales secuencias será conocida para los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación. Por lo general, se preferirán las secuencias derivadas de genes altamente expresados en las plantas. Se contempla que los vectores para el uso descrito en la presente memoria pueden construirse para incluir un elemento potenciador ocs. Este elemento se identificó por primera vez como un potenciador palindrómico de 16 pb del gen de la octopina sintasa (ocs) de *Agrobacterium* (Ellis et al., 1987), y está presente en al menos otros 10 promotores (Bouchez et al., 1989). El uso de un elemento potenciador, como el elemento ocs y en particular múltiples copias del elemento, puede actuar para aumentar el nivel de transcripción de promotores adyacentes cuando se aplica en el contexto de la transformación de plantas.

Se prevé que las secuencias de polinucleótidos o las secuencias de ADN seleccionadas puedan introducirse bajo el control de nuevos promotores o potenciadores, etc., o de promotores o elementos de control homólogos o específicos de un tejido. Los vectores que se utilizan para dirigir genes a tejidos específicos en plantas transgénicas por lo general incluyen promotores específicos de tejido y también pueden incluir otros elementos de control específicos de tejido, tales como secuencias potenciadoras. Los expertos en la técnica conocerán los promotores que dirigen la expresión específica o mejorada en determinados tejidos vegetales a la luz de la presente divulgación. Entre ellos se encuentran, por ejemplo, el promotor rbcS, específico del tejido verde; los promotores ocs, nos y más, que tienen mayor actividad en las raíces o en el tejido foliar herido. En determinadas realizaciones, se pueden emplear promotores que causen una baja expresión del ADN seleccionado. Los promotores de baja expresión pueden obtenerse por mutación y/o recombinación de elementos de ADN de promotores que causan alta expresión o seleccionando elementos reguladores aguas arriba de genes que causan expresión de ARNm o proteína con baja abundancia.

B. Terminadores

Los constructos de transformación preparadas como se describe en la presente memoria suelen incluir una secuencia de ADN en el extremo 3' que actúa como señal para terminar la transcripción y permitir la poliadenilación del ARNm producido por las secuencias codificantes unidas de forma operativa a un promotor. Entre los ejemplos de terminadores que se consideran útiles en este contexto se incluyen los del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (extremo 3' de nos) (Bevan et al., 1983), el terminador del transcrito T7 del gen de la octopina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*, y el extremo 3' de los genes inhibidores de la proteasa I o II de la patata o el tomate. También pueden incluirse, si se desea, elementos reguladores tales como un intrón Adh (Callis et al., 1987), un intrón sacarosa sintasa (Vasil et al., 1989) o un elemento omega TMV (Gallie et al., 1989).

C. Péptidos de tránsito o de señalización

Las secuencias que se unen a la secuencia codificante de un gen expresado, que se eliminan postraduccionalmente del producto de traducción inicial y que facilitan el transporte de la proteína hacia o a través de membranas intracelulares o extracelulares, se denominan secuencias de tránsito (normalmente hacia vacuolas, vesículas, plástidos y otros orgánulos

intracelulares) y secuencias señal (normalmente hacia el retículo endoplásmico, el aparato de golgi y el exterior de la membrana celular). Al facilitar el transporte de la proteína a compartimentos dentro y fuera de la célula, estas secuencias pueden aumentar la acumulación del producto génico protegiéndolo de la degradación proteolítica. Estas secuencias también permiten unir secuencias adicionales de ARNm de genes altamente expresados a la secuencia codificante de los genes. Dado que el ARNm traducido por ribosomas es más estable que el ARNm desnudo, la presencia de ARNm traducible delante del gen puede aumentar la estabilidad general del transcrito de ARNm del gen y, por tanto, aumentar la síntesis del producto génico. Dado que las secuencias de tránsito y de señalización suelen eliminarse postraduccionalmente del producto de traducción inicial, el uso de estas secuencias permite añadir secuencias traducidas adicionales que pueden no aparecer en el polipéptido final. Además, se contempla que la orientación de determinadas proteínas puede ser deseable para mejorar la estabilidad de la proteína (Patente de los Estados Unidos 5,545,818).

Además, los vectores pueden construirse y emplearse para dirigir intracelularmente un producto génico específico dentro de las células de una planta transgénica o para dirigir una proteína al medio extracelular. Por lo general, esto se conseguirá uniendo una secuencia de ADN que codifique una secuencia de péptido de tránsito o señal a la secuencia codificante de un gen concreto. El péptido de tránsito o de señal resultante transportará la proteína a un destino intracelular o extracelular determinado, respectivamente, y después será eliminado postraduccionalmente.

D. Genes marcadores

Empleando una proteína marcadora seleccionable o cribable, se puede proporcionar o mejorar la capacidad de identificar transformantes. Los "genes marcadores" son genes que imparten un fenotipo distinto a las células que expresan la proteína marcadora y permiten así distinguir tales células transformadas de las células que no tienen el marcador. Tales genes pueden codificar un marcador seleccionable o cribable, dependiendo de si el marcador confiere un rasgo que se puede "seleccionar" por medios químicos, es decir, mediante el uso de un agente selectivo (por ejemplo, un herbicida, antibiótico o similar), o si es simplemente un rasgo que se puede identificar mediante observación o pruebas, es decir, por "cribado" (por ejemplo, la proteína verde fluorescente). Por supuesto, muchos ejemplos de proteínas marcadoras adecuadas son conocidos en la técnica y pueden emplearse en la presente memoria.

También se incluyen dentro de los términos marcadores seleccionables o cribables los genes que codifican un "marcador secretable" cuya secreción puede detectarse como medio de identificación o selección de células transformadas. Algunos ejemplos son los marcadores que son antígenos secretables que pueden identificarse mediante la interacción de anticuerpos, o incluso enzimas secretables que pueden detectarse por su actividad catalítica. Las proteínas secretables se dividen en varias clases, entre las que se incluyen proteínas pequeñas y difusibles detectables, por ejemplo, mediante ELISA; pequeñas enzimas activas detectables en solución extracelular (por ejemplo, alfa-amilasa, beta-lactamasa, fosfotricina acetiltransferasa); y proteínas que se insertan o quedan atrapadas en la pared celular (por ejemplo, proteínas que incluyen una secuencia líder tal como la que se encuentra en la unidad de expresión de la extensina o la PR S del tabaco).

Se conocen muchas regiones codificadoras de marcadores seleccionables que podrían utilizarse en este caso, entre ellas neo (Potrykus et al., 1985), que confiere resistencia a la kanamicina y puede seleccionarse utilizando kanamicina, G418, paromomicina, etc.; bar, que confiere resistencia al bialafos o a la fosfotricina; una proteína EPSP sintasa mutante (Hinchee et al., 1988) que confiere resistencia al glifosato; una nitrilasa como bxn de *Klebsiella ozaenae* que confiere resistencia al bromoxinil (Stalker et al., 1988); una acetolactato sintasa (ALS) mutante que confiere resistencia a la imidazolinona, la sulfonilurea u otros productos químicos inhibidores de la ALS (Solicitud de Patente Europea 154, 204, 1985); una DHFR resistente al metotrexato (Thillet et al., 1988), una dalapon deshalogenasa que confiere resistencia al herbicida dalapón; o una antranilato sintasa mutada que confiere resistencia al 5-metil-triptófano.

Una realización ilustrativa de marcador seleccionable capaz de utilizarse en sistemas para seleccionar transformantes son los que codifican la enzima fosfotricina acetiltransferasa, tal como el gen bar de *Streptomyces hygroscopicus* o el gen pat de *Streptomyces viridochromogenes*. La enzima fosfotricina acetiltransferasa (PAT) inactiva el ingrediente activo del herbicida bialafós, la fosfotricina (PPT). La PPT inhibe la glutamina sintetasa, (Murakami et al., 1986; Twell et al., 1989) provocando una rápida acumulación de amoníaco y la muerte celular.

Entre los marcadores cribables que pueden emplearse se incluyen un gen beta-glucuronidasa (GUS) o uidA que codifica una enzima para la que se conocen diversos sustratos cromogénicos; un gen R-locus, que codifica un producto que regula la producción de pigmentos antociánicos (color rojo) en los tejidos vegetales (Dellaporta et al., 1988); un gen beta-lactamasa (Sutcliffe, 1978), que codifica una enzima para la que se conocen diversos sustratos cromogénicos (por ejemplo, PADAC, una cefalosporina cromogénica); un gen xylE (Zukowsky et al., 1983) que codifica una catecol dioxigenasa que puede convertir catecoles cromogénicos; un gen alfa-amilasa (Ikuta et al., 1990); un gen de la tirosinasa (Katz et al., 1983), que codifica una enzima capaz de oxidar la tirosina a DOPA y dopaquinona, que a su vez se condensa para formar el compuesto fácilmente detectable melanina; un gen de la beta-galactosidasa, que codifica una enzima para la que existen sustratos cromogénicos; un gen de la luciferasa (lux) (Ow et al., 1986), que permite la detección por bioluminiscencia; un gen aequerin (Prasher et al., 1985), que puede emplearse en la detección por bioluminiscencia sensible al calcio; o un gen que codifica para la proteína verde fluorescente (Sheen et al., 1995; Haseloff et al., 1997; Reichel et al., 1996; Tian et al., 1997; WO 97/41228). El gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) también se contempla como un gen indicador particularmente útil (Sheen et al., 1995; Haseloff et al., 1997; Reichel et al., 1996; Tian et al., 1997; WO 97/41228).

La expresión de la proteína verde fluorescente puede visualizarse en una célula o planta como fluorescencia tras la iluminación con determinadas longitudes de onda de luz.

Constructos antisentido y ARNi

Los tratamientos antisentido yARNi representan una forma de alterar la actividad de la PPO11 como se describe en la presente memoria. En particular, los constructos que comprenden una secuencia codificante de la biosíntesis de PPO11, incluidos fragmentos de la misma, en orientación antisentido, o combinaciones de orientación sentido y antisentido, pueden utilizarse para disminuir o eliminar eficazmente la expresión de un gen PPO11 en una planta y obtener una mejora de la vida útil como se describe en la presente memoria. De acuerdo con lo anterior, esto puede utilizarse para "eliminar" la PPO11 o secuencias homólogas de la misma.

Las técnicas de ARNi son bien conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Lehner et al., (2004) y Downward (2004). La técnica se basa en el hecho de que el ARN de doble cadena es capaz de dirigir la degradación del ARN mensajero con secuencia complementaria a una u otra cadena (Fire et al., 1998). Por lo tanto, mediante la expresión de una secuencia codificante concreta en orientación sentido y antisentido, ya sea como fragmento o porción más larga de la secuencia codificante correspondiente, se puede regular a la baja la expresión de dicha secuencia codificante.

La metodología antisentido, y en algunos aspectos ARNi, aprovecha el hecho de que los ácidos nucleicos tienden a emparejarse con secuencias "complementarias". Por complementarios se entiende polinucleótidos capaces de emparejarse según las reglas estándar de complementariedad Watson-Crick. Es decir, las purinas más grandes se emparejarán con las pirimidinas más pequeñas para formar combinaciones de guanina emparejada con citosina (G:C) y adenina emparejada ya sea con timina (A:T) en el caso del ADN, o adenina emparejada con uracilo (A:U) en el caso del ARN. La inclusión de bases menos comunes como inosina, 5-metilcitosina, 6-metiladenina, hipoxantina y otras en las secuencias de hibridación no interfiere con el emparejamiento.

Dirigirse al ADN de bicatenario (bc) con polinucleótidos conduce a la formación de triple hélice; dirigirse al ARN conducirá a la formación de doble hélice. Los oligonucleótidos antisentido, cuando se introducen en una célula diana, se unen específicamente a su polinucleótido diana e interfieren en la transcripción, el procesamiento del ARN, el transporte, la traducción y/o la estabilidad. Los constructos antisentido y de ARNi, o el ADN que codifica dichos ARN, pueden emplearse para inhibir la transcripción o la traducción de genes, o ambas, dentro de una célula hospedadora, ya sea in vitro o in vivo, como dentro de una células hospedadora vegetal. Dicho oligonucleótido puede comprender cualquier porción única de una secuencia de ácido nucleico proporcionada en la presente memoria. Dicha secuencia comprende al menos 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 o más ácidos nucleicos contiguos de la secuencia de ácido nucleico de un gen PPO11, y/o complementos del mismo, que pueden estar en orientación sentido y/o antisentido. La inclusión de secuencias tanto en sentido como en antisentido puede aumentar la supresión de la secuencia codificante correspondiente.

Pueden diseñarse constructos que sean complementarios a todo o parte del promotor y otras regiones de control, exones, intrones o incluso límites exón-intrón de un gen. Se contempla que los constructos más eficaces incluirán regiones complementarias a las uniones de empalme intrón/exón. Por tanto, se propone que una realización preferida incluya un constructo con complementariedad a regiones dentro de 50-200 bases de una unión de empalme intrón-exón. Se ha observado que algunas secuencias de exones pueden incluirse en el constructo sin afectar seriamente a la selectividad de la diana de la misma. La cantidad de material exónico incluido variará en función de las secuencias concretas de exones e intrones utilizadas. Se puede comprobar fácilmente si se incluye demasiado ADN de exón simplemente probando los constructos in vitro para determinar si se ve afectada la función celular normal o si se ve afectada la expresión de genes relacionados que tienen secuencias complementarias.

Como se ha indicado anteriormente, "complementario" o "antisentido" se refiere a secuencias polinucleotídicas que son sustancialmente complementarias en toda su longitud y tienen muy pocos apareamientos erróneos de bases. Por ejemplo, las secuencias de quince bases de longitud pueden denominarse complementarias cuando tienen nucleótidos complementarios en trece o catorce posiciones. Naturalmente, las secuencias completamente complementarias serán secuencias totalmente complementarias en toda su longitud y sin apareamientos erróneos de bases. También se contemplan otras secuencias con grados de homología inferiores. Por ejemplo, podría diseñarse un constructo de ARNi o antisentido que tenga regiones limitadas de alta homología, pero que también contenga una región no homóloga (por ejemplo, ribozima; véase más arriba). Estas moléculas, aunque tienen menos del 50 % de homología, se unirían a secuencias diana en condiciones apropiadas.

Puede ser ventajoso combinar porciones de ADN genómico con ADNc o secuencias sintéticas para generar constructos específicos. Por ejemplo, si se desea un intrón en el constructo final, será necesario utilizar un clon genómico. El ADNc o un polinucleótido sintetizado pueden proporcionar sitios de restricción más convenientes para la parte restante del constructo y, por lo tanto, se utilizarían para el resto de la secuencia.

Procedimientos de transformación genética

Se considera que los procedimientos adecuados para la transformación de células vegetales o de otro tipo para su uso en la presente memoria incluyen prácticamente cualquier procedimiento por el que se pueda introducir ADN en una célula,

tal como, mediante la administración directa de ADN, tal como la transformación de protoplastos mediada por PEG (Omirulleh et al., 1993), mediante la absorción de ADN mediada por desecación/inhibición (Potrykus et al., 1985), por electroporación (Patente de los Estados Unidos 5,384,253), por agitación con fibras de carburo de silicio (Kaeppeler et al., 1990; Patente de los Estados Unidos 5,302,523; y Patente de los Estados Unidos No. 5,464,765), por transformación mediada por *Agrobacterium* (Patente de los Estados Unidos No. 5,591,616 y Patente de los Estados Unidos No. 5,563,055) y por aceleración de partículas recubiertas de ADN (Patente de los Estados Unidos No. 5,550,318; Patente de los Estados Unidos No. 5,538,877; y Patente de los Estados Unidos No. 5,538,880). Mediante la aplicación de técnicas como éstas, las células de prácticamente cualquier especie vegetal pueden transformarse de forma estable y convertirse en plantas transgénicas.

A. Transformación mediada por *Agrobacterium*

La transferencia mediada por *Agrobacterium* es un sistema ampliamente aplicable para introducir genes en células vegetales porque el ADN puede introducirse en tejidos vegetales enteros, evitando así la necesidad de regenerar una planta intacta a partir de un protoplasto. El uso de vectores integradores de plantas mediados por *Agrobacterium* para introducir ADN en células vegetales es bien conocido en la técnica. Véanse, por ejemplo, los procedimientos descritos por Fraley et al., (1985), Rogers et al., (1987) y la Patente de los Estados Unidos No. 5,563,055. La transformación mediada por *Agrobacterium* es más eficaz en plantas dicotiledóneas y es el procedimiento preferido para la transformación de dicotiledóneas, como *Arabidopsis*, tabaco, tomate, alfalfa y patata. De hecho, mientras que la transformación mediada por *Agrobacterium* se ha utilizado de forma rutinaria con plantas dicotiledóneas durante varios años, sólo recientemente se ha hecho aplicable a plantas monocotiledóneas. Los avances en las técnicas de transformación mediada por *Agrobacterium* han permitido aplicar esta técnica a casi todas las plantas monocotiledóneas. Por ejemplo, las técnicas de transformación mediadas por *Agrobacterium* se han aplicado ya al arroz (Hiei et al., 1997; Patente de los Estados Unidos No. 5,591,616), al trigo (McCormac et al., 1998), a la cebada (Tingay et al., 1997; McCormac et al., 1998), a la alfalfa (Thomas et al., 1990) y al maíz (Ishidia et al., 1996).

Los vectores de transformación modernos de *Agrobacterium* son capaces de replicarse tanto en *E. coli* así como en *Agrobacterium*, lo que permite manipulaciones convenientes como las descritas (Klee et al., 1985). Además, los recientes avances tecnológicos en los vectores para la transferencia de genes mediada por *Agrobacterium* han mejorado la disposición de los genes y los sitios de restricción en los vectores para facilitar la construcción de vectores capaces de expresar diversos genes codificadores de polipéptidos. Los vectores descritos (Rogers et al., 1987) tienen convenientes regiones multienlazantes flanqueadas por un promotor y un sitio de poliadenilación para la expresión directa de genes codificantes de polipéptidos insertados y son adecuados para los fines presentes. Además, para las transformaciones pueden utilizarse *Agrobacterium* que contengan genes Ti armados y desarmados. En aquellas cepas de plantas en las que la transformación mediada por *Agrobacterium* es eficaz, es el procedimiento de elección debido a la naturaleza fácil y definida de la transferencia génica.

B. Electroporación

Para efectuar la transformación por electroporación, se pueden emplear tejidos friables, tal como un cultivo en suspensión de células o un callo embrionógico, o bien transformar directamente embriones inmaduros u otros tejidos organizados. En esta técnica, se degradarían parcialmente las paredes celulares de las células elegidas exponiéndolas a enzimas que degradan la pectina (pectoliasas) o hiriéndolas mecánicamente de forma controlada. Ejemplos de algunas especies que han sido transformadas por electroporación de células intactas incluyen el maíz (Patente de los Estados Unidos No. 5,384,253; Rhodes et al., 1995; D'Halluin et al., 1992), el trigo (Zhou et al., 1993), el tomate (Hou and Lin, 1996), la soja (Christou et al., 1987) y el tabaco (Lee et al., 1989).

También se pueden emplear protoplastos para la transformación de plantas por electroporación (Bates, 1994; Lazzeri, 1995). Por ejemplo, Dhir and Widholm describen en el documento WO 9217598 la generación de plantas transgénicas de soja por electroporación de protoplastos derivados de cotiledones. Otros ejemplos de especies para las que se ha descrito la transformación de protoplastos son la cebada (Lazzeri, 1995), el sorgo (Battraw et al., 1991), el maíz (Bhattacharjee et al., 1997), el trigo (He et al., 1994) y el tomate (Tsukada, 1989).

C. Bombardeo de microproyectiles

Otro procedimiento para suministrar segmentos de ADN transformante a las células vegetales, como se describe en la presente memoria, es el bombardeo con microproyectiles (Patentes de los Estados Unidos 5,550,318; 5,538,880; 5,610,042; y el documento WO 94/09699). En este procedimiento, las partículas se recubren con ácidos nucleicos y se introducen en las células mediante una fuerza propulsora. Las partículas ejemplares incluyen las compuestas de tungsteno, platino y, preferiblemente, oro. Se contempla que, en algunos casos, la precipitación del ADN en partículas metálicas no sería necesaria para el suministro de ADN a una célula receptora mediante el bombardeo de microproyectiles. Sin embargo, se contempla que las partículas puedan contener ADN en lugar de estar recubiertas de ADN. Por consiguiente, se propone que las partículas recubiertas de ADN pueden aumentar el nivel de suministro de ADN a través del bombardeo de partículas, pero no son, en sí mismas, necesarias.

Para el bombardeo, las células en suspensión se concentran en filtros o en un medio de cultivo sólido. Alternativamente, los embriones inmaduros u otras células diana pueden disponerse sobre un medio de cultivo sólido. Las células que se van a bombardear pueden colocarse a una distancia apropiada por debajo de la placa de detención de macroproyectiles.

- 5 Una realización ilustrativa de un procedimiento para introducir ADN en células vegetales por aceleración es el sistema Biolistics Particle Delivery System, que puede utilizarse para propulsar partículas recubiertas con ADN o células a través de una malla, tal como una malla de acero inoxidable o Nytex, sobre una superficie de filtro cubierta con células vegetales monocotiledóneas cultivadas en suspensión. El tamiz dispersa las partículas para que no lleguen a las células receptoras en grandes agregados. Las técnicas de bombardeo con microproyectiles son ampliamente aplicables y pueden utilizarse para transformar prácticamente cualquier especie vegetal. Entre los ejemplos de especies que se han transformado mediante bombardeo de microproyectiles se incluyen especies monocotiledóneas tales como el maíz (solicitud PCT WO 95/06128), la cebada (Ritala et al., 1994; Hensgens et al., 1993), el trigo (Patente de los Estados Unidos 5,563,055), el arroz (Hensgens et al., 1993), la avena (Torbet et al., 1995; Torbet et al., 1998), el centeno (Hensgens et al., 1993), la caña de azúcar (Bower et al., 1992), y el sorgo (Casa et al., 1993; Hagio et al., 1991); así como un número de dicotiledóneas entre las que se incluyen el tabaco (Tomes et al., 1990; Buising and Benbow, 1994), la soja (Patente de los Estados Unidos No. 5,322,783), el girasol (Knittel et al., 1994), el cacahuete (Singsit et al., 1997), el algodón (McCabe and Martinell, 1993), el tomate (VanEck et al., 1995), y las leguminosas en general (Patente de los Estados Unidos No. 5,563,055).

20 D. Otros procedimientos de transformación

La transformación de protoplastos puede lograrse utilizando procedimientos basados en la precipitación de fosfato cálcico, el tratamiento con polietilenglicol, la electroporación y combinaciones de estos tratamientos (véase, por ejemplo, Potrykus et al., 1985; Lorz et al., 1985; Omirulleh et al., 1993; Fromm et al., 1986; Uchimiya et al., 1986; Callis et al., 1987; Marcotte et al., 1988).

La aplicación de estos sistemas a diferentes cepas vegetales depende de la capacidad de regenerar esa cepa vegetal concreta a partir de protoplastos. Se han descrito procedimientos ilustrativos para la regeneración de cereales a partir de protoplastos (Toriyama et al., 1986; Yamada et al., 1986; Abdullah et al., 1986; Omirulleh et al., 1993 y la Patente de los Estados Unidos No. 5,508,184). Ejemplos del uso de la transformación por absorción directa de protoplastos de cereales incluyen la transformación de arroz (Ghosh-Biswas et al., 1994), sorgo (Battraw y Hall, 1991), cebada (Lazerri, 1995), avena (Zheng y Edwards, 1990) y maíz (Omirelleh et al., 1993).

Para transformar cepas de plantas que no pueden regenerarse con éxito a partir de protoplastos, pueden utilizarse otras formas de introducir ADN en células o tejidos intactos. Por ejemplo, la regeneración de cereales a partir de embriones inmaduros o de explantes puede efectuarse como se ha descrito (Vasil, 1989). Además, la transformación mediada por fibra de carburo de silicio puede utilizarse con o sin protoplastia (Kaeppeler, 1990; Kaeppeler et al., 1992; la Patente de los Estados Unidos No. 5,563,055). La transformación con esta técnica se consigue agitando fibras de carburo de silicio junto con células en una solución de ADN. El ADN entra pasivamente a medida que se perforan las células. Esta técnica se ha utilizado con éxito, por ejemplo, con los cereales monocotiledóneos maíz (solicitud PCT WO 95/06128; (Thompson, 1995) y arroz (Nagatani, 1997).

E. Cultivos de tejidos

45 Los cultivos de tejidos pueden utilizarse en determinadas técnicas de transformación para la preparación de células para la transformación y para la regeneración de plantas a partir de las mismas. El mantenimiento de los cultivos de tejidos requiere el uso de medios y entornos controlados. "Medios" se refiere a las numerosas mezclas de nutrientes que se utilizan para cultivar células in vitro, es decir, fuera del organismo vivo intacto. El medio suele ser una suspensión de varias categorías de ingredientes (sales, aminoácidos, reguladores del crecimiento, azúcares, tampones) que son necesarios para el crecimiento de la mayoría de los tipos celulares. Sin embargo, cada tipo específico de célula requiere una gama específica de proporciones de ingredientes para su crecimiento, y una gama aún más específica de fórmulas para un crecimiento óptimo. La tasa de crecimiento celular también variará entre los cultivos iniciados con el conjunto de medios que permiten el crecimiento de ese tipo celular.

55 Los medios nutrientes se preparan en forma líquida, pero ésta puede solidificarse agregando el líquido a materiales capaces de proporcionar un soporte sólido. El agar es el más utilizado para este fin. Bactoagar, agar Hazelton, Gelrite y Gelgro son tipos específicos de soporte sólido adecuados para el crecimiento de células vegetales en cultivo de tejidos.

60 Algunos tipos de células crecen y se dividen en suspensión líquida o en medios sólidos. Como se describe en la presente memoria, las células vegetales crecen en suspensión o en medio sólido, pero la regeneración de plantas a partir de cultivos en suspensión por lo general requiere la transferencia de medio líquido a medio sólido en algún momento del desarrollo. El tipo y el grado de diferenciación de las células en cultivo se verán afectados no sólo por el tipo de medio utilizado y por el entorno, por ejemplo, el pH, sino también por el hecho de que el medio sea sólido o líquido.

65 Los tejidos que se pueden cultivar incluyen células meristemáticas, callos de Tipo I, Tipo II y Tipo III, embriones inmaduros y células gaméticas tales como microsporas, polen, espermatozoides y óvulos. Los callos de Tipo I, Tipo II y Tipo III pueden

5 iniciarse a partir de fuentes tisulares que incluyen, pero no se limitan a, embriones inmaduros, meristemas apicales de plántulas, raíces, hojas, microsporas y similares. Las células capaces de proliferar como callo también son células receptoras para la transformación genética. Las células somáticas son de diversos tipos. Las células embriogénicas son un ejemplo de células somáticas que pueden inducirse para regenerar una planta mediante la formación de embriones.

10 Las células no embriogénicas son las que normalmente no responden de esta manera. Pueden utilizarse determinadas técnicas que enriquecen las células receptoras dentro de una población celular. Por ejemplo, el desarrollo de callos de Tipo II, seguido de la selección manual y el cultivo de tejido embriogénico friable, suele dar lugar a un enriquecimiento de células. Las técnicas de selección manual que pueden emplearse para seleccionar las células diana pueden incluir, por ejemplo, la evaluación de la morfología y la diferenciación celular, o pueden utilizar diversos medios físicos o biológicos.

15 La crioconservación también es un posible procedimiento de selección de células receptoras.

La selección manual de células receptoras, por ejemplo, mediante la selección de células embriogénicas de la superficie de un callo de tipo II, es un medio que puede utilizarse en un intento de enriquecer para células particulares antes del cultivo (ya sea cultivadas en medios sólidos o en suspensión).

15 Cuando se emplean, las células cultivadas pueden crecer sobre soportes sólidos o en forma de suspensiones líquidas. En ambos casos, se pueden proporcionar nutrientes a las células en forma de medios y controlar las condiciones ambientales. Existen muchos tipos de medios de cultivo de tejidos compuestos por diversos aminoácidos, sales, azúcares, reguladores del crecimiento y vitaminas. La mayoría de los medios empleados en la presente memoria tendrán algunos componentes similares, pero pueden diferir en la composición y proporciones de sus ingredientes dependiendo de la aplicación particular prevista. Por ejemplo, diversos tipos de células suelen crecer en más de un tipo de medio, pero mostrarán diferentes tasas de crecimiento y diferentes morfologías, dependiendo del medio de crecimiento. En algunos medios, las células sobreviven pero no se dividen.

25 Anteriormente se han descrito diversos tipos de medios adecuados para el cultivo de células vegetales. Algunos ejemplos de estos medios incluyen, pero no se limitan a, el medio N6 descrito por Chu et al. (1975) y el medio MS (Murashige and Skoog, 1962).

30 Producción y caracterización de plantas transformadas de forma estable

Una vez realizado el suministro de ADN exógeno a las células receptoras, las etapas siguientes suelen consistir en identificar las células transformadas para su posterior cultivo y regeneración vegetal. Con el fin de mejorar la capacidad de identificar a los transformantes, se puede desear emplear un gen marcador que se puede cribar o seleccionable con un vector de transformación preparado en la presente memoria. En este caso, generalmente se analizaría la población celular potencialmente transformada exponiendo las células a un agente o agentes selectivos, o se cribarían las células en busca del rasgo genético marcador deseado.

A. Selección

40 Se cree que el ADN sólo se introduce en un pequeño porcentaje de células diana en cualquier estudio. Para proporcionar un sistema eficaz de identificación de las células que reciben el ADN y lo integran en sus genomas, se puede emplear un medio para seleccionar las células que se transforman de forma estable. Una realización ejemplar de dicho procedimiento consiste en introducir en la célula hospedadora un gen marcador que confiere resistencia a algún agente normalmente inhibidor, tal como un antibiótico o un herbicida. Ejemplos de antibióticos que pueden utilizarse son los antibióticos aminoglucósidos neomicina, kanamicina y paromomicina, o el antibiótico higromicina. La resistencia a los antibióticos aminoglucósidos la confieren enzimas fosfo-transferasas de aminoglucósidos tales como la neomicina fosfotransferasa II (NPT II) o la NPT I, mientras que la resistencia a la higromicina la confiere la higromicina fosfotransferasa.

50 A continuación, las células potencialmente transformadas se exponen al agente selectivo. En la población de células supervivientes estarán aquellas células en las que, generalmente, el gen que confiere resistencia se ha integrado y expresado a niveles suficientes para permitir la supervivencia celular. Las células pueden someterse a más pruebas para confirmar la integración estable del ADN exógeno.

55 Un herbicida que constituye un agente de selección deseable es el herbicida de amplio espectro bialafos. El bialafós es un antibiótico tripéptido producido por *Streptomyces hygroscopicus* y compuesto por fosfinotricina (PPT), un análogo del ácido L-glutámico, y dos residuos de L-alanina. Tras la eliminación de los residuos de L-alanina por peptidasas intracelulares, el PPT se libera y es un potente inhibidor de la glutamina sintetasa (GS), una enzima fundamental implicada en la asimilación del amoníaco y el metabolismo del nitrógeno (Ogawa et al., 1973). El PPT sintético, principio activo del herbicida Liberty[®], también es eficaz como agente de selección. La inhibición de la GS en las plantas por el PPT provoca la rápida acumulación de amoníaco y la muerte de las células vegetales.

60 El organismo productor de bialafos y otras especies del género *Streptomyces* también sintetizan una enzima fosfinotricina acetil transferasa (PAT) que está codificada por el gen bar en *Streptomyces hygroscopicus* y el gen pat en *Streptomyces viridochromogenes*. El uso del gen de resistencia a herbicidas que codifica la fosfinotricina acetil transferasa (PAT) se menciona en el documento DE 3642 829 A, en el que el gen se aísla de *Streptomyces viridochromogenes*. En el organismo fuente bacteriano, esta enzima acetila el grupo amino libre del TPP previniendo la auto-toxicidad (Thompson et al., 1987).

El gen bar ha sido clonado (Murakami et al., 1986; Thompson et al., 1987) y expresado en tabaco transgénico, tomate, patata (De Block et al., 1987) Brassica (De Block et al., 1989) y maíz (Patente de los Estados Unidos 5,550,318). En informes anteriores, algunas plantas transgénicas que expresaban el gen de resistencia eran completamente resistentes a formulaciones comerciales de PPT y bialafos en invernaderos.

Otro ejemplo de herbicida útil para la selección de líneas celulares transformadas según se describe en la presente memoria es el herbicida de amplio espectro glifosato. El glifosato inhibe la acción de la enzima EPSPS, activa en la ruta biosintética de los aminoácidos aromáticos. La inhibición de esta enzima provoca la inanición de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano y de los metabolitos secundarios derivados de ellos. La Patente de los Estados Unidos No. 4,535,060 describe el aislamiento de mutaciones de EPSPS que confieren resistencia al glifosato en el gen de *Salmonella typhimurium* para EPSPS, *aroA*. El gen EPSPS se clonó a partir de *Zea mays* y se introdujeron in vitro mutaciones similares a las encontradas en un gen *aroA* resistente al glifosato. Los genes mutantes que codifican enzimas EPSPS resistentes al glifosato se describen, por ejemplo, en la Patente Internacional WO 97/4103. El gen EPSPS mutante mejor caracterizado que confiere resistencia al glifosato comprende cambios de aminoácidos en los residuos 102 y 106, aunque se prevé que otras mutaciones también sean útiles (WO97/4103).

Para utilizar el sistema selectivo bar-bialafos o EPSPS-glifosato, el tejido transformado se cultiva durante 0 - 28 días en medio no selectivo y posteriormente se transfiere a un medio que contenga desde 1-3 mg/l de bialafos o 1-3 mM de glifosato, según corresponda. Aunque por lo general se preferirán intervalos de 1-3 mg/l de bialafos o 1-3 mM de glifosato, se propone que los intervalos de 0,1-50 mg/l de bialafos o 0,1-50 mM de glifosato resulten útiles.

Un ejemplo de marcador de rasgo cribable es la enzima luciferasa. En presencia del sustrato luciferina, las células que expresan luciferasa emiten luz que puede detectarse en una película fotográfica o de rayos X, en un luminómetro (o contador de centelleo líquido), mediante dispositivos que potencian la visión nocturna, o mediante una cámara de vídeo altamente sensible a la luz, tal como una cámara de recuento de fotones. Estos ensayos no son destructivos y las células transformadas pueden seguir cultivándose tras su identificación. La cámara de recuento de fotones es especialmente valiosa, ya que permite identificar células específicas o grupos de células que expresan luciferasa y manipularlas en tiempo real. Otro marcador cribable que puede utilizarse de forma similar es el gen que codifica la proteína verde fluorescente.

B. Regeneración y producción de semillas

Las células que sobreviven a la exposición al agente selectivo, o las células que han dado positivo en un ensayo de cribado, pueden cultivarse en medios que favorezcan la regeneración de las plantas. En una realización ejemplar, los medios MS y N6 pueden modificarse incluyendo sustancias adicionales, tales como reguladores del crecimiento. Uno de estos reguladores del crecimiento es dicamba o 2,4-D. Sin embargo, pueden emplearse otros reguladores del crecimiento, como NAA, NAA + 2,4-D o picloram. Se ha comprobado que la mejora de los medios en estos y otros aspectos similares facilita el crecimiento de las células en fases de desarrollo específicas. El tejido puede mantenerse en un medio básico con reguladores del crecimiento hasta que se disponga de tejido suficiente para iniciar los esfuerzos de regeneración de la planta, o tras repetidas rondas de selección manual, hasta que la morfología del tejido sea adecuada para la regeneración, al menos 2 semanas, y luego transferirse a un medio propicio para la maduración de los embrioides. Los cultivos se transfieren cada 2 semanas en este medio. El desarrollo de los brotes señalará el momento de transferirlos a un medio carente de reguladores del crecimiento.

Las células transformadas, identificadas mediante selección o cribado y cultivadas en un medio adecuado que favorezca la regeneración, se dejarán madurar hasta convertirse en plantas. Las plántulas en desarrollo se transfieren a una mezcla de crecimiento vegetal sin suelo y se endurecen, por ejemplo, en una cámara de ambiente controlado, por ejemplo, a aproximadamente 85 % de humedad relativa, 600 ppm de CO₂ y 25-250 microeinsteins m² s⁻¹ de luz. Las plantas pueden madurar en una cámara de crecimiento o en un invernadero. Las plantas pueden regenerarse entre aproximadamente 6 semanas y 10 meses después de la identificación de un transformante, dependiendo del tejido inicial. Durante la regeneración, las células se cultivan en medios sólidos en recipientes de cultivo de tejidos. Las realizaciones ilustrativas de tales recipientes son placas de Petri y Plant Cons. Las plantas regeneradoras pueden cultivarse a una temperatura de entre 19 y 28 °C. Una vez que las plantas regeneradoras han alcanzado la fase de desarrollo de brotes y raíces, pueden trasladarse a un invernadero para su posterior crecimiento y prueba.

Las semillas de plantas transformadas pueden requerir ocasionalmente el rescate de embriones debido al cese del desarrollo de las semillas y a la senescencia prematura de las plantas. Para rescatar los embriones en desarrollo, se extraen de semillas desinfectadas superficialmente entre 10 y 20 días después de la polinización y se cultivan. Una realización de los medios utilizados para el cultivo en esta fase comprende sales MS, 2 % de sacarosa y 5,5 g/l de agarosa. En el rescate de embriones, los embriones grandes (definidos como de más de 3 mm de longitud) se germinan directamente en un medio apropiado. Los embriones más pequeños pueden cultivarse durante 1 semana en un medio que contenga los ingredientes mencionados junto con 10-5M de ácido abscísico y, a continuación, transferirse a un medio sin regulador del crecimiento para la germinación.

C. Caracterización

Para confirmar la presencia del ADN exógeno o "transgenes" en las plantas regeneradas, se pueden realizar diversos ensayos. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de "biología molecular", tales como transferencias Southern y Northern y PCR™; ensayos "bioquímicos", tales como la detección de la presencia de un producto proteico, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISAs y transferencias Western) o por función enzimática; ensayos de partes de la planta, tales como ensayos de hojas o raíces; y también, analizando el fenotipo de toda la planta regenerada.

D. Integración del ADN, expresión del ARN y herencia

El ADN genómico puede aislarse de líneas celulares o de cualquier parte de la planta para determinar la presencia del gen exógeno mediante el uso de técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Tenga en cuenta que las secuencias intactas no siempre estarán presentes, probablemente debido a la reorganización o delección de secuencias en la célula. La presencia de elementos de ADN introducidos mediante los procedimientos en la presente memoria descritos puede determinarse, por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR™). Mediante esta técnica, se amplifican fragmentos discretos de ADN y se detectan por electroforesis en gel. Este tipo de análisis permite determinar si un gen está presente en un transformante estable, pero no prueba la integración del gen introducido en el genoma de la célula hospedadora. Sin embargo, suele ocurrir que el ADN se ha integrado en el genoma de todos los transformantes que demuestran la presencia del gen mediante el análisis PCR™. Además, normalmente no es posible utilizar técnicas de PCR™ para determinar si los transformantes tienen genes exógenos introducidos en diferentes sitios del genoma, es decir, si los transformantes son de origen independiente. Se contempla que utilizando técnicas de PCR™ sería posible clonar fragmentos del ADN genómico del hospedador adyacentes a un gen introducido.

La prueba positiva de la integración del ADN en el genoma hospedador y las identidades independientes de los transformantes pueden determinarse mediante la técnica de hibridación Southern. Mediante esta técnica se pueden identificar las secuencias de ADN específicas que se introdujeron en el genoma del hospedador y las secuencias de ADN flanqueantes del hospedador. Por consiguiente el patrón de hibridación Southern de un determinado transformante sirve como característica identificativa del mismo. Además, mediante hibridación Southern es posible demostrar la presencia de genes introducidos en ADN de alto peso molecular, es decir, confirmar que el gen introducido se ha integrado en el genoma de la célula hospedadora. La técnica de hibridación Southern proporciona información que se obtiene mediante PCR™, por ejemplo, la presencia de un gen, pero también demuestra la integración en el genoma y caracteriza cada transformante individual.

Se contempla que utilizando las técnicas de hibridación por transferencia puntual o por ranura que son modificaciones de las técnicas de hibridación Southern se podría obtener la misma información que se deriva de la PCR™, por ejemplo, la presencia de un gen.

Tanto la PCR™ como las técnicas de hibridación Southern pueden utilizarse para demostrar la transmisión de un transgén a la progenie. En la mayoría de los casos, el patrón de hibridación Southern característico de un transformante determinado segregará en la progenie como uno o más genes mendelianos (Spencer et al., 1992), lo que indica una herencia estable del transgén.

Mientras que las técnicas de análisis de ADN pueden llevarse a cabo utilizando ADN aislado de cualquier parte de una planta, el ARN sólo se expresará en células o tipos de tejidos concretos y, por consiguiente, será necesario preparar ARN para su análisis a partir de estos tejidos. Las técnicas PCR™ también pueden utilizarse para la detección y cuantificación del ARN producido a partir de genes introducidos. En esta aplicación de la PCR™ es necesario primero transcribir inversamente el ARN en ADN, utilizando enzimas tales como la transcriptasa inversa, y después mediante el uso de técnicas convencionales de PCR™ amplificar el ADN. En la mayoría de los casos, las técnicas PCR™, aunque útiles, no demostrarán la integridad del producto de ARN. Puede obtenerse más información sobre la naturaleza del producto de ARN mediante transferencia Northern. Esta técnica demostrará la presencia de una especie de ARN y dará información sobre la integridad de ese ARN. La presencia o ausencia de una especie de ARN también puede determinarse mediante hibridaciones por transferencia Northern puntual o por ranura. Estas técnicas son modificaciones de la transferencia Northern y sólo demostrarán la presencia o ausencia de una especie de ARN.

E. Expresión génica

Aunque la transferencia Southern y la PCR™ pueden utilizarse para detectar el gen o genes en cuestión, no proporcionan información sobre si se está expresando la proteína correspondiente. La expresión puede evaluarse identificando específicamente los productos proteínicos de los genes introducidos o evaluando los cambios fenotípicos provocados por su expresión.

Los ensayos para la producción e identificación de proteínas específicas pueden hacer uso de propiedades físico-químicas, estructurales, funcionales o de otro tipo de las proteínas. Sus propiedades físico-químicas o estructurales únicas permiten separar e identificar las proteínas mediante procedimientos electroforéticos, tales como la electroforesis en gel nativa o desnaturizante o el enfoque isoelectrico, o mediante técnicas cromatográficas como el intercambio iónico o la cromatografía de exclusión en gel. Las estructuras únicas de las proteínas individuales ofrecen oportunidades para el uso de anticuerpos específicos para detectar su presencia en formatos tales como un ensayo ELISA. Pueden emplearse combinaciones de enfoques con una especificidad aún mayor, como la transferencia western, en el que se utilizan

anticuerpos para localizar productos génicos individuales que han sido separados mediante técnicas electroforéticas. Pueden emplearse técnicas adicionales para confirmar absolutamente la identidad del producto de interés, como la evaluación mediante secuenciación de aminoácidos tras la purificación. Aunque estos son algunos de los más utilizados, también pueden emplearse otros procedimientos.

Los procedimientos de ensayo también pueden utilizarse para identificar la expresión de proteínas por su funcionalidad, especialmente la capacidad de las enzimas para catalizar reacciones químicas específicas que implican sustratos y productos específicos. Estas reacciones pueden seguirse proporcionando y cuantificando la pérdida de sustratos o la generación de productos de las reacciones mediante procedimientos físicos o químicos. Los ejemplos son tan variados como la enzima que se va a analizar y pueden incluir ensayos para la actividad enzimática PAT siguiendo la producción de fosfotricina acetilada radiomarcada a partir de fosfotricina y ¹⁴C-acetil CoA o para la actividad antranilato sintasa siguiendo la pérdida de fluorescencia del antranilato, por nombrar dos.

Con mucha frecuencia, la expresión de un producto génico se determina evaluando los resultados fenotípicos de su expresión. Estos ensayos también pueden adoptar muchas formas, incluyendo, pero no se limitan a, el análisis de los cambios en la composición química, la morfología o las propiedades fisiológicas de la planta. La composición química puede alterarse mediante la expresión de genes que codifican enzimas o proteínas de almacenamiento que modifican la composición de aminoácidos y pueden detectarse mediante análisis de aminoácidos, o mediante enzimas que modifican la cantidad de almidón, que puede analizarse mediante espectrometría de reflectancia en el infrarrojo cercano. Los cambios morfológicos pueden incluir una mayor estatura o tallos más gruesos. En la mayoría de los casos, los cambios en la respuesta de las plantas o partes de ellas a los tratamientos impuestos se evalúan en condiciones cuidadosamente controladas, denominadas bioensayos.

Plantas de cultivo

Además de la transformación directa de un genotipo de planta particular con una construcción preparada como se describe en la presente memoria, las plantas transgénicas pueden obtenerse cruzando una planta que tenga un ADN seleccionado como se describe en la presente memoria con una segunda planta que carezca de la construcción. Por ejemplo, una secuencia codificadora de la biosíntesis de la lignina seleccionada puede introducirse en una variedad vegetal concreta mediante cruzamiento, sin necesidad de transformar nunca directamente una planta de esa variedad dada. Por lo tanto, no sólo se incluyen las plantas directamente transformadas o regeneradas a partir de células que han sido transformadas, sino también la progenie de tales plantas.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "progenie" denota la descendencia de cualquier generación de una planta original preparada tal como se describe en la presente memoria, en la que la progenie comprende una construcción de ADN seleccionada. El "cruzamiento" de una planta para proporcionar una línea vegetal que tenga uno o más transgenes agregados en relación con una línea vegetal de partida, tal como se describe en la presente memoria, se define como las técnicas que dan lugar a la introducción de un transgen tal como se describe en la presente memoria en una línea vegetal mediante el cruzamiento de una línea de partida con una línea vegetal donante que comprende un transgen como se describe en la presente memoria. Para lograrlo, se podrían seguir, por ejemplo, las siguientes etapas:

- (a) plantar semillas de las plantas parentales primera (línea de partida) y segunda (línea de planta donante que comprende un transgén según se describe en la presente memoria);
- (b) convertir las semillas del primer y segundo progenitor en plantas con flores;
- (c) polinizar una flor de la primera planta original con polen de la segunda planta original; y
- (d) cosechar las semillas producidas en la planta original que lleva la flor fecundada.

El retrocruzamiento se define en la presente memoria como el procedimiento que incluye las etapas de:

- (a) cruzar una planta de un primer genotipo que contenga un gen, secuencia de ADN o elemento deseado con una planta de un segundo genotipo que carezca del gen, secuencia de ADN o elemento deseado;
- (b) seleccionar una o más plantas progenitoras que contengan el gen, la secuencia de ADN o el elemento deseados;
- (c) cruzar la planta progenie con una planta del segundo genotipo; y
- (d) repetir las etapas b) y c) con el fin de transferir una secuencia de ADN deseada de una planta de un primer genotipo a una planta de un segundo genotipo.

La introgresión de un elemento de ADN en un genotipo vegetal se define como el resultado del procedimiento de retroconversión. Un genotipo vegetal en el que se ha introgresado una secuencia de ADN puede denominarse genotipo retrocruzado, línea, endogamia o híbrido. Del mismo modo, un genotipo vegetal que carece de la secuencia de ADN deseada puede denominarse genotipo no convertido, línea, endogamia o híbrido.

Ejemplos

Ejemplo 1: La actividad total de la enzima PPO no predice el rendimiento de la vida útil

Se sembró un panel de 23 cultivares, incluidos los controles de decoloración, en un ensayo de tres repeticiones en un único entorno. Los cultivares se cosecharon el mismo día y se determinó la actividad enzimática total de la PPO. Se observó una distribución normal de las unidades totales de actividad PPO ($U \text{ Actividad PPO} = \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$) entre los 23 cultivares. A continuación, las variedades con las cinco actividades de PPO más altas y las cinco más bajas se cultivaron en un segundo entorno, y se determinó la vida útil utilizando un diseño de bloques completos aleatorizados de 6 repeticiones. Se reconoció que la actividad de la cosecha no predecía el rendimiento de la vida útil, las dos variedades más resistentes a la decoloración en este conjunto se identificaron por tener una alta actividad enzimática. En una comparación de la actividad enzimática PPO de la cosecha (total) para 8 cosechas diferentes de controles de decoloración, 7 de 8 comparaciones no se diferenciaron estadísticamente. Estos resultados fueron sorprendentes e inesperados porque anteriormente se creía que la actividad enzimática, la suma total de la actividad de todas las enzimas activas, era un factor predictivo de la vida útil.

Ejemplo 2: La expresión de PPO11 aumenta con el tiempo tras la cosecha

Se identificaron once (11) genes homólogos de PPO, mostrados en la figura 1, y 3 genes homólogos de PAL en la lechuga. Se evaluó el análisis de la expresión génica de estas enzimas homólogas de la vía de la decoloración para determinar su correlación con el fenotipo de decoloración/rendimiento de vida útil. La capacidad de correlacionar la actividad de la enzima PPO en la cosecha o la inducción de genes específicos de la vía con el rendimiento de la vida útil proporcionó una herramienta de selección centrada para permitir que un programa de cultivo mejorara el rendimiento de la vida útil. Protocolo RT PCR: Las QRT-PCR se realizaron según se describe en el manual del operador utilizando un Stratagene MX3000PTM. Se diseñaron cebadores PCR específicos para cada gen utilizando criterios que incluían una temperatura de fusión prevista de al menos 58 °C, una longitud de cebador de 22-24 nucleótidos, un contenido de guanosa-citosina de al menos el 48 % y una longitud de amplicón de 120-150 pb. La especificidad del cebador se confirmó mediante el análisis de la curva de fusión, por una eficiencia de amplificación del producto de 1,0 $\pm$ 0,1, y por la verificación de la secuencia de al menos ocho amplicones PCR clonados para cada gen. Se realizaron reacciones con agua en lugar de ADNc molde con cada par de cebadores como control. El perfil térmico estándar: Se utilizaron 95 °C por 10 min, luego 60 ciclos de 95 °C por 30 s, 53 °C por 30 s y 72 °C por 30 s. La señal de fluorescencia se capturó al final de cada ciclo, y se realizó un análisis de la curva de fusión desde la temperatura de hibridación hasta 95 °C con captura de datos cada 0,2 °C durante una retención de 1 s. La cantidad de cada transcrito es la media de dos réplicas técnicas. Todos los gráficos de amplificación se analizaron con el software MX3000PTM para obtener los valores del ciclo umbral (Ct). La abundancia del transcrito se normalizó con respecto a la abundancia del transcrito de ubiquitina (número de acceso al GenBank EF681766).

Los resultados se muestran en la figura 2, que proporciona un experimento de curso temporal del perfil de expresión de las PPO. Dos homólogos de PPO, PPO2 y PPO11, fueron regulados al alza después de la cosecha. La PPO11 fue la PPO más regulada durante el experimento de curso temporal. La expresión de PPO1 y PPO10 disminuyó con el tiempo. La expresión de PPO8 no cambió con el tiempo.

Ejemplo 3: Determinación de la vida útil de las lechugas

La norma actual de la industria para evaluar el rendimiento, el pardeamiento o la vida útil de la lechuga es evaluar una variedad de lechuga en un envase con atmósfera modificada a los 14 días del procesamiento y asegurarse de que se produce menos de un 2 % de pardeamiento visible. Se desconoce el rendimiento de las variedades individuales más allá de los 4 d. Se evalúa el rendimiento de variedades de lechuga troceada en un ensayo de aire ambiente a 4°C. Esta evaluación permite distinguir rápidamente el rendimiento de las variedades de lechuga. Además, se comprobó la correlación de la actividad enzimática de la polifenoloxidasas (PPO) en la nervadura central de cada variedad con el rendimiento de la lechuga.

Para llevar a cabo la evaluación de la vida útil, se recogen seis cabezas de lechuga y se empaquetan en una caja de cartón encerado. Para el transporte de las muestras se utiliza un camión refrigerado a 5 °C (41 °F).

Las cabezas individuales se sacan de la bolsa de plástico y la etiqueta de identificación se coloca en una bandeja azul individual. Se colocan dos tubos de 50 ml vacíos con código de barras en la bandeja y la muestra puede pasar a ser troceada. Se eliminan las hojas exteriores dañadas y se corta la base. Se retira el tallo y se desecha, las hojas interiores del cogollo (amarillas y de menos de 15,2 cm (6 pulgadas) de largo) se desechan. De cada cabeza, se apartan dos hojas de las hojas exteriores e interiores para la evaluación de la nervadura central, se recogen 12 hojas en total. Todas las hojas de lechuga restantes se trocean para evaluar su vida útil.

Evaluación de la nervadura central: De los 12 pecíolos (6 cabezas x 2 hojas) se retira con un cuchillo la materia foliar superior y la materia del borde a lo largo de los 2/3 inferiores de la nervadura de la lechuga. Se desecha el material

frondoso y se conservan los 2/3 inferiores de las nervaduras centrales. Todas las nervaduras se cortan en rodajas de 2,5 cm (1 pulgada), se mezclan a mano y luego se submuestran en tubos que se llenan hasta la línea de 30 ml.

Las lechugas romana, CRC y tipo espinaca se preparan de la siguiente manera. Se retira el material frondoso por encima de la nervadura. El exceso de material frondoso paralelo a la nervadura se elimina para dejar sólo aproximadamente 2,5-5,1 cm (1-2 pulgadas) de material frondoso a cada lado de la nervadura. Si la hoja es lo suficientemente estrecha, no se realiza esta etapa. La nervadura y los trozos de hoja que la flanquean se cortan en trozos de 1,9 cm (¾ de pulgada) perpendiculares a la longitud de la nervadura. Todo el material se recoge y se sumerge en agua dulce fría utilizando una cesta de malla grande, se transfiere a una centrifugadora de ensalada eléctrica y se seca durante 60 s. Se recogen tres envases tipo clamshells de 0,95 L (un cuarto de galón) ampliamente llenos (códigos de barras individuales) si están disponibles. Los restos de lechuga troceada se recogen en una bandeja negra con código de barras.

Las lechugas tipo Iceberg: se preparan de la siguiente manera: La lechuga se corta en tiras de ¾ de pulgada y luego estas tiras se cortan en un ángulo de 90° en cuadrados de 1,9 cm (¾ de pulgada). Todo el material se recoge en un contenedor azul, se lava en una cesta de malla y se centrifuga durante 60 s en una centrifugadora eléctrica. Se recogen tres envases tipo clamshells de 0,95 L (un cuarto de galón) ampliamente llenos (códigos de barras individuales) si están disponibles. Los restos de lechuga troceada se recogen en una bandeja negra con código de barras. Las muestras se escanean en orden, los tubos falcon se almacenan a -80 °C, y las muestras se clasifican visualmente y se realiza un análisis de imágenes mediante Clasificaciones visuales y análisis de imágenes.

Clasificaciones visuales: A partir de las 72 horas posteriores al procesamiento, varias personas puntuarán cada muestra en una escala de valoración de 1 (mejor) a 5 (peor) comparándola con fotos de referencia. Es necesario garantizar una iluminación adecuada para discernir las diferencias de pardeamiento. Lo ideal es que las muestras se evalúen en los días 3, 5 y 7 según las fotos de referencia, y que el calendario de las evaluaciones de los envases tipo clamshells se haga en bloques desde el campo. Se registrará la puntuación combinada de cada envase tipo clamshell.

Análisis de imágenes: Los trozos de lechuga de cada bandeja negra se fotografíarán en los mismos puntos temporales que las valoraciones visuales. Se utilizará una estación de iluminación con barras luminosas Rosco Litepad HO+ de 7,62 cm (3") x 30,48 cm (12") colocadas a un ángulo de 40° con respecto a la horizontal a ambos lados y a una distancia de 45,72 cm (18") de la superficie de trabajo. Las imágenes se recogen con una Canon EOS Rebel T3 situada a 53 cm por encima de la plataforma. La cantidad de decoloración se determina mediante el análisis de imágenes utilizando un programa Matlab personalizado para cuantificar el número de píxeles marrones en relación con el número de píxeles que representan la superficie total de la hoja de lechuga.

Ejemplo 4: La expresión de PPO11 se correlaciona con el pardeamiento y la reducción del tiempo de vida útil

Los niveles de expresión de PPO2, PPO8, PPO10, PPO11 y PAL1 se determinaron probando extracciones de ARN de nervadura central media de materiales recogidos en el momento del procesamiento o tras 7-9 días de almacenamiento en aire ambiente a 4 °C. Las muestras de ARN se prepararon utilizando el kit PureLink® Plant RNA Reagent (Ambion) siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante. Las QRT-PCR se realizaron según se describe en el manual del operador utilizando un Stratagene MX3000PTM. Se diseñaron cebadores PCR específicos para cada gen (véase la tabla 2). Todos los gráficos de amplificación se analizaron con el software MX3000PTM para obtener los valores del ciclo umbral (Ct). La abundancia del transcrito se normalizó con respecto a la abundancia del transcrito de ubiquitina (número de acceso al GenBank EF681766).

Tabla 2. Cebadores PCR específicos de genes:

SEQ NOs	ID	Amplicón	Nombre cebador	del	Etiqueta fluorescente	5'→3'
SEQ NO:12	ID	PAL1	PAL1-F	-		CGTCGAGATTCTGCGAG AAAG
SEQ NO:13	ID	PAL1	PAL1-R	-		GCAAACGTCGTCGATGT AAGC
SEQ NO:14	ID	PAL1	Sonda LsPAL1		6FAM	

ES 2 974 736 T3

SEQ NOs	ID	Amplicón	Nombre cebador	del	Etiqueta fluorescente	5'→3'
						CTCCTCCGTGTTGTTGAT CGTGAATACGTC
SEQ NO:15	ID	PPO1	PPO1-F	-		GCAAGTTCAATAAAGCCA TCGA
SEQ NO:16	ID	PPO1	PPO1-R	-		CGCAATAGGCACAATGA ACATT
SEQ NO:17	ID	PPO1	Sonda LsPPO1	6FAM		CCCAGATGACGATCCTC GTAGCTTTAAGC
SEQ NO:18	ID	PPO10	PPQ10-F	-		AAGGCTTCCAGAAACAT
						CAAGAA
SEQ NO:19	ID	PPO10	PPO10-R	-		AGACTCGCCGGAAAAAC ATCT
SEQ NO:20	ID	PPO10	Sonda LsPPO10	6FAM		CATGCCCATGAACACATA CCCTTTGCA
SEQ NO:21	ID	PPO11	PPO11-F	-		GCAAGATCAAGAAGCTC GCTGTA
SEQ NO:22	ID	PPO11	PPO11-R	-		ACTCGCCGGAAAAACAT CTTT

ES 2 974 736 T3

SEQ NOs	ID	Amplicón	Nombre del cebador	Etiqueta fluorescente	5'→3'
SEQ NO:23	ID	PPO11	Sonda LsPPO11	6FAM	CGAGCCGATGAACACAT ACCCTTTGC
SEQ NO:24	ID	PPO2	PPO2-F	-	GACGTACCATGGCTAAA AAGCAA
SEQ NO:25	ID	PPO2	PPO2-R	-	CGATGGATTTCCTCGCA ACT
SEQ NO:26	ID	PPO2	Sonda LsPPO2}	6FAM	CCAGTCCCACGTGCACC CAGG
SEQ NO:27	ID	PPO8	PPO8-F	-	GCTGCAACAGACCCGGT TA
SEQ NO:28	ID	PPO8	PPO8-R	-	CTGGCGGGTCCTTCTGA TT
SEQ NO:29	ID	PPO8	Sonda LsPPO8	6FAM	CCGAAGAGGAACAACAC AAAGGACTTCCC
SEQ NO:30	ID	Ubiquitina	Ubiquitina-F	-	TTGTCTTGAATTTAGCT TTGACGTT
SEQ NO:31	ID	Ubiquitina	Ubiquitina-R	-	CCTTGACCGGAAAAACA ATCA
SEQ NO:32	ID	Ubiquitina	Sonda LsUbiquitina	Vic	TCAATGGTGTCGGAGCT TTCCACTTCC

SEQ NOs	ID	Amplificón	Nombre del cebador	Etiqueta fluorescente	5'→3'

5 En la figura 3a y la figura 4 se muestra un gráfico de la decoloración visual frente a las combinaciones gen x punto temporal con una $r > 0,7$. La PPO11 se expresaba débilmente o no se expresaba en el momento de la cosecha, pero se inducía fuertemente tras el procesamiento y el almacenamiento. Se observó que la inducción de PPO11 tenía el mayor intervalo de amplitud de expresión, como se demuestra en la figura 5.

10 La correlación de la expresión de PPO11 y la decoloración visual en un experimento a gran escala en un entorno diferente se muestra en la figura 3B. De nuevo, los niveles de expresión de PPO11 9 días después del procesamiento y almacenamiento en frío con índices de decoloración visual para dos cruces de romana crisphead, tres iceberg y cinco cultivares de romana fueron significativos. Cada punto representa la media mínima cuadrática para un único cultivar con seis réplicas biológicas tanto para la expresión génica como para las valoraciones visuales.

15 En resumen, la correlación de la expresión de PPO11 con un fenotipo de pardeamiento visual se demostró en las figuras 3A-B, y se proporcionó un gráfico de decoloración visual en la figura 4, demostrando que el pardeamiento estaba fuertemente correlacionado con la expresión de PPO11.

Ejemplo 5: La selección de marcadores puede utilizarse para rastrear el locus PPO11

20 Las secuencias de marcadores genéticos asociadas a un locus PPO11 con expresión génica reducida pueden utilizarse para rastrear ese locus en un programa de cultivo. Un gen PPO11 u ortólogo del mismo con expresión reducida puede identificarse, por ejemplo, mediante el cribado de líneas naturales de baja expresión o mediante una de las metodologías descritas en la presente memoria. Una vez identificado o fabricado un locus PPO11 de expresión reducida, las secuencias marcadoras asociadas al locus PPO11 pueden utilizarse para rastrear el locus de expresión reducida en la progenie segregante de un cruce de plantas. Por ejemplo, la secuencia puede amplificarse por PCR a partir de secuencias que flaquean la PPO11, tales como SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11 y a través de la región genética PPO11 en ambos progenitores del cruce. Los polimorfismos de nucleótido único o las diferencias de secuencia entre los dos progenitores pueden compararse para identificar alelos específicos de cada progenitor asociados con la expresión normal o reducida del gen PPO11. El ensayo basado en la secuencia (por ejemplo, TaqMan) de estos polimorfismos de nucleótido único o diferencias de secuencia en la progenie segregante de un cruce permitirá la selección del alelo marcador vinculado al gen PPO11 de expresión reducida deseable.

Ejemplo 6: Identificación de dianas de la PPO en patata y manzana

35 La secuencia PPO11 incluida aquí puede utilizarse para buscar homólogos de PPO en los datos de secuencias genómicas de la patata y la manzana. Utilizando los procedimientos aquí detallados, los datos de expresión de estos genes PPO pueden correlacionarse con la incidencia del pardeamiento para identificar dianas homólogas de PPO para aumentar la vida útil. Una vez identificadas las dianas apropiadas, su expresión reducida puede ser identificada o provocada y rastreada mediante las metodologías aquí descritas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para identificar plantas que tienen una expresión reducida o carecen de expresión de un gen PPO11 que comprende:
 - a) cribado de una pluralidad de plantas, obtenidas por mutagénesis aleatoria, para la expresión de un gen PPO11 que tenga SEQ ID NO: 9, en el que la expresión se correlaciona positivamente con el pardeamiento o la reducción de la vida útil de un producto transformado de la planta;
 - b) seleccionar una o más plantas cribadas que comprenden una expresión disminuida del gen PPO11 en relación con la expresión del gen PPO11 en una planta original, o en una planta isogénica de otro modo , y que muestren un pardeamiento reducido o una vida útil aumentada.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la pluralidad de plantas comprende 10, 100 o 1000 o más plantas.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la pluralidad de plantas son variedades de la misma especie de plantas.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cribado de la expresión del gen PPO comprende determinar la actividad de una proteína codificada por SEQ ID NO: 9, o determinar la abundancia de una proteína o ARN codificado por SEQ ID NO:9.
5. Una planta que tiene una expresión reducida o carece de expresión de un gen PPO11 que tiene SEQ ID NO:9 debido a una mutación en dicho gen PPO11, en la que dicha planta muestra un pardeamiento reducido o una vida útil aumentada en relación con una planta original, o una planta isogénica de otro modo.

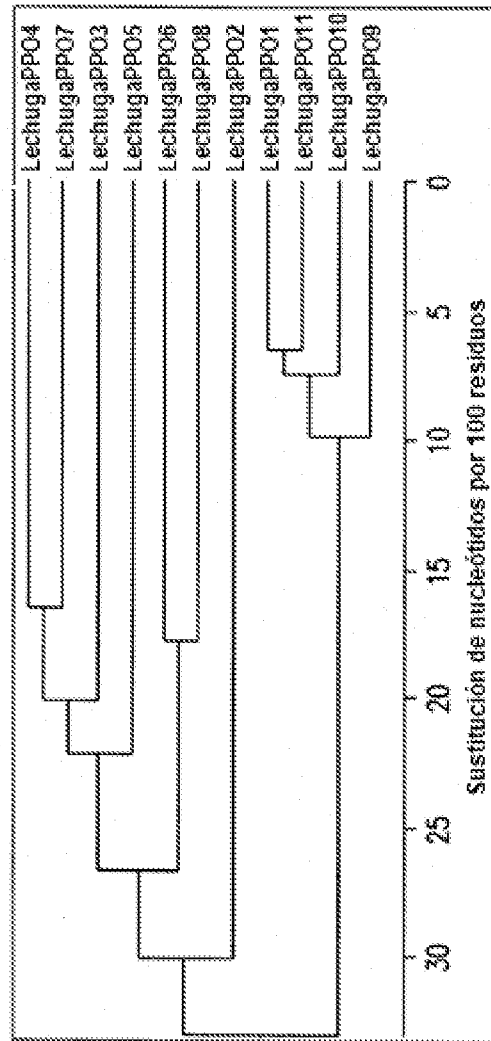


FIG. 1

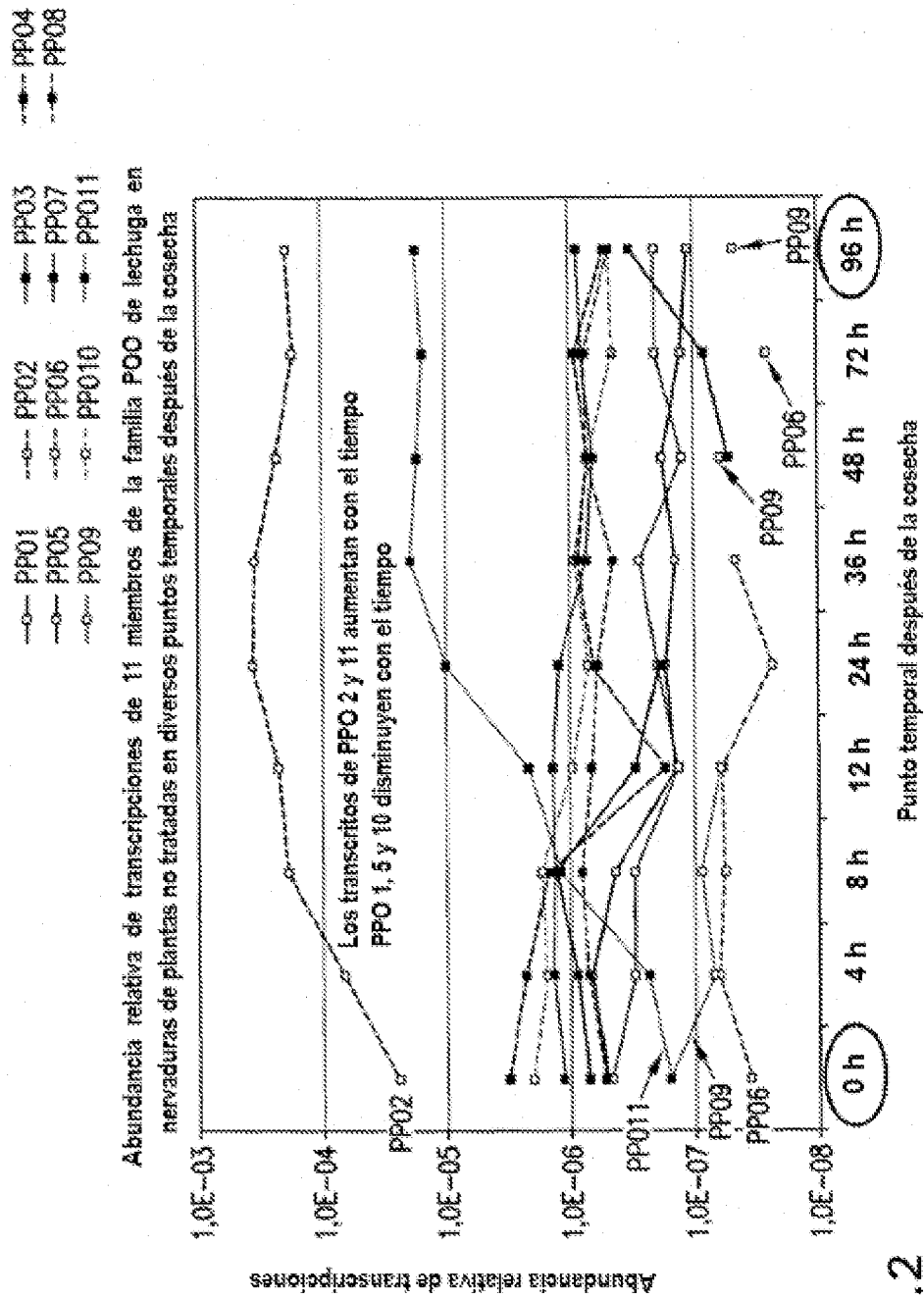


FIG.2

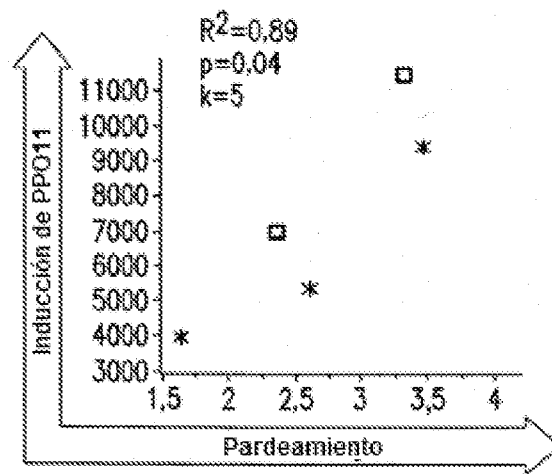


FIG. 3A

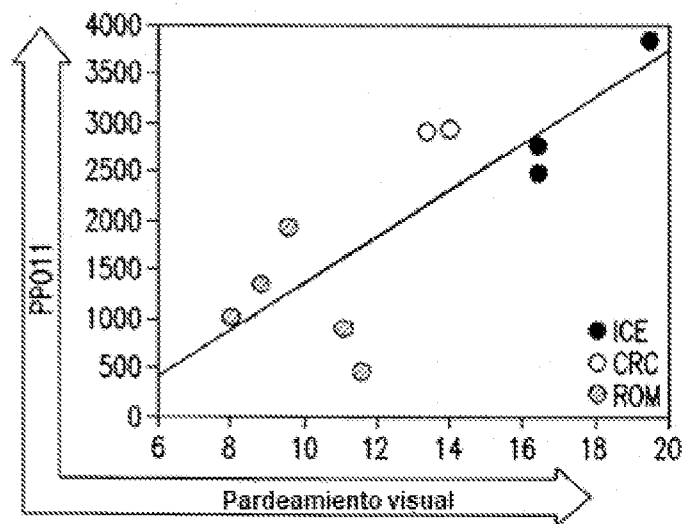


FIG. 3B

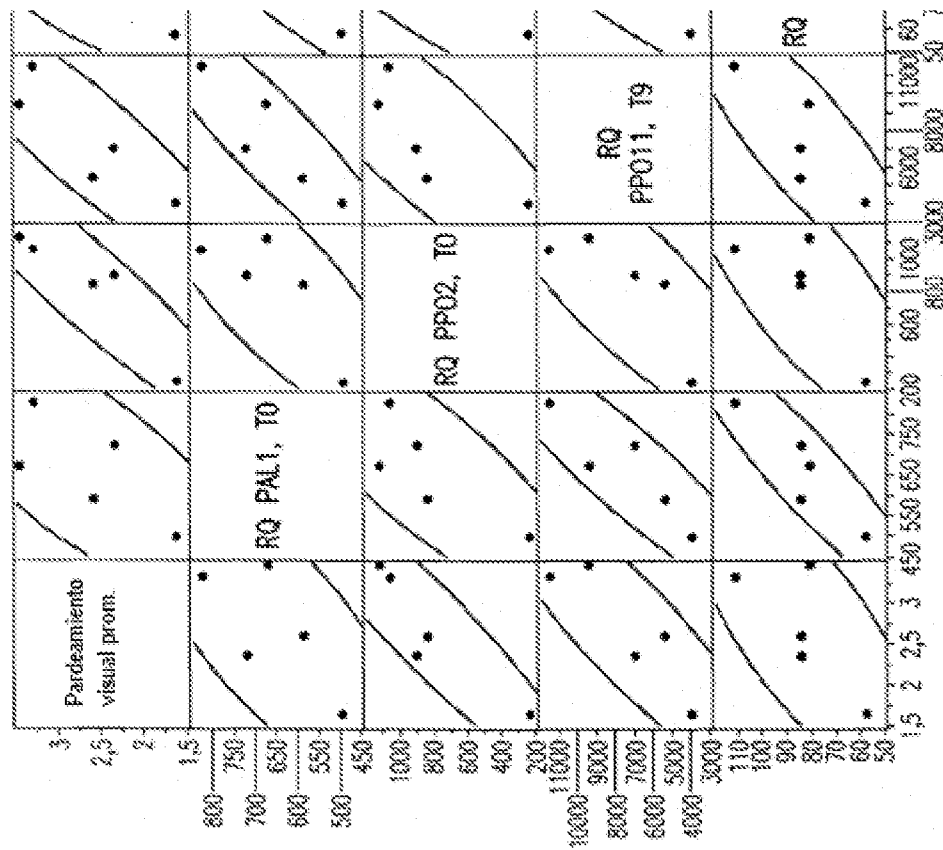


FIG.4

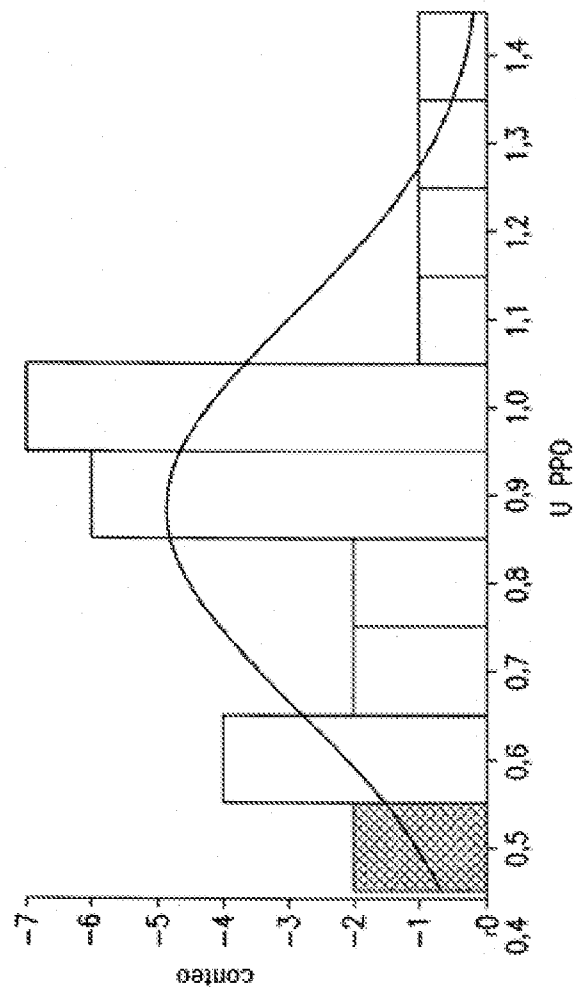


FIG.5

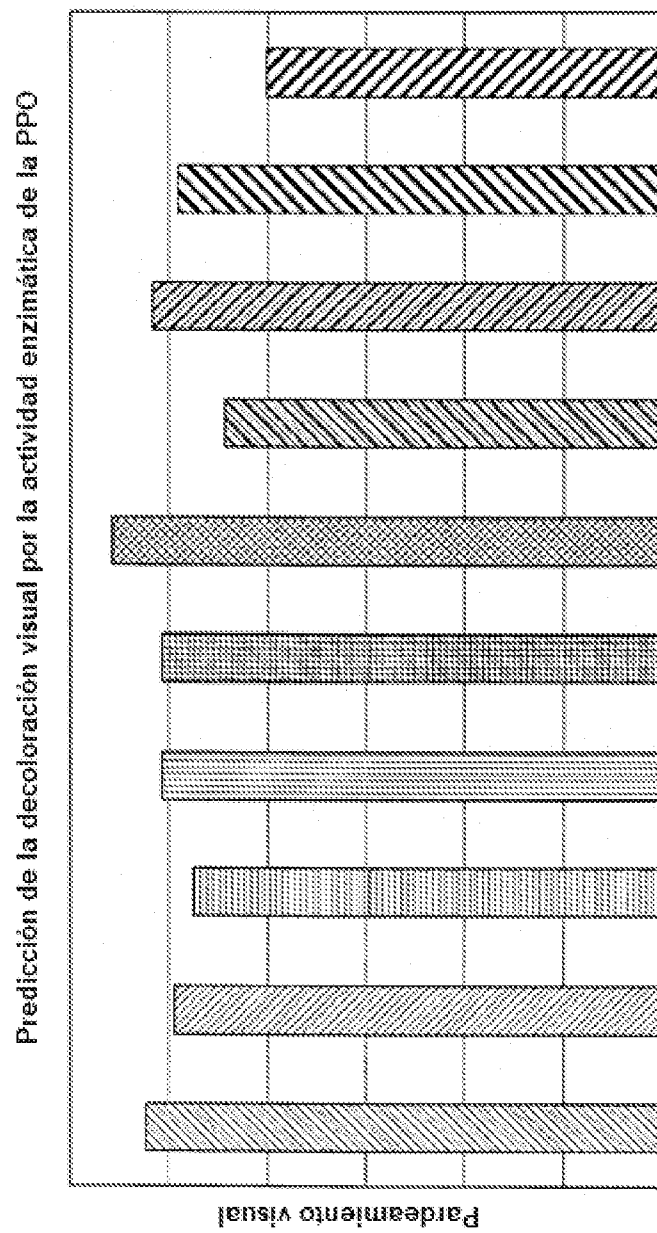


FIG.6