



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 301 234**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

A23L 1/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **99903673 .4**

(86) Fecha de presentación : **25.01.1999**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1049791**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **08.11.2000**

(54)

Título: **Procedimiento y composiciones para modular el contenido de flavonoides.**

(30)

Prioridad: **26.01.1998 GB 9801598**

(73)

Titular/es: **UNILEVER N.V.**
Weena 455
3013 AL Rotterdam, NL

(45)

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2008

(72)

Inventor/es: **Bovy, Arnaud Guillaume;**
Hughes, Stephen Glyn;
Muir, Shelagh Rachael;
Van Tunen, Adrianus Johannes;
Verhoeven, Martine Elisa;
De Vos, C., H., R. y
v/d Hijden, Hendrikus Theodorus Wilhelmus Maria

(45)

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

(74)

Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 301 234 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

Procedimiento y composiciones para modular el contenido de flavonoides.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere, de forma general, a procedimientos para manipular la producción de flavonoides en plantas mediante la manipulación de la actividad génica en la ruta biosintética de flavonoides y a composiciones para su uso en tales procedimientos. En particular, se refiere a procedimientos para aumentar los niveles de flavonoides, distintos de antocianinas, mediante la expresión de genes que codifican factores de transcripción implicados en el control de la expresión de genes que codifican enzimas de la ruta biosintética de flavonoides.

Antecedentes de la invención

Los flavonoides forman un extenso grupo de compuestos polifenólicos, que se basan en un esqueleto difenolpropano común, que se encuentran de forma natural en plantas. Están incluidos en esta clase de compuestos los flavonoles, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonoides, dihidroflavonoles y estilbenos. Los flavonoides se presentan mayoritariamente como glucósidos.

En los frutos del tomate, el principal flavonoide encontrado es la naricalcona (naringenina calcona) (Hunt *et al.*, *Phytochemistry*, 19: 1415-1419 (1980)). Se sabe que se acumula casi exclusivamente en la piel y se forma simultáneamente con la coloración del fruto. Además de la naringenina calcona, también se encuentran en la piel del tomate glucósidos de quercetina, y en menor medida, canferol.

Las descripciones en la bibliografía sugieren que existen evidencias crecientes de que los flavonoides, especialmente los flavonoles son, potencialmente, componentes de la dieta humana protectores de la salud. Los estudios epidemiológicos sugieren una relación directa entre la protección cardiaca y el aumento en el consumo de flavonoides, en particular flavonoles del tipo quercetina y canferol, procedentes de fuentes de la dieta tales como cebolla, manzanas y el té (véase, por ejemplo, Hertog *et al.*, *Lancet* 342: 1007-1011 (1993)).

Se ha descrito que los flavonoides presentan un amplio espectro de actividades biológicas *in vitro* que incluyen las actividades anti-inflamatoria, anti-alérgica y vasodilatadora (Cook *et al.*, *Nutritional Biochemistry*, 7: 66-76, 1996)). Esta actividad se ha atribuido, en parte, a su capacidad para actuar como antioxidantes, capaces de secuestrar radicales libres y de evitar la producción de radicales libres. En este grupo de compuestos, aquellos que tienen la actividad antioxidante más potente son los flavonoles (Rice-Evans *et al.*, *Free Radical Research* 22, 375-383 (1995)). Además, los flavonoides pueden inhibir también la actividad de procesos clave tal como la peroxidación de lípidos, la agregación de plaquetas y la permeabilidad de capilares (véase, Rice-Evans *et al.*, *Trends in Plant Science* 2: 152-159 (1997)).

Basándose en estudios de este tipo, existe actualmente un interés considerable en el desarrollo de productos alimenticios de plantas ricos en tales flavonoides protectores.

Sería deseable producir plantas que poseyeran niveles elevados de compuestos protectores de la salud, tales como los flavonoides, con el fin de desarrollar productos alimenticios con propiedades protectoras aumentadas. Tradicionalmente, la aproximación para mejorar variedades vegetales se ha basado en técnicas de cruzamiento convencionales, pero éstas son lentas y requieren tiempo para la propagación y el crecimiento de generaciones de plantas sucesivas. Más recientemente, la tecnología de ADN recombinante se ha aplicado al problema general de la modificación de genomas vegetales para producir plantas con los rasgos fenotípicos deseados. Aunque se han realizado descripciones en la bibliografía del uso de técnicas de manipulación genética para la modificación de la ruta biosintética flavonoide, como se discutirá más adelante, es notable que estos intentos se hayan dirigido, en general, hacia la modificación de la producción de antocianina pigmentaria.

Por ejemplo, varios estudios han tratado de modificar la ruta flavonoide por introducción de genes que codifican enzimas de la ruta flavonoide. Ejemplos de esto son los documentos EP522880 y WO 90/11682 y las referencias Goldsbrough *et al.*, en *Plant Physiology* 105: 191-194 (1994) y Yoder *et al.*, en *Euphytica* 79: 163-167 (1994)).

Otros estudios han intentado modificar la ruta de biosíntesis de la antocianina alterando la expresión de un único factor de transcripción. Son ejemplos de esto el documento WO 91/2059, las referencias Goldsbrough *et al.*, *Plant Journal* 9(6): 927-933 (1996), Mooney *et al.*, *Plant Journal*, 7(2): 333-339, (1995), los documentos WO 93/14211 y WO 93/18171 y la referencia Moyano *et al.*, en *Plant Cell*, Vol 8: 1519-1532, (1996).

La ruta biosintética de flavonoides está bien establecida y se ha estudiado extensamente en varias especies vegetales diferentes (véase, por ejemplo, Koes *et al.*, *BioEssays* 16: 123-132 (1994)). Brevemente, tres moléculas de malonil-CoA se condensan con una molécula de coumaroil-CoA, proceso catalizado por la enzima calcona sintasa, para generar naringenina calcona que, rápidamente, isomeriza a naringenina, proceso catalizado por la isomerasa calcona. Posteriormente, la hidroxilación de la naringenina, catalizada por la flavona 3-hidroxilasa, conduce a dihidrocanferol. Este dihidrocanferol se puede hidroxilar para producir, bien dihidroquercetina, o bien dihidromiricetina. Los tres dihidroflavonoles se pueden convertir, posteriormente, a antocianinas (mediante la acción de la dihidroflavonol reduc-

tasa y la flavonoid glucosiltransferasa) o, alternativamente, convertirse a flavonoles tales como canferol, quercetina y miricetina, mediante la acción de la flavonol sintasa.

Hasta el momento, los estudios en maíz han identificado dos genes reguladores; *Cl* y *R*, que se requieren para la producción de antocianina (véase Lloyd *et al.*, Science 258: 1773-1775 (1992)). El gen *Cl* codifica una proteína que tiene un dominio myb de unión a ADN (Paz-Ares *et al.*, EMBO Journal 6: 3553-3558 (1987)), mientras que el gen *R* codifica una proteína con un dominio hélice-lazo-hélice característico de la familia de reguladores transcripcionales myc (Ludwing *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7092-7096 (1989)).

En Lloyd *et al.*, referido anteriormente, se revela la expresión de estos factores transcripcionales, específicos de la ruta de la antocianina de la monocotiledónea maíz, en las dicotiledóneas *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum*. Se describe que la producción de antocianina en las dos especies de plantas se activa por *R* (alelo *Lc*) en los tejidos que normalmente producen antocianina, pero que *Cl* solo no tiene efecto. Se ha descrito que transgénicos híbridos de *Arabidopsis* que expresan ambos factores de transcripción, situados bajo el control transcripcional del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, producen antocianinas en tejidos que normalmente no las expresarían, tales como raíz, pétalos y estambres.

Se llevaron a cabo cruces utilizando una línea que expresaba *R(Lc)* para polinizar tres plantas que expresaban *Cl*. Como los cuatro parentales fueron heterocigotos, se hubiera esperado que uno de cada cuatro miembros de la progenie contuviera tanto *R* como *Cl*. En un cruce, se produjeron treinta y seis miembros de la progenie, de los cuales cuatro plantas presentaban acumulación de antocianina en las raíces y dieron lugar a una cantidad de antocianina pequeña en los tejidos de pétalos y estambres, pero no se registró la magnitud exacta del incremento sobre el tipo salvaje. De los treinta y ocho miembros de la progenie que resultaron de otro cruce, tres plantas generaron antocianina en los tejidos de pétalos, mientras que un tercer cruce no produjo ningún miembro de la progenie con pigmentación en la raíz o en los pétalos. Se asumió que las plantas que produjeron antocianinas en la raíz y los pétalos, contenían tanto *Cl* como *R*, aunque esto no se confirmó experimentalmente, ni existe ninguna explicación de porque ningún miembro de la progenie resultante del tercer cruce presentó acumulación de antocianina en raíces y pétalos. Los autores del estudio no describieron si la presencia de *R* y *Cl* juntos en *Arabidopsis* conducía a la producción constitutiva de antocianina en la planta completa o si la producción de antocianina se restringía a ciertas áreas de la planta.

Las descripciones en la bibliografía sugieren que la introducción de un factor de transcripción de otra especie en *Arabidopsis* podría provocar que esta especie se comportara atípicamente con respecto a la regulación positiva de la producción de antocianina (véase, por ejemplo, Mooney *et al.*, Plant Journal 7: 333-339 (1995)). Aquí, la sobre-expresión del gen que codifica el factor de transcripción de *Antirrhinum*, *DELILA*, bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, da lugar a niveles aumentados de antocianina tanto en tomate como en tabaco, pero no produjo un fenotipo obvio en *Arabidopsis*. En el tomate, el aumento de pigmentación se produjo en hipocotiledón, cotiledón, hojas, tallo y raíces pero no se encontró un aumento detectable, respecto a la pigmentación normal, en los frutos de tomate y en los tegumentos de la semilla. Se observó aumento de pigmentación en las flores en el tabaco pero no se pigmentó ninguna parte vegetativa.

Como describieron Goldsbrough *et al.*, Plant Journal 9 (6): 927-933 (1996), la expresión del gen *Lc* en tomate bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, condujo a la acumulación de antocianina sólo en los tejidos en los que normalmente se esperaría producción de antocianinas, tales como hojas, tallos, sépalos y la vena principal de los pétalos. En hojas, toda la producción de antocianina se produjo únicamente en la capa epidérmica. Se describió, además, que la sobre-expresión de *Lc* homocigoto es letal para la planta.

Quattrocchio *et al.*, en Plant Cell Vol. 5: 1497-1512 (1993) describieron la introducción de genes en partes de las hojas de petunia mediante bombardeo de partículas. En estos experimentos, la combinación de los factores de transcripción *Lc* y *Cl* condujo a la acumulación de antocianina en las hojas. No se ha proporcionado ninguna información acerca de que efectos tiene esta metodología en la producción de flavonoides distintos de la antocianina, tales como los flavonoles. Además, es muy conocido en la técnica que los experimentos llevados a cabo por técnicas de bombardeo de partículas no se pueden usar para predecir de forma fiable los efectos que se podrían obtener por la incorporación de genes mediante transgenes.

No existen descripciones en la bibliografía que confirmen que los niveles de antocianinas se correlacionen directamente con los niveles de flavonoles u otros flavonoides. No existe, tampoco, ninguna descripción en la literatura acerca de la manipulación de flavonoides, distintos de las antocianinas, en plantas mediante la expresión de factores reguladores de la transcripción.

De acuerdo con esto, persiste la necesidad de desarrollar procedimientos para aumentar los niveles de flavonoides distintos de las antocianinas, en particular de flavonoles, en plantas.

Además, existe una necesidad de aumentar los niveles de flavonoides, distintos de antocianinas, en plantas o en partes específicas de ellas, evitando un aumento sustancial en la producción de antocianina, de forma que, por un lado, se aumente la cantidad de ingredientes deseados y, por otro, el color de la planta permanezca sustancialmente igual.

Resumen de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para producir una planta que presenta niveles aumentados de flavonoles, que comprende la incorporación en dicha planta de: (i) un gen que codifica un factor de transcripción de tipo *myb*, implicado en el control de la biosíntesis de flavonoides, operativamente unido a un promotor funcional en una célula vegetal, y (ii) un gen que codifica un factor de transcripción de tipo *myc*, implicado en el control de la biosíntesis de flavonoides, operativamente unido a un promotor funcional en una célula vegetal, de forma que esa planta se transforma establemente con cada uno de los genes, en la que la planta es una planta de tomate y en la que el factor de transcripción de tipo *myb* es el factor de transcripción *CI* del maíz y el factor de transcripción de tipo *myc* es el factor de transcripción *Lc* del maíz.

Sorprendentemente se ha encontrado que la combinación de los dos genes anteriores, que codifican factores de transcripción, proporciona niveles alterados de flavonoides distintos de antocianinas. Preferentemente, las plantas según la invención se transforman establemente con estos genes.

La invención proporciona, también, una planta que tiene un gen que codifica un factor de transcripción de tipo *myb* implicado en el control de la biosíntesis de flavonoides y un gen que codifica un factor de transcripción de tipo *myc*, implicado en el control de la biosíntesis de flavonoides, transformados establemente en su genoma de forma que se aumenta su capacidad para producir flavonoles, en el que el factor de transcripción de tipo *myb* es el factor de transcripción *CI* del maíz y el factor de transcripción de tipo *myc* es el factor de transcripción *Lc* del maíz.

La invención proporciona, además, una planta de tomate que tiene una combinación de los dos genes anteriores, que codifican factores de transcripción para la síntesis de flavonoides, incorporados, preferentemente de forma estable, en su genoma de forma que se altera su capacidad para producir flavonoides, distintos de antocianinas.

Preferentemente la planta es una planta de tomate que tiene los niveles de flavonoles aumentados en la pulpa del fruto.

También se incluyen en la invención, las semillas, los frutos y la progenie de tales plantas y los híbridos, que comprenden los factores de transcripción *CI* y *Lc* del maíz.

La invención proporciona, adicionalmente, una planta que comprende una construcción de ADN que comprende secuencias que codifican una combinación de los dos genes anteriores, codificando cada uno de ellos un factor de transcripción diferente para la biosíntesis de flavonoides, y estando cada gen operativamente unido a un promotor. Cuando se transforman en una célula vegetal de tomate, estas construcciones son útiles para la sobre-expresión de genes que codifican enzimas de la ruta biosintética flavonoide, por lo que alteran la capacidad de la planta de tomate para producir flavonoles. La invención proporciona, también, las semillas, los frutos y la progenie de las mismas que comprenden estos genes.

Breve descripción de las figuras

La presente invención se podría entender mejor, referida a la siguiente descripción, cuando ésta se lee junto con las figuras adjuntas en las que:

La Figura 1 muestra los mapas de restricción de los plásmidos pUCAP, pUCM2 y pUCM3.

La Figura 2 muestra los mapas de restricción de los plásmidos pGPTV-KAN y pBBC3.

La Figura 3 muestra la región ADN-T de las construcciones de genes quiméricos: (a) pBBC10; (b) pBBC20; (c) pBBC30; (d) pBBC200; (e) pBBC300. Las abreviaturas son: Pnos: promotor del gen de la nopalina sintasa; Pd35s: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), potenciado dos veces; Tnos: terminador del gen de la nopalina sintasa; Trbc: terminador del gen de la subunidad pequeña de la ribulosa bifosfato carboxilasa del guisante; *CI*: gen *CI* del maíz; *Lc*: gen *Lc* del maíz sin secuencia líder; *Lc**: gen *Lc* del maíz más la secuencia líder.

La Figura 4 muestra un análisis por Southern blot de ADN cromosómico de tomate. El ADN cromosómico se aisló a partir de hojas de plantas de tomate, transgénicas y no transgénicas. 5 µg de ADN se digirieron con la enzima de restricción *Bgl*II, se separaron en un gel de agarosa y se transfirieron a un filtro de nylon. El ADN se hibridó con la sonda específica *npt*II marcada radiactivamente y se realizó una autorradiografía, utilizando un "bio-imager".

La Figura 5 muestra un análisis por Southern blot de ADN cromosómico de tomate. El ADN cromosómico se aisló a partir de hojas de plantas de tomate, transgénicas y no transgénicas. 5 µg de ADN se digirieron con las enzimas de restricción *Eco*RI (panel A) y *Nco*I (panel B), se separaron en un gel de agarosa y se transfirieron a un filtro de nylon. El ADN se hibridó con la sonda específica de *CI* marcada radiactivamente y se realizó una autorradiografía. La flecha señala a la banda que hibrida con el fragmento de 1,5 kb de la digestión con *Nco*I de pBBC10.

La Figura 6 muestra un análisis por Southern blot de ADN cromosómico de tomate. El ADN cromosómico se aisló a partir de hojas de plantas de tomate, transgénicas y no transgénicas. 5 µg de ADN se digirieron con las enzimas de

ES 2 301 234 T3

restricción *BglIII/ClaI*, se separaron en un gel de agarosa y se transfirieron a un filtro de nylon. El ADN se hibridó con la sonda específica *npII* marcada radiactivamente y se realizó una autorradiografía.

La Figura 7 muestra un análisis por Southern blot de ADN cromosómico de tomate. El ADN cromosómico se aisló a partir de hojas de plantas de tomate, transgénicas y no transgénicas. 5 µg de ADN se digirieron con las enzimas de restricción *BglIII/ClaI*, se separaron en un gel de agarosa y se transfirieron a un filtro de nylon. El ADN se hibridó con la sonda específica de *Lc* marcada radiactivamente y se realizó una autorradiografía.

La Figura 8 muestra cromatogramas de HPLC típicos, registrados a 370 nm, de extractos hidrolizados de (A) piel y (B) tejido de la pulpa de frutos rojos de plantas de tomate no transformadas. Se indican los picos de los aglicones de quercetina y canferol.

La Figura 9 muestra cromatogramas de HPLC típicos, registrados a 360 nm, de extractos no hidrolizados de (A) piel y (B) tejido de la pulpa de frutos rojos de plantas de tomate no transformadas. Los picos de diferencia entre los glucósidos de flavonol y de naringenina-chalcona se indican por el nombre del compuesto.

La Figura 10 muestra cromatogramas de HPLC, registrados a 370 nm, de extractos hidrolizados de tejido de la pulpa de frutos rojos de (A) una planta no transformada y (B) una planta transformada con la construcción del gen pBBC300.

La Figura 11 muestra los niveles de quercetina, canferol y naringenina (en mg/kg de peso seco (PS) en extractos de la pulpa de frutos rojos de algunas plantas control y de plantas transformadas con éxito con las construcciones génicas pBBC200 (serie 2000-2499 de las plantas transformadas), o pBBC300 (serie 3000 de las plantas transformadas). Los datos se calcularon a partir de los extractos hidrolizados, esto es, la naringenina deriva de la isomerización de la naricalcona y los aglicones de quercetina y canferol derivan de sus respectivos glucósidos.

La Figura 12 muestra los niveles totales de flavonoles (quercetina más canferol) y de naringenina en extractos de frutos totales de algunas plantas de tomate control y transformadas. Los datos se calcularon a partir de los extractos hidrolizados, esto es, la naringenina deriva de la isomerización de la naricalcona y los aglicones de quercetina y canferol derivan de sus respectivos glucósidos.

La Figura 13 muestra cromatogramas de HPLC típicos, registrados a 360 nm, de extractos no hidrolizados de tejido de pulpa de frutos rojos de (A) una planta no transformada y (B) una planta transformada con pBBC300.

La Figura 14 muestra la acumulación, dependiente de maduración, de los flavonoles de tipo canferol en la pulpa de frutos de una planta transformada con pBBC300. Se muestran los cromatogramas de HPLC, registrados a 370 nm, de extractos hidrolizados de frutos en las etapas (A) verde, (B) en cambio de color y (C) roja.

La Figura 15 muestra los mapas de restricción de los plásmidos pFLAP10, pFLAP20 y pFLAP30.

La figura 16 muestra los mapas de restricción de los plásmidos pFLAP200 y pFLAP300.

La Figura 17 muestra los mapas de restricción de los plásmidos pBBC10, pBBC20 y pBBC30.

La Figura 18 muestra los mapas de restricción de los plásmidos pBBC200 y pBBC300.

La Figura 19 muestra un mapa de restricción del plásmido pT7E8.

La Figura 20 muestra un mapa de restricción del plásmido pBBC250.

La Figura 21 muestra la expresión de los genes reguladores *Lc* y *CI*, respecto del gen constitutivo *cyp*, en frutos rojos de una planta control (número 004), de plantas transformadas con las construcciones de un único gen pBBC10 (numeradas desde 100 en adelante), pBBC20 (numeradas desde 200 en adelante) o pBBC30 (numeradas desde 300 en adelante), y de plantas transformadas con las construcciones de dos genes pBBC250 (numeradas desde 2500 en adelante) o pBBC300 (numerada 3031). También se muestra el nivel de canferol, medido en los frutos, para cada planta. ---: <2 mg/kg de peso en fresco; +: 2-10 mg/kg de peso en fresco; ++: 11-40 mg/kg de peso en fresco; +++ > 40 mg/kg de peso en fresco.

La figura 22 muestra la relación entre el nivel total de flavonoides (quercetina, canferol y naringenina) y la actividad antioxidante (valores TEAC) de los frutos rojos de algunas plantas de tomate control (c) y transformadas pBBC300 (t).

La Figura 23 muestra las relaciones de los precipitados de suero para las pastas de tomate preparadas a partir de tomates transformados, en comparación con las pastas preparadas a partir de tomates control.

La figura 24 muestra una comparación de los valores de Bostwick de las pastas de tomate preparadas a partir de tomates transformados, en comparación con pastas preparadas a partir de tomates control.

La Figura 25 muestra una representación del índice respecto del espectro de un detalle de un cromatograma de HPLC, registrado a 280 nm, de extractos no hidrolizados de frutos rojos completos de una planta transformada con pBBC300. Los tiempos de retención y el espectro de absorbancia de las especies flavonoides, que aumentaron en la planta transformada, se indican en el panel superior.

La Figura 26 muestra cromatogramas de HPLC típicos, registrados a 360 nm, de extractos no hidrolizados de frutos rojos completos de (A) una planta no transformada y (B) una planta transformada con pBBC300. Se indican los tiempos de retención y los nombres de los picos identificados.

La Figura 27 muestra cromatogramas de HPLC típicos, registrados a 280 nm, de extractos no hidrolizados de frutos rojos completos de (A) una planta no transformada y (B) una planta transformada con pBBC300. Se indican los tiempos de retención y los nombres de los picos identificados.

La figura 28 muestra los niveles totales de flavonoles (quercetina más canferol) de extractos hidrolizados de frutos rojos completos de: plantas control sin transformar (barra izquierda, media $\pm$ d.e, n= 10), plantas transformadas con construcciones de un único gen pBCC10 (numeradas desde 100 en adelante), pBBC20 (numeradas desde 200 en adelante) o en pBBC30 (numeradas desde 300 en adelante), así como de plantas transformadas con las construcciones de dos genes pBBC200 (numeradas 2000-2499) o de pBBC300 (numerada 3000-3499).

La figura 29 muestra los niveles totales de flavonoles (quercetina más canferol), canferol, quercetina y naringenina, medidos por HPLC en frutos rojos completos de plantas de tomate control y transformadas. Los niveles de flavonoides se expresan en mg/kg de peso en fresco y se calcularon a partir de extractos hidrolizados, esto es, la naringenina deriva de la hidrólisis de glucósidos de naringenina (sólo en transformantes) y a partir de la isomerización de naricalcona (tanto controles como transformantes). La barra primera de cada representación, muestra los niveles de las plantas control (medias $\pm$ d.e., n= 10).

La Figura 30 muestra cromatogramas típicos GC-MS y cuentas de iones totales (TIC) registradas, de compuestos volátiles generados por los frutos de tomate rojo de (A) una planta control sin transformar, (B) una planta transformada con pBBC20, (C) una planta transformada con pBBC10 y (D) una planta transformada con pBBC200. La flecha indica la posición (con áreas de pico integradas) de metilsalicilato. Eje Y: porcentaje de TIC (100% = 8×10^6); Eje X: tiempo de retención (minutos).

Descripción detallada de la invención

Como se usa en esta descripción, “planta” significa una planta completa o una parte de la misma, o una célula vegetal o un grupo de células vegetales. Preferentemente, sin embargo, la invención se dirige particularmente a la transformación de plantas completas y al uso de la planta completa o partes significativas de la misma, tales como frutos, hojas o semillas.

Un “flavonoide” o “flavonol” podría ser, adecuadamente, un aglicón o un glucósido.

Un “gen” es una secuencia de ADN que codifica una proteína, que incluye secuencias de ADN sintéticas o modificadas o secuencias que se presentan de forma natural que codifican una proteína, y excluye la secuencia 5' que dirige la iniciación de la transcripción.

Un “factor de transcripción” es una proteína que puede interactuar con un promotor y, por tanto, influye en el nivel de expresión de un gen operativamente unido a ese promotor. Una secuencia funcionalmente equivalente a la misma es cualquier secuencia que codifica una proteína que tienen propiedades funcionales similares. Se apreciará que las secuencias funcionales equivalentes incluyen, pero no se limitan a, fragmentos de genes que todavía tienen propiedades funcionales similares, y genes alterados (por ejemplo, genes mutados) que todavía tienen propiedades funcionales similares. Preferentemente, existe un alto grado de homología (procedimiento a ojo) entre los genes y sus equivalentes funcionales, por ejemplo, al menos el 60%, siendo más preferido mayor del 80% y todavía más preferido mayor del 95%.

El término “operativamente unido a uno o más promotores” significa que el gen, o secuencia de DNA, está conectado con el promotor, o en una posición respecto a éste, de tal forma que se asegure su funcionamiento. El promotor es cualquier secuencia suficiente que permita que se transcriba el ADN. Después de la unión de las secuencias del gen y del promotor, tras activación del promotor, el gen se expresará.

Una “construcción” es un polinucleótido que comprende secuencias de ácidos nucleicos que no están asociadas de forma natural.

La presente invención se basa en el inesperado descubrimiento de que los niveles de flavonoides, distintos de antocianinas, en plantas de tomate, se pueden manipular por la incorporación en la planta de dos o más genes que codifican los factores de transcripción *C1* y *Lc*, derivados del maíz, para la biosíntesis de flavonoides.

Preferentemente, las plantas están transformadas establemente con los dos genes que codifican los factores de transcripción, por ejemplo, mediante el uso de rutas de modificación genética.

ES 2 301 234 T3

Ventajosamente, por las técnicas de la invención, se podrían aumentar los niveles de flavonoles en plantas de tomate. Típicamente, se prefiere que el aumento de flavonoles sea apreciable, al menos, en una parte de las plantas.

Preferentemente, el aumento de los niveles de flavonoides, distintos de antocianina, y/o el aumento en el nivel de flavonoles en la planta de tomate, en su totalidad o en la parte deseada de la misma, normalmente en la parte comestible, es, al menos, de dos veces, siendo más preferido, al menos de cinco veces, y todavía más preferido, al menos de diez veces, en comparación con plantas similares que no se han transformada según la invención.

Además, se ha encontrado que el nivel de flavonoides, distintos de antocianinas, en particular el nivel de flavonoles, se podría aumentar en partes específicas de las plantas de tomate. Para plantas de tomate, fresa, etc., que tienen frutos, es ventajoso que el nivel se aumente en el fruto

Específicamente, se ha encontrado que es posible aumentar el nivel de flavonoides, distintos de antocianinas, particularmente flavonoles, en el fruto del tomate, e incluso más sorprendentemente en la pulpa del fruto del tomate, un tejido que normalmente no contiene flavonoides, por lo que se producen tomates con unas características nutricionales, de conservación y de sabor mejoradas.

El nivel de flavonoles en la pulpa del tomate es, al menos de 2 mg/kg (peso en fresco), siendo más preferido, al menos de 10 mg/kg (peso en fresco), y todavía más preferido, al menos de 30 mg/kg (peso en fresco)

Una ventaja adicional de las formas de realización de la invención se refiere al aumento en el nivel de flavonoides, distintos de antocianinas, en toda o en las partes deseadas de la planta de tomate, por lo que el nivel de antocianinas no aumenta excesivamente, de forma que el color de la planta, o de las partes deseadas de la misma, permanece igual.

Preferentemente, por tanto, el nivel de antocianinas en la planta de tomate en su conjunto, o en la parte deseada de la misma (particularmente en el fruto), es similar al nivel en la planta no transformada, por ejemplo el nivel en plantas transformadas, o en partes de la misma, es menor de 2 veces el nivel en las plantas no transformadas, más preferentemente menor de 1,5 veces, siendo más preferido aproximadamente el mismo o menor.

En plantas de tomate, la piel y la pulpa del fruto están, normalmente, sustancialmente libres de antocianinas. En las formas de realización de la invención el nivel de antocianinas en esas partes, por ejemplo la piel y/o pulpa del fruto de tomate, de las plantas transformadas de la invención es, por tanto, igualmente bajo, por ejemplo, menor de 2 mg/kg de peso en fresco, siendo más preferido menor de 1 mg/kg de peso en fresco, más preferentemente sustancialmente libre de antocianinas.

Se apreciará adicionalmente que la secuencia que codifica los factores de transcripción *Cl* y *Lc* de la ruta de biosíntesis de flavonoides podría ser un clon genómico o de ADNc.

Las secuencias de los genes que codifican factores de transcripción para la biosíntesis de flavonoides para su uso según la presente invención, se podrían obtener, adecuadamente, a partir de plantas de maíz (ver, por ejemplo, Lloyd *et al.*, referida anteriormente), de *antirrhinum* (ver, por ejemplo, Goodrich *et al.*, Cell, 68: 955-964 (1992)) y de *Petunia* (ver Quattrocchio *et al.*, Plant Cell, 5: 1497-1512 (1993)).

Las secuencias de los genes de interés estarán operativamente unidas (esto es, en una posición adecuada que asegure su funcionamiento) a uno o más promotores adecuados que permiten que se transcriba el ADN. Se conocen en la técnica promotores adecuados, que podrían ser homólogos o heterólogos al gen (esto es, no operativamente unidos de forma natural a un gen que codifica un factor de transcripción para la biosíntesis de flavonoides), útiles para la expresión en plantas, como se describe, por ejemplo, en Weising *et al.*, Ann. Rev. Genetics, 22: 421-477 (1988). Los promotores para su uso según la invención podrían ser inducibles, constitutivos o específicos de tejido o tener distintas combinaciones de estas características.

Preferentemente, al menos, uno de los genes está unido a un promotor que es no constitutivo y/o específico de tejido. Se piensa que el uso de, al menos, un promotor constitutivo es ventajoso debido a que podría evitar la formación de dosis muy altas (letales) de uno o más ingredientes en la ruta flavonoide. Igualmente, el uso de promotores específicos de tejido podría ser ventajoso ya que éstos podrían permitir su uso para introducir o aumentar la formación de flavonoides, distintos de antocianina, en las partes específicas de la planta que se desee.

Los promotores útiles incluyen, pero no se limitan a, promotores constitutivos tales como el del virus del anillo grabado del clavel (CERV), el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), o más particularmente, el promotor del virus del mosaico de la coliflor, potenciado dos veces, que comprende dos promotores CaMV 35S en tandem (referido como promotor "35S doble").

Podría ser deseable usar, en ciertas circunstancias, un promotor regulado durante el desarrollo o específico de tejido, en lugar de un promotor constitutivo. Un promotor específico de tejido induce o aumenta la expresión del factor de transcripción para la biosíntesis de flavonoides en ciertos tejidos deseados, preferentemente, sin afectar excesivamente a la expresión en otros tejidos. Los promotores usados en la sobre-expresión del factor de transcripción *Lc* del maíz en plantas de tomate serán, preferentemente, específicos de tejido, especialmente específicos del fruto. Se sabe que la sobre-expresión de *Lc* en tejidos vegetativos de las plantas de tomate es perjudicial para la salud de la planta (ver

Goldsbrough *et al.*, referida anteriormente). Los promotores específicos del fruto adecuados incluyen al promotor E8 del tomate (Deikman *et al.*, EMBO J. 7: 3315-3320 (1988)), 2A11 (Van Haaren *et al.*, Plant Mol. Biol. 21: 625-640), E4 (Cordes *et al.* Plant Cell 1: 1025-1034 (1989)) y PG (Bird *et al.*, Plant Mol. Biol. 11: 651-662 (1988), Nicholass *et al.*, Plant Molecular Biology 28: 423-435 (1995)). Ambos factores de transcripción para su uso según el procedimiento de la invención podrían estar operativamente unidos al mismo o a diferentes promotores específicos del fruto.

Sin embargo, según una forma de realización preferida del procedimiento de la invención, un gen que codifica un primer factor de transcripción del tomate para la biosíntesis de flavonoides estaría operativamente unido a un promotor constitutivo, mientras que un gen que codifica un segundo factor de transcripción para la biosíntesis de flavonoides estaría operativamente unido a un promotor no constitutivo o específico de tejido, por ejemplo, un promotor específico del fruto. La combinación de un promotor constitutivo y de uno específico del fruto ayuda a asegurar que se producen los flavonoides deseados, principalmente, en el fruto del tomate. Una ventaja adicional en el uso de esta combinación, es que se evitan los posibles efectos inhibitorios ("silenciamiento de genes") sobre la expresión de los genes introducidos que surgen por el uso del mismo promotor.

El gen que codifica el factor de transcripción *CI* del maíz, operativamente unido al promotor constitutivo 35S doble de CaMV, se combina con un factor de transcripción *Lc* del maíz, operativamente unido al promotor E8 específico del fruto del tomate.

Se apreciará que la sobre-expresión de genes que codifican los factores de transcripción anteriores para la biosíntesis de flavonoides, según el procedimiento de la invención, podrían resultar en la acumulación tanto de antocianinas como de flavonoides, distintos de antocianinas, particularmente si los factores de transcripción operan en una posición de la ruta biosintética de flavonoides, anterior a aquella en la que divergen las rutas respectivas del flavonol y la antocianina. Esto podría no ser deseable algunas veces ya que la formación de antocianinas no sólo resulta en la producción de frutos de color púrpura, estéticamente desagradables, sino también podría limitar la producción de flavonoles. En una forma de realización preferida de la invención, se eligen, por tanto, los genes que codifican factores de transcripción que, por un lado permiten un incremento del nivel de flavonoides, distintos de antocianinas, en la planta total o en los tejidos deseados y, por otro no aumentan sustancialmente el nivel de antocianinas en dicha planta o en los tejidos deseados de la misma. En una forma de realización adicional, esto se podría llevar a cabo bloqueando la ruta hacia la expresión de antocianinas, por ejemplo, mediante una etapa adicional que comprende la supresión, mediante oligonucleótidos anti-sentido, de la dihidroflavonol reductasa (DFR), la enzima que cataliza la etapa final en la producción de antocianinas. Alternativamente, los factores de transcripción se podrían sobre-expresar en una línea mutante, tal como en una línea de tomate que fuera deficiente en actividad DFR, por ejemplo, el mutante sin antocianina (*aw*) que describen Goldsbrough *et al.*, Plant Physiol. 105: 491-496 (1994).

Además, la acumulación de flavonoides se podría inhibir, también, por la tasa de producción del aminoácido fenilalanina, el principal sustrato en la síntesis de fenilpropanoides y posteriormente de flavonoides. Con el fin de aumentar la biosíntesis de fenilalanina, los genes que codifican las enzimas de la ruta de la fenilalanina, que no son sensibles a la regulación por retroalimentación, se podrían introducir como una etapa adicional opcional.

Las plantas que incorporan una combinación de genes que codifican factores de transcripción para la biosíntesis de flavonoides según la invención, se podrían producir cruzando una planta que expresa un factor de transcripción del par con otra planta que expresa el otro factor de transcripción, utilizando técnicas de cruzamiento convencionales. Los materiales de partida respectivos se podrían producir mediante técnicas convencionales de transformación de plantas, muy conocidas en la técnica.

Preferentemente, sin embargo, las secuencias génicas deseadas, operativamente unidas a los promotores adecuados respectivos, se fusionan con secuencias de expresión apropiadas para proporcionar un módulo de expresión funcional en una célula vegetal que se puede introducir en una célula vegetal mediante cualquier procedimiento convencional de transformación vegetal.

De acuerdo con esto, la invención proporciona, en un aspecto adicional, un módulo de expresión que comprende, como componentes operativamente unidos en la dirección de transcripción 5'-3', dos o más unidades, comprendiendo cada una de ellas un promotor funcional en una célula vegetal, un gen que codifica un factor de transcripción para la biosíntesis de flavonoides y una región reguladora de terminación de la transcripción y de la traducción en una célula vegetal.

El promotor y las regiones reguladoras de terminación serán funcionales en la célula vegetal huésped y podrían ser heterólogos (esto es, que no ocurren de forma natural) u homólogos (derivados de las especies vegetales huésped) a la célula vegetal y al gen. Los promotores adecuados que se podrían usar se describieron anteriormente.

La región reguladora de la terminación podría derivar de la región 3' del gen del que se ha obtenido el promotor o de otro gen. Las regiones de terminación adecuadas que se podrían usar son muy conocidas en la técnica e incluyen el terminador de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (*Tnos*), el terminador de la manopina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (*Tmas*) y el terminador 35S de CaMV (*T35S*). Son particularmente preferidas las regiones de terminación, para su uso según la invención, que incluyen la región de terminación de la subunidad pequeña de la ribulosa bifosfato carboxilasa del tabaco (*Trbcs*) o la región de terminación *Tnos*.

Adecuadamente, se podría realizar una selección de estas construcciones génicas por su actividad, transformándolas en una planta huésped, vía *Agrobacterium*, y seleccionándolas de acuerdo a los niveles de flavonoides.

Convenientemente, el módulo de expresión según la invención se podría preparar clonando las unidades promotor/gen/terminador individuales en un vector de clonaje adecuado. Se conocen en la técnica vectores de clonaje adecuados que incluyen vectores tales como pUC (Norlander *et al.*, Gene 26: 101-106 (1983)), pEMBL (Dente *et al.*, Nucleic Acids Research 11: 1645-1699 (1983)), pBLUESCRIPT (disponible en Stratagene), pGEM (disponible en Promega) y pBR322 (Bolívar *et al.*, Gene 2: 95-113 (1977)). Son particularmente útiles los vectores de clonaje basados en las series pUC. El vector de clonaje permite que el ADN se amplifique o se manipule, por ejemplo uniendo secuencias. Las regiones de clonaje están en forma de un "polilinker", preferentemente, que es una secuencia que contiene múltiples sitios de restricción adyacentes, de forma que permite flexibilidad en el clonaje.

En una forma de realización particularmente preferida, las unidades promotor/gen/terminador individuales se clonan en pares adyacentes de sitios de restricción en un vector de clonaje adecuado. Las unidades promotor/gen/terminador individuales se podrían construir convenientemente usando un vector de clonaje, que comprenda los mismos sitios de restricción presentados por el vector de clonaje para la construcción de múltiples unidades, pero en la que los sitios de restricción están dispuestos de forma superpuesta en lugar de secuencial.

Adecuadamente, las secuencias de nucleótidos de los genes se podrían extraer de la base de datos de nucleótidos Genbank y analizarse para determinar las enzimas de restricción que no la cortan. Estos sitios de restricción se podrían añadir a los genes mediante procedimientos convencionales tales como la incorporación de estos sitios en cebadores para PCR o mediante sub-clonaje.

Preferentemente, la construcción de ADN según la invención está comprendida en un vector, más adecuadamente, un vector de expresión adaptado para la expresión en un huésped celular apropiado (vegetal). Se apreciará que será suficiente cualquier vector que sea capaz de producir una planta que comprenda la secuencia de ADN introducida.

Los vectores adecuados son muy conocidos por los expertos en la técnica y se describen en referencias técnicas generales, tales como Pouwels *et al.*, Cloning Vectors. A laboratory manual, Elsevier, Amsterdam (1986). Los vectores particularmente adecuados incluyen los vectores plásmidos Ti.

Las técnicas de transformación para introducir las construcciones de ADN según la invención en las células huésped son muy conocidas en la técnica e incluyen procedimientos tales como la microinyección, la utilización de polietilenglicol, la electroporación, o la penetración balística de alta velocidad. Un procedimiento preferido para su uso según la presente invención depende de la transformación mediada por *Agrobacterium*.

Después de la transformación de las células vegetales o plantas, las células vegetales o plantas en las que se ha incorporado del ADN deseado se podrían seleccionar por procedimientos tales como resistencia a antibióticos, resistencia a herbicidas, tolerancia a análogos de aminoácidos o utilizando marcadores fenotípicos.

Se podrían utilizar distintos ensayos para determinar si la célula vegetal muestra un incremento en la expresión génica, por ejemplo, Northern blot o transcripción inversa-PCR cuantitativa (RT-PCT). Las plantas transgénicas totales se podrían regenerar a partir de las células transformadas mediante procedimientos convencionales. Estas plantas transgénicas que tienen niveles de flavonoides mejorados se podrían propagar y cruzar para producir líneas homocigotas. Tales plantas producen semillas que contienen los genes para introducir el rasgo y se pueden crecer para producir plantas que podrían producir el fenotipo seleccionado.

De acuerdo con una forma de realización particular de la invención, los vectores de clonaje, plásmidos pUCM2 y pUCM3 se prepararon mediante la modificación del vector de clonaje pUCAP (Van Engelen *et al.*, Transgenic Research 4: 288-290 (1995)). Las regiones de clonaje múltiples en estos plásmidos se construyeron por inserción de adaptadores sintéticos que contenían los sitios de restricción necesarios. Cada una de las construcciones génicas individuales, que codifican un factor de transcripción para la biosíntesis de flavonoides, se preparó en pUCM2. Generalmente, cada promotor se clonó como un fragmento *KpnI/BamHI*, cada gen estructural como un fragmento *BamHI/SalI* y cada región terminadora como un fragmento *SalI/ClaI*, de forma que la fusión de cada gen individual se realizó como un fragmento *KpnI/ClaI*. Mediante el uso de sitios de restricción en el exterior de los sitios *KpnI* y *ClaI*, se pueden clonar fusiones génicas individuales, una detrás de otra, en el plásmido pUCM3, que contiene los sitios de restricción de pUCM2 pero en un orden diferente. Usando los dos sitios de restricción únicos *PacI* y *AscI*, las construcciones de múltiples genes deseadas se transformaron en un vector binario de transformación vegetal, el plásmido pBBC3, un derivado del plásmido pGPTV-KAN al que se ha añadido un adaptador sintético que contiene los sitios de restricción únicos *PacI* y *AscI*.

La invención se refiere también al uso de plantas de tomate según la invención, o a partes deseadas de la misma, en la preparación de productos alimenticios o en productos protectores de la piel o el cabello.

Por ejemplo, para la preparación de productos alimenticios, las partes deseadas de la planta con el nivel alterado de flavonoides, distintos de antocianinas, se podrían recoger y procesar adicionalmente en un producto comestible.

ES 2 301 234 T3

La invención se refiere al uso de tomates con niveles aumentados de flavonoides, distintos de antocianinas, particularmente flavanoles. Estos tomates se podrían recolectar y comer como tal. Alternativamente, los tomates se podrían usar en la preparación de productos alimenticios. Por ejemplo, partes de tomate se podrían añadir a ensaladas. También se podría aplicar un tratamiento por calor, por ejemplo, los tomates se podrían usar para preparar salsas de tomate con el tomate como uno de los ingredientes principales (por ejemplo, a niveles del 10% en peso o más, por ejemplo el 80% en peso o más) tales como pasta de tomate, tomate ketchup, salsa para pizza, salsa para pasta, aliños, etc. También se podrían usar los tomates para preparar productos como zumo de tomate, sopas de tomate, etc.

Sorprendentemente, se ha encontrado que las plantas de tomate de la invención no sólo tienen niveles alterados de flavonoides, distintos de antocianinas, sino también tienen otras ventajas.

Una ventaja particular es que los tomates podrían tener niveles aumentados de metilsalicilato. Este es un precursor muy conocido en la ruta del aroma y, por tanto, conducir a un mejor aroma de los productos de la invención.

Una forma de realización adicional de la invención es que los tomates podrían contribuir a mejorar las propiedades reológicas de los productos derivados de ellos. Por ejemplo, cuando las salsas de tomate, tales como la pasta de tomate, tomate ketchup, salsa para pizza, salsa para pasta, aliños, etc., se han fabricado a partir de tomates de la invención, esto podría llevar a un aumento del espesor de dichas salsas.

Las manipulaciones del ADN se realizaron usando procedimientos estándar muy conocidos en la técnica, como los descritos, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989 (referido a partir de aquí como "Sambrook").

Las referencias bibliográficas siguientes se mencionan en los Ejemplos:

Becker, D. *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 20: 1195-1197 (1992).

Bonierbale, M.W. *et al.*, *Genetics* 120: 1095-1103 (1988).

Bovy, A.G. *et al.*, *Acta Hort.* 405: 179-189 (1995).

Damiani, R. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8244-8248 (1993).

Hanahan, D. J. *Mol. Biol.* 166: 557-580 (1983).

Hertog, M.G.L. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* 40: 1591-1598 (1992).

Hoekema, A. *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 5: 85-89 (1985).

Jackson, D. *et al.*, *Plant Cell* 3: 115-125 (1991).

Jefferson, R. *et al.*, *Embo J.* 6: 3901-3907 (1987).

Lloyd, A. *et al.*, *Science* 258: 1773-1775 (1992).

Miller, N.J. y **Rice-Evans** C.A. *Free Rad. Res.* 26: 195-199 (1997).

Murashige, T. y **Skoog**, F. *Physiol. Plant.* 15: 73-97 (1962).

Van **Engelen**, F. *et al.*, *Transgenic R.* 4: 288-290 (1995).

Verhoeven, H.A. *et al.*, *Chromatographia* 46: 63-66 (1997).

Ejemplos

Ejemplo 1

Material vegetal

Todos los experimentos se pueden realizar utilizando líneas de tomate procesadas, disponibles normalmente, como material de partida. La línea FM6203 es comparable con las líneas disponibles comercialmente tales como las variedades Napoli y Roma VF, que están disponibles en Simpson's Seeds (Tomato Growers Club, Surrey, England, número de registro MAFF 2620).

La línea de tomate FM6203 se creció en un invernadero con un fotoperiodo de 16 horas y a una temperatura día/noche de 21/17°C.

Ejemplo 2

Cepas bacterianas

5 Se utilizó la cepa de *Escherichia coli*: DH5' supE44, D(lacZYA-ArgF)U169, f80lacZDM15, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1, deoR (Hanahan, 1983).

Se utilizó la cepa de *Agrobacterium* LBA4404 (Hoekema, 1985).

10 La transformación de *E. coli* DH5' se realizó usando el procedimiento de Hanahan (1983).

La transformación de *Agrobacterium* LBA4404 se realizó según Gynheung *et al.*, (1988) en Plant Molecular Biology Manual, Eds Gelvin y Schilperoort, Kluwer Academic Publishers (Dordrecht) pPMAN-A311-19.

Ejemplo 3

Construcciones génicas

20 3.1 Estrategia para sobre-expresar genes de la biosíntesis de flavonoides en los frutos de tomate

La producción de flavonoides en frutos de tomate se aumenta mediante sobre-expresión de los genes de los factores de transcripción del maíz, *C1* y *Lc*, cuyos productos son capaces de inducir la expresión de los genes endógenos de la biosíntesis de flavonoides en tomate. Para aumentar el nivel de flavonoides en el fruto del tomate, predominantemente, 25 el gen *Lc*, se expresa bajo el control del promotor E8 específico del fruto del tomate. El gen *C1* se expresa bajo el control del promotor constitutivo 35S de CaMV con un potenciador doble.

Se usó la aproximación de un módulo para clonar los distintos componentes de las construcciones génicas, de forma que todos los promotores se clonaron con las mismas enzimas de restricción, todos los genes estructurales con las mismas enzimas de restricción y todos los terminadores con las mismas enzimas de restricción. Para seleccionar tales 30 enzimas de restricción, las secuencias de nucleótidos de todos los genes mencionados anteriormente se obtuvieron de la base de datos de nucleótidos Genbank y se analizaron para determinar las enzimas de restricción que no las cortan. Estos sitios de restricción se añadieron a los genes, bien por incorporación de estos sitios en cebadores para PCR, o bien mediante sub-clonaje. Posteriormente, los genes se clonaron, etapa por etapa, en vectores derivados de pUC especialmente diseñados, que contenían los sitios de las enzimas de restricción seleccionadas en su región de clonaje múltiple. 35

Los insertos de las construcciones finales se transfirieron a un vector de transformación vegetal y se transformaron plantas de tomate. 40

3.2 Construcción de los vectores de clonaje pUCM2 y pUCM3

Los plásmidos pUCM2 y pUCM3 se derivaron a partir del vector de clonaje pUCAP (Figura 1; Van Engelen *et al.* (1995)). Las regiones de clonaje múltiple en estos plásmidos se construyeron por inserción de adaptadores sintéticos 45 que contenían los sitios de restricción necesarios. En primer lugar, se generó cada construcción génica en pUCM2. Todos los promotores se clonaron como un fragmento *KpnI/BamHI*, cada uno de los genes estructurales como un fragmento *BamHI/SalI* y cada terminador como un fragmento *SalI/ClaI*. De esta forma todas las fusiones génicas se realizaron como un fragmento *KpnI/ClaI*. Mediante el uso de sitios de restricción en el exterior de los sitios *KpnI* y *ClaI*, las fusiones génicas individuales se pueden colocar, una detrás de otra, en el plásmido pUCM3, que contiene los 50 sitios de restricción de pUCM2 en un orden diferente. Con estos dos módulos génicos se pueden clonar hasta cuatro fusiones génicas, una detrás de otra en una construcción. Usando los dos sitios de restricción únicos *PacI* y *AscI*, las construcciones de múltiples genes se pueden transferir al vector binario pBBC3 (Figura 2), un derivado del plásmido pGPTV-KAN (Becker *et al.* (1992)).

55 3.3 Construcciones de fusiones génicas de *Lc* y *C1*

Siguiendo la estrategia descrita anteriormente, se generaron cinco construcciones binarias que contenían fusiones de, bien los genes *Lc* o *C1* individualmente, o bien los dos genes *Lc* y *C1* juntos. Se usaron dos versiones del gen *Lc*: un ADNc de *Lc* con su región líder 5' no traducida (*Lc*⁺) y un cDNA de *Lc* al que le faltaba la región líder 5' no traducida (*Lc*⁻). La región líder 5' contienen un marco de lectura abierto pequeño que reprime la traducción de *Lc* y, 60 por tanto, se obtienen niveles de proteína más altos con el último de los genes *Lc* (Damiani, 1993). La Figura 3 muestra un esquema de la región de ADN-T de estas construcciones. Las construcciones en pBBC10, pBBC20 y pBBC30 son construcciones con un único gen. Las construcciones pBBC200 y pBBC300 son construcciones de dos genes que contienen los genes *Lc* y *C1*, usados para aumentar la cantidad de flavonoles en frutos del tomate (particularmente en 65 la pulpa).

En la construcción pBBC10, el gen *C1* del maíz se fusionó con el promotor 35S, potenciado dos veces y el terminador *nos*. Las construcciones pBBC20 y pBBC30 son construcciones con un único gen en las que las dos

versiones del gen *Lc* del maíz (menos y más el ARNm 5' señal, respectivamente) se fusionan con el promotor *e8* del tomate y el terminador *rbcS* del guisante. La construcción pBBC200 es una construcción de dos genes que consiste en el gen *C1* fusionado con el promotor *d35s* y el terminador *nos*, y el gen *Lc* (menos la secuencia líder) fusionado con el promotor *e8* y el terminador *rbcS*. La construcción pBBC300 es idéntica a pBBC200, excepto que esta construcción contiene el gen *Lc* más la secuencia líder 5'. A continuación se muestra una descripción detallada de la construcción de todos los plásmidos usados.

Construcciones génicas

Los diferentes componentes de las fusiones génicas y los diferentes vectores plásmidos se usaron de la forma siguiente. El vector plásmido pUCAP (Van Engelen *et al.* (1995)) fue proporcionado por CPRO-DLO. El vector binario pGPTV-KAN (Becker *et al.* 1992) fue proporcionado por Unilever. El terminador *nos* (*Tnos*) se amplificó a partir del plásmido pBI121 (Jefferson *et al.* (1987)). El promotor *35s*, potenciado dos veces, de CaMV (*Pd35s*) se aisló a partir del plásmido pMOG18 (Symons *et al.* Biotechnology 8: 217-221 (1990)). El promotor del tomate *e8* (*Pe8*) se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de tomate (variedad MoneyMaker) utilizando la polimerasa Taq y los cebadores E851 (5' GAATTCAAGCTTGACATCCCTAAT 3') y E8A2 (5' CTTTGTGCACTGTGAATGATTAGA 3'). E851 y E8A2 hibridan en los extremos distal (5') y proximal (3') del promotor *e8*, respectivamente. El fragmento de PCR de 2,2 kb resultante se clonó, posteriormente, en el sitio *EcoRV* del vector pT7 Blue-T (disponible en Novagen). Esto resultó en un vector con el promotor *e8* insertado en la orientación de las agujas del reloj (la misma que el gen *lacZ*), que se llamó pT7E8 (Figura 16). Las construcciones que contenían el gen *C1* (pAL77), el gen *Lc* más la región líder 5' (pAL69) y el gen *Lc* menos la región líder 5' (pAL144) se obtuvieron de R.W. Davis (Stanford University, véase también Lloyd *et al.* (1992)). Los genes *Lc* en los plásmidos pAL69 y pAL144 se fusionaron con el terminador *rbcS* (*TrbcS*) y se pudieron usar como tal. Todos los componentes se clonaron, etapa por etapa, como se describe a continuación.

A. Construcción de los plásmidos pUCM2 y pUCM3

Para construir el plásmido pUCM2, la región de clonaje múltiple del plásmido pUCAP se modificó mediante la inserción de dos adaptadores. En primer lugar, el adaptador F1F2, que contenía los sitios de restricción *SalI/ClaI/SphI* (Tabla 1), se clonó en el plásmido pUCAP digerido con *SalI/SphI*. Esto resultó en el plásmido pUCM1. A continuación, el adaptador F3F4, que consistía en los sitios de restricción *PacI/NotI/BglIII/EcoRI*, se clonó en el plásmido pUCM1 digerido con *PacI/EcoRI*. Esto resultó en el plásmido pUCM2 (Figura 1).

Para construir el plásmido pUCM3, el plásmido pUCAP se digirió con *PacI/AscI* y la región de clonaje múltiple completa se reemplazó por el adaptador F5F6 (Tabla 1). Esto resultó en el plásmido pUCM3 (Figura 1).

B. Construcción de pBBC3

Para construir el plásmido pBBC3, el adaptador F38F39 se ligó al plásmido pGPTV-KAN digerido con *EcoRI/HindIII*. De esta forma el gen *gusA-Tnos* en pGPT-KAN se reemplaza por una región de clonaje múltiple pequeña que consiste en los sitios de restricción *PacI/EcoRI/HindIII/AscI* (Figura 2).

C. Construcción de pBBC10

La fusión génica *C1* se clonó en pUCM2, un derivado de pUC, en tres etapas principales.

En primer lugar, *Tnos* se amplificó por PCR a partir de pBI121 con los cebadores F12 y AB13 (véase Tabla 1). El producto resultante de 250 pb se clonó en pUCM2 como un fragmento *SalI/ClaI*. Esto resultó en el plásmido pFLAP1.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

Resumen de los cebadores para PCR y de los adaptadores usados

Cebador	Secuencia (5' a 3')
(*)	
F1	TCGACCATATCGATGCATG
F2	CATCGATATGG
F3	TAAGCGGCCGCGAGATCTGG
F4	AATTCAGATCTGCGGCCGCTTAAT
F5	TAAGGGGTACCACCATCGATACCGAATTCTACATGCATGCATGGA GATCTCCCAAGCTTCTAAGATGCGGCCGCTAAACATGG
F6	CGCGCCATGTTTAGCGGCCGCGATCTTAGAAGCTTGGGAGATCTCC ATGCATGCATGTAGAATTCGGTATCGATGGTGGTACCCCTTAAT
F7	AATTGCACCGGTCCG
F8	GATCCGACCG
F9	TAGCCATGGG
F10	TCGACCCATGGCTAAT
F12	CCCGTCGACTTTCCCGATCGTTCAAACATTTGGC
AB13	CCCATCGATGCGTCTAGTAACATAGATGAC
F38	AATTGGGCGCGCCAAGCTTCCGAATTCTTAATTAAG
F39	AGCTCTTAATTAAGAATTCGGAAGCTTGGCGCGCCC
F69	ATGAGAGTGTGAGGAAGGAG
F72	GCCATAATACTCGAACTCAG
F80	TGGGCACAACAGACAATCGGCTGC
F81	TGCGAATCGGGAGCGGCGATACCG
CYP1S	CTTCGCCGATACCACTCCCAAAAC
CYP2A	ACCGCAGTCAGCAATAACCACAGG

* Los adaptadores se generaron combinando dos cebadores, calentando a 95°C durante 5 minutos e hibridando los dos cebadores por enfriamiento lento a temperatura ambiente.

En segundo lugar, el gen *C1* se clonó como un fragmento *Bam*HI/*Sal*I anterior a *Tnos* en pFLAP2 como sigue. El gen *C1* se transfirió como un fragmento *Eco*RI de 2 kb del plásmido pAL77 al plásmido de alto número de copias pBluescript SK-, dando como resultado el plásmido pBLC1. El gen *C1* se aisló a partir de pBLC1 como un fragmento *Eco*RI/*Pac*I de 1,6 kb y se ligaron los adaptadores F7F8 y F9F10 (Tabla 1) en cada uno de los extremos del fragmento con el fin de añadir sitios de restricción *Bam*HI y *Sal*I únicos en ambos extremos del gen y de destruir los sitios *Eco*RI y *Pac*I. El fragmento de *C1* *Bam*HI/*Sal*I resultante se clonó antes del terminador *nos*, dando como resultado el plásmido pFLAP2.

En tercer lugar, *Pd35s* se clonó como un fragmento *Kpn*I/*Bam*HI antes de *C1* en pFLAP2 como sigue. Para crear un sitio único *Bam*HI en el extremo 3' del promotor *d35s*, el plásmido pMOG18 se digirió con *Eco*RV/*Bam*HI, eliminando así la parte 3' del promotor *d35s* y el gen *gusA*. La parte 3' del promotor *35s* presente en el plásmido pAB80 (Bovy *et al.* (1995)) se ligó al fragmento *Eco*RV/*Bam*HI de 0,2 kb en el vector pMOG18, dando como resultado el plásmido pMOG18B. Para crear un sitio *Kpn*I único en el extremo 5' del promotor *d35s*, el plásmido pMOG18B se digirió

con *EcoRI*, se hicieron romos los extremos con la polimerasa Klenow, y posteriormente se digirieron con *BamHI*. El fragmento del promotor *d35s* romo/*BamHI* de 0,85 kb resultante se clonó en el plásmido *pBLCI* digerido con *XhoI*/hecho romo con la polimerasa Klenow/*BamHI*. Esto resultó en el plásmido *pBLd35s*. Finalmente, el promotor *d35s* se transfirió como un fragmento *KpnI/BamHI* desde *pBLd35s* al plásmido *pFLAP2*. Esto dio como resultado el plásmido *pFLAP* (Figura 15).

El inserto del plásmido *pFLAP10* se transfirió, como un fragmento *PacI/AscI* de 2,8 kb, al vector binario *pBBC3*, resultando en el plásmido *pBBC10* (Figuras 3 y 17).

D. Construcción de *pBBC20*

La construcción del plásmido *pBBC20* constó de tres etapas principales: (i) clonaje del gen *Lc⁻* (menos secuencia líder) más el terminador *brcS* en el vector *pUCM2*, (ii) clonaje del promotor *e8*, específico del fruto del tomate, antes del gen *Lc⁻*, e (iii) transferencia de la fusión *Lc* al vector binario *pBBC3*. Estas etapas se esquematizarán en los párrafos siguientes.

En primer lugar, el gen *Lc⁻* y el terminador *rbcS* se aislaron del plásmido *pAL144* como un fragmento *BamHI/ClaI* de 2,8 kb y se clonaron en el plásmido *pUCM2* digerido con las mismas enzimas. Esto dio como resultado el plásmido *pFLAP4*.

En segundo lugar, el promotor *e8* del tomate se clonó antes del gen *Lc⁻* como sigue. El promotor *e8* estaba presente como un fragmento de 2,2 kb en el plásmido *pT7E8*. Este fragmento del promotor *e8* contenía un sitio *Pac I*, que no se quería conservar, en la posición 430 respecto del extremo 5'. Para eliminar este sitio *Pac I*, el plásmido *pT7E8* se digirió con *PacI*, los extremos se hicieron romos con la ADN polimerasa de T4, y el plásmido se religó, dando como resultado el plásmido *pT7E8-Pac*. Posteriormente, el promotor *e8* se amplificó a partir de este plásmido mediante PCR con los cebadores F23 y F26, que contenían los sitios de restricción únicos *KpnI* y *BamHI* (Tabla 1), respectivamente. El producto de PCR se digirió con estas enzimas y se clonó antes del gen *Lc⁻* en el plásmido *pFLAP4*. Esto resultó en el plásmido *pFLAP20* (Figura 15).

En tercer lugar, el inserto de *pFLAP20* se transfirió como un fragmento *PacI/AscI* de 5,1 kb al vector binario *pBBC3*, dando como resultado el plásmido *pBBC20* (Figuras 3 y 17).

E. Construcción de *pBBC30*

El plásmido *pBBC30* es idéntico a *pBBC20*, excepto por la presencia del gen *Lc⁺* en lugar del gen *Lc⁻*. Este plásmido se construyó como sigue.

En primer lugar, la fusión génica *Lc⁺/TrbcS* se clonó como un fragmento *EcoRI/ClaI* en el derivado de *pEMBL*, *pAB10*. Esto dio como resultado el plásmido *pAB Lc⁺*.

En segundo lugar, la fusión génica *Lc⁺/TrbcS* se transfirió, como un fragmento *BamHI/ClaI*, desde *pAB Lc⁺* al plásmido *pFLAP20*, reemplazando así *Lc⁻/TrbcS* con *Lc⁺/TrbcS*. Esto dio como resultado el plásmido *pFLAP30* (Figura 15).

En tercer lugar, el inserto de *pFLAP30* se transfirió, como un fragmento *PacI/AscI* de 5,3 kb, al vector binario *pBBC3*, dando como resultado el plásmido *pBBC30* (Figuras 3 y 17).

F. Construcción de *pBBC200*

Las construcciones de un único gen descritas anteriormente se usaron para construir los plásmidos *pBBC200* y *pBBC300* como sigue.

En primer lugar, el inserto *Pd35s-C1-Tnos* del plásmido *pFLAP10* se transfirió, como un fragmento *KpnI/ClaI* de 2,8 kb, al plásmido *pUCM3*, dando como resultado el plásmido *pFLAP100*.

En segundo lugar, el inserto *Pe8-Lc⁻-TrbcS* del plásmido *pFLAP20* se transfirió, como un fragmento *NotI/AscI* de 5,1 kb, al plásmido *pFLAP100*, dando como resultado el plásmido *pFLAP200* (Figura 16).

En tercer lugar, el inserto del plásmido *pFLAP200* se transfirió, como un fragmento *PacI/AscI* de 7,9 kb, al vector binario *pBBC3*, dando como resultado el plásmido *pBBC200* (Figuras 3 y 18).

G. Construcción de *pBBC300*

Para construir *pBBC300*, el inserto *Pe8-Lc⁺-TrbcS* del plásmido *pFLAP30* se transfirió, como un fragmento *NotI/AscI* de 5,3 kb, al plásmido *pFLAP100*, dando como resultado el plásmido *pFLAP300* (Figura 16)

El inserto del plásmido *pFLAP300* se transfirió, como un fragmento *PacI/AscI* de 8,1 kb, al vector binario *pBBC3*, dando como resultado el plásmido *pBBC300* (Figuras 3 y 18).

Ejemplo 4

*Transformación estable de las construcciones de genes reguladores en la línea de tomate FM6203*5 4.1 A. Transformaciones en *Tumefaciens*

Los plásmidos binarios pBBC10, pBBC20, pBBC30, pBBC200 y pBBC300 se introdujeron en la capa LBA4404 de *Agrobacterium* mediante la adición de 1 µg de ADN del plásmido a 100 µl de células competentes de *Agrobacterium*, preparadas por inoculación de un cultivo de 50 ml en medio YEP (Sambrook, 1989) y crecimiento a 28°C hasta que el cultivo alcanzó una OD₆₀₀ de 0,5-1,0. Las células se centrifugaron, el precipitado se resuspendió en 1 ml de una disolución de CaCl₂ y se repartió en alícuotas de 100 µl. La mezcla *Agrobacterium*-ADN se congeló en nitrógeno líquido y se descongeló en un baño a 37°C. Después de la adición de 1 ml de medio YEP, las bacterias se incubaron a 28°C durante 4 horas con agitación suave. Finalmente, las bacterias transformadas se seleccionaron en placas de agar YEP, que contenían 50 µg/ml de kanamicina. La presencia de los plásmidos se analizó mediante análisis de restricción.

15 4.2 Transformaciones en plantas de tomate

Las semillas de la línea de tomate FM6203 se esterizaron mediante una incubación de 2 horas con 1,5% de hipoclorito, seguido por tres aclarados con agua estéril. Las semillas se germinaron y los plantones se crecieron durante 8 días en una mezcla 1:1 de vermacolita y medio MS (Murashige y Skoog, 1962; Duchefa) suplementado con 0,3% (peso/volumen) de sacarosa, con un fotoperiodo de 16 horas (3000 lux) a 25°C.

Los cotiledones de 8 días de edad se cortaron en cuadrados de 25 mm² y se preincubaron durante 24 horas sobre placas recubiertas con una suspensión alimentadora de tabaco, a baja intensidad de luz (1000 lux). El cultivo en suspensión de hojas de tabaco se creció sobre placas que contenían medio MS que incluía vitaminas, suplementado con sacarosa (3% peso/volumen), agarosa (6 g/l), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; 0,5 mg/l) y bencilaminopurina (BAP; 0,5 mg/l).

Una única colonia de los cultivos de *Agrobacterium* LBA4404, que contenían los vectores binarios mencionados en los Ejemplos 3 y 4.1, se creció durante 48 horas en medio Minimal A líquido (Sambrook, 1989) suplementado con 50 µg/ml de kanamicina, hasta una OD₆₀₀ de 0,5-1,0. Las bacterias se precipitaron por centrifugación y se resuspendieron en medio MS que incluía vitaminas (Duchefa) y 3% (peso/volumen) de sacarosa, hasta una OD₆₀₀ de 0,5. Los explantes de cotiledón se incubaron en la suspensión de *Agrobacterium* durante 30 minutos, se secaron con papel de filtro y se co-cultivaron durante 48 horas sobre las placas recubiertas con la suspensión alimentadora de tabaco, a 25°C y baja intensidad de luz.

Después del co-cultivo, los explantes se transfirieron al medio de regeneración, que consistía en medio MS suplementado con vitaminas Nitsch, sacarosa (2% peso/volumen), agar-gel (5g/l), ribosido de zeatina (2 mg/l), kanamicina (100 mg/l) y cefotaxima (500 mg/l). Los explantes regenerados se transfirieron a medio nuevo cada dos semanas. Los brotes resistentes a kanamicina que regeneraron se transfirieron a medio de enraizamiento, que consistía en medio MS más vitaminas B5, suplementado con sacarosa (0,5% peso/volumen), gelrite (2 g/l), kanamicina (50 mg/l) y cefotaxima (250 mg/l). Durante la regeneración y el enraizamiento, los explantes se incubaron en una cámara de crecimiento a 25°C con un fotoperiodo de 16 horas (3000 lux). Después de la formación de raíces, las plántulas se transfirieron a tierra y crecieron en un invernadero.

Las plantas transgénicas que contenían las construcciones pBBC200 y pBBC300 se numeraron de 2001-2499 y de 3001-3499, respectivamente.

Ejemplo 5

50 *Análisis por Southern de las plantas transgénicas*

5.0 Análisis por Southern de las plantas transformadas con los plásmidos pBBC200 y pBBC300

La presencia y el número de copias de transgenes en plantas transgénicas se determinó por hibridación en análisis por Southern. El ADN genómico se aisló de hojas jóvenes como describen Bonierbale *et al.* (1988). Se digirieron alícuotas de 5 µg de ADN genómico con *Bgl*III durante 16 horas y se separaron en un gel de agarosa del 0,7% en TAE. Posteriormente, el ADN se desnaturalizó en 0,4 M NaOH durante 30 minutos y se transfirió a una membrana Hybond N+ en 0,4 M NaOH

Las membranas se hibridaron con un fragmento de PCR de 700 pb específico de *nptII* marcado radiativamente con ³²P, amplificado a partir del plásmido pBBC3 con los cebadores F80 y F81 (Tabla 1), bajo condiciones de restricción (65°C). La prehibridación se llevó a cabo durante 2 horas a 65°C en una mezcla 6,6 x SSC, 10 x solución de Denhardt, 0,1% de SDS y 0,1 mg/ml de ADN de esperma de arenque desnaturalizado. La hibridación se realizó por adición de una sonda de ADN desnaturalizada al medio de prehibridación y continuando con la incubación a 65°C durante 16 horas. Las membranas hibridadas se lavaron tres veces, durante 30 minutos a 65°C, en 0,2 x SSC, 0,1% de SDS y se realizó una autorradiografía utilizando un bio-imager (Fuji).

La enzima de restricción *Bgl*III corta en el ADN-T inmediatamente antes del gen *ntpII*, a 1,7 kb del extremo izquierdo (LB). Los fragmentos específicos de *ntpII* que hibridan están flanqueados, en un extremo por este sitio *Bgl*III interno y en el otro extremo por un sitio *Bgl*III genómico, situado en la región que flanquea el LB del ADN-T. Esto dará lugar a bandas de hibridación de diferentes longitudes, dependiendo del lugar de integración, y se puede usar para determinar el número de inserciones de ADN-T en cada planta transgénica.

El resultado del análisis por Southern se muestra en la Figura 4. La planta número 3028 (línea 3) no es transgénica ("ha escapado") y procede de tejido cultivado. Todas las demás plantas son transgénicas e hibridan con la sonda *ntpII*. El número de copias en las plantas transgénicas varía de 1 a 4.

5.1 Análisis por Southern de las plantas transformadas con el plásmido pBBC10

El número de copias y la calidad de la inserción de ADN-T en las plantas transgénicas, obtenidas después de la transformación con el plásmido pBBC10 (números 100) se determinó por hibridación en análisis por Southern. Se digirieron alícuotas de 5 µg de ADN genómico durante 16 horas con *Eco*RI y *Nco*I, se separaron en un gel de agarosa del 0,7% en TAE y se transfirieron a una membrana Hybond N+ como se describió en la sección 5.0.

Las membranas se hibridaron con un fragmento de restricción de 900 pb específico de *CI*, obtenido tras la digestión del plásmido pFLAP10 con *Nco*I/*Pst*I, marcado radiactivamente con ³²P. Las condiciones de hibridación y de lavado fueron como las descritas en la sección 5.0.

La enzima de restricción *Eco*RI corta en el ADN-T inmediatamente antes de la fusión génica *P35s-c1-Tnos*, a 2,8 kb del extremo derecho (RB). Los fragmentos específicos de *CI* que hibridan están flanqueados, en un extremo por este sitio *Eco*RI interno y en el otro extremo por un sitio *Eco*RI genómico, situado en la región que flanquea el RB del ADN-T. Esto dará lugar a bandas de hibridación de diferentes longitudes, dependiendo del lugar de integración, y se puede usar para determinar el número de inserciones de ADN-T en cada planta transgénica.

La enzima de restricción *Nco*I corta dos veces en la región del ADN-T del plásmido pBBC10, en la posición +92 respecto al sitio de inicio de la traducción de *c1* y en el segmento de unión entre el gen *CI* y el terminador *nos*. La digestión del ADN cromosómico con *Nco*I, por tanto, dará lugar a una banda de hibridación de 1,5 kb.

El resultado del análisis por Southern se muestra en la Figura 5. La planta número 5002 es una planta transgénica que contiene un inserto *Pe8-gusA-Tnos* y se usa como un control negativo. El resto de las plantas son transgénicas e hibridan con la sonda *c1*. El número de copias en estas plantas transgénicas varía de 1 a 4 (panel A). Después de la digestión con *Nco*I, todas las plantas transgénicas, excepto 5002, dan una banda de 1,5 kb, que corre en el gel en la misma posición que el plásmido pBBC10 digerido con *Nco*I (panel B). Esto indica que todos los transformantes pBBC10 analizados contienen, al menos, una copia intacta del gen *CI*.

5.2 Análisis por Southern de las plantas transformadas con los plásmidos pBBC20 y pBBC30

El número de copias y la calidad de la inserción del ADN-T en las plantas transgénicas, obtenidas después de la transformación con el plásmido pBBC20 (números 200) y pBBC30 (números 300) se determinó por hibridación en análisis por Southern. Se digirieron alícuotas de 5 µg de ADN genómico durante 16 horas con *Bgl*III y *Cla*I, se separaron en un gel de agarosa del 0,7% en TAE y se transfirieron a una membrana Hybond N+ como se describió en la sección 5.0.

Para determinar el número de copias, las membranas se hibridaron con un fragmento de 700 pb, específico de *ntpII* (ver sección 5.0) marcado radiactivamente con ³²P. Para determinar la calidad de la inserción de ADN-T, la sonda *ntpII* se eliminó de la membrana según el protocolo del fabricante (Amersham) y se hibridó de nuevo con un fragmento de restricción de 0,7 kb específico de *Lc*, obtenido tras la digestión del plásmido pFLAP30 con *Pst*I/*Nco*I. Las condiciones de hibridación y de lavado se describieron en la sección 5.0.

Las enzimas de restricción *Bgl*III y *Cla*I cortan cuatro veces en la región del ADN-T de los transformantes pBBC20 y pBBC30. Respecto del extremo izquierdo, *Bgl*III es el primer sitio de restricción en el ADN-T. Corta inmediatamente antes de del gen *ntpII*, a 1,7 kb del extremo izquierdo (LB). Los fragmentos específicos de *ntpII* que hibridan están flanqueados, en un extremo por este sitio *Bgl*III interno y en el otro extremo por un sitio *Bgl*III genómico, situado en la región que flanquea el LB del ADN-T. Esto dará lugar a bandas de hibridación de diferentes longitudes, dependiendo del lugar de integración, y se puede usar para determinar el número de inserciones de ADN-T en cada planta transgénica.

La enzima de restricción *Bgl*III corta una vez en la región de la fusión génica *Pe8-lc-Trbc* de los plásmidos pBBC20 y pBBC30, en la posición +202 respecto del sitio de inicio de la traducción de *lc*. La enzima de restricción *Cla*I corta inmediatamente después del terminador *rbcS*. La digestión del ADN cromosómico con *Bgl*III/*Cla*I, por tanto, dará lugar a una banda de hibridación de 2,6 kb con la sonda específica de *lc*.

Los resultados de los análisis por Southern se muestran en la Figura 6. (sonda *ntpII*) y en la Figura 7 (sonda *lc*). La planta número 004 es una planta control no transgénica, que no hibrida con ninguna de las sondas utilizadas. Las plantas 5002, 104, 109, y 117 hibridan únicamente con la sonda *ntpII* y no con la sonda *lc*. El resto de las plantas

(series 200 y 300) son transgénicas e hibridan con las dos sondas, *ntpII* y *lc*. El número de copias en estas plantas varía de 1 a 7 (Figura 6). Después de la hibridación con la sonda *lc*, todas las plantas numeradas como 200 y 300, dan una banda de 1,5 kb, que corre en el gel en la misma posición que los plásmidos pBBC20 y pBBC30 digeridos con *BglII/ClaI* (Figura 7). Esto indica que todos los transformantes pBBC20 y pBBC30 analizados contienen, al menos, una copia intacta del gen *Lc*.

Ejemplo 6

Medidas de flavonoides en frutos de tomate

6.1 Crecimiento y recolección de los frutos de tomate

Las plantas de tomate se crecieron en macetas de 10 l en un invernadero en las condiciones estándar de crecimiento. Los frutos se recolectaron cuando estaban totalmente rojos, en el estado de madurez; y también en etapas del desarrollo más tempranas, en el caso de los estudios de desarrollo (Figura 14). Para la discriminación entre los flavonoides de los tejidos de la piel y de la pulpa, la capa externa, de aproximadamente 2 mm de grosor (esto es, la cutícula, la capa epidérmica más algo de tejido sub-epidérmico), se separó del fruto usando un escalpelo; el resto del fruto se clasificó como tejido de la pulpa. Después de la separación, los tejidos se cortaron rápidamente en piezas, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Para los análisis de los niveles de flavonoides en los frutos completos, los frutos rojos se cortaron en cuartos y se tomó un cuarto de cada fruto, que se cortó en piezas y se congeló rápidamente.

6.2 Extracción de flavonoides de los tejidos

Los flavonoides se determinaron como aglicones o como sus glucósidos mediante la preparación de extractos hidrolizados y no hidrolizados, respectivamente.

La preparación de extractos hidrolizados se realizó según Hertog *et al.* (1992) como sigue: Los tejidos congelados de trituraron hasta un polvo fino usando, bien un mortero y una maza, o bien un molinillo de café. Los tejidos de la piel y de la pulpa se liofilizaron durante 24 horas, antes de la extracción de flavonoides. Cuarenta miligramos de este material liofilizado se pesaron y se transfirieron a un tubo de vidrio Pyrex de 10 ml. A cada tubo se le añadieron 1,6 ml de 62,5% de metanol (calidad de HPLC) en agua destilada y 0,4 ml de 6M HCl. Los tubos se cerraron con tapas de rosca que contenían una junta de teflón y se incubaron durante 60 minutos a 90°C en un baño de agua. Después de la hidrólisis, los tubos se enfriaron en hielo, los extractos se diluyeron con 2 ml de 100% de metanol y se sonicaron durante 5 minutos. Para la determinación de los niveles de aglicón en los tomates completos, se pesaron 1,2 g de tejidos congelados molidos (no liofilizados) y se hidrolizaron con 2 ml de 100% de metanol y 0,8 ml de 6M HCl, como se describió anteriormente. Después de la hidrólisis, estos extractos de tomate se diluyeron con 4 ml de 100% de metanol y se sonicaron durante 5 minutos.

Mediante el uso de flavonoides patrón (obtenidos de Apin Chemicals Ltd, Abingdom, UK) se estableció que durante la etapa de hidrólisis, los aglicones se liberaron de sus glucósidos respectivos en un 100%, mientras que la naricalcona (= naringenina calcona) se convirtió químicamente en naringenina en más de un 95%. La recuperación de los patrones de quercetina, canferol y naringenina, añadidos a los extractos de piel y pulpa justo antes de la hidrólisis, fue superior al 90%.

Para la determinación de los glucósidos flavonoides y de naringenina calcona, se añadieron 40 mg de tejido de tomate liofilizado a 4 ml de una disolución acuosa del 75% de metanol acidificada con HCl a pH 2. La extracción tuvo lugar a temperatura ambiente (20-25°C) por mezclado continuo en una banda giratoria durante 2 horas.

6.3 Condiciones de HPLC para el análisis de flavonoides

Después de sonicar, se tomó aproximadamente 1 ml de cada extracto mediante una jeringa desechable y se filtró a través de un filtro desechable de PTFE de 0,2 µm (Inacom Instruments BV, Países Bajos) antes de la inyección en el sistema de HPLC.

El sistema de HPLC constaba de un equipo Waters 600E Multisolvant Delivery System (Waters Chromatography), un autoinyector Promis (Separations Analytical Instruments BV) con un lazo de 10 µl unido y una columna analítica Nova-Pak C₁₈ (3,9 x 150 mm, tamaño de partícula de 4 µm) (Waters Chromatography) protegida por una precolumna Guard-Pak Nova-Pak C₁₈. Ambas columnas se colocaron en un horno para columnas de HPLC, LKB 2155 (Pharmacia Biotech) fijado a 30°C. Se utilizó un detector de fotodiodos (photodiode array detector 996 de Waters) para registrar los espectros de los componentes que eluían de la columna conectada. El detector se estableció para registrar los espectros de absorbancia entre 240 y 600 nm, con una resolución de 4,8 nm, a un intervalo de tiempo de 1 segundo. Se utilizó un equipo Millennium 2010 Chromatography Manager (Waters Chromatography BV) para controlar el sistema de liberación de disolventes y el detector de diodos.

La separación por HPLC de los flavonoides presentes en los extractos hidrolizados (aglicones de flavonol y naringenina) se llevó a cabo en condiciones isocráticas del 25% de acetonitrilo (UV lejano para HPLC) en 0,1% de

ácido trifluoroacético (TFA), a un caudal de 0,9 ml/min. La separación por HPLC de los flavonoides en extractos no hidrolizados (glucósidos de flavonoides y naringenina calcona) se realizó usando un gradiente de acetonitrilo en 0,1% de TFA, a un caudal de 1,0 ml/ml: 5-25% lineal en 30 min; posteriormente 25-30% en 5 min y 30-50% en 2 minutos, seguido por 3 min de lavado con 50% de acetonitrilo en 0,1% de TFA. Después del lavado, la composición del eluyente volvió a las condiciones iniciales en 2 minutos, y la columna se equilibró durante 6 minutos antes de la próxima inyección. La Tabla 2 resume los tiempos de retención, obtenidos con los dos procedimientos distintos de separación por HPLC, de algunos flavonoides patrón.

TABLA 2

Tiempos de retención típicos de algunos flavonoides patrón

flavonoide patrón	longitud de onda (nm) de detección	Tiempo de retención (minutos)	
		condiciones isocráticas	condiciones en gradiente
rutina	360	-	19,2
quercetin-3-glucósido	360	-	19,7
canferol-3-rutinosido	360	-	21,9
miricitina	370	3,0	23,0
quercetina	370	5,1	29,5
naringenina	280	8,3	33,5
naricalcona	360	-	34,8
canferol	370	9,8	35,5

Nota: los picos de las antocianinas serían visibles, normalmente, en espectros a longitudes de onda de 520 a 280 nm. En los experimentos, sin embargo, estos picos no son visibles (véase, por ejemplo, la Figura 25), lo que significa que no se formaron niveles detectables de antocianinas en los tejidos analizados.

Los datos de HPLC se analizaron usando el software de Millennium 2010 Chromatography Manager. El espectro de absorbancia (corregido para la línea base del espectro) y los tiempos de retención de los picos eluidos (con una pureza del pico mayor que un valor umbral de pureza) se compararon con los de flavonoides patrón disponibles comercialmente. Se establecieron curvas dosis-respuesta de quercetina, naringenina y canferol (de 0 a 20 µg/ml) para cuantificar estos compuestos en los extractos hidrolizados de tomate. Los aglicones de quercetina y canferol se detectaron y calcularon a partir de su absorbancia a 370 nm y la naringenina a 280 nm. Los glucósidos de flavonol, así como los de naringenina calcona se detectaron a 360 nm (véase también la Tabla 2). Los niveles de flavonoides en tomates se calcularon, bien respecto al peso seco (para los tejidos de la piel y la pulpa), o bien respecto al peso en fresco (para los tomates completos). Con el sistema de HPLC y de software utilizados, el límite inferior de detección para los flavonoides en los extractos de tomate fue de aproximadamente 0,1 µg/ml, que corresponde a 10 mg/kg de peso seco y a 1 mg/kg de peso en fresco. Las variaciones entre las inyecciones replicadas fueron inferiores al 5%.

Ejemplo 7

Caracterización del contenido de flavonoides en el fruto de tomates transgénicos

7.1 Flavonoides en la piel y pulpa de tomates control

Los datos de HPLC de extractos hidrolizados de frutos rojos de la variedad FM6203 se muestran en la Figura 8. La figura 8a muestra que tanto la quercetina como el canferol están presentes en el tejido de la piel. Contrastando con esto, la Figura 8b ilustra que los extractos hidrolizados del tejido de la pulpa de este fruto contenían únicamente trazas de quercetina sin niveles detectables de canferol. Los cromatogramas obtenidos a 280 nm de los mismos extractos (no mostrados) revelaron un pico grande de naringenina en la piel, pero no en la pulpa.

La Figura 9 muestra el espectro de HPLC de extractos no hidrolizados de este fruto. Se puede observar que sólo un pequeño pico, que corresponde a rutina, estaba presente en la pulpa (Figura 9B). Contrastado con esto, en la piel se detectaron, al menos, cinco glucósidos de flavonol diferentes, así como naricalcona (Figura 9A). Los estudios por RMN probaron que el pico a un tiempo de retención igual a 19,2 minutos era rutina, mientras que el pico a 17,6 minutos era un quercetin-3-trisacarido: rutina con apiosa unidos a la glucosa del rutinósido. El tiempo de retención y el espectro de absorbancia del pico menor, a 19,7 minutos, se correspondían con los de quercetin-3-glucósido, mientras que los del pico a 21,9 minutos se corresponden con canferol-3-rutinosido. El pico pequeño a 25,6 minutos tenía un espectro de absorbancia comparable al del canferol-3-rutinosido, pero su valor a un tiempo de retención mayor indica que es un glucósido de canferol, no conocido todavía. El pico grande, a 34,8 minutos, fue naricalcona. Los aglicones de quercetina y canferol, así como la naringenina (todos ellos presentes en extractos hidrolizados de piel) no se detectaron en ninguno de los extractos no hidrolizados.

Mediante la comparación de las especies de flavonoides en los extractos hidrolizados con las de los extractos no hidrolizados del mismo tejido, se puede concluir que la presencia de quercetina y aglicones de canferol en los extractos hidrolizados resultaban de la hidrólisis de sus glucósidos respectivos; la presencia de naringenina en los extractos hidrolizados de piel resultó de la isomerización de la naricalcona durante la etapa de hidrólisis (véase el Ejemplo 6.2).

Estos datos de HPLC de flavonoides indican que la ruta biosintética de flavonoides es activa en la piel, pero no, o sólo a un nivel muy limitado, en la pulpa del fruto de tomate. Esta conclusión se confirmó mediante análisis de ARNm de tejidos de la piel y la pulpa usando sondas para *chs*, *chi* y *fls*.

7.2 Flavonoides en frutos de plantas de tomate transformadas

Para determinar si las construcciones de pBBC200 y pBBC300 eran capaces de inducir la ruta biosintética de flavonoides en plantas de tomate, se analizó la presencia de flavonoides en la pulpa de los frutos, un tejido que normalmente sólo contiene trazas de flavonoides (véase 7.1), tanto en las plantas transformantes como en las control. Este análisis se realizó mediante HPLC usando extractos hidrolizados. Se analizaron 17 plantas que fueron transformadas con éxito con las construcciones pBBC200 y pBBC300 (esto es, las plantas positivas para *nptII*), junto con 10 plantas control no transformadas ("que han escapado", esto es, plantas que aparecen como *nptII* negativas después de las etapas de transformación y selección con kanamicina). Todas las plantas control, no transformadas, analizadas contenían únicamente una cantidad pequeña de quercetina en los extractos hidrolizados de pulpa de tomate y ninguna de ellas tenía niveles detectables de canferol o de naringenina, como ocurría también con las plantas originales FM6203. De los 17 transformantes analizados, 11 plantas (65%) parecían acumular flavonoides, específicamente del tipo del canferol y de la naringenina, en la pulpa de tomate a niveles detectables. La Figura 10 muestra un ejemplo de los cromatogramas (registrados a 370 nm) obtenidos con una planta control no transformada y con la planta número 3031, que contenía una construcción génica pBBC300. Aunque los extractos hidrolizados de la pulpa de los tomates no transformados contenían sólo un pequeño pico de quercetina (véanse el Ejemplo 7.1 y la Figura 8), el extracto hidrolizado de la pulpa de los tomates transformados contenía un pico claro de canferol (Figura 10), así como uno de naringenina (detectado a 280 nm, no mostrado). La Figura 11 resume los niveles (respecto al peso seco) de canferol, quercetina y naringenina, basados en extractos hidrolizados, en la pulpa de frutos rojos de algunas plantas control y de algunas plantas transformadas con las construcciones génicas pBBC200 o pBBC300. El principal flavonoide presente en los extractos hidrolizados de la pulpa de plantas transformadas fue canferol, seguido por naringenina; una excepción fue la planta número 3035, cuyo extracto hidrolizado de pulpa contenía más naringenina que canferol. La quercetina no aumentó, o sólo lo hizo ligeramente, en estos transformantes. También se observó un incremento en el contenido de canferol en los extractos hidrolizados del tejido de la piel de plantas de tomate transformadas con pBBC200 y pBBC300.

Las Figuras 12 y 29 muestran los niveles de flavonoides (respecto al peso en fresco) en los frutos rojos completos de plantas de tomate control y transformadas. El nivel de flavonoles totales (quercetina más canferol) en frutos de plantas control (barra primera) fue $5,2 \pm 4,3$ mg/kg de peso en fresco (media $\pm$ desviación típica, $n = 10$), con valores que oscilaban entre 1,3 y 12,0 dependiendo de la temporada de cultivo. La quercetina fue siempre el principal flavonol en los frutos de las plantas control. En comparación con el nivel medio en las plantas control, 11 de 13 plantas transformadas con pBBC200 (esto es, el 85%) y 11 de 17 plantas transformadas con pBBC300 (65%) tenían niveles significativamente aumentados, de hasta 75 mg/kg, esto es, un incremento de 15 veces, de flavonoles totales en sus frutos. Los niveles más altos de canferol en los transformantes fueron de aproximadamente 75 mg/kg, un aumento de 75 veces en comparación con los niveles control. Contrastando con el canferol, la quercetina aumentó en unas pocas plantas únicamente y en una extensión mucho menor, de hasta 3 veces el nivel en los controles. El nivel de naringenina, derivada únicamente de la naricalcona presente en la piel, en los frutos control fue de 24 ± 14 mg/kg de peso en fresco (media $\pm$ desviación típica, $n = 10$). El nivel de naringenina, derivada de la naricalcona y de los glucósidos de naringenina, en frutos completos de transformantes (véanse, las Figuras 27 y 25) aumentó significativamente en unas pocas plantas, hasta 2,5 veces el nivel de los frutos control.

Utilizando extractos no hidrolizados, se estudió la forma en la que los flavonoides se acumulaban en los frutos de tomate de las plantas transformadas. Comparando los cromatogramas de HPLC, registrados a 360 nm, de los extractos no hidrolizados de los frutos rojos totales de tomates control y transformados (Figura 26), parece que el nivel de naringenina calcona (pico a un tiempo de retención = 35,9 minutos) decreció en los tomates transformados. Sin embargo, al menos 6 flavonoides distintos, detectables a 360 nm, aumentaron en los frutos de tomates transformados:

picos a tiempos de retención = 13,9; 14,3; 16,1; 22,8; 23,4 y 26,0 minutos. Además de estos 6 compuestos, los cromatogramas de HPLC, registrados a 280 nm (Figura 27), indicaron un aumento de, al menos, otros 5 compuestos flavonoides en los tomates transformados: picos a tiempos de retención = 11,2; 15,2; 21,2; 23,1 y 28,5 minutos. Otros picos que aumentaron en los cromatogramas de frutos transformados (por ejemplo, en la Figura 14: los picos a tiempos de retención = 5,1 y 11,9 minutos) parecían ser picos impuros resultantes de la elución simultánea de componentes todavía desconocidos. Basándose en el comportamiento cromatográfico y al espectro de absorbancia de los picos puros que aumentaron en los frutos transgénicos (Figura 25), se concluye que el componente que eluye a un tiempo de retención de 22,8 minutos es canferol-3-O-rutinósido y que el de 23,1 minutos es naringenina-7-O-ramnoglucósido (= naringenina). Los espectros de absorbancia de los compuestos que eluyen a 13,9; 14,3; 16,1; 23,4 y 26,0 minutos se corresponden muy bien, en todos los casos, con canferol-3-rutinósido, pero sus distintos valores de tiempo de retención indican que son glucósidos de canferol diferentes. Del mismo modo, los compuestos a tiempos de retención = 11,2; 15,2; 21,2 y 28,5 minutos tienen espectros de absorbancia similares a la naringenina, pero sus diferentes valores de tiempo de retención indican que son diferentes de los glucósidos de naringenina.

Los patrones de los cromatogramas (registrados a 360 nm) obtenidos con extractos no hidrolizados de tomate fueron muy similares entre los transformantes de las series pBBC200 y pBBC300. Este resultado indica que todos los transformantes acumulaban las mismas especies de flavonoides a relaciones aproximadamente similares; los transformantes sólo diferían en su nivel de acumulación.

La Figura 13 muestra un ejemplo de cromatogramas, registrados a 360 nm, de extractos no hidrolizados preparados a partir de tejido de la pulpa, únicamente, de los frutos de tomate (quitada la piel). Aunque sólo se detectó rutina en la pulpa de los frutos control, en la pulpa de los frutos transgénicos se detectaron rutina, así como los glucósidos de canferol descritos anteriormente (Figura 26). Los análisis por HPLC de los mismos extractos de la pulpa, a 280 nm (no mostrados), revelaron que, además de estos glucósidos de canferol, se produjeron los glucósidos de naringenina descritos anteriormente (Figura 27) exclusivamente en frutos transgénicos. Estos resultados indican que la ruta biosintética de flavonoides en plantas transgénicas no está restringida a la piel, como en las plantas no transformadas, sino que también es activa en la pulpa de los frutos.

De las 11 especies de flavonoides que aumentaron en los frutos completos de las plantas transgénicas (Figura 26), sólo el canferol-3-rutinósido se encontraba también en los frutos de plantas FM6203 control, aunque sólo en la piel. Así, las plantas de tomate transformadas con pBBC200 y pBBC300 producían exclusivamente (al menos) 6 glucósidos de canferol y 5 glucósidos de naringenina diferentes en la pulpa de sus frutos. Además, excepto por el canferol-3-rutinósido, las especies flavonoides inducidas por pBBC200 o pBBC300 son nuevos productos en los frutos de la variedad FM6203.

La acumulación de flavonoides en los frutos de plantas transformadas fue dependiente del estado de maduración. La Figura 14 muestra que el pico de canferol no fue detectable en extractos hidrolizados de la pulpa de frutos de tomate totalmente crecidos en la etapa verde, fue pequeño en el estado de cambio de color, siendo más alto en el estado rojo. Un aumento similar, dependiente de maduración, se observó para la naringenina (cromatogramas registrados a 280 nm, no mostrados). Este patrón de tiempo de la biosíntesis de flavonoides se correlaciona con el patrón de activación del promotor *e8*, que está presente tanto en las construcciones génicas pBBC200 como en las pBBC300.

En algunas plantas transformadas con pBBC200 o pBBC300 se observó una ligera pigmentación púrpura en los frutos, debida a la acumulación de antocianina, aunque sólo en la etapa verde y en la de cambio de color. El análisis mediante lupa binocular de secciones transversales de estos frutos con color púrpura reveló que la acumulación de antocianina se restringía al tejido de la piel de los frutos. Sin embargo, las antocianinas podrían no detectarse, ni a simple vista ni por análisis por HPLC de los extractos hidrolizados y no hidrolizados, a 520 nm, en los frutos rojos. En contraste con este patrón de producción de antocianina, la producción de glucósidos de canferol y de naringenina en los mismos frutos transgénicos, no se restringía a la piel del fruto y aumentaba durante la maduración del fruto (véase lo anterior). Por tanto, la biosíntesis inducida de flavonoides en los frutos de tomate, como la reivindicada en la presente invención, no está relacionada con la producción de antocianinas.

7.3 La transformación simultánea con *Lc* y *Cl* es esencial para el aumento de los niveles de flavonoides en frutos de tomate

Para analizar si *Lc* y *Cl* en solitario podrían, asimismo, inducir la biosíntesis de flavonoides en frutos de tomate, la variedad FM6203 se transformó también con los plásmidos pBBC10, pBBC20 y pBBC30 que contenían las construcciones con único gen regulador, *d35s-cl*, *e8-lc* sin la secuencia líder y *e8-lc* más la secuencia líder, respectivamente. Los extractos hidrolizados se prepararon a partir de frutos rojos y se analizaron por HPLC como se describe en el Ejemplo 6. La Figura 28 muestra que los frutos de las plantas transformadas sólo con *Cl* (plantas numeradas de 101 en adelante) o sólo con *Lc* (plantas numeradas como de 201 y de 301 en adelante, para las plantas sin y con secuencia líder, respectivamente), tenían niveles de flavonoles totales (quercetina más canferol) en el intervalo de 1,2 a 8 mg/kg de peso en fresco, esto es, en el intervalo de los frutos control (1,8 a 8,8 mg/kg de peso en fresco). Estos datos indican que la transformación de las plantas de tomate con, bien *Cl* o bien *Lc* (con o sin secuencia líder), no resultaban en niveles aumentados de flavonol en sus frutos. Contrastando con esto, los frutos de las plantas que contenían los dos genes reguladores, después de la transformación con pBBC200 o pBBC300 (numerados de 2000 y de 3000 en adelante), tenían niveles significativamente aumentados de flavonoles en sus frutos, en comparación tanto con las plantas control como con las plantas transformadas con las construcciones de un único gen. Este aumento de flavonoles fue

debido, principalmente, a la acumulación de canferol (Figura 29). Como es evidente, la presencia de dos genes de factores de transcripción, tales como *Cl* y *Lc*, es esencial para la producción aumentada de flavonoides en frutos de tomate.

Similarmente, el nivel de flavonoles se puede medir en las hojas de tomates transformados. Se observó que los niveles de flavonoles en las hojas aumentaron hasta seis veces, en comparación con el control, y que la mayoría estuvieron en un nivel inferior al nivel de flavonoles en la pulpa del fruto. En ninguno de los casos se detectaron dosis letales de flavonoles, lo que se podría explicar por el hecho de que se usó un promotor específico del fruto que, aunque aparentemente no evita totalmente la formación de flavonoles en las hojas, limita los niveles a dosis no letales.

Ejemplo 8

Análisis de la expresión del transgen en las plantas transgénicas

La expresión de los genes *Cl* y *Lc* introducidos en las plantas de tomate transgénicas obtenidas, se analizó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real, usando el ensayo de la nucleasa 5' fluorogénica realizado con el kit de reactivos de PCR Taqman en un sistema de detección de secuencia ABI PRISM 7700 (Perkin-Elmer/ABI). El principio de este procedimiento es como sigue: El ADNc se obtuvo a partir de ARN total, extraído de la fuente de interés, mediante transcripción inversa. La expresión del gen diana se monitoriza en una reacción de PCR a la que se añade una sonda fluorogénica, que consta de un oligonucleótido al que se han unido un colorante indicador y uno amortiguador, que hibrida específicamente entre los cebadores directo e inverso. Cuando la sonda se escinde por la actividad de la nucleasa 5' de la ADN polimerasa, el colorante indicador se separa del amortiguador y se genera una señal específica de secuencia. Con cada ciclo, moléculas adicionales de colorante indicador se escinden de sus sondas respectivas, y se monitoriza la intensidad de fluorescencia durante la reacción de PCR. El ciclo de PCR en el que la fluorescencia alcanza un valor umbral determinado es una medida del número de copias de partida del ARN diana. Esto se puede cuantificar analizando una serie de patrones con cantidades conocidas del gen diana.

Las plantas siguientes se seleccionaron para su análisis con Taqman: plantas transformadas con el plásmido pBBC10 (*p35s-cl-Tnos*), números 104, 109 y 117; plantas transformadas con el plásmido pBBC20 (*Pe8-lc⁻-Trbc*), números 201, 204 y 209; plantas transformadas con pBBC30 (*Pe8-lc⁺-Trbc*), números 302 y 305; plantas transformadas con pBBC300 (*P35s-cl-Tnos/Pe8-lc⁺-Trbc*), número 3031; y plantas transformadas con el plásmido pBBC250 (*Pe8-cl-Tnos/Pe8-lc⁻-Trbc*), números 2509, 2511 y 2519. En el plásmido pBBC250, tanto el gen *Cl* como el gen *Lc*, se expresan bajo el control del promotor *e8* específico del tomate. El plásmido pBBC250 se representa en la Figura 20 y se puede preparar de forma análoga a los plásmidos pBBC200 y pBBC300, numerándose los transformantes con el plásmido pBBC250 como 2500-2999.

El ARN total se aisló a partir de los frutos rojos de las plantas de tomate transgénicas. La primera cadena de ADNc se sintetizó a partir de 350 ng de ARN total por transcripción inversa. Se usaron alícuotas de 100 ng de ADNc en tres reacciones de PCR Taqman con las sondas *cl*, *lc* y *cyp*, respectivamente. El gen de la ciclofilina (*cyp*) se expresa de forma constitutiva en los frutos del tomate, como se observa mediante análisis por northern, y, por tanto, se puede usar como un control interno. Como patrones se utilizaron cantidades conocidas del plásmido pFLAP300 y un fragmento de PCR de 0,4 kb de ciclofilina, obtenido por RT-PCR de ARN de frutos de tomate con los cebadores CYP1S y CYP2A (Tabla 1). Las secuencias de los cebadores para la reacción con taqman y de las sondas usadas están enumeradas en la Tabla 4.

Para las tres combinaciones de cebador-sonda, se determinó el número de moléculas de ARNm específicas presentes en cada muestra y se expresó respecto a la cantidad del ARNm de *cyp*. La cantidad absoluta de ARNm de *cyp* varió menos de 2,5 veces entre las diferentes plantas transgénicas, lo que indicó que este gen puede, verdaderamente, funcionar como un control interno. Como se muestra en la Figura 21, la planta control 004 no dio señal con la sonda *Cl*, ni con la sonda *Lc*. Contrastando con esto, todas las plantas transgénicas analizadas mostraron una clara expresión de los transgenes introducidos: las plantas con un único gen *Cl* (104, 109 y 117) sólo mostraron expresión del gen *Cl*, las plantas con un único gen *Lc* (201, 204, 209, 302 y 305) sólo mostraron expresión del gen *Lc* y todas las plantas con los dos genes *Cl/Lc* analizadas (2509, 2511, 2519 y 3031) mostraron expresión de *Cl* y *Lc*. Aunque el nivel de expresión de los genes *Cl* y *Lc* en algunas plantas transgénicas con un único gen es mayor que los niveles encontrados en algunas plantas con dos genes, no se observa, sin embargo, un aumento detectable en el nivel de canferol (Figura 21). Esto indica que se requiere la expresión conjunta de *Cl* y *Lc* para regular positivamente la ruta de los flavonoides en frutos de tomate y permitir una producción aumentada del flavonol canferol.

TABLA 4

Resumen de los cebadores de Taqman y las sondas usadas

Cebador/sonda (*)	Gen	Secuencias (5' a 3')
C1F	C1	GCCCTGGCGTCGTTTCT
C1R	C1	TGGACATCTATACGTGTACTTGTGTCTAC
C1T (*)	C1	CTCCGCTGTCAGACGGCCGG
LCF	Lc	CGGGAGCAGCACAGGAAAT
LCR	Lc	GTCGCTTTCGCTCCGACAT
LCT(*)	Lc	TGGCACTGGCACCAAGAACCACG
CYPF	cyp	GAGTGGCTCAACGGAAAGCA
CYPR	cyp	CCAACAGCCTCTGCCTTCTTA
CYPT (*)	cyp	ACATCCATGCCTTCAACAACCTTGTCCAA

(*) Sondas de Taqman marcadas fluorescentemente.

Ejemplo 9

Los frutos de tomate con niveles de flavonoides aumentados por transformación con Lc y C1 presentan una actividad antioxidante aumentada

Ya que los efectos beneficiosos postulados de los flavonoides en la dieta humana se deben, al menos en parte, a sus características antioxidantes, se analizó si las plantas de tomate con niveles aumentados de flavonoides en sus frutos tenían también actividades antioxidantes aumentadas.

Se pesaron 0,6 g FW de frutos totales (material triturado de un grupo de 3 frutos rojos por planta) de 3 controles y de 3 transformantes independientes (números 3031, 3059 y 3060, como se describió anteriormente), se extrajeron en 2 ml de 70% de metanol sonicando durante 30 minutos, y se filtraron (0,2 μ m). La capacidad antioxidante se determinó analizando la capacidad de los extractos para reaccionar con un radical catión de ABTS coloreado (ácido 2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico]), esencialmente como describen Miller y Rice-Evans (1997). La solución madre de radical ABTS, generada con persulfato potásico, se diluyó en 5 mM fosfato potásico (pH 7,4), que contenía 250 mM NaCl, justo antes de su uso, obteniéndose una solución de trabajo con un valor de absorbancia, medido a 734 nm, de 1,240. La actividad antioxidante de los extractos de tomate se analizó añadiendo 10 μ l de extracto a 990 μ l de solución de trabajo de radical ABTS, mezclando durante 30 segundos y leyendo la absorbancia a 734 nm, exactamente 1 minuto después de la adición del extracto. Se preparó una curva de calibración de trolox (0-20 nmoles) para calcular los valores de capacidad antioxidante equivalentes a trolox (valores TEAC) de los extractos de tomate. La variación entre los replicados fue siempre menor del 7%.

Los valores TEAC de los extractos de tomate control fue 2513 ± 409 μ moles/kg FW (media $\pm$ desviación típica de 3 plantas). En comparación con los valores control, los valores TEAC de las plantas transgénicas aumentaron en un 20% en 3031, 40% en 3059 y 64% en 3060. La Figura 22 muestra que los valores TEAC de los frutos estaban estrechamente relacionados con los niveles totales de flavonoides en estos frutos, tanto en las plantas control como en las transgénicas. Este resultado sugiere que el aumento en la actividad antioxidante observado en los frutos de las plantas transformadas con *lc/c1* fue el resultado de una biosíntesis de flavonoides aumentada.

Ejemplo 10

Propiedades de las pastas de tomate preparadas a partir de los tomates transformados de la invención

Este ejemplo demuestra que la sobre-expresión de factores de transcripción en tomate puede mejorar propiedades de importancia comercial, tales como la consistencia de la pasta, lo que conduce a pastas más espesas al mismo nivel de uso de los frutos.

ES 2 301 234 T3

En este ejemplo se incluyen los datos de cinco preparaciones de pasta independientes. Las pastas 1 y 2 proceden de plantas de la generación T1 (esto es, una población derivada de semillas de la planta transgénica primaria 2059 autopolinizada). Las pastas 3, 4 y 5 derivan de las plantas homocigotas T2.

10.1. *Material vegetal*

10.1 *Crecimiento*

Las semillas de las plantas de tomate transgénicas primarias 2059, con un único inserto, autopolinizadas, se sembraron en superficies de tierra en un invernadero, bajo condiciones de luz como las del Ejemplo 1. Las plántulas que habían retenido el transgen pBBC300 se seleccionaron mediante PCR, usando el par de cebadores específicos del transgen, F69/F72 (Tabla 1). Las plantas positivas para el transgen en análisis por PCR se denominaron 2059+. Las plantas control, negativas en PCR, que habían perdido el transgen pBBC300 por segregación, se denominaron 2059-. También, se plantó como control la línea parental FM6203.

Después de la selección por PCR, las plántulas de 16-20 días de edad se transfirieron a un sistema hidropónico automático de alimentación y riego.

Las semillas de las plantas T1 homocigotas, autopolinizadas, se plantaron en superficies de tierra en un invernadero. Las semillas de 16-20 días de edad se transfirieron a un sistema hidropónico automático de alimentación y riego.

Los frutos se recolectaron entre los días 18-21 posteriores al inicio del cambio de color (el cambio representa la etapa en la que aparece el primer tono naranja en la fruta en desarrollo). Los frutos se usaron para la producción de pasta en las 2-4 horas siguientes a la recolección.

10.2 *Preparación de pasta de tomate*

Se cortaron 450-850 g de fruta en dados (15 mm) y se calentaron en un horno microondas (potencia máxima), en un recipiente de Pyrex, durante tiempos de 4, 2 y 1 minutos, agitando entre cada periodo de calentamiento. La pulpa se enfrió a temperatura ambiente sobre hielo derretido y le se añadió agua hasta que esta pulpa de tomate cocinada alcanzó su peso húmedo original. El jugo enfriado se tamizó a través de mallas de 1400 y 710 μm , en las que normalmente ocurría una pérdida (semillas + piel) de aproximadamente el 10-14%.

Una cantidad pesada del jugo obtenido caliente se centrifugó a 5.000 rpm durante 5 minutos, se decantó el suero y se determinaron los pesos del suero y del precipitado (relación suero/precipitado). La relación suero/precipitado es una medida del grado de ocupación de partículas (cuanto más espesa es la pasta, menor es la relación suero/precipitado). Las pastas preparadas usando los tomates de la línea 2059+ poseían relaciones suero/precipitado consistentemente más bajas que las preparadas a partir, bien de la línea 2059-, o bien de la parental FM6203 (Figura 23).

Las pastas se reconstituyeron mezclando de nuevo una porción del suero (normalmente de hasta el 75% del peso del jugo) con el precipitado y dejándolas un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente para que las partículas se rehidratarán.

El índice de Bostwick representa un patrón industrial para medir la viscosidad de las pastas. Aproximadamente 100 g de esta pasta del 75% (preparada como se describió anteriormente) se colocó en la cámara del calibrador de Bostwick, se abrió la barrera y se registró la distancia (en cm) sobre la que fluía la pasta durante 30 segundos. Las pastas con un valor de Bostwick, bajo tienen una viscosidad alta y viceversa.

Las pastas preparadas con tomates derivados de la línea 2059+ poseían valores de Bostwick consistentemente más bajos que las preparadas con 2059- o con la línea parental FM203 (Figura 24).

Estos resultados muestran que las líneas de tomate de la invención proporcionan propiedades ventajosas a los productos de tomate, por ejemplo pueden proporcionar un aumento del espesor de productos tales como las pastas de tomate.

Ejemplo 11

La transformación de las plantas de tomate con Lc y C1 aumenta la producción de metilsalicilato en los frutos

Se analizaron los efectos de los genes reguladores *lc* y *c1* sobre la producción de compuestos volátiles elaborados por los frutos de tomate, usando microextracción en fase sólida (SPME) y cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (GC-MS).

En un vial de vidrio de 4 ml, se pesaron 0,5 g de material congelado (respecto del peso en fresco) de los frutos rojos completos molidos. Después de la descongelación, el material de los frutos se incubó a temperatura ambiente con agitación suave durante 5 minutos, para que tuvieran lugar las reacciones enzimáticas. La reacción se paró por adición de 0,37 g de CaCl_2 sólido y el vial se cerró rápidamente con una tapa acodada abierta, con una junta de teflón. El vial se colocó en un baño de agua a 50°C encima de un dispositivo de agitación. Tras 10 minutos de preincubación,

a la vez que se agitaba, se recogieron muestras de los compuestos volátiles en el espacio de cabecera durante 15 minutos, usando SPME con una fibra de sílice recubierta con 100 μm de polidimetilsiloxano (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA). Los compuestos volátiles atrapados se identificaron por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) según Verhoeven *et al.* (1997).

La Figura 30 muestra cromatogramas típicos de GC-MS de compuestos volátiles producidos por tomates rojos de plantas FM6203 no transformadas y transgénicas. La producción de metilsalicilato se mostró significativamente más alta en extractos de frutos de plantas que expresan tanto *Lc* como *CI*: su área del pico, expresada como cuentas de iones totales $\times 10^6$, en plantas control fue $9,2 \pm 1,6$ (media $\pm$ desviación típica, $n = 2$), mientras que en plantas transformadas independientemente con *Lc* y con *CI* estaba en el intervalo de 17,2 a 32,2 (media $\pm$ desviación típica: $29,6 \pm 11,4$; $n = 3$). Contrastando con esto, la producción de metilsalicilato no cambió en frutos de plantas que expresan sólo *lc* (Figura 30B): en estas plantas transgénicas la media $\pm$ desviación típica del área del pico fue $10,8 \pm 2,1$ ($n = 2$). De las dos plantas analizadas que expresan sólo *ci* en sus frutos, una tenía un nivel comparable al de las plantas control no transformadas, mientras que la otra (Figura 30C) producía metilsalicilato de forma similar a las plantas que expresaban tanto *CI* como *Lc*. Los solicitantes, por tanto, especulan que el aumento en la producción de metilsalicilato en los frutos de las plantas transformadas con los genes reguladores *Lc* y *CI* se debe principalmente a la acción de *CI*.

Se encontró un aumento significativo del nivel de metilsalicilato en los tomates de la invención, en comparación con los frutos control. El metilsalicilato es una molécula de señalización volátil, clave en la respuesta a lesiones por patógenos en plantas. Su biosíntesis mediante la ruta del fenilpropanoide implica probablemente al ácido benzoico como precursor.

Sorprendentemente, la inserción combinada de *Lc* + *CI* no sólo proporciona niveles aumentados de flavonoides, sino también niveles aumentados de metilsalicilato y, por ello, ofrece posibilidades para el diseño selectivo de plantas que produzcan niveles alterados de compuestos de aroma dirigidos y nuevos materiales alimenticios aromatizados.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir una planta que presenta niveles aumentados de flavonoles que comprende la
5 incorporación en dicha planta de: (i) un gen que codifica un factor de transcripción de tipo *myb*, implicado en el control
de la biosíntesis de flavonoides, operativamente unido a un promotor funcional en una célula vegetal; y (ii) un gen que
codifica un factor de transcripción de tipo *myc*, implicado en el control de la biosíntesis de flavonoides, operativamente
unido a un promotor funcional en una célula vegetal; de forma que la planta esté transformada establemente con cada
uno de estos genes; en el que la planta es una planta de tomate y en el que el factor de transcripción de tipo *myb* es el
10 factor de transcripción *CI* del maíz y el factor de transcripción de tipo *myc* es el factor de transcripción *Lc* de maíz.

2. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que, al menos, uno de los genes
que codifica un factor de transcripción está operativamente unido a un promotor no constitutivo y/o a un promotor
específico de tejido.

15 3. Un procedimiento según la reivindicación 2, en el que el gen que codifica el factor de transcripción *CI* del maíz
está operativamente unido al promotor constitutivo doble 35S del virus del mosaico de la coliflor y el gen que codifica
el factor de transcripción *Lc* del maíz está operativamente unido al promotor *E8*, específico del fruto del tomate.

20 4. Una planta que tiene un gen que codifica un factor de transcripción de tipo *myb*, implicado en el control de
la biosíntesis de flavonoides y un gen que codifica un factor de transcripción de tipo *myc*, implicado en el control
de la biosíntesis de flavonoides, transformados establemente en su genoma de forma que su capacidad para producir
flavonoles está aumentada, siendo la planta una planta de tomate y en la que en el que el factor de transcripción de tipo
myb es el factor de transcripción *CI* del maíz y el factor de transcripción de tipo *myc* es el factor de transcripción *Lc*
25 de maíz.

5. Una planta que comprende una construcción de ADN que comprende secuencias que codifican un gen que
codifica un factor de transcripción de tipo *myb*, implicado en el control de la biosíntesis de flavonoides, y un gen que
codifica un factor de transcripción de tipo *myc* implicado en el control de la biosíntesis de flavonoides, estando cada
30 uno de estos genes operativamente unido a un promotor funcional en una célula vegetal, siendo la planta una planta
de tomate y en la que el factor de transcripción de tipo *myb* es el factor de transcripción *CI* del maíz y el factor de
transcripción de tipo *myc* es el factor de transcripción *Lc* de maíz.

35 6. Una planta según la reivindicación 5, en la que los genes están presentes como componentes operativamente
unidos en un módulo de expresión, comprendiendo cada unidad un promotor funcional en una célula vegetal, un gen
que codifica uno de los factores de transcripción mencionados y una región de terminación de la transcripción y de la
traducción, funcional en una célula vegetal.

40 7. Una planta según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que es una planta de tomate que tiene niveles
aumentados de flavonoides en la pulpa del fruto.

8. Las semillas, los frutos, la progenie y los híbridos de una planta según una cualquiera de las reivindicaciones 5
a 7, **caracterizada** porque comprende la construcción de ADN de la reivindicación 5.

45 9. El uso de una planta según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 en la preparación de un producto
alimenticio o de un producto protector de la piel o el cabello.

10. El uso de una planta de tomate según la reivindicación 7 en un procedimiento para aumentar el espesor de las
pastas de tomate, usando tomates de dicha planta como un ingrediente de las mismas.

Fig.1.

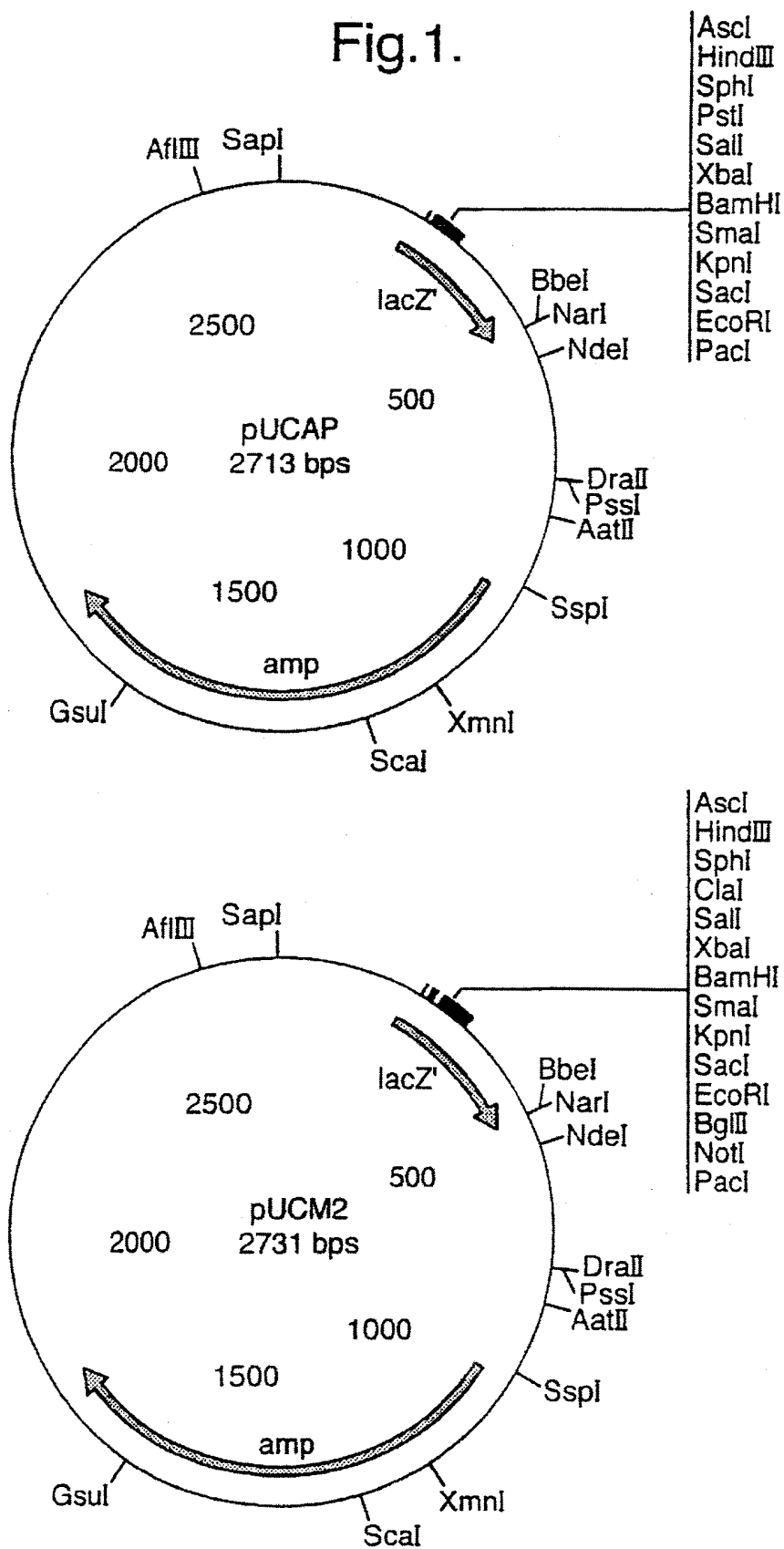


Fig.1 (Cont).

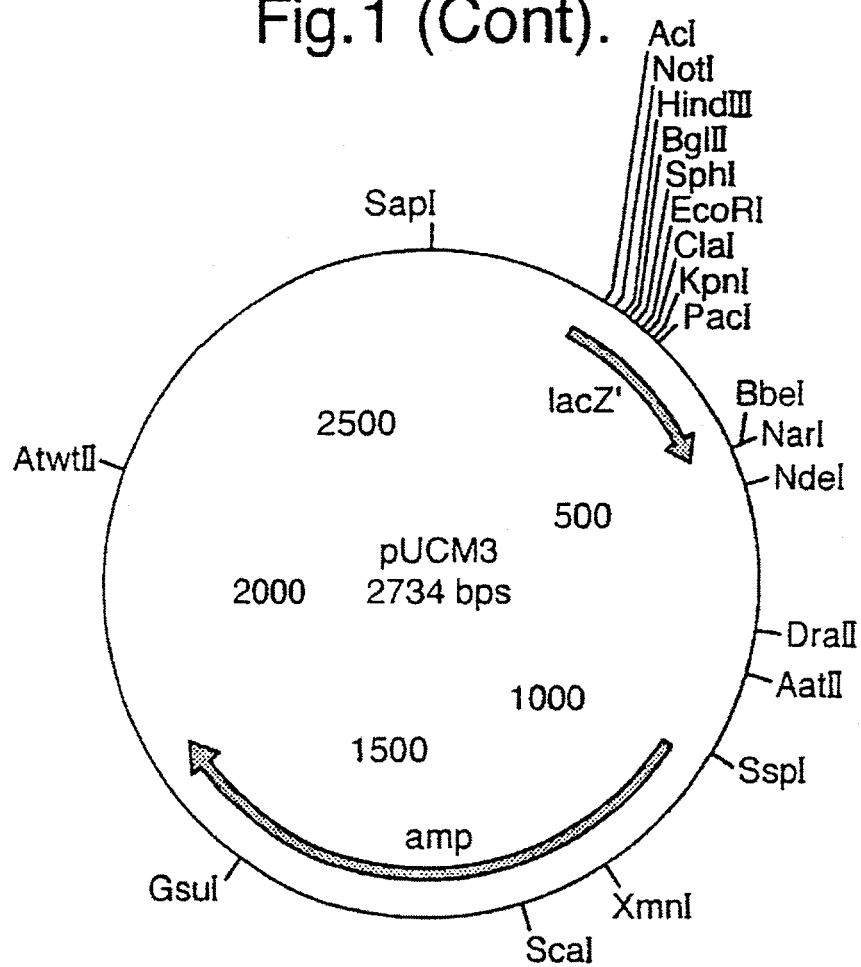


Fig.2.

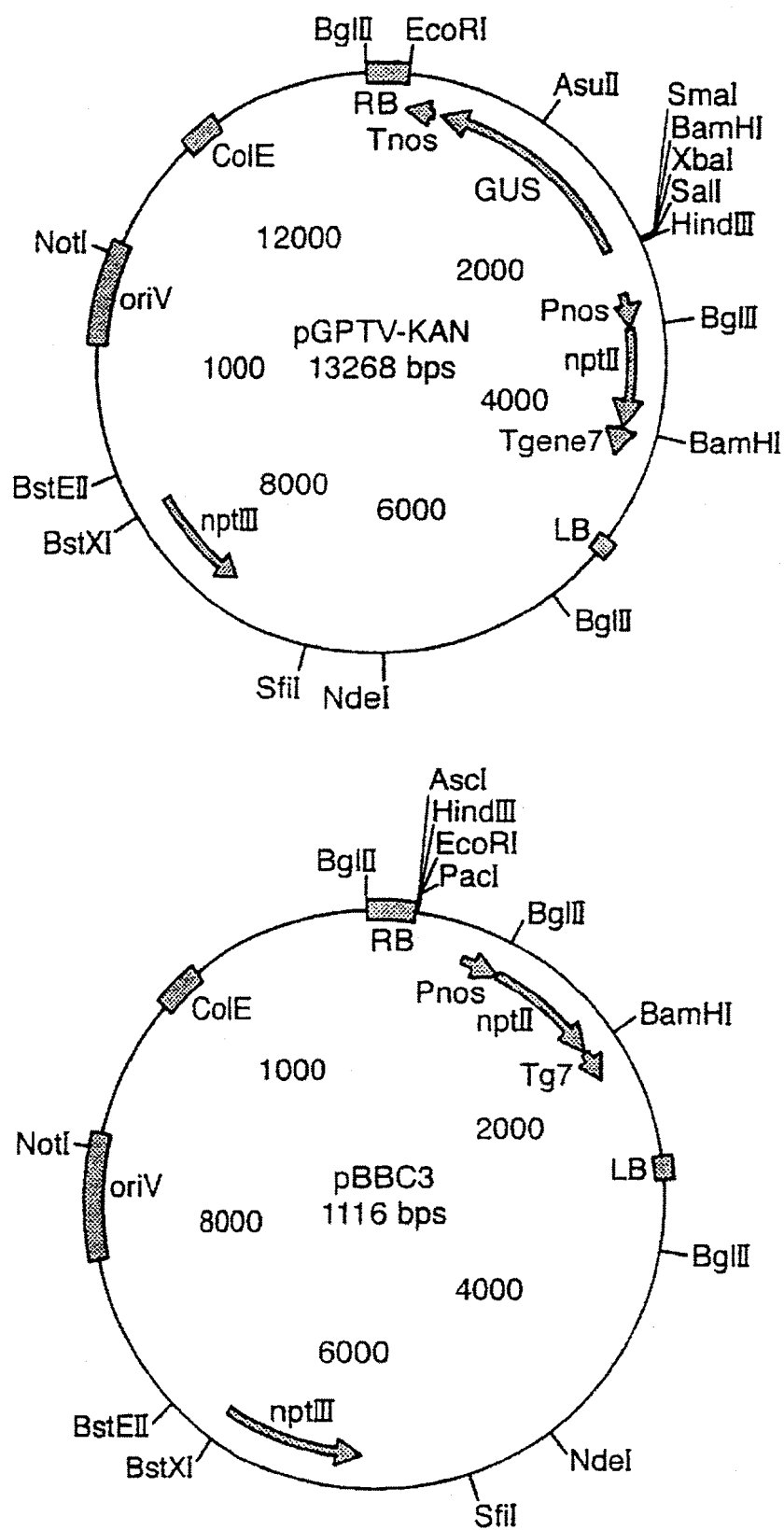


Fig.3(a).

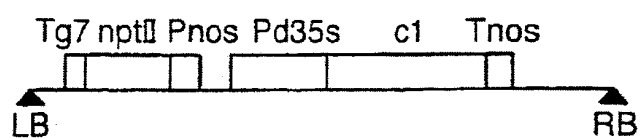


Fig.3(b).

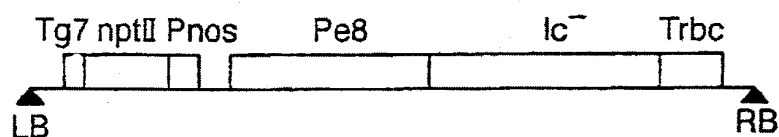


Fig.3(c).

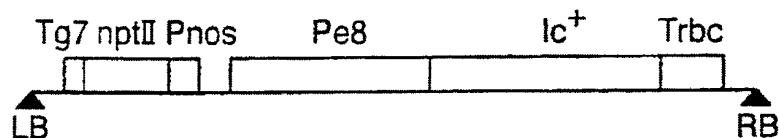


Fig.3(d).

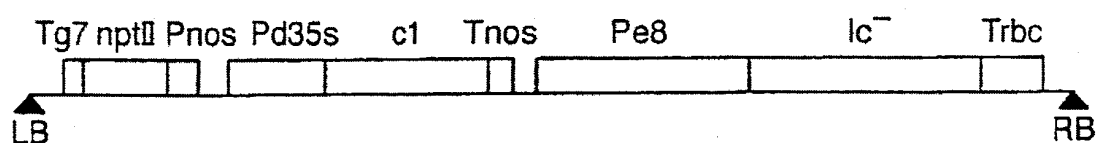


Fig.3(e).

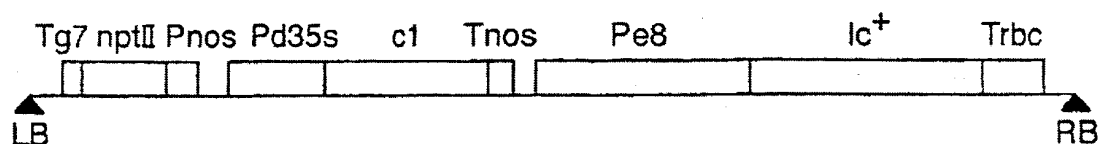


Fig.4.

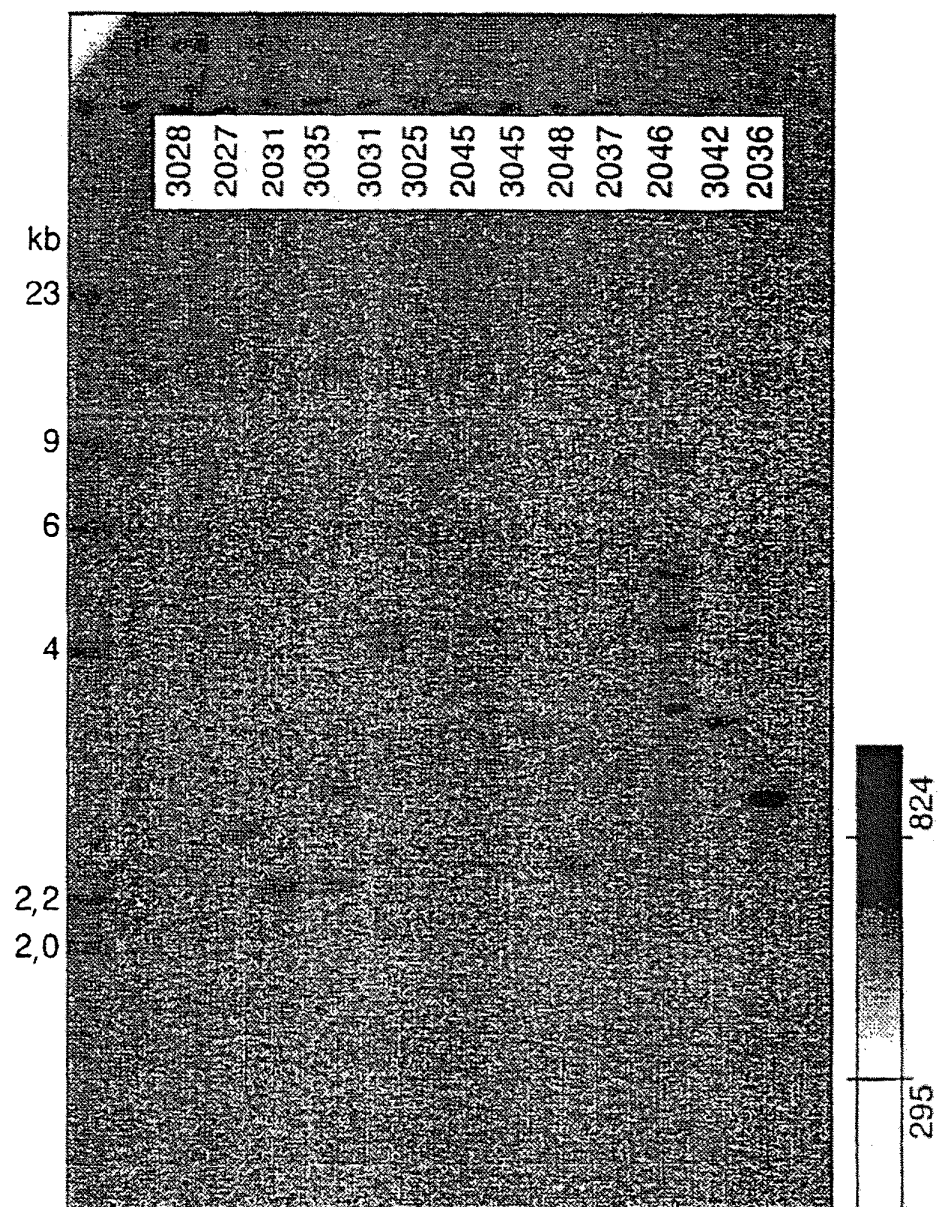


Fig.5(a).

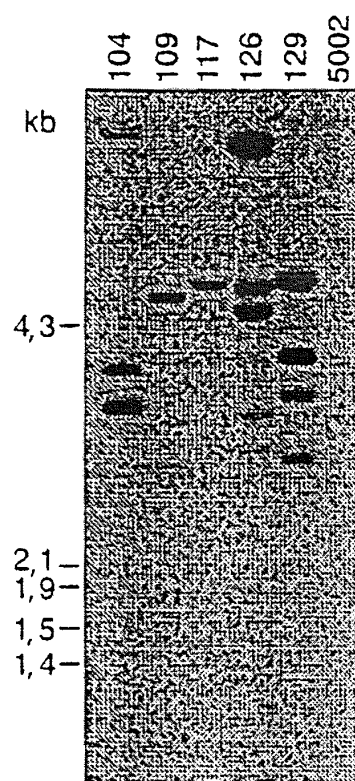


Fig.5(b).

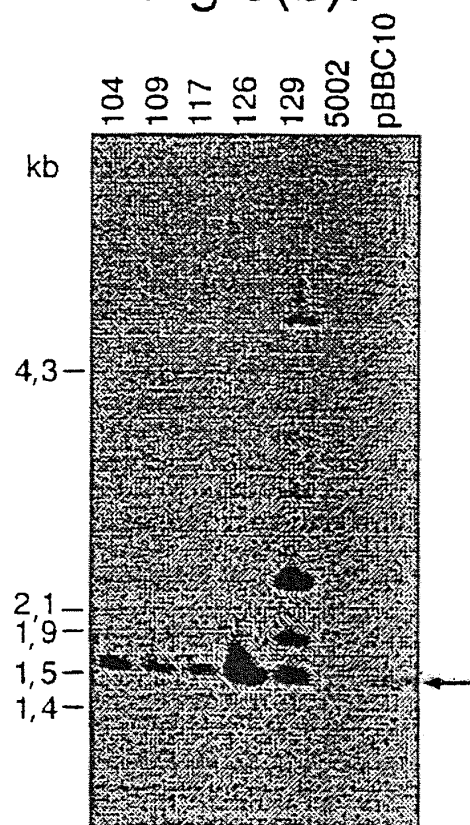


Fig.6.

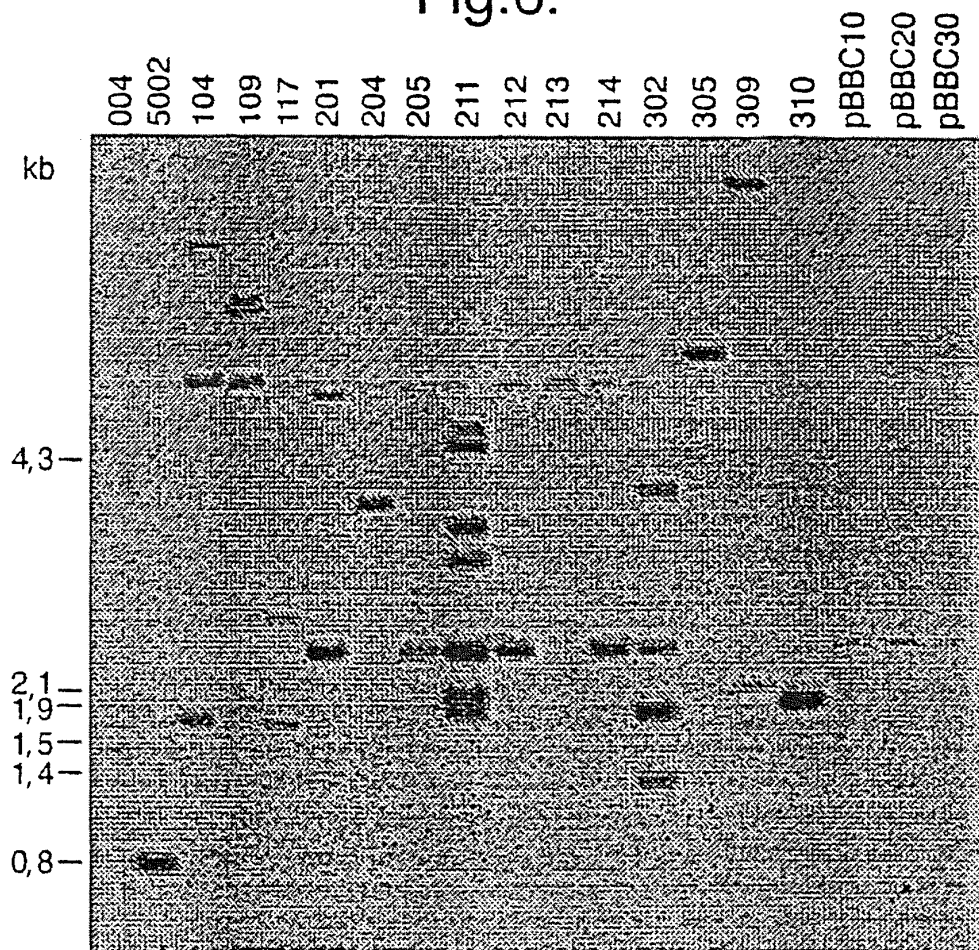


Fig.7.

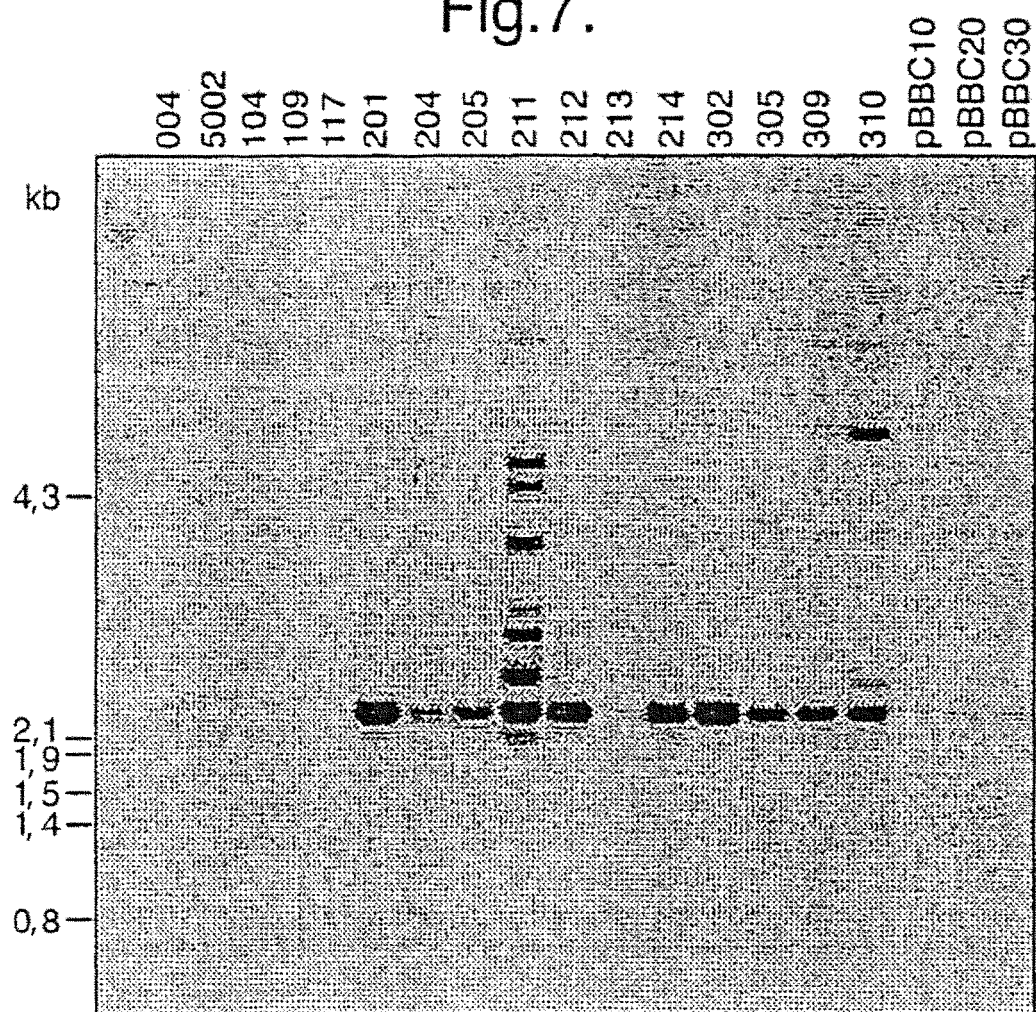


Fig.8(a).

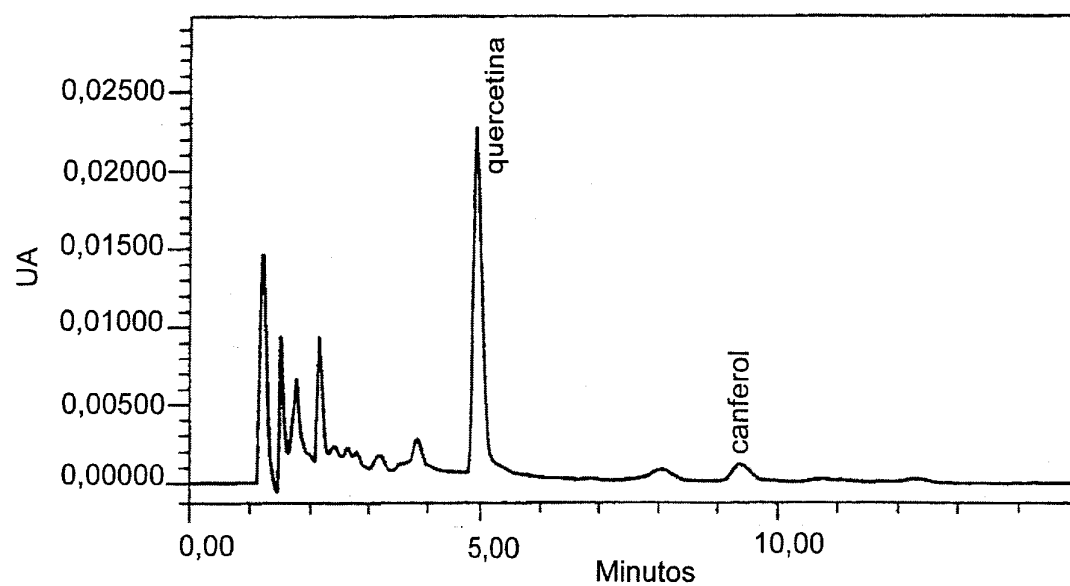


Fig.8(b).

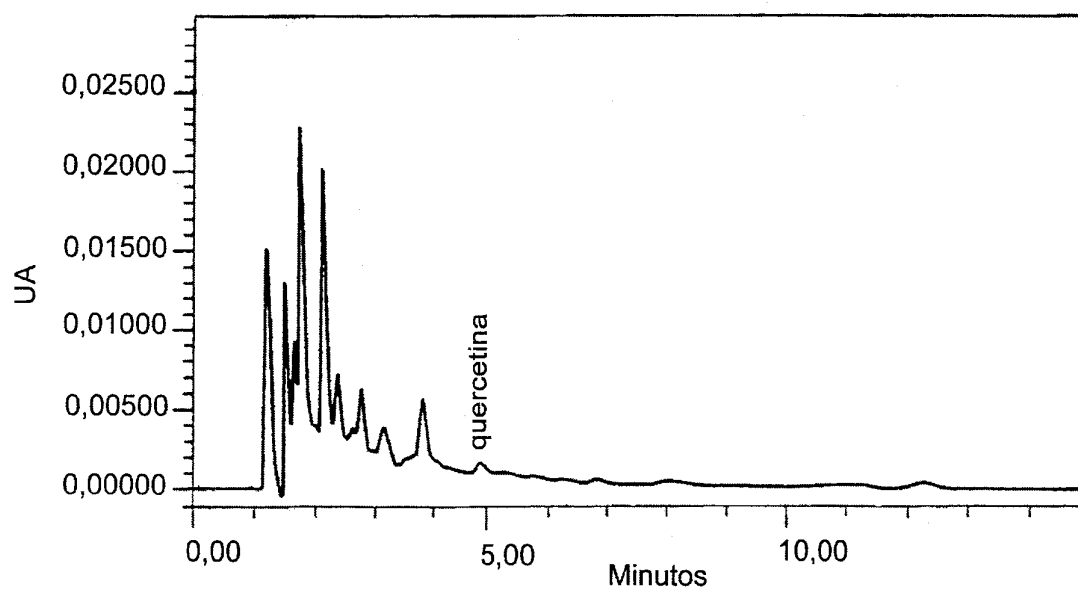


Fig.9(a).

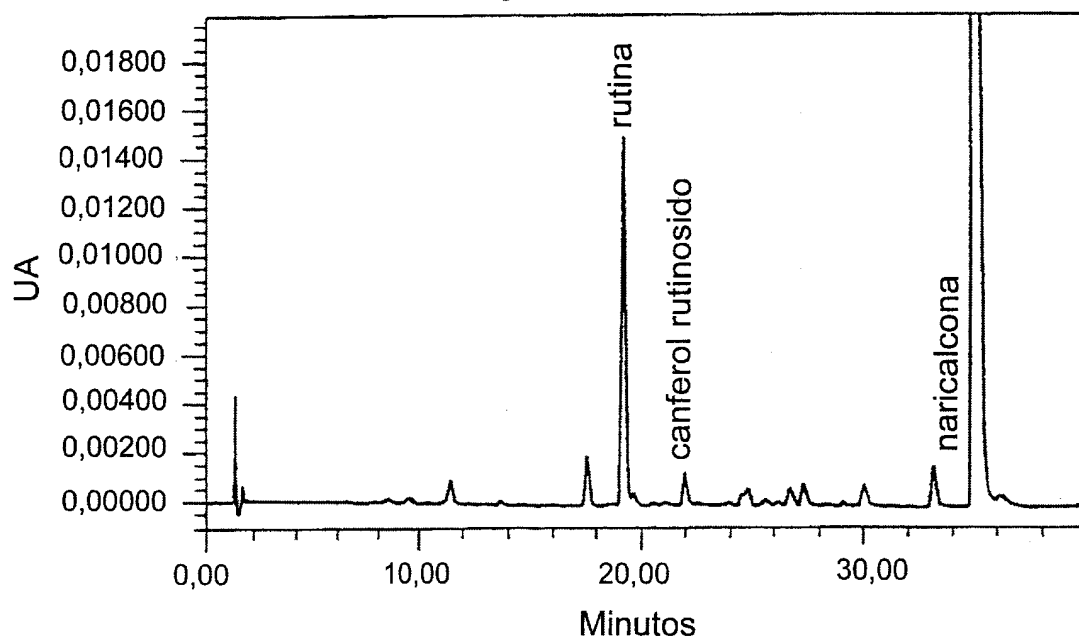


Fig.9(b).

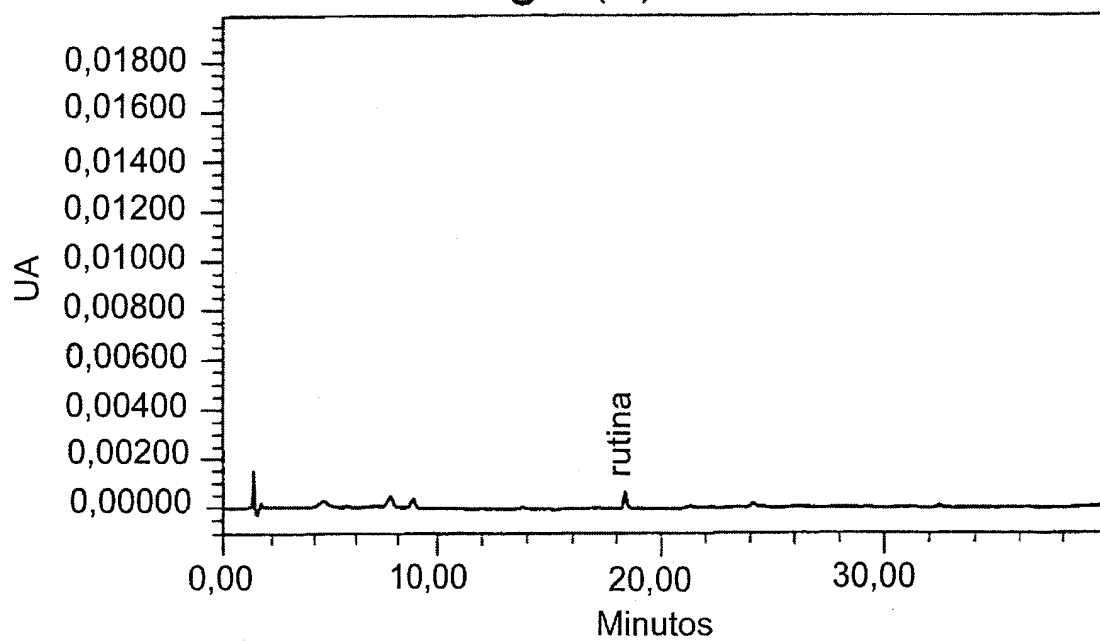


Fig.10(a).

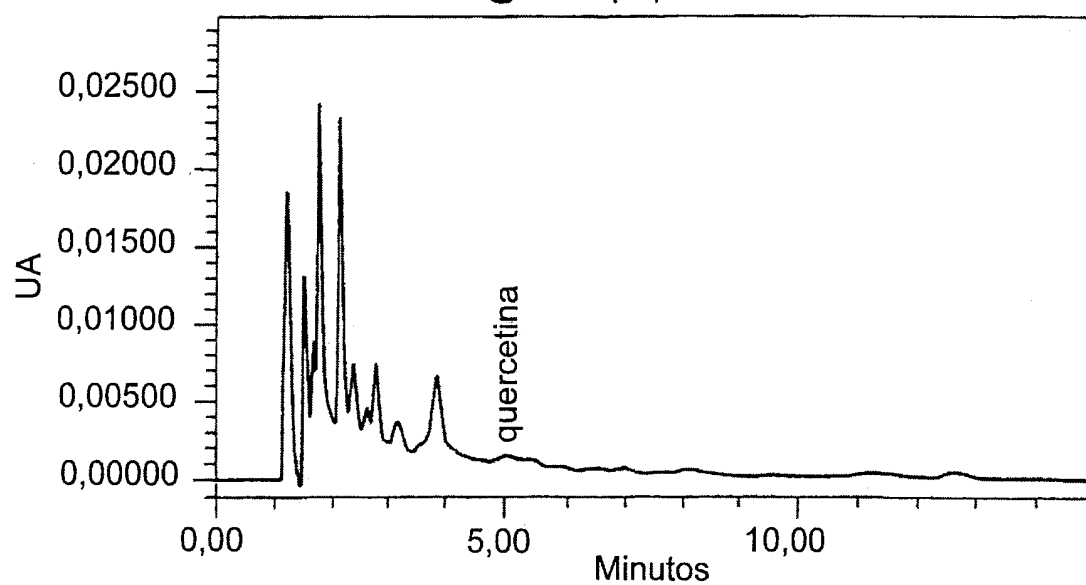


Fig.10(b).

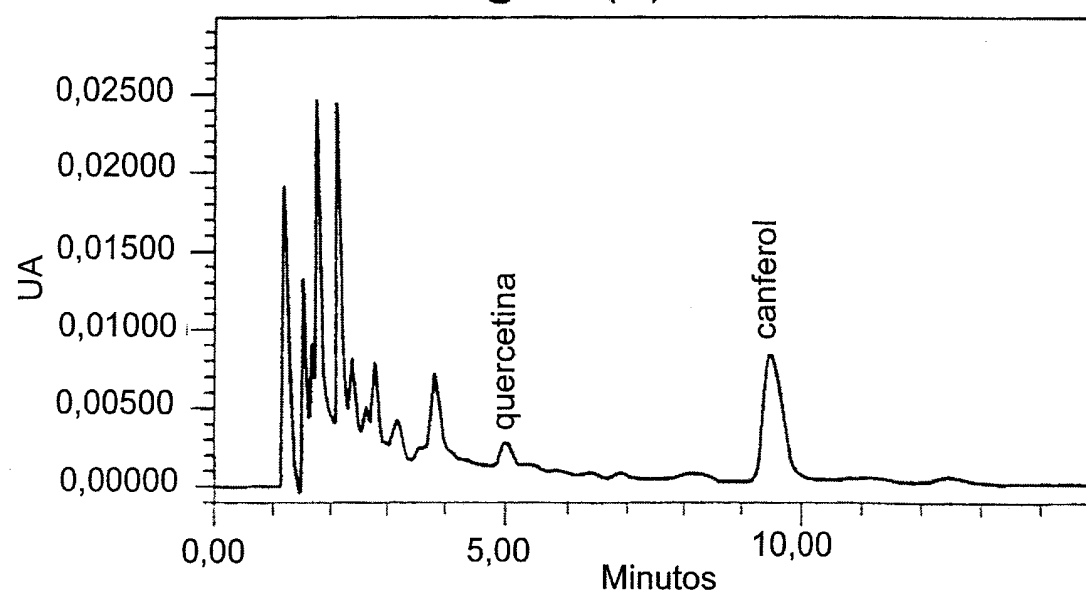


Fig.11.

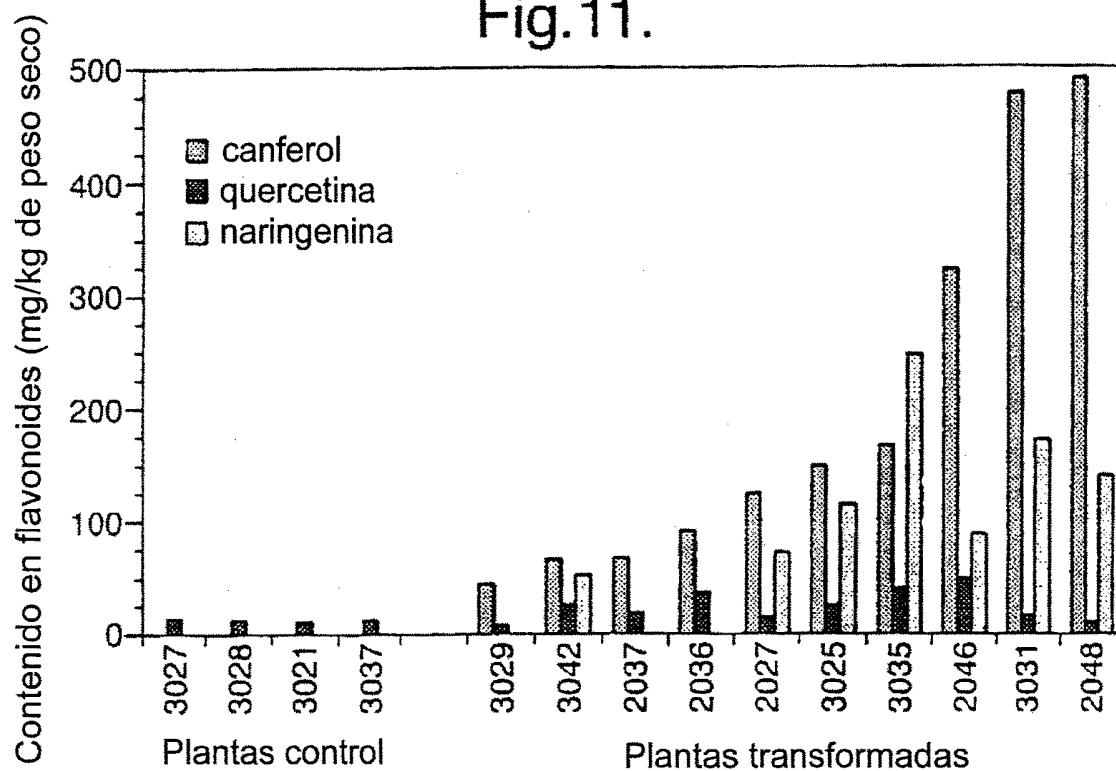


Fig.12.

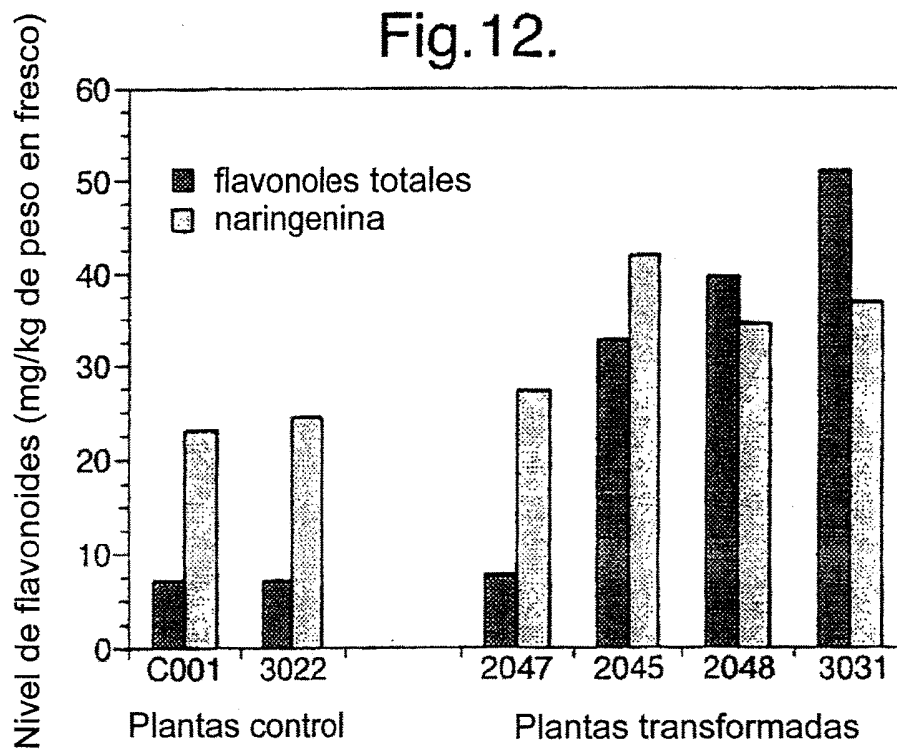


Fig.13(a)

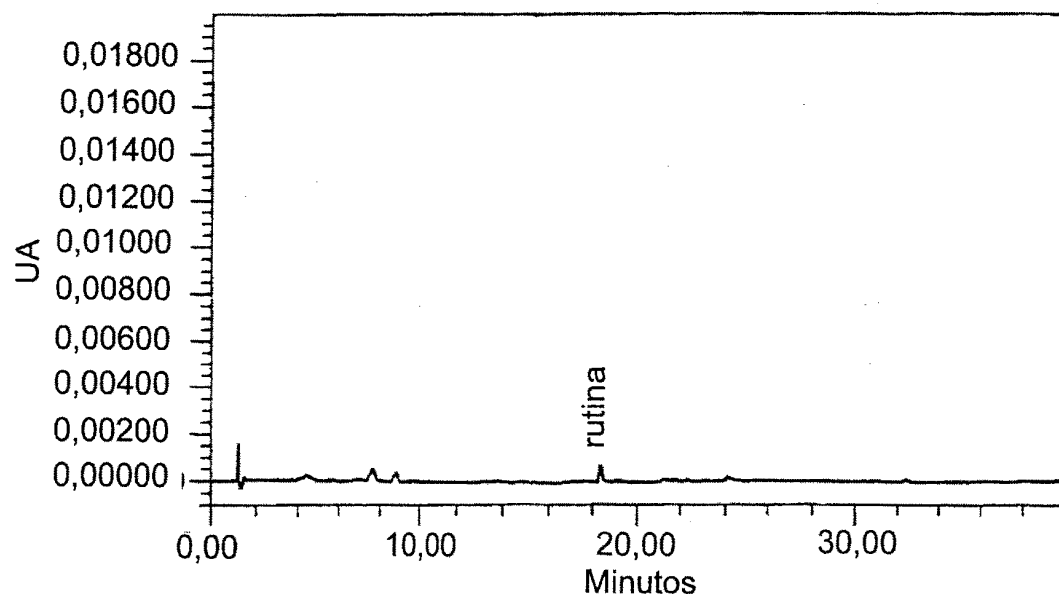


Fig.13(b).

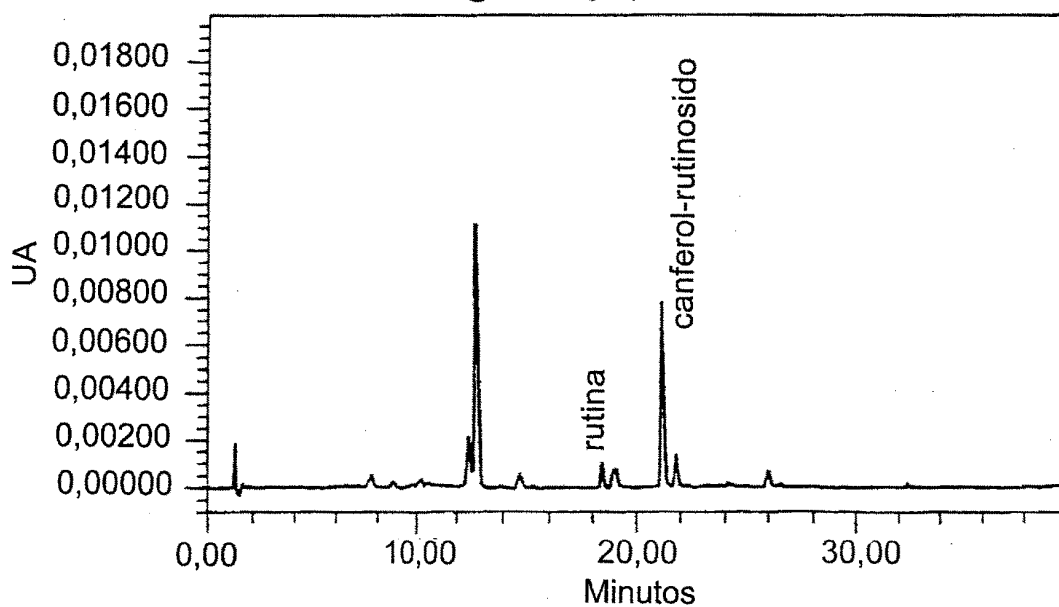


Fig.14(a).

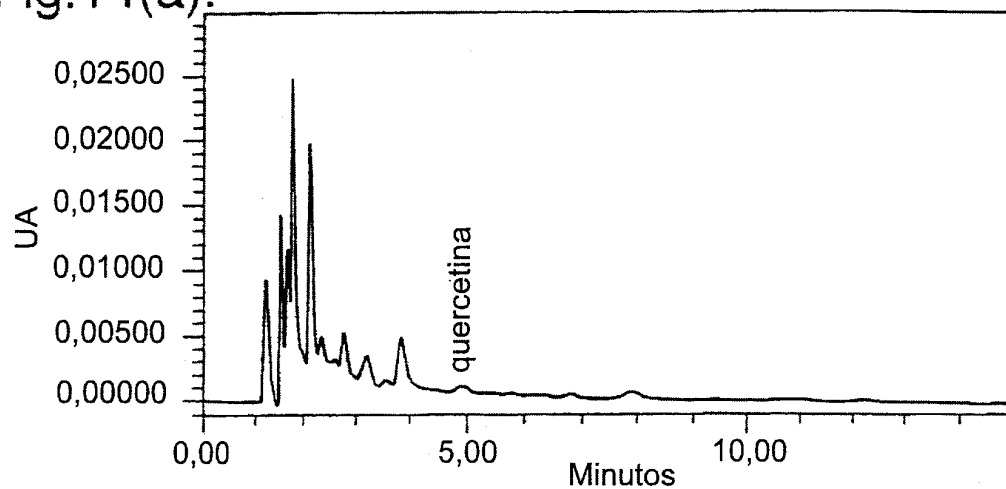


Fig.14(b).

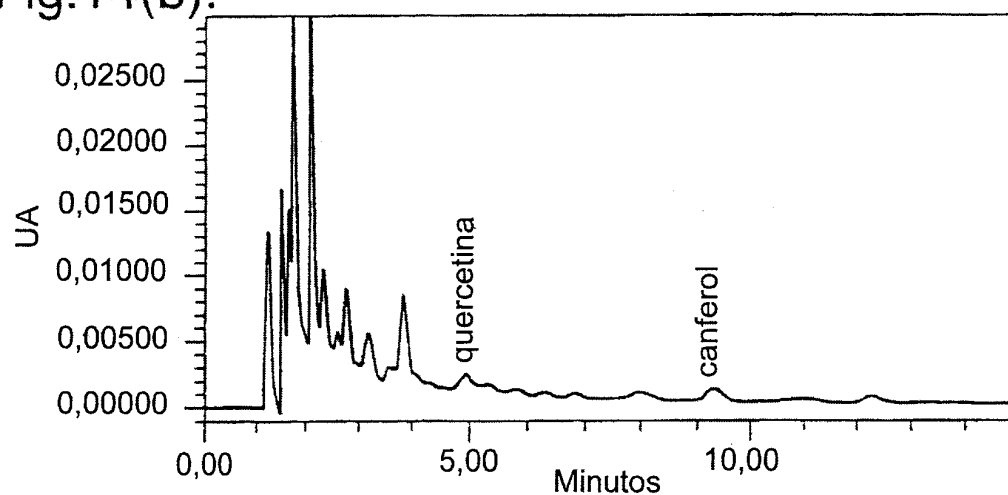


Fig.14(c).

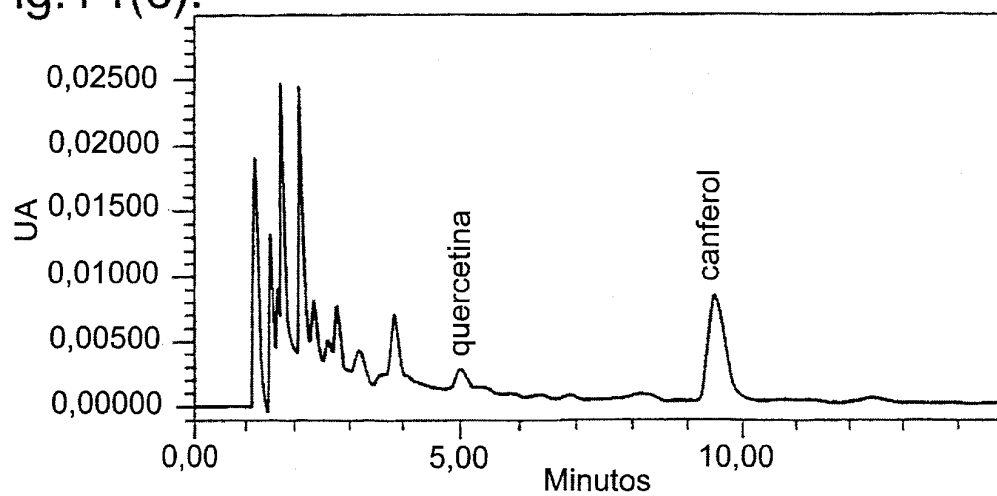


Fig.15.

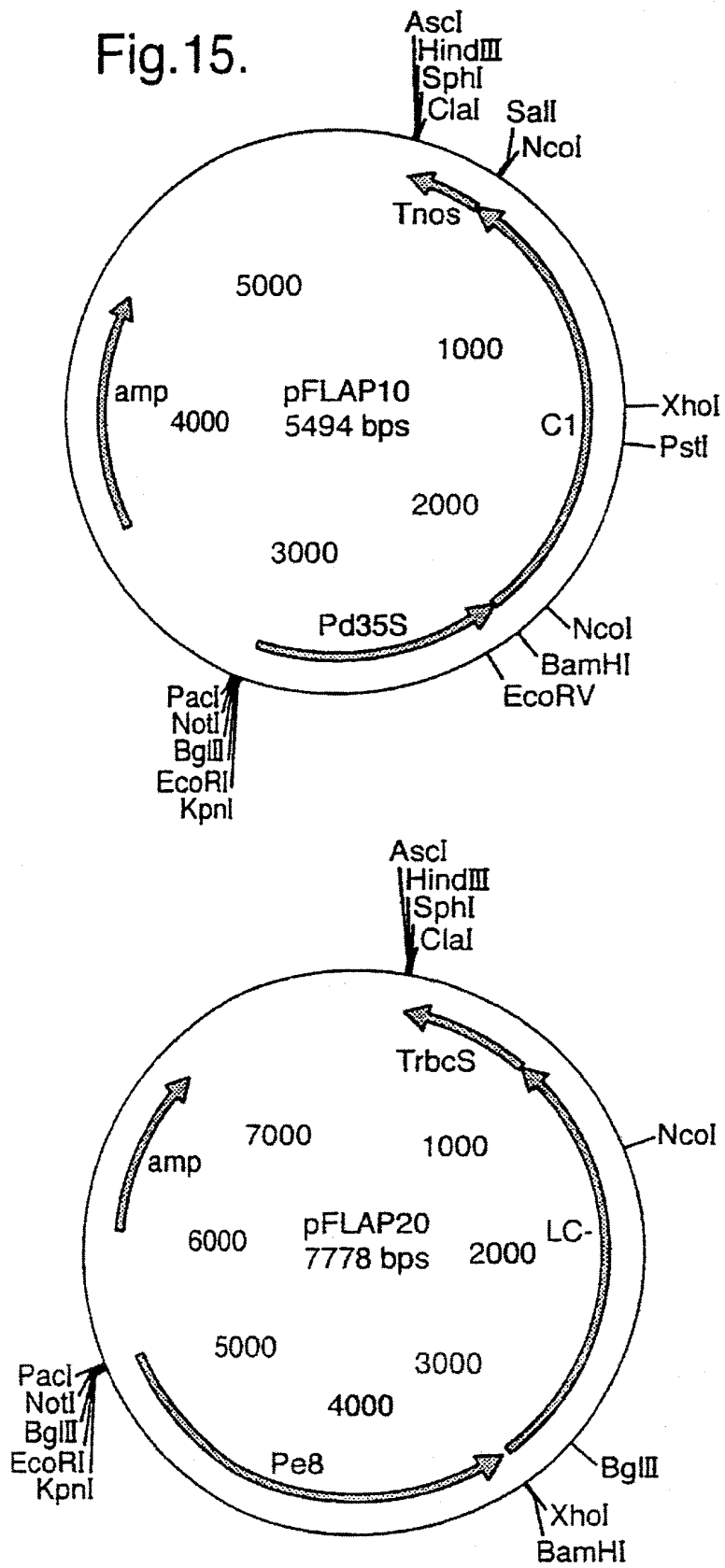


Fig.15 (Cont).

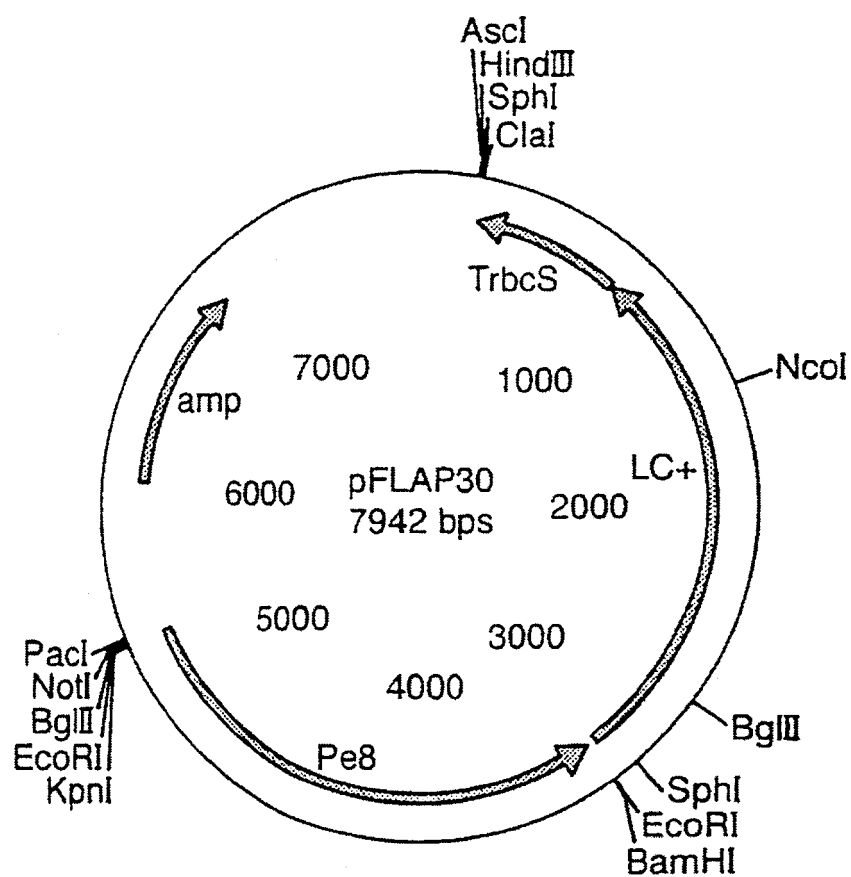


Fig.16.

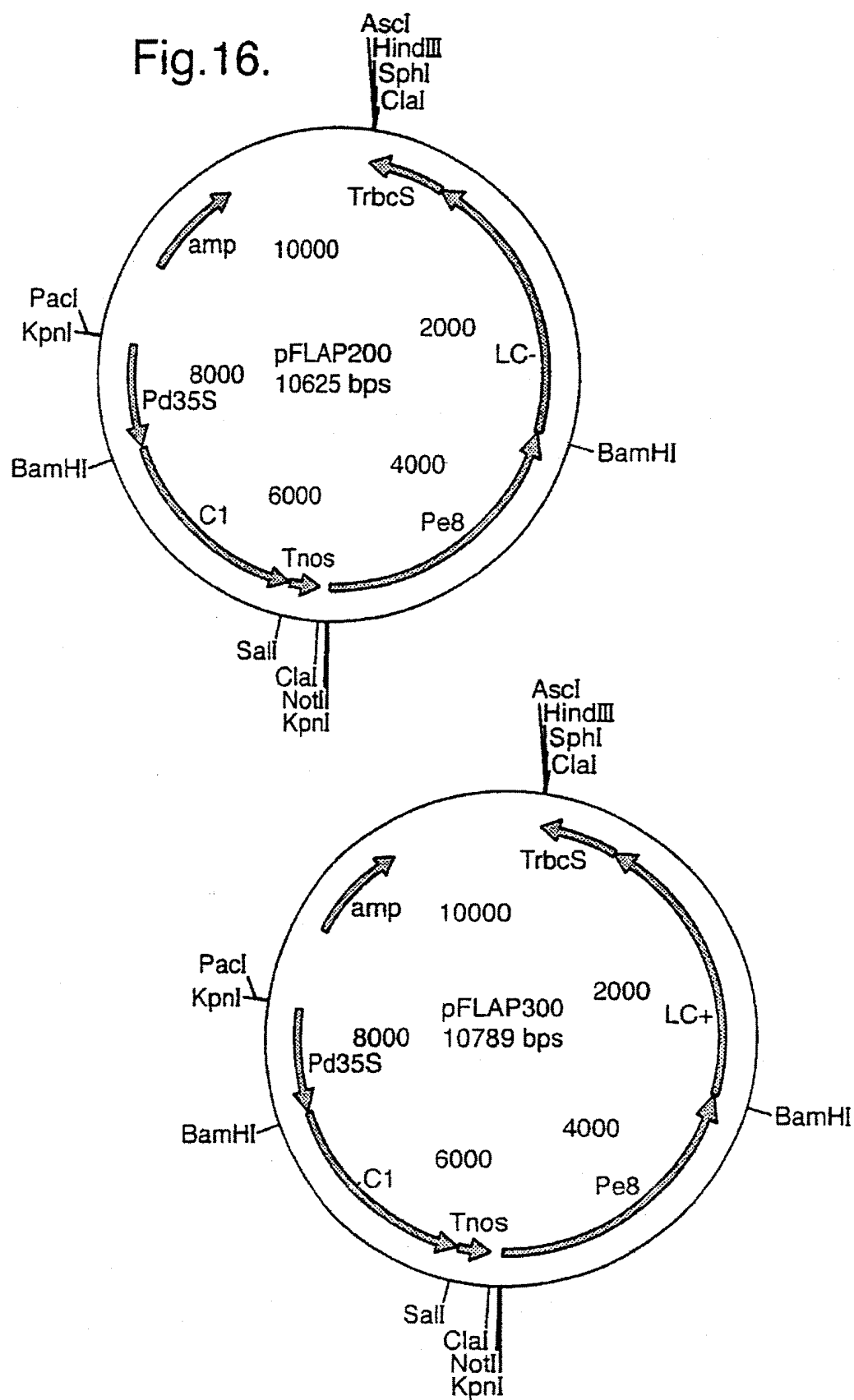


Fig.17.

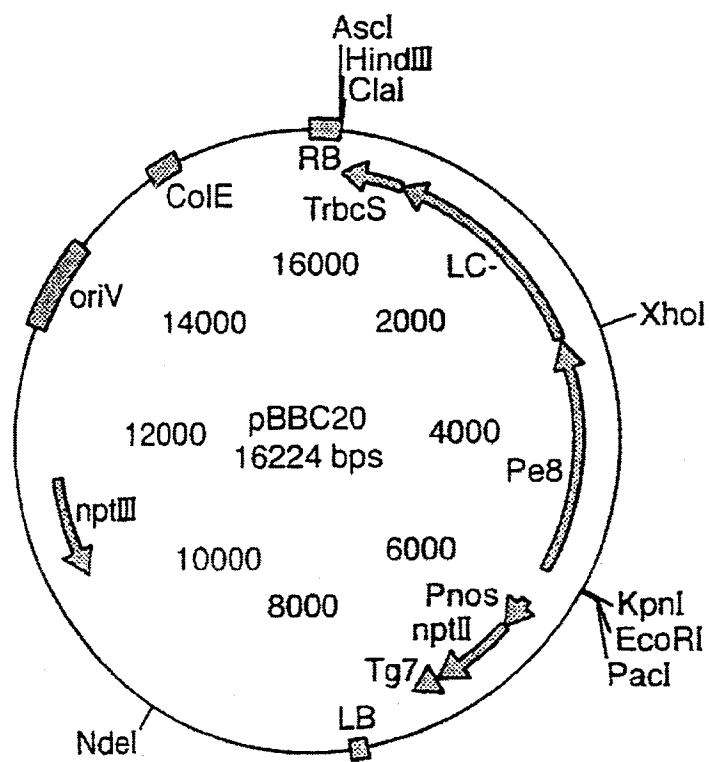
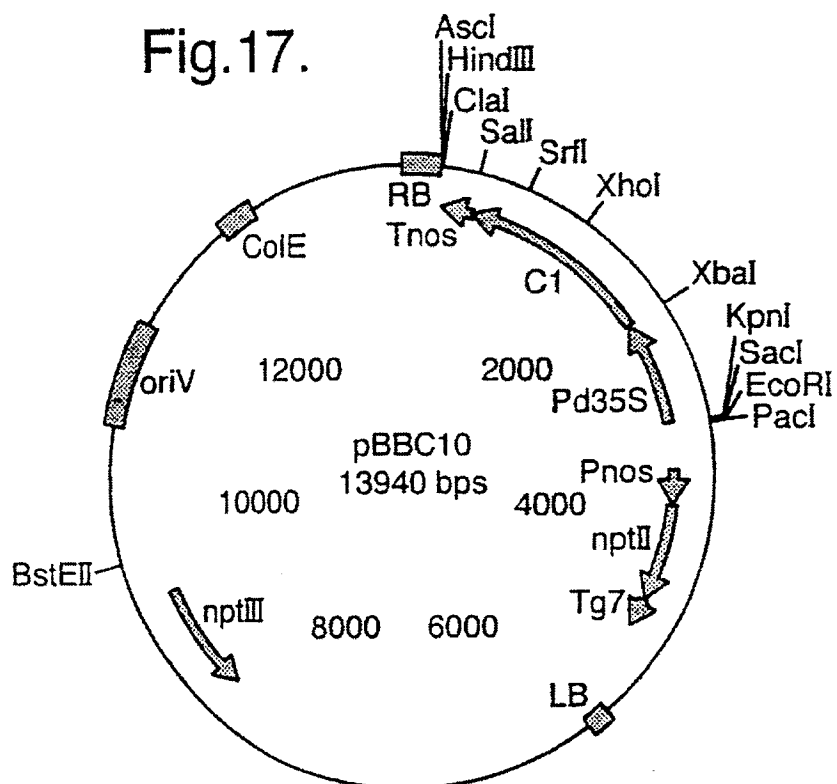


Fig.17 (Cont).

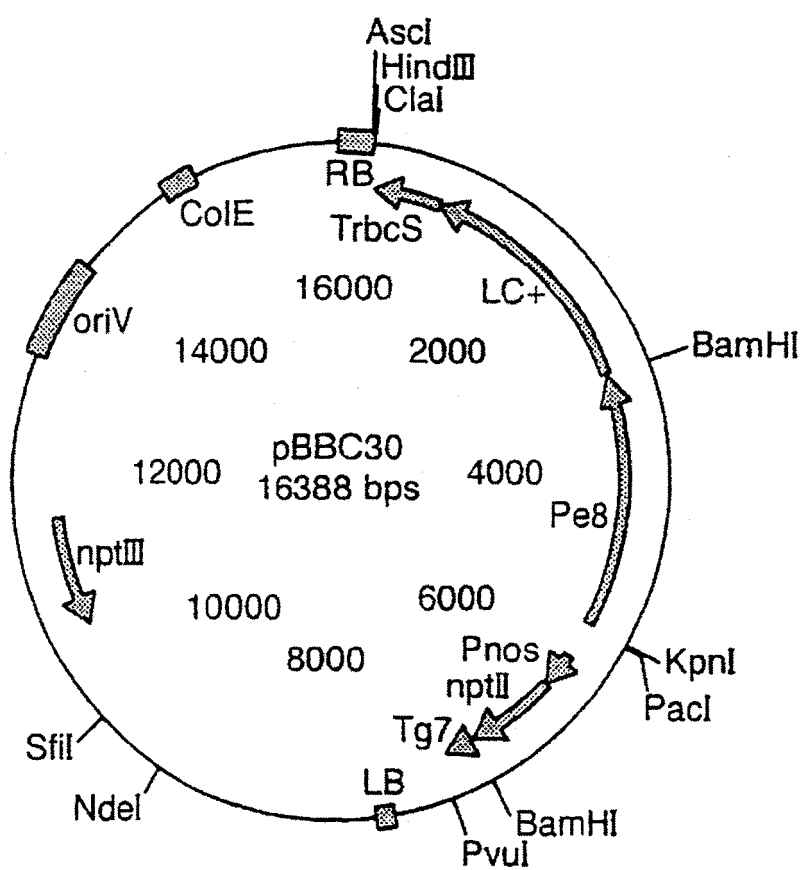


Fig.18.

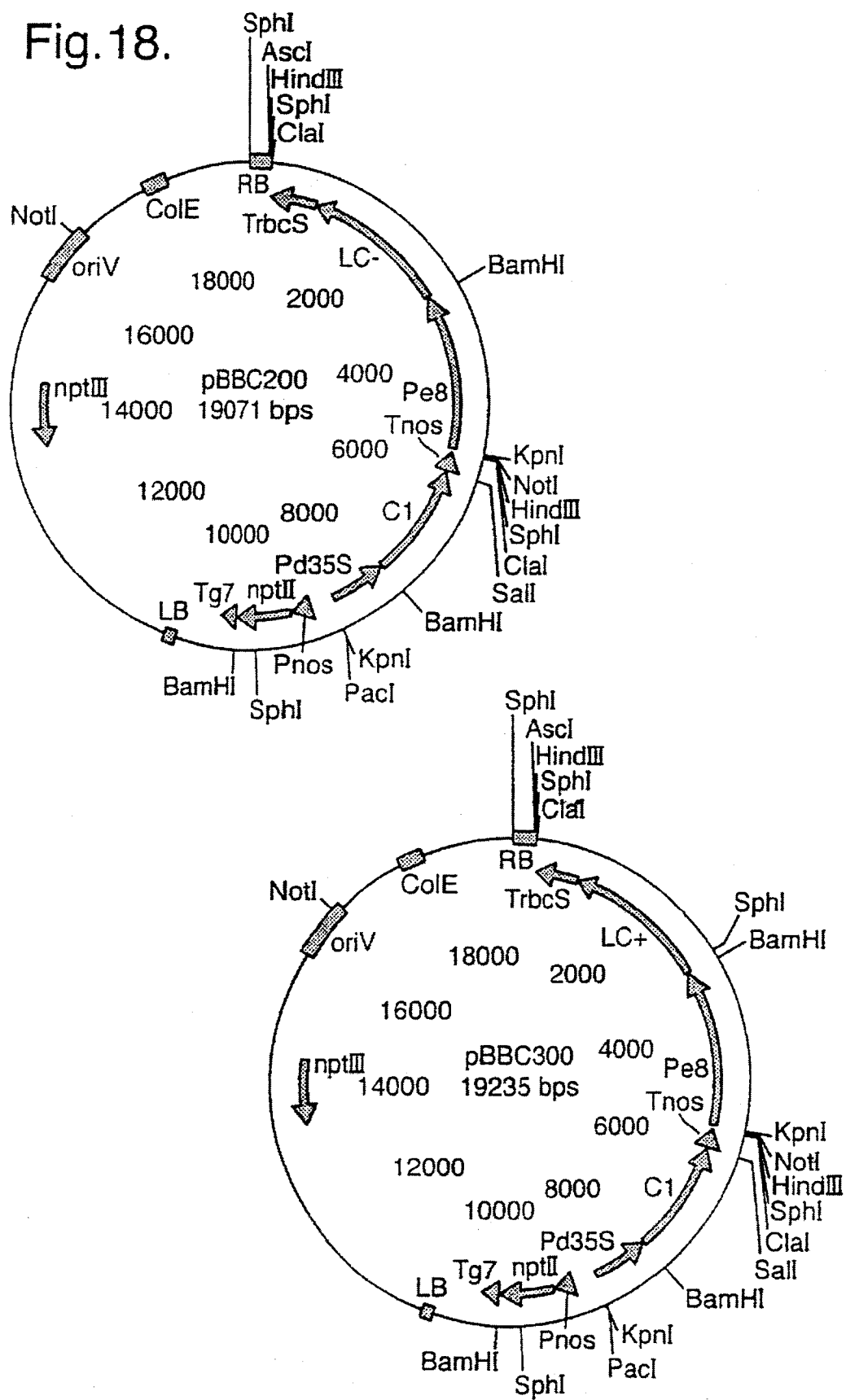


Fig. 19.

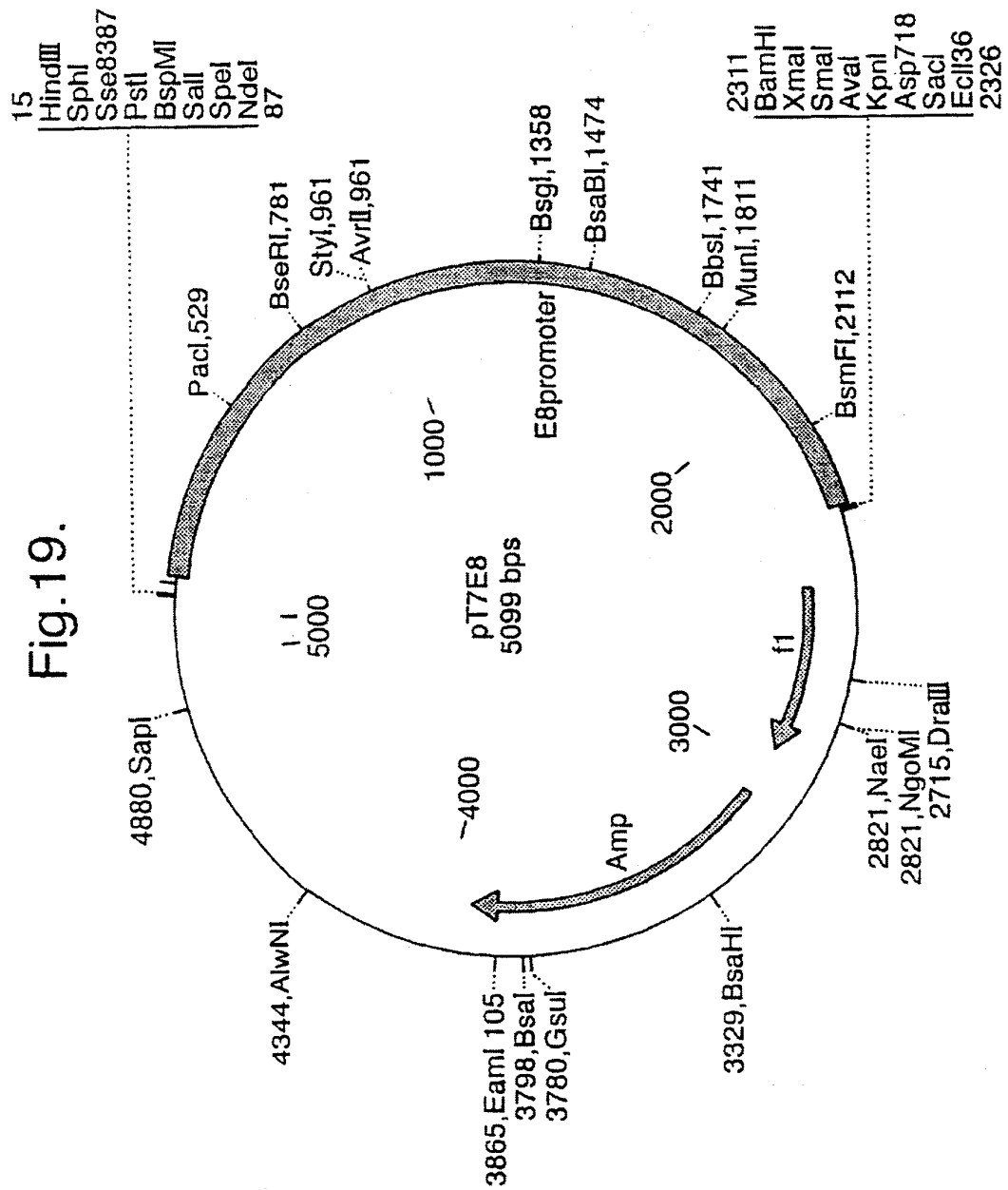
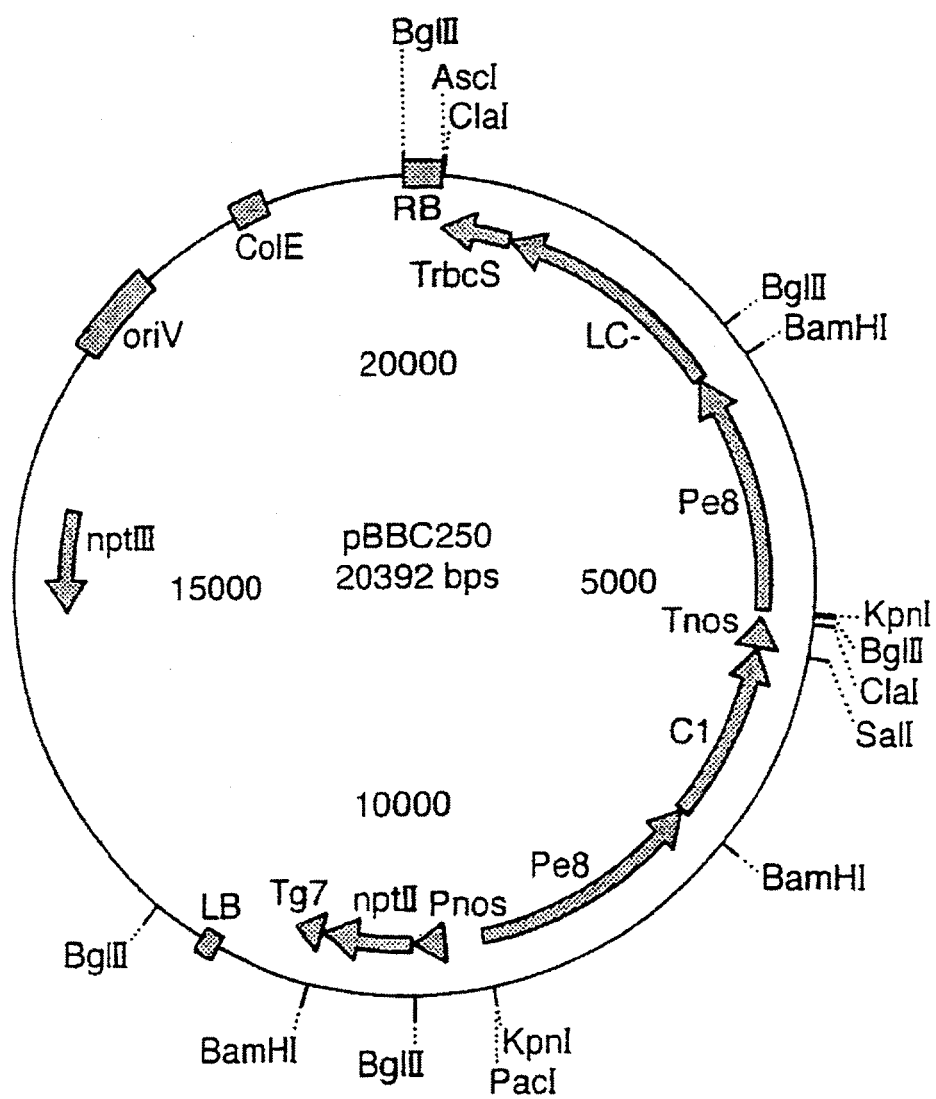


Fig.20.



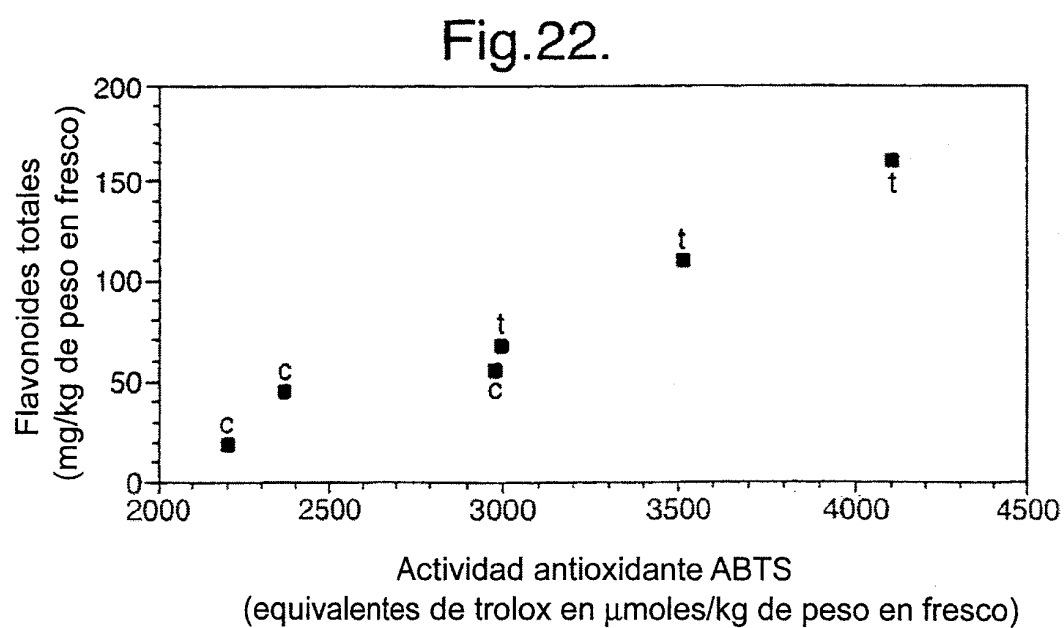
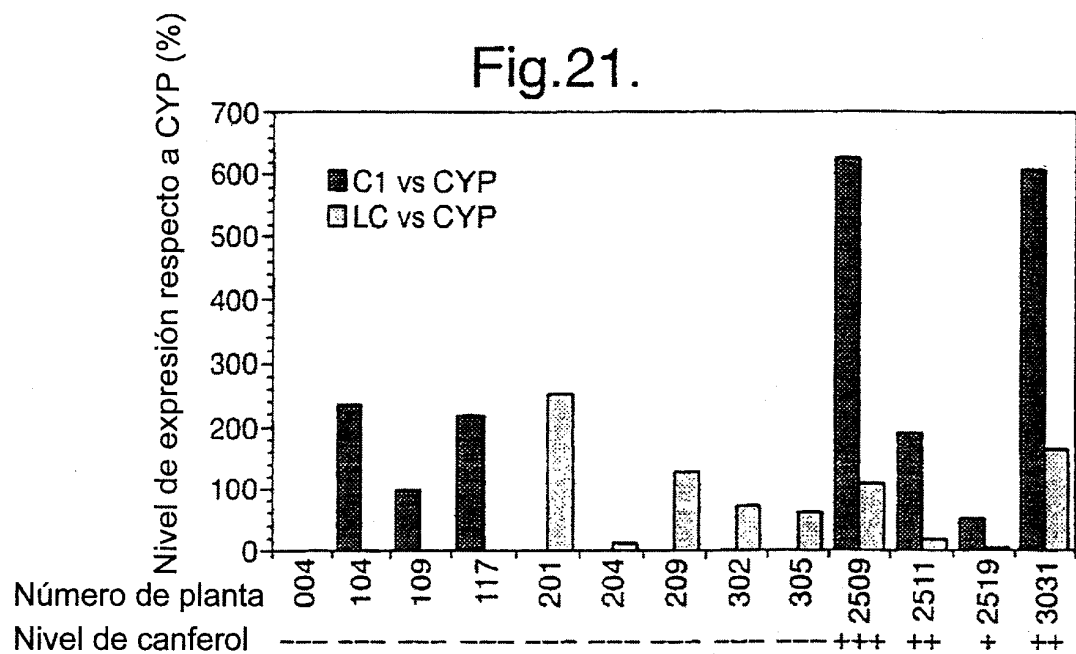


Fig.23.

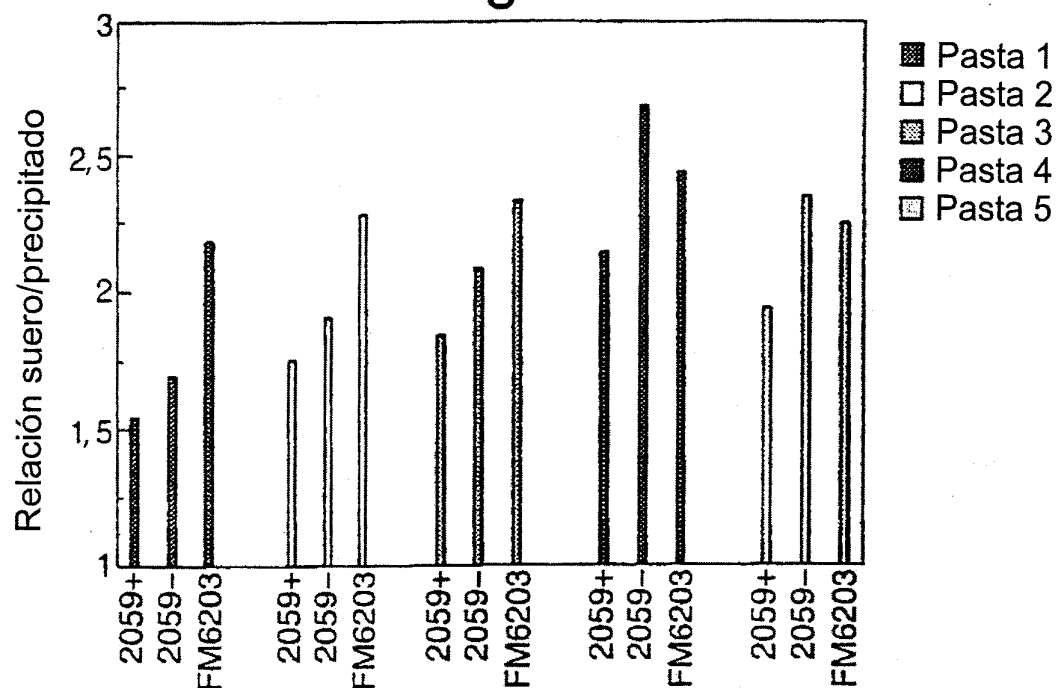


Fig.24.

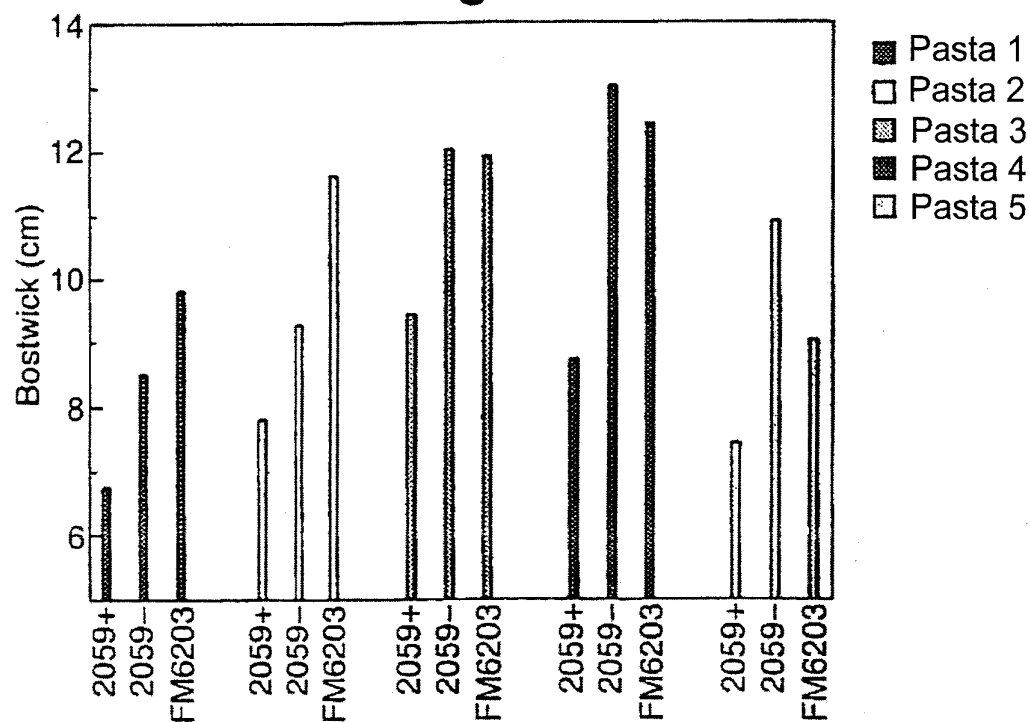


Fig.25.

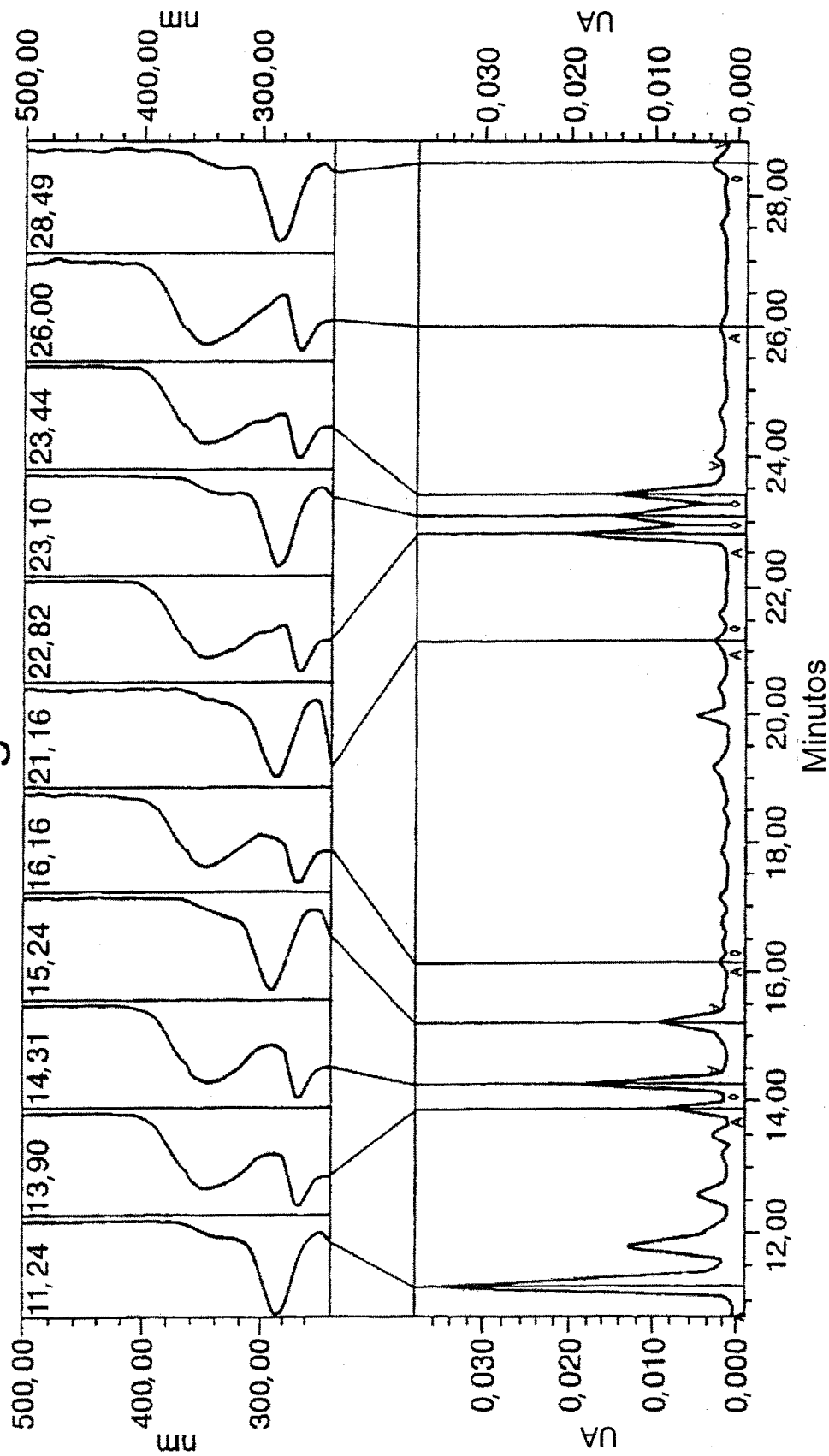


Fig.26(a).

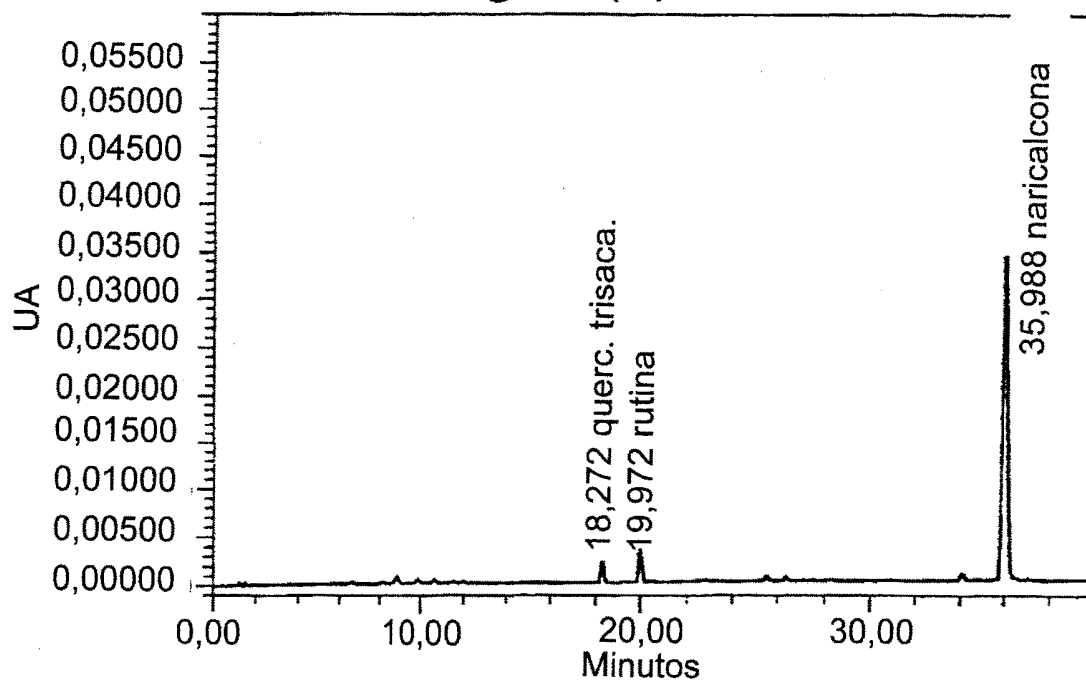


Fig.26(b).

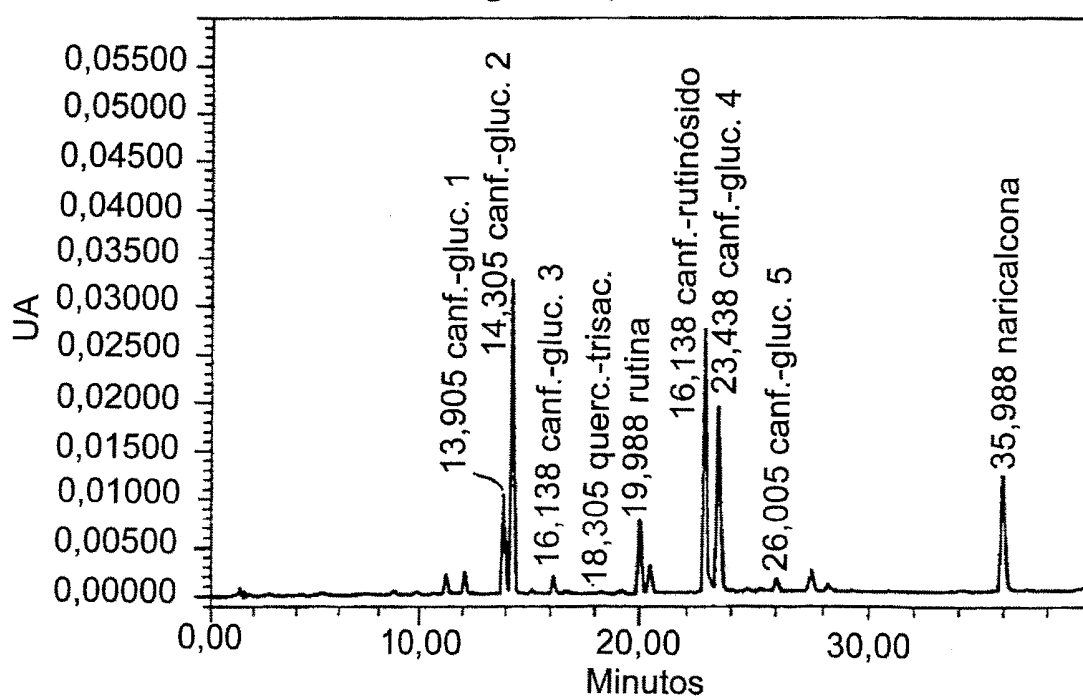


Fig.27(a).

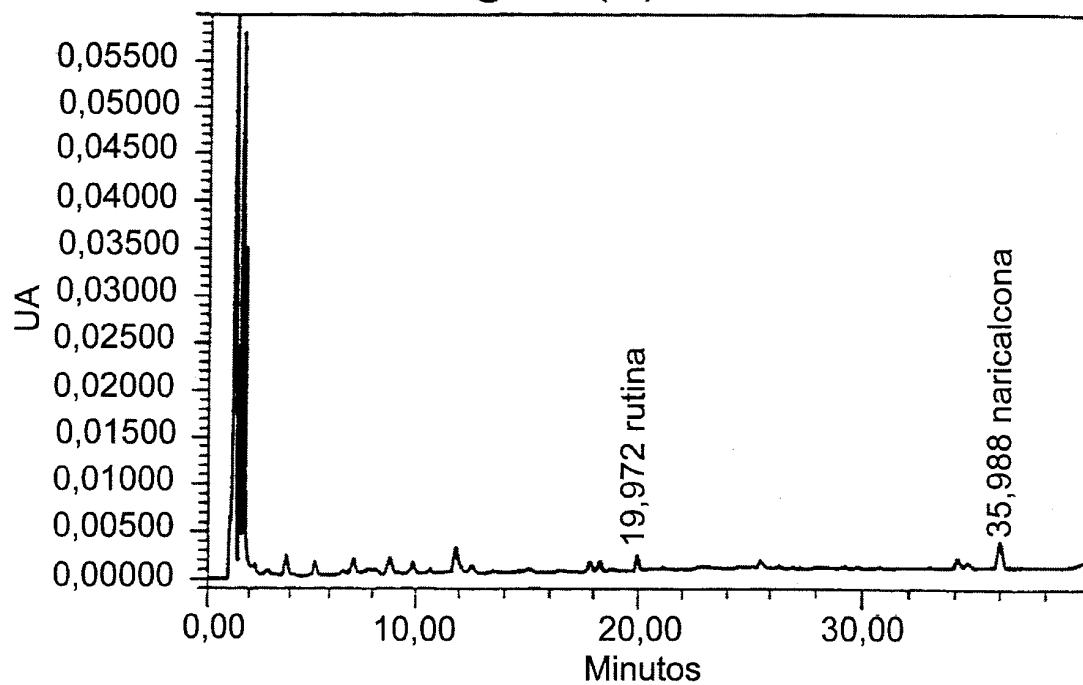


Fig.27(b).

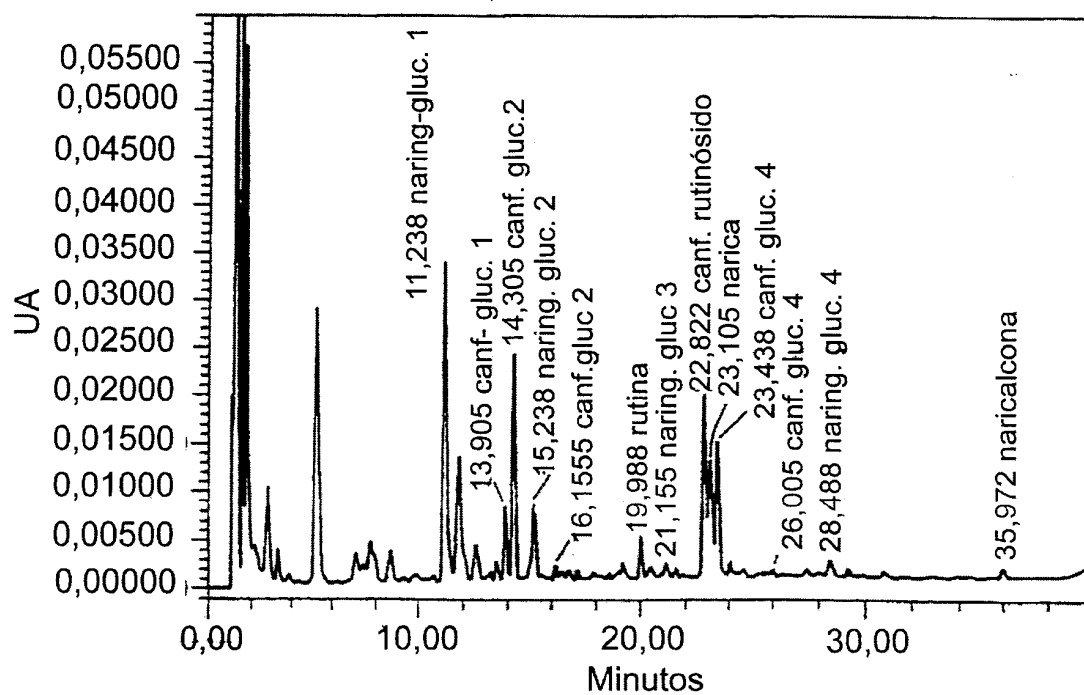


Fig.28.

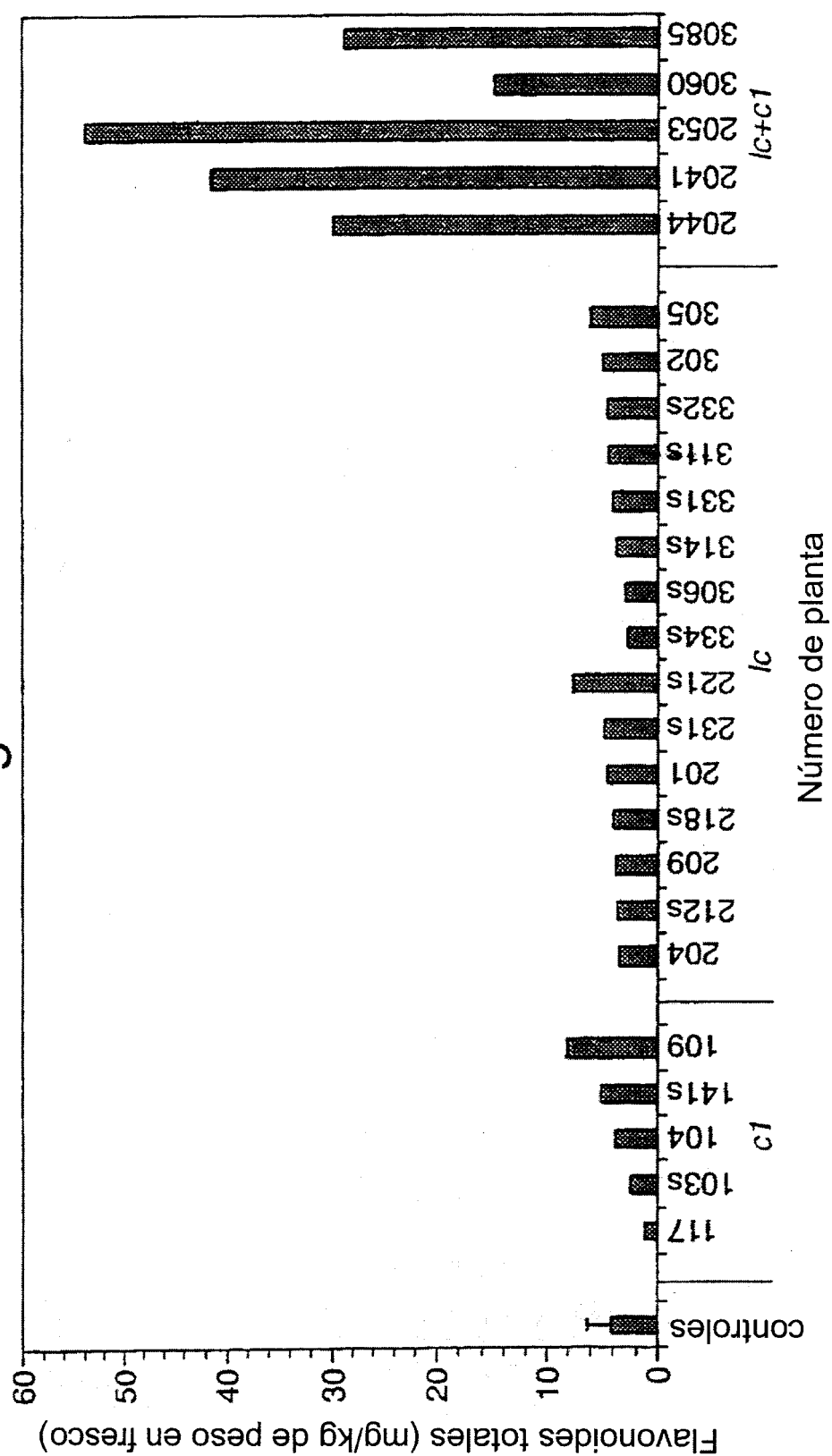


Fig.29(a).

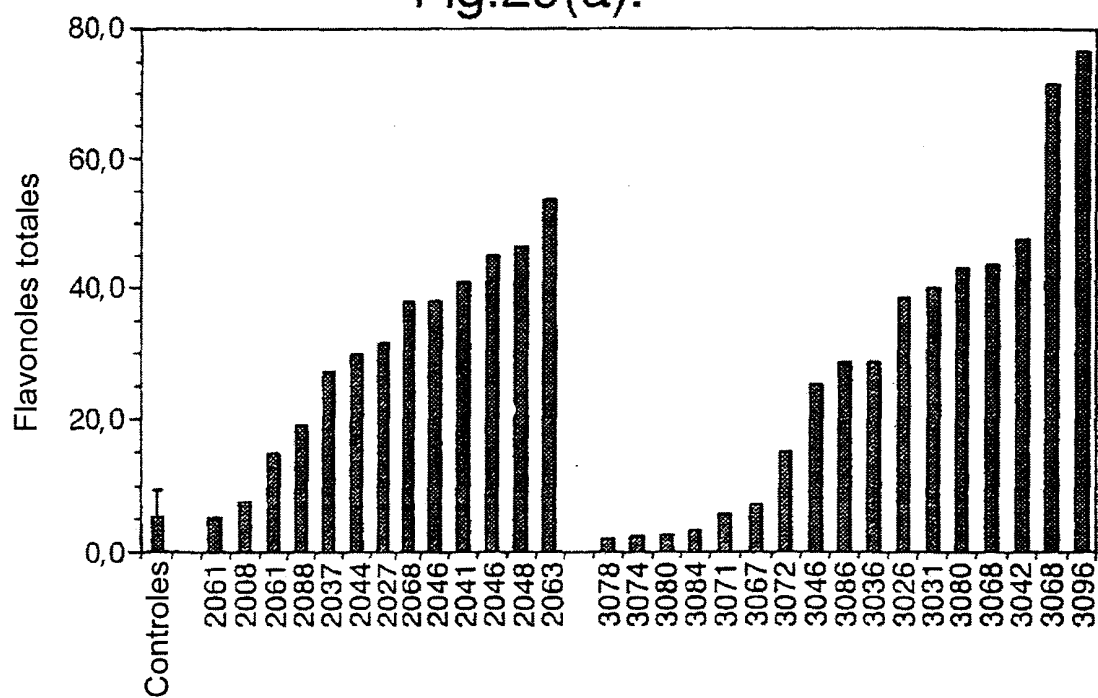


Fig.29(b).

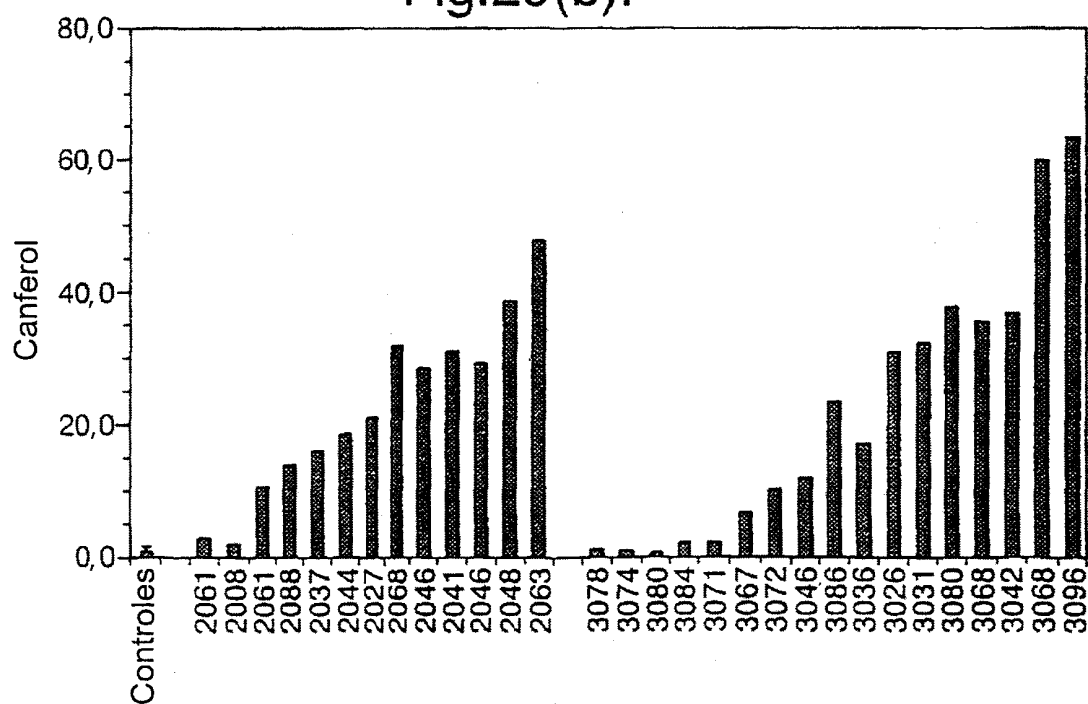


Fig.29(c).

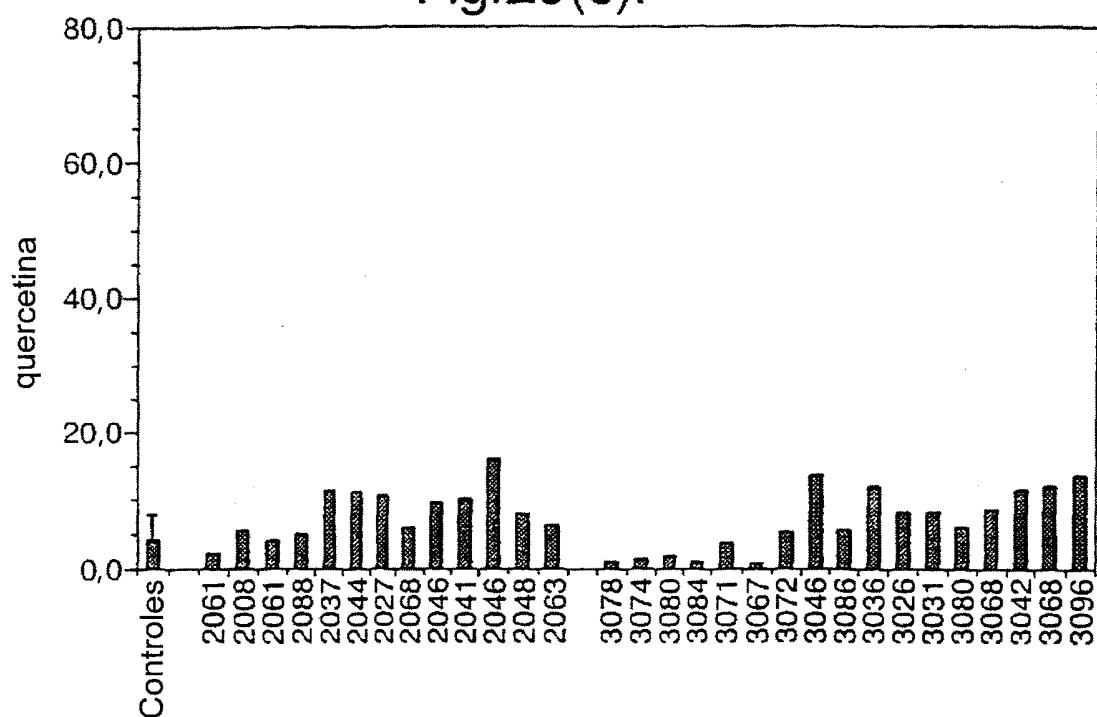
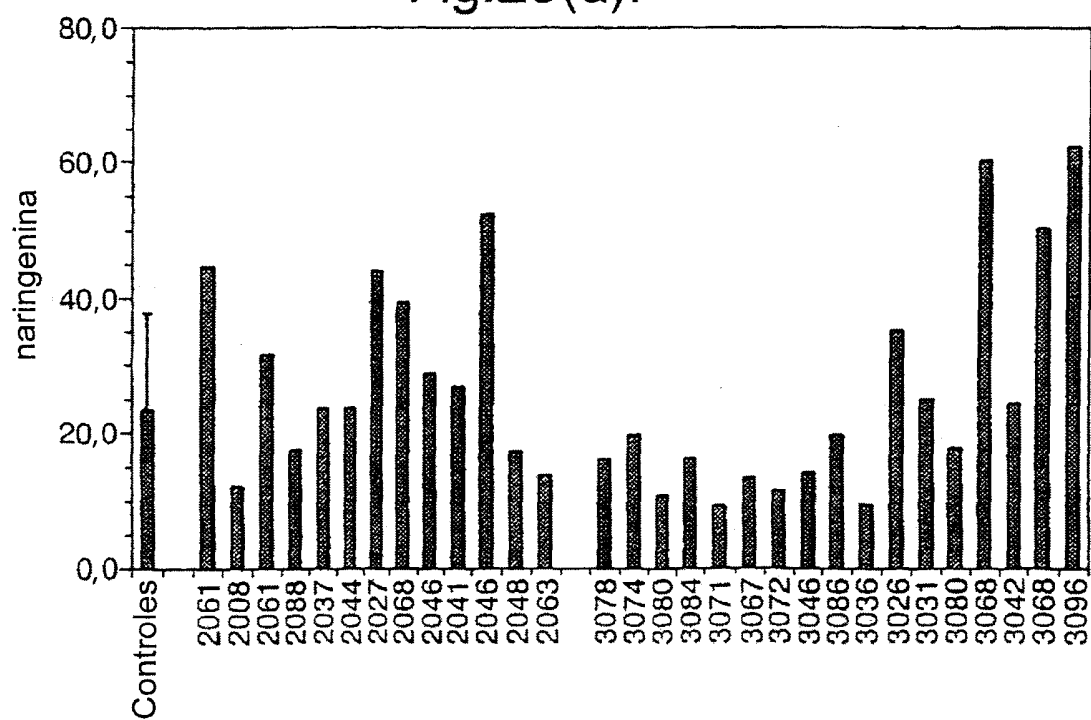
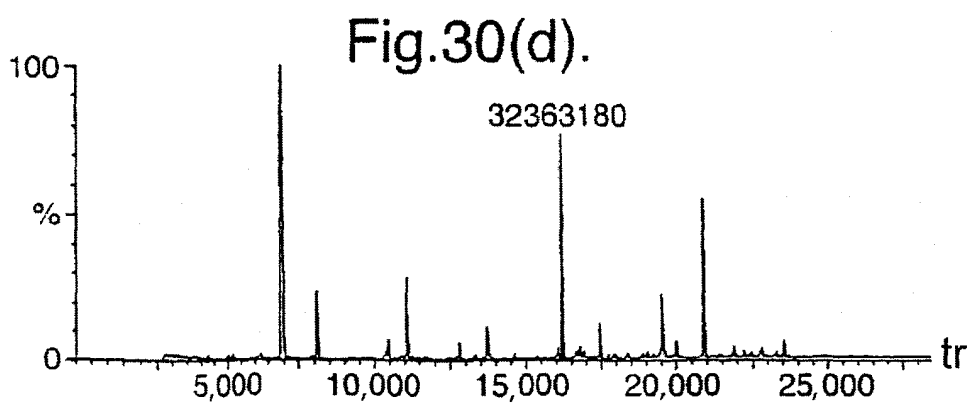
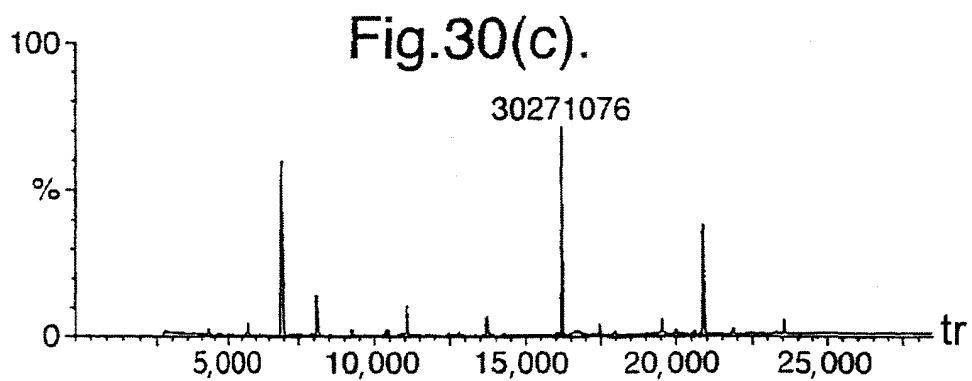
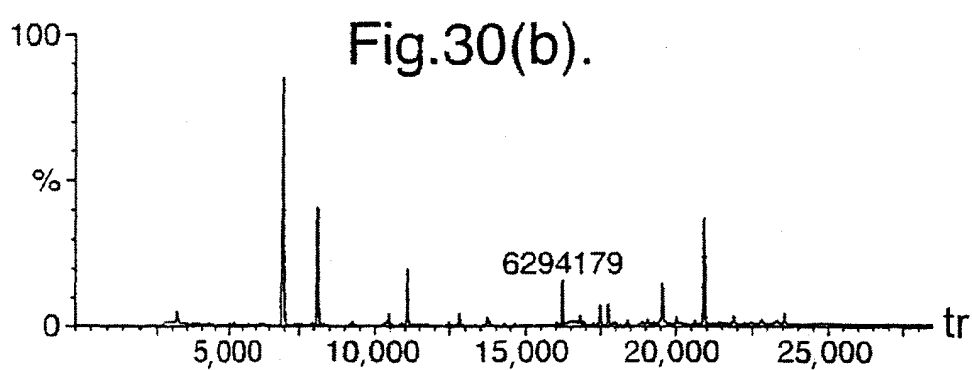
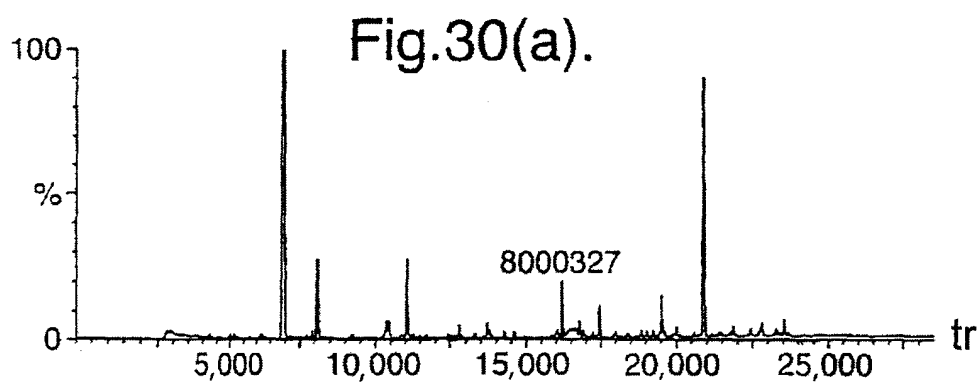


Fig.29(d).





ES 2 301 234 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> UNILEVER PLC UNILEVER NV	
5	<120> <130> <160> 31	
10	<170> PatentIn Ver. 2.1 <210> 1 <211> 24	
15	<212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
20	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR <400> 1	
25	gaattcaagc ttgacatccc taat	24
	<210> 2 <211> 23	
30	<212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
35	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR <400> 2	
40	ctttgcact gtgaatgatt aga	23
	<210> 3 <211> 19	
45	<212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
50	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR <400> 3	
55	tcgaccatat cgatgcatg	19
	<210> 4 <211> 11	
60	<212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
65	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	

ES 2 301 234 T3

	<400> 4	
	catcgatatg g	11
5	<210> 5	
	<211> 19	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	
15	<400> 5	
	taagcggccg cagatctgg	19
20	<210> 6	
	<211> 25	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	
30	<400> 6	
	aattccagat ctgcggccgc ttaat	25
35	<210> 7	
	<211> 83	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	
45	<400> 7	
	taaggggtac caccatcgat accgaattct acatgcatgc atggagatct cccaagcttc	60
50	taagatgcgg ccgctaaaca tgg	83
	<210> 8	
	<211> 89	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	
	<400> 8	
65	cgcgccatgt ttagcggccg catcttagaa gcttgggaga tctccatgca tgcattgaga	60
	attcggtatc gatggtggtgta ccccttaat	89

ES 2 301 234 T3

	<210> 9	
	<211> 14	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	
10	<400> 9	
	aattgcaccg gtcg	14
15	<210> 10	
	<211> 10	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	
25	<400> 10	
	gatccgaccg	10
30	<210> 11	
	<211> 10	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	
40	<400> 11	
	tagccatggg	10
45	<210> 12	
	<211> 16	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	
55	<400> 12	
	tcgacccatg gctaatt	16
60	<210> 13	
	<211> 35	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 301 234 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	
5	<400> 13	
	cccgctcgact ttcccgatc gttcaaacat ttggc	35
10	<210> 14	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	
20	<400> 14	
	cccatcgatg cgtctagtaa catagatgac	30
25	<210> 15	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	
35	<400> 15	
	aattgggcgc gccaaagcttc cgaattctta attaag	36
40	<210> 16	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	
50	<400> 16	
	agctcttaat taagaattcg gaagcttggc gcgccc	36
55	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	
65	<400> 17	
	atgagagtgt gaggaaggag	20

ES 2 301 234 T3

	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	
10	<400> 18	
	gccataatac tcgaactcag	20
15	<210> 19	
	<211> 24	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	
25	<400> 19	
	tgggcacaac agacaatcgg ctgc	24
30	<210> 20	
	<211> 24	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	
40	<400> 20	
	tgcgaaatcgg gagcggcgat accg	24
45	<210> 21	
	<211> 24	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	
55	<400> 21	
	cttcgccgat accactccca aaac	24
60	<210> 22	
	<211> 24	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 301 234 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	
5	<400> 22	
	accgcagtca gcaataacca cagg	24
10	<210> 23	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	
20	<400> 23	
	gccctggcgt cgtttct	17
25	<210> 24	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	
35	<400> 24	
	tggacatcta tacgtgtact tgtgtctac	30
40	<210> 25	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	
50	<400> 25	
	ctccgctgtc agacggccgg	20
55	<210> 26	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	
65	<400> 26	
	cgggagcagc acaggaaat	19

ES 2 301 234 T3

	<210> 27	
	<211> 19	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	
10	<400> 27	
	gtcgttttcg ctccgacat	19
15	<210> 28	
	<211> 23	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	
25	<400> 28	
	tggcactggc accaagaacc acg	23
30	<210> 29	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	
40	<400> 29	
	gagtggctca acggaaagca	20
45	<210> 30	
	<211> 21	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR	
55	<400> 30	
	ccaacagcct ctgccttctt a	21
60	<210> 31	
	<211> 28	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 301 234 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: CEBADOR

5 <400> 31

 acatccatgc cttcaacaac ttgtccaa

28

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65