

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 997 261**

(51) Int. Cl.:

C12N 9/88 (2006.01)
C12N 15/60 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/00 (2008.01)
C12Q 1/68 (2008.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2012 PCT/NL2012/050382**
(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12165961**
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2012 E 12728330 (7)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2024 EP 2714901**

(54) Título: **Plantas resistentes a plagas**

(30) Prioridad:

31.05.2011 US 201161491339 P
06.03.2012 US 201261607008 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.02.2025

(73) Titular/es:

KEYGENE N.V. (100.00%)
P.O. Box 216
6700 AE Wageningen, NL

(72) Inventor/es:

SCHUURINK, ROBERT CORNELIS;
HARING, MICHAEL ALBERTUS y
BLEEKER, PETRONELLA MARTINA

(74) Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones:

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

ES 2 997 261 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

Plantas resistentes a plagas

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una 7-epizingibereno sintasa, un gen quimérico que comprende dicha molécula de ácido nucleico, vectores que la comprenden, células huésped que comprenden dicho vector, así como las propias proteínas zingibereno sintasa aisladas. La presente invención proporciona más un método para preparar 7-epizingibereno usando dicha molécula de ácido nucleico. Además, se proporcionan plantas y células vegetales transgénicos que comprenden un gen que codifica dicha zingibereno sintasa, opcionalmente integrada en su genoma, y métodos para producir dichas plantas y células. Se proporcionan especialmente plantas y partes de plantas (semillas, frutos, hojas, etc.) de Solanaceae con resistencia mejorada a las plagas de insectos.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] Algunas plagas de insectos comunes de plantas de cultivo agronómicamente importantes, como los tomates, incluyen el minador sudamericano de la hoja del tomate (*Tuta absoluta*), chinches apestosas, gusanos cortadores, gusanos cuernos, pulgones, gusanos medidores de la col, moscas blancas (*Bemisia* y *Trialeurodes*), gusanos de la fruta, escarabajos pulga, ácaros araña, tales como *Tetranychus urticae* (ácaro araña roja de invernadero), *Panonychus ulmi* (ácaro araña roja de los árboles frutales) y *Panonychus citri* (ácaro rojo de los cítricos), insectos del orden Diptera y escarabajos de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*).

25 [0003] Por ejemplo, las moscas blancas de los géneros *Bemisia* (mosca blanca de la batata) y *Trialeurodes* (mosca blanca de invernadero) son plagas importantes de plantas de cultivo en todo el mundo, que provocan pérdidas económicas especialmente debido a la transmisión de virus de plantas durante la alimentación (es decir, actúan como "vectores de virus"). *Bemisia tabaci* es capaz de transmitir más de 60 miembros diferentes de Geminiviridae, muchos de los cuales pertenecen a los *Begomovirus*, como el virus del mosaico africano de la mandioca (ACMV, por sus siglas en inglés), el virus del mosaico dorado del frijol (BGMV, por sus siglas en inglés), el virus del mosaico enano del frijol, el virus del rizado amarillo de la hoja del tomate (TYLCV, por sus siglas en inglés), el virus del moteado del tomate (ToMoV, por sus siglas en inglés) y otros, además de varios crinivirus. Los cultivos tropicales y templados se ven afectados, como tomates, frijoles, cucurbitáceas, patatas, algodón, mandioca y batatas.

35 [0004] Hasta la fecha, la principal estrategia de control de plagas de insectos es la aplicación de insecticidas, cuyo objetivo es matar adultos, juveniles y huevos. Además de los costos sustanciales de la aplicación de insecticidas, esta práctica tiene un impacto ambiental severo. Además, muchas plagas de insectos son difíciles de controlar con insecticidas debido a la resistencia emergente a los ingredientes activos.

40 [0005] Para reducir la aplicación de insecticidas, es necesario encontrar nuevas formas de controlar los daños y las pérdidas de los cultivos debido a las plagas de insectos de las plantas, tanto en cultivos de campo como en cultivos de invernadero. Según la bibliografía, se sabe que los componentes volátiles pueden influir directamente en el comportamiento de los insectos (por ejemplo, Bruce et al., 2005, *Trends Plant Sci.* 10: 269-74). Una forma de controlar la transmisión de virus por plagas de insectos en las plantas es mediante la identificación de repelentes de insectos, que pueden aplicarse sobre las plantas de cultivo o cerca de ellas o pueden producirse en el cultivo.

50 [0006] El documento EP 0 583 774 describe el uso de aceite vegetal para reducir la fitotoxicidad de los agentes de control de insectos foliares, por lo que se puede utilizar cualquier tipo de agente de control de insectos. Los tricomas glandulares son prominentes en el follaje y los tallos del género *Lycopersicon* (ahora clasificado como *Solanum*) y se ha demostrado que producen una gran cantidad de compuestos secundarios, tales como hidrocarburos mono y sesquiterpénicos, ácidos sesquiterpénicos, metilcetonas y ésteres de azúcar. Varios estudios han intentado correlacionar la densidad de los tricomas glandulares con la resistencia contra plagas de plantas, como el gusano cogollero del maíz (*Heliothis zea*) o el escarabajo de la patata de Colorado (Kauffman y Kennedy, 1989, *J Chem Ecol* 15, 1919-1930; Antonious, 2001, *J Environ Sci Health B* 36, 835-848 y Antonious et al. 2005, *J Environ Sci Health B* 40: 619-631). También se ha demostrado que las metilcetonas 2-undecanona y 2-tridecanona, almacenadas en los tricomas glandulares de *L. hirsutum f. glabratum* (renombrada como *S. habrochaites*), muestran un efecto tóxico contra las larvas de cuarto estadio del escarabajo de la patata de Colorado y las moscas blancas adultas *B. tabaci*, respectivamente (Antonious et al. 2005, *J Environ Sci Health B* 40: 619-631).

55 [0007] Antonious y Kochhar (*J Environm Science and Health B*, 2003, B38: 489-500) trajeron y cuantificaron zingibereno y curcumeno de accesiones de tomates silvestres con el objetivo de seleccionar accesiones de tomates silvestres que se puedan usar para la producción de hidrocarburos sesquiterpénicos para la producción de insecticidas naturales. Sin embargo, no se ha revelado si dichos compuestos se pueden usar como repelentes

o atrayentes de moscas blancas. Se menciona que el zingibereno se ha asociado con la resistencia al escarabajo de Colorado y la resistencia al gusano cogollero de la remolacha, mientras que el curcumeno se ha asociado con efectos insecticidas. Se menciona que la especie de tomate silvestre *L. hirsutum f. tipicum* (*S. habrochaites*) es resistente a *B. argentifolii* (ahora llamada *B. tabaci*) (Heinz *et al.* 1995, 88:1494-1502), pero la resistencia de las plantas basada en tricoma podría, por supuesto, tener varias causas y a partir de este artículo no se pueden hacer inferencias con respecto a la presencia o identidad de compuestos que tienen propiedades para atraer o repeler moscas blancas.

[0008] Freitas *et al.* (*Euphytica* 2002, 127: 275-287) estudiaron la herencia genética de los genes para la producción tanto del sesquiterpeno zingibereno como de los tricomas glandulares tipos I, IV, VI y VII en cruces interespecíficos entre *L. esculentum* (*S. lycopersicum*; tomate cultivado, sin zingibereno) y *L. hirsutum* silvestre var. *hirsutum* (*S. habrochaites*; alto contenido de zingibereno). El contenido de zingibereno en plantas F2 contribuyó a la resistencia a *B. argentifolii* (*B. tabaci*) por correlación y se sugirió criar plantas con niveles simultáneamente altos de zingibereno, 2-tridecanona y/o acilazúcares para contribuir a niveles más altos de resistencia a la mosca blanca.

[0009] El documento ES 2341085 divulga la aplicación exógena de alfa-zingibereno como repelente e insecticida contra *T. absoluta* y otros insectos que afectan a los cultivos de tomate. El alfa-zingibereno se puede aplicar en su forma pura o en su forma natural mediante el uso de aceites esenciales que contengan la molécula en concentraciones apropiadas.

[0010] De Azavedo *et al.*, *Euphytica* 2003, 134, 247-351 describen el efecto de la resistencia mediada de zingibereno endógeno a *T. absoluta*.

[0011] Según Pushkar, N. K. y Balawant, S.J. (2001) "Alternative medicine: Herbal drugs and their critical appraisal" en Jucker, E. *Progress en Drug Research*, vol. 57, el aceite esencial de jengibre contiene alfa-zingibereno, pero no 7-epizingibereno (tabla 4, página 46).

[0012] Bleeker *et al.*, *Phytochemistry* 2011, 72(1):68-73 divulgan que el 7-epizingibereno y el R-curcumeno, ambos purificados a partir de *Solanum habrochaites* (PI127826), actúan como repelentes para las moscas blancas *Bemisia tabaci*, mientras que los estereoisómeros alfa-zingibereno y S-curcumeno del aceite *Zingiber officinalis* (aceite de jengibre) no lo hacen. Los bioensayos demostraron que un tomate cultivado podría volverse menos atractivo para *B. tabaci* que sus hermanos vecinos mediante la adición del estereoisómero de tomate 7-epizingibereno o su derivado R-curcumeno (resumen).

[0013] Davidovich-Rikanati *et al.*, *The Plant Journal* 2008, 56(2):228-238 divulgan la transformación de plantas de tomate con un constructo que alberga la alfa-zingibereno sintasa de albahaca limón (*Ocimum basilicum* L.) acoplada al promotor de poligalacturonasa (PG) de tomate específico de la maduración de la fruta. La sobreexpresión de la alfa-zingibereno sintasa da como resultado la producción de alfa-zingibereno por los tomates transgénicos. Se describe, además, que el alfa-zingibereno es un sesquiterpeno principal del aceite de las hojas de *Solanum hirsutum*, y este rasgo se ha asociado con la resistencia a *B. tabaci*.

[0014] Lijima *et al.*, *Plant Physiology* 2004, 136(3):3724-3736 divulgan el aislamiento y la expresión en *E. coli* de una alfa-zingibereno sintasa de albahaca dulce.

[0015] Aunque existen varios métodos para combatir las plagas de insectos de las plantas, todavía existe la necesidad de una protección adecuada contra las plagas de insectos, como, por ejemplo, *B. tabaci*.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0016] Los presentes inventores han identificado ahora un gen que codifica una proteína 7-epizingibereno sintasa de *Solanum habrochaites* (ShZIS).

[0017] Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una proteína aislada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a lo largo de toda la longitud, que tiene actividad de 7-epizingibereno. La presente invención proporciona, además, una molécula de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende: a) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2; b) una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; c) una secuencia de nucleótidos que es al menos un 97 % idéntica a las secuencias de ácidos nucleicos de (a) o (b), y codifica una 7-epizingibereno sintasa; y d) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1-4; un gen quimérico que comprende un promotor, opcionalmente activo en células vegetales, unido operativamente a dicha molécula de ácido nucleico, y, de manera opcional, unido operativamente, además, a una molécula de ácido nucleico 3' no traducida, así como un vector que

comprende dicho gen químérico. Una célula huésped que comprende dicho vector también se incluye en la presente invención.

5 [0018] La presente invención también se refiere a un método para preparar 7-epizingibereno y/o R-curcumeno que comprende los pasos de: a) transformar una célula huésped con la molécula de ácido nucleico, un gen químérico o un vector según la presente invención; b) cultivar dicha célula huésped en condiciones que permitan la producción de 7-epizingibereno; c) opcionalmente, aislar el 7-epizingibereno producido en el paso b); y d) opcionalmente, deshidrogenar dicho 7-epizingibereno para producir R-curcumeno.

10 [0019] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir 7-epizingibereno a partir de zFPP en una célula huésped, que comprende: a) introducir en dicha célula huésped una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una zFPS como se muestra en SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 a lo largo de toda la longitud, y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una 7-epizingibereno sintasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; b) cultivar la célula huésped transformada en condiciones adecuadas para la expresión de dicha primera y dicha segunda secuencias de ácidos nucleicos; y, c) opcionalmente, recoger la zFPP y/o el 7-epizingibereno contenido en dicha célula huésped y/o en el medio de cultivo.

15 20 [0020] En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una planta, célula vegetal, semilla o un fruto transgénicos, que comprende el transgén que tiene la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a lo largo de toda la longitud, que tiene actividad de 7-epizingibereno sintasa.

25 30 35 [0021] En otro aspecto más, la presente invención se refiere a una planta, célula vegetal, semilla o un fruto de *Solanum lycopersicum* que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a lo largo de toda la longitud. Preferiblemente, dicha planta, célula vegetal, semilla o dicho fruto de *Solanum lycopersicum* comprende, además, una secuencia de ácido nucleico que codifica una Z,Z-farnesil-difosfato sintasa (en el presente documento también denominada "zFPP" o Z,Z-FPP) como se muestra en SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, a lo largo de toda la longitud.

40 45 50 [0022] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para producir una planta transgénica que tiene una resistencia mejorada a las plagas de insectos en comparación con una planta de control no transgénica, donde dicho método comprende los pasos de: (a) transformar una planta o célula vegetal con una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a lo largo de toda la longitud, que tiene actividad de 7-epizingibereno unida operativamente a un promotor activo en células vegetales, y (b) regenerar una planta. Dicha molécula de ácido nucleico puede estar integrada en el genoma de dicha planta. Dicho método puede comprender, además, el paso de (c) examinar la planta regenerada, o un descendiente de la misma que alberga la molécula de ácido nucleico, para determinar su resistencia a una o más plagas de insectos e identificar una planta que comprenda una resistencia mejorada a una o más de dichas plagas de insectos. El promotor puede ser un promotor inducible por plagas de insectos. La planta puede pertenecer a la familia Solanaceae. La planta puede ser del género *Solanum*.

55 60 65 [0023] En una forma de realización, el método comprende, además, el paso de transformar la planta o célula vegetal con una molécula de ácido nucleico que codifica una zFPS, como se muestra en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, a lo largo de toda la longitud, unida operativamente a un promotor activo en células vegetales. La divulgación se refiere, además, al uso de una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a lo largo de toda la longitud para la generación de plantas resistentes a plagas de insectos. Se describe un método para identificar un polimorfismo genómico entre *Solanum habrochaites* y especies del tipo *Solanum* que son sexualmente compatibles con *Solanum habrochaites* que comprende detectar un polimorfismo genómico con marcadores moleculares que comprenden todo o parte del gen que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 92 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 para controlar la introgresión del gen correspondiente en dichas especies.

DEFINICIONES GENERALES

5 [0024] El término "molécula de ácido nucleico" (o "secuencia de ácido nucleico") se refiere a una molécula de ADN o ARN en forma monocatenaria o bicatenaria, particularmente un ADN que codifica una proteína según la invención. Una "secuencia de ácido nucleico aislada" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que ya no se encuentra en el entorno natural del que fue aislada, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico en una célula huésped bacteriana o en el genoma nuclear o plastidial de una planta.

10 [0025] Los términos "proteína" o "polipéptido" se usan indistintamente y se refieren a moléculas que consisten en una cadena de aminoácidos, sin referencia a un modo específico de acción, tamaño, estructura dimensional u origen específicos. Un "proteína aislada" se utiliza para referirse a una proteína que ya no se encuentra en su entorno natural, por ejemplo, *in vitro* o en una célula huésped vegetal o bacteriana recombinante.

15 [0026] El término "7-epizingibereno sintasa" o "proteína 7-epizingibereno sintasa", como se utiliza en este documento, denota una proteína 7-epizingibereno sintasa, es decir, la proteína de la invención es capaz de convertir Z,Z-farnesil-difosfato en 7-epizingibereno.

20 [0027] "Funcional", en relación con las proteínas 7-epizingibereno sintasa (o variantes, como ortólogos o mutantes, y fragmentos), se refiere a la capacidad para proporcionar resistencia a plagas de insectos modificando el nivel de expresión del gen que codifica la 7-epizingibereno sintasa en una planta.

25 [0028] El término "gen" significa una secuencia de ADN que comprende una región (región transcrita), que se transcribe en una molécula de ARN (por ejemplo, un ARNm) en una célula, unida operativamente a regiones reguladoras adecuadas (por ejemplo, un promotor). Por lo tanto, un gen puede comprender varias secuencias unidas operativamente, como un promotor, una secuencia líder 5' que comprende, por ejemplo, secuencias implicadas en la iniciación de la traducción, una región codificante (de proteína) (ADNc o ADN genómico), intrones y una secuencia 3' no traducida que comprende, por ejemplo, sitios de terminación de la transcripción.

30 [0029] Un "gen quimérico" (o gen recombinante) se refiere en cualquier gen, que no se encuentra normalmente en la naturaleza en una especie, en particular un gen en el que están presentes una o más partes de la secuencia de ácido nucleico que no están asociadas entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el promotor no está asociado en la naturaleza con parte o la totalidad de la región transcrita o con otra región reguladora. Se entiende que el término "gen quimérico" incluye construcciones de expresión en las que un promotor o una secuencia reguladora de la transcripción está unida operativamente a una o más secuencias codificantes o a una secuencia antisentido (complemento inverso de la cadena sentido) o de repetición invertida (sentido y antisentido, por lo que la transcripción de ARN forma ARN bicatenario tras la transcripción).

35 [0030] Una "3' UTR" o "secuencia 3' traducida" (también denominada a menudo región 3' no traducida o extremo 3') se refiere a la secuencia de ácido nucleico que se encuentra en dirección hacia el extremo 3' de la secuencia codificante de un gen, que comprende, por ejemplo, un sitio de terminación de la transcripción y (en la mayoría de los ARNm eucariotas, pero no en todos) una señal de poliadenilación (como, por ejemplo, AAUAAA o variantes de la misma). Después de la terminación de la transcripción, el transcripto de ARNm puede ser escindido en dirección hacia el extremo 3' de la señal de poliadenilación y puede añadirse una cola de poli(A), que está involucrada en el transporte del ARNm al citoplasma (donde tiene lugar la traducción).

40 [0031] La "expresión de un gen" se refiere al proceso donde una región de ADN, que está unida operativamente a regiones reguladoras apropiadas, particularmente un promotor, se transcribe en un ARN, que es biológicamente activo, es decir, que es capaz de traducirse en una proteína o un péptido biológicamente activos (o fragmento de péptido activo) o que es activo en sí mismo (por ejemplo, en silenciamiento génico postranscripcional o ARNi). Una proteína activa en ciertas formas de realización se refiere a una proteína que es constitutivamente activa. La secuencia codificante está preferiblemente en orientación sentido y codifica una proteína o un péptido biológicamente activos deseados, o un fragmento de péptido activo. En los métodos de silenciamiento génico, la secuencia de ADN está presente preferiblemente en forma de un ADN antisentido o un ADN repetido invertido, que comprende una secuencia corta del gen diana en orientación antisentido o en orientación sentido y antisentido. La "expresión ectópica" se refiere a la expresión en un tejido en el que el gen normalmente no se expresa.

45 [0032] Una "secuencia reguladora de la transcripción" se define en el presente documento como una secuencia de ácido nucleico que es capaz de regular la tasa de transcripción de una secuencia (codificante) unida operativamente a la secuencia reguladora de la transcripción. Una secuencia reguladora de la transcripción como se define en el presente documento comprenderá, por tanto, todos los elementos de secuencia necesarios para la iniciación de la transcripción (elementos promotores), para el mantenimiento y para la regulación de la transcripción, incluidos, por ejemplo, atenuadores o potenciadores. Aunque se hace referencia principalmente a las secuencias reguladoras de la transcripción de la transcripción en dirección hacia el extremo 5' de una secuencia codificante, las secuencias reguladoras que se encuentran en dirección hacia el extremo 3' de una secuencia codificante también están comprendidas en esta definición.

[0033] Como se utiliza en este documento, el término "promotor" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que funciona para controlar la transcripción de uno o más genes, situado en dirección hacia el extremo 5' con respecto a la dirección de transcripción del sitio de iniciación de la transcripción del gen, y se identifica estructuralmente por la presencia de un sitio de unión para la ARN polimerasa dependiente del ADN, sitios de iniciación de la transcripción y cualquier otra secuencia de ADN, incluidos, pero de forma no limitada, sitios de unión de factores de transcripción, sitios de unión de proteínas represoras y activadoras, y cualquier otra secuencia de nucleótidos que un experto en la materia conoce que actúa directa o indirectamente para regular la cantidad de transcripción del promotor. Un promotor "constitutivo" es un promotor que está activo en la mayoría de los tejidos en la mayoría de las condiciones fisiológicas y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que está regulado fisiológicamente (por ejemplo, mediante la aplicación externa de ciertos compuestos) o por el desarrollo. Un promotor "específico de tejido" solo está activo en tipos específicos de tejidos o células. Un "promotor activo en plantas o células vegetales" se refiere a la capacidad general del promotor para impulsar la transcripción dentro de una planta o célula vegetal. No tiene ninguna implicación sobre la actividad espaciotemporal del promotor.

[0034] Como se utiliza en este documento, el término "unido/a/os/as operativamente" se refiere a una unión de elementos polinucleotídicos en una relación funcional. Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor, o más bien una secuencia reguladora de la transcripción, está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia codificante. Unido operativamente significa que las secuencias de ADN que se unen son normalmente contiguas.

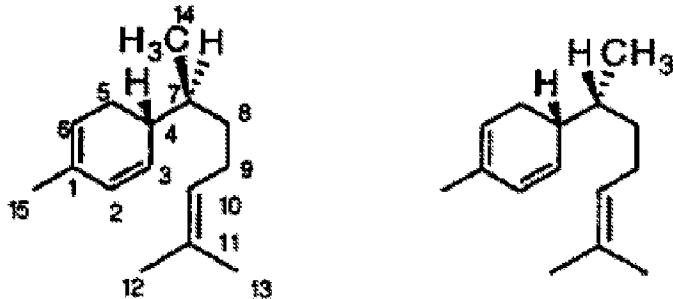
[0035] Los términos "péptido diana" se refieren a secuencias de aminoácidos que dirigen una proteína, o un fragmento de proteína, a orgánulos intracelulares, tales como plástidos, preferiblemente cloroplastos, mitocondrias, o al espacio extracelular o apoplasto (péptido señal de secreción). Una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido diana puede fusionarse (en marco) a la secuencia de ácido nucleico que codifica el extremo amino terminal (extremo N-terminal) de la proteína o del fragmento de proteína, o se puede usar para reemplazar un péptido nativo de direccionamiento.

[0036] Una "construcción de ácido nucleico" o "vector" pretende significar en este documento una molécula de ácido nucleico artificial resultante del uso de tecnología de ADN recombinante y que se utiliza para administrar ADN exógeno a una célula huésped. La estructura principal del vector puede ser, por ejemplo, un vector binario o superbinario (véase, por ejemplo, los documentos US 5591616, US 2002138879 y WO95/06722), un vector cointegrado o un vector de ADN-T, como se conoce en la técnica y como se describe en otra parte del presente documento, en el que se integra un gen químérico o, si ya está presente una secuencia reguladora de la transcripción adecuada, solo se integra una secuencia de ácido nucleico deseada (por ejemplo, una secuencia codificante, una secuencia antisentido o una secuencia de repetición invertida) en dirección hacia el extremo 3' de la secuencia reguladora de la transcripción. Los vectores comprenden normalmente otros elementos genéticos para facilitar su uso en la clonación molecular, como, por ejemplo, marcadores seleccionables, sitios de clonación múltiples y similares (véase más adelante).

[0037] Las "condiciones de hibridación rigurosas" se pueden utilizar para identificar secuencias de nucleótidos que son sustancialmente idénticas a una secuencia de nucleótidos determinada. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Generalmente, se seleccionan condiciones rigurosas que sean aproximadamente 5 °C más bajas que el punto de fusión térmico (T_m) para las secuencias específicas a una fuerza iónica y un pH definidos. El T_m es la temperatura (con una fuerza iónica y un pH definidos) a la que el 50 % de la secuencia diana se hibrida con una sonda perfectamente compatible. Normalmente se elegirán condiciones rigurosas en las que la concentración de sal sea de aproximadamente 0,02 molar a pH 7 y la temperatura sea de al menos 60 °C. La disminución de la concentración de sal y/o el aumento de la temperatura incrementa la rigurosidad. Las condiciones rigurosas para las hibridaciones ARN-ADN (transferencias Northern (*Northern blots*) que usan una sonda de, por ejemplo, 100 nt) son, por ejemplo, aquellas que incluyen al menos un lavado en SSC 0,2X a 63 °C durante 20 min, o condiciones equivalentes. Las condiciones rigurosas para la hibridación ADN-ADN (transferencias Southern (*Southern blots*) que usan una sonda de, por ejemplo, 100 nt) son, por ejemplo, aquellas que incluyen al menos un lavado (normalmente 2) en SSC 0,2X a una temperatura de al menos 50 °C, normalmente de alrededor de 55 °C, durante 20 min, o condiciones equivalentes. Véase también Sambrook *et al.* (1989) y Sambrook y Russell (2001).

[0038] La "identidad de secuencia" y la "similitud de secuencia" se pueden determinar mediante la alineación de dos secuencias de péptidos o dos secuencias de nucleótidos utilizando algoritmos de alineación global o local. Las secuencias pueden entonces denominarse "sustancialmente idénticas" o "esencialmente similares" cuando (cuando se alinean óptimamente, por ejemplo, con los programas GAP o BESTFIT utilizando parámetros predeterminados) comparten al menos un cierto porcentaje mínimo de identidad de secuencia (como se define a continuación). GAP usa el algoritmo de alineamiento global de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias a lo largo de toda su longitud, lo que maximiza el número de coincidencias y minimiza el número de huecos. Generalmente, se utilizan los parámetros predeterminados de GAP, con una penalización por creación de huecos = 50 (nucleótidos) / 8 (proteínas) y penalización por extensión de huecos = 3 (nucleótidos) / 2

- (proteínas). Para los nucleótidos, la matriz de puntuación predeterminada que se usa es nwsgapdna y para las proteínas, la matriz de puntuación predeterminada es Blosum62 (Henikoff y Henikoff, 1992, *PNAS* 89, 915-919). Los alineamientos de secuencias y las puntuaciones para el porcentaje de identidad de secuencia se pueden determinar utilizando programas informáticos, tales como el paquete GCG Wisconsin, versión 10.3, disponible en Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752 EE. UU., o EmbossWin versión 2.10.0 (utilizando el programa "needle"). Alternativamente, el porcentaje de similitud o identidad se puede determinar mediante una búsqueda en bases de datos, usando algoritmos, tales como FASTA, BLAST, etc. Preferiblemente, la identidad de secuencia se refiere a la identidad de secuencia a lo largo de toda la longitud de la secuencia.
- [0039] Una "célula huésped" o una "célula huésped recombinante" o "célula transformada" son términos que se refieren a una nueva célula (u organismo) individual que surge como resultado de al menos una molécula de ácido nucleico, que comprende especialmente un gen químérico que codifica una proteína deseada o una secuencia de ácido nucleico que, tras la transcripción, produce un ARN antisentido o un ARN de repetición invertida (o ARN de horquilla) para el silenciamiento de un gen/una familia de genes diana, que se ha introducido en dicha célula. La célula huésped es preferiblemente una célula vegetal o una célula bacteriana. La célula huésped puede contener la construcción de ácido nucleico como una molécula de replicación extracromosómica (episonal) o, más preferiblemente, comprende el gen químérico integrado en el genoma nuclear o plastidial de la célula huésped. A lo largo del texto, el término "huésped" también puede referirse a la especie vegetal huésped que un patógeno puede invadir o infectar, pero esto quedará claro en el contexto. Las especies vegetales se clasifican como especies "huésped" o "no huésped" en relación con un patógeno. Las especies "no huésped" son completamente inmunes a la infección por patógenos de todas las razas o cepas de un patógeno, incluso en condiciones óptimas para el desarrollo de la enfermedad. Las especies "huésped" también se conocen como el "rango huésped" de un patógeno y son inmunes a ciertas razas (pero no a todas) de un patógeno.
- [0040] El término "marcador seleccionable" es un término familiar para un experto en la técnica y se utiliza, en este caso, para describir cualquier entidad genética que, cuando se expresa, se puede usar para seleccionar una célula o varias células que contiene(n) el marcador seleccionable. Los productos génicos de marcadores seleccionables confieren, por ejemplo, resistencia a antibióticos o, más preferiblemente, resistencia a herbicidas u otro rasgo seleccionable, como un rasgo fenotípico (por ejemplo, un cambio en la pigmentación) o requisitos nutricionales. El término "indicador" se usa principalmente para referirse a marcadores visibles, como la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés), eGFP, luciferasa, GUS y similares.
- [0041] Los términos "plagas" y "plaga", tal y como se utilizan en este documento, se refieren a "plagas de insectos de las plantas" o "plagas de las plantas" o "plagas de insectos" o "especies de plagas de las plantas". Dichas plagas de insectos de las plantas incluyen especies de insectos que causan infestación y daños en cultivos y/o plantas ornamentales (especies de plantas huésped), mediante la infestación de las plantas o partes de las plantas. Una "infestación" es la presencia de una cantidad de organismos de plagas en un área (por ejemplo, un campo o un invernadero), sobre la superficie de una planta huésped o sobre cualquier cosa que pueda entrar en contacto con una planta huésped, o en el suelo. Las plagas de insectos de las plantas incluyen plagas de insectos chupadores de savia (véase más adelante), pero también otras plagas de insectos, tales como trips, cigarras y saltahojas. El término "plagas de insectos", como se utiliza en este documento, incluye cualquier artrópodo herbívoro, como ácaros (por ejemplo, ácaros araña y otros).
- [0042] Las "plagas de insectos chupadores de savia" incluyen plagas de las plantas del suborden *Sternorrhyncha* (del orden *Hemiptera*, de la clase *Insecta*), es decir, plagas de insectos que incluyen psílidos, moscas blancas, pulgones, cochinillas e insectos escama y comparten una propiedad común, a saber, la utilización de la savia de las plantas como fuente de alimento.
- [0043] Los "pulgones" incluyen en este caso plagas de insectos de las plantas de la familia *Aphididae*, tales como *Aphis gossypii*, *A. fabae*, *A. glicinas*, *A. nerii*, *A. nasturtii*, *Myzus persicae*, *M. cerasi*, *M. ornatus*, *Nasonovia* (por ejemplo, *N. ribisnigri*), *Macrosiphum*, *Brevicoryne* y otros. Los "insectos vectores" son insectos que son capaces de transportar y transmitir virus, bacterias, plasmódios, etc. a las plantas.
- [0044] La "mosca blanca" o las "moscas blancas" se refieren a especies del género *Bemisia*, especialmente *B. tabaci* y *B. argentifolii* (también conocidas como biotipo B de *B. tabaci*), y/o especies del género *Trialeurodes*, especialmente *T. vaporariorum* (mosca blanca de invernadero) y *T. abutilonea* (mosca blanca de alas rayadas). En este documento se incluyen todos los biotipos, como el biotipo Q y B de *B. tabaci*, así como cualquier fase de desarrollo, como huevos, larvas y adultos.
- [0045] A lo largo de toda la solicitud se hace referencia a "7-epizingibereno". A este respecto, es importante señalar que el 7-epizingibereno es un diastereoisómero del alfa-zingibereno (Breedon y Coates, 1994, *Tetrahedron*, 50 (38), 11123-11132). Las dos moléculas difieren en la configuración estereoquímica de un hidrógeno y un grupo metilo:



5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Cuando se expone al aire, el 7-epizingibereno aislado puede convertirse de forma espontánea en R-curcumeno. Esto fue observado previamente por Bleeker *et al.* (*Phytochemistry*. Enero de 2011 ;72(1):68-73).

[0046] "Solanaceae" se refiere en este caso a géneros, especies y variedades de plantas pertenecientes a la familia *Solanaceae*. Estos incluyen especies del género *Solanum* (incluido *Solanum lycopersicum*, que solía conocerse como *Lycopersicon esculentum*), *Nicotiana*, *Capsicum*, *Petunia* y otros géneros.

[0047] El término "ortólogo/a" de un gen o una proteína se refiere en el presente documento al gen o a la proteína homólogos que se encuentra en otras especies, que tiene la misma función que el gen o la proteína, pero (normalmente) divergió en secuencia desde el momento en que la especie que albergaba los genes divergió (es decir, los genes desarrollados a partir de un ancestro común por especiación). Por lo tanto, los ortólogos del gen que codifica la zingibereno sintasa de *Solanum habrochaites* de la invención se puede identificar en otras especies de plantas basándose tanto en comparaciones de secuencias (por ejemplo, basándose en porcentajes de identidad de secuencia a lo largo de toda la secuencia completa o a lo largo de dominios específicos) como en análisis funcionales.

[0048] Los términos "homólogo/a" y "heterólogo/a" se refieren a la relación entre una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos y su célula u organismo huésped, especialmente en el contexto de organismos transgénicos. Por lo tanto, una secuencia homóloga se encuentra de forma natural en las especies huésped (por ejemplo, una planta de tomate transformada con un gen de tomate), mientras que una secuencia heteróloga no se encuentra naturalmente en la célula huésped (por ejemplo, una planta de tomate transformada con una secuencia de plantas de patata). Dependiendo del contexto, el término "homólogo/a" se puede referir alternativamente a secuencias que descienden de una secuencia ancestral común (por ejemplo, pueden ser ortólogos).

[0049] Como se utiliza en este documento, el término "planta/vegetal" incluye células vegetales, tejidos u órganos vegetales, protoplastos vegetales, cultivos de tejido celular vegetal a partir de los cuales se pueden regenerar plantas, callos vegetales, grupos de células vegetales y células vegetales que están intactas en plantas o partes de plantas, como embriones, polen, óvulos, frutos (por ejemplo, tomates cosechados), flores, hojas, semillas, raíces, puntas de raíces y similares.

[0050] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones pretenden significar en su sentido no limitativo que se incluyen los elementos que siguen a la palabra, pero no se excluyen los elementos que no se mencionan específicamente. También abarca el verbo más limitativo "consistir en". Además, la referencia a un elemento mediante el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que esté presente más de uno de los elementos, a menos que el contexto requiera claramente que solo haya uno de los elementos. Por lo tanto, el artículo indefinido "un" o "una" significa normalmente "al menos un/a". Se entiende, además, que, cuando se hace referencia a "secuencias" en el presente documento, generalmente se hace referencia a las moléculas físicas reales con una determinada secuencia de subunidades (por ejemplo, aminoácidos).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Proteínas y secuencias de ácidos nucleicos

[0051] La proteína 7-epizingibereno sintasa de la presente invención tiene un 91 % de identidad de secuencia a lo largo de toda la longitud con una proteína que tiene la entrada ACJ38409.1 de GenBank (710 de 777 aminoácidos idénticos), donde dicha proteína se denomina una santaleno y bergamoteno sintasa de *Solanum*

habrochaites. Se sabe que dicha proteína produce (+)-alfa-santaleno, (-)-endo-alfa-bergomoteno y (+)-endo-beta-bergamoteno (Sallaud *et al.*, *Plant Cell*, vol. 21(1), 301-317, 2009 y US 2010-0138954).

[0052] En un aspecto descrito en el presente documento se proporcionan secuencias de ácidos nucleicos y secuencias de aminoácidos de proteínas 7-epizingibereno sintasa (incluidos los ortólogos), así como métodos para aislar o identificar ortólogos de proteínas 7-epizingibereno sintasa en otras especies de plantas, como otras de Solanaceae. Las proteínas 7-epizingibereno sintasa y fragmentos funcionales y variantes de las mismas, como se hace referencia en este caso, son capaces de producir 7-epizingibereno a partir de Z,Z-farnesildifosfato ("zFPP"). Por lo tanto, dichas proteínas, así como sus fragmentos funcionales y variantes, tienen actividad de 7-epizingibereno sintasa.

[0053] En una forma de realización, se proporcionan proteínas 7-epizingibereno sintasa. Las "proteínas 7-epizingibereno sintasa" comprenden la proteína representada en SEQ ID NO: 1, así como fragmentos y variantes de la misma. Las variantes de la 7-epizingibereno sintasa son proteínas que tienen al menos un 92 %, 92,5 %, 93 %, 93,5 %, 94 %, 94,5 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,5 % o más, como un 100 %, de identidad de secuencia de aminoácidos a lo largo de toda la longitud con la SEQ ID NO: 1. La identidad de secuencia de aminoácidos se determina mediante alineamiento por pares usando el algoritmo de Needleman y Wunsch y los parámetros de GAP predeterminados, tal y como se ha definido anteriormente. Las variantes también incluyen proteínas que tienen actividad de 7-epizingibereno, que se han derivado, mediante una o más sustituciones, delecciones o inserciones de aminoácidos, del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, dichas proteínas comprenden desde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más hasta aproximadamente 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15 sustituciones, delecciones o inserciones de aminoácidos. Por ejemplo, y sin limitación, se pueden sustituir los siguientes aminoácidos: R10, P22, V42, K60, S90, N159, F190, I200, V298, A304, I310, V498, M504, S609, I626, F646. Por ejemplo, y sin limitación, se pueden introducir las siguientes sustituciones: R10Q, P22T, V42L, K60N, S90T, N159S, F190V, I200M, V298A, A304V, I310M, V498M, M504I, S609T, I626L, F646C.

[0054] Las variantes de la 7-epizingibereno sintasa se pueden obtener de diversas fuentes, como, por ejemplo, de otras especies de plantas (especialmente otras especies de Solanaceae) u otras variedades, o pueden obtenerse mediante síntesis de novo, mutagénesis y similares. Por lo tanto, las proteínas 7-epizingibereno sintasa según la invención pueden aislarse de fuentes naturales, sintetizarse de novo mediante síntesis química (usando, por ejemplo, un sintetizador de péptidos, como el suministrado por Applied Biosystems) o producirse mediante células huésped recombinantes expresando la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína 7-epizingibereno sintasa, el fragmento o la variante. Las variantes y los fragmentos son preferiblemente funcionales, es decir, tienen actividad de 7-epizingibereno sintasa. Cuando la proteína 7-epizingibereno sintasa de la presente invención no está precedida por una secuencia de direccionamiento, como se describe a continuación, la proteína 7-epizingibereno sintasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una variante de la misma, tal y como se define en el presente documento, estará precedida por un residuo de metionina, y la secuencia de ácido nucleico que codifica dicha proteína, por ejemplo, como se representa en SEQ ID NO: 2, estará precedida por un codón de inicio. En el caso de que la proteína 7-epizingibereno sintasa de la presente invención esté precedida por una secuencia de direccionamiento, dicha metionina estará codificada dentro del péptido de direccionamiento.

[0055] Las variantes de la 7-epizingibereno sintasa pueden comprender sustituciones de aminoácidos conservadoras dentro de las categorías básicas (por ejemplo, Arg, His, Lys), ácidas (por ejemplo, Asp, Glu), no polares (p. ej. Ala, Val, Trp, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp) o polares (por ejemplo, Gly, Ser, Thr, Tyr, Cys, Asn, Gln). Además, las sustituciones de aminoácidos no conservativas se encuentran dentro del alcance de la invención.

[0056] La funcionalidad de cualquier proteína 7-epizingibereno sintasa, variante o fragmento, se puede determinar usando varios métodos. Por ejemplo, la sobreexpresión transitoria o estable en células vegetales se puede usar para probar si la proteína tiene actividad, es decir, proporciona una resistencia mejorada a las plagas de insectos, *in planta*. La funcionalidad se prueba preferiblemente en *Solanum lycopersicum*. Por lo tanto, por ejemplo, se puede utilizar la expresión transitoria o estable para determinar si se mejora la resistencia a las plagas de insectos, lo que indica funcionalidad.

[0057] Los "fragmentos" de proteínas 7-epizingibereno sintasa y de variantes de proteínas 7-epizingibereno sintasa, como se ha descrito anteriormente, comprenden fragmentos de 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, aminoácidos contiguos o más, como 777. Preferiblemente, dichos fragmentos son funcionales en el tejido vegetal, es decir, son capaces de conferir o mejorar la resistencia a las plagas de insectos cuando se producen en células vegetales.

[0058] En otra forma de realización, se proporcionan secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican cualquiera de las proteínas, las variantes o los fragmentos anteriores, tales como secuencias de ADNc, ADN genómico y ARN. Debido a la degeneración del código genético, varias secuencias de ácidos nucleicos pueden codificar la misma secuencia de aminoácidos. En el presente documento, se hace referencia a cualquier

secuencia de ácido nucleico que codifique proteínas 7-epizingibereno sintasa o variantes de las mismas como "secuencias codificantes de 7-epizingibereno sintasa". Las secuencias de ácidos nucleicos proporcionadas incluyen secuencias de ácidos nucleicos naturales, artificiales o sintéticas. Una de estas secuencias de ácidos nucleicos que codifican una proteína 7-epizingibereno sintasa se proporciona en SEQ ID NO: 2. Se entiende que, cuando las secuencias se representan como secuencias de ADN mientras se hace referencia a ARN, la secuencia de bases reales de la molécula de ARN es idéntica a la diferencia de que la timina (T) se reemplaza por uracilo (U).

[0059] También se describen variantes y fragmentos de secuencias de ácidos nucleicos que codifican la 7-epizingibereno sintasa, como las secuencias de ácidos nucleicos que se hibridan con secuencias de ácidos nucleicos que codifican la 7-epizingibereno sintasa en condiciones de hibridación rigurosas, tal y como se define. Las variantes de secuencias de ácidos nucleicos que codifican la 7-epizingibereno sintasa son secuencias de ácidos nucleicos que tienen una identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 (a lo largo de toda la longitud) de al menos el 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o más. Está claro que se pueden usar muchos métodos para identificar, sintetizar o aislar variantes o fragmentos de secuencias de ácidos nucleicos que codifican la 7-epizingibereno sintasa, como la hibridación de ácidos nucleicos, la tecnología PCR, el análisis *in silico* y la síntesis de ácidos nucleicos, y similares.

[0060] La secuencia de ácido nucleico, particularmente la secuencia de ADN, que codifica las proteínas 7-epizingibereno sintasa de esta invención se puede insertar en vectores de expresión para producir grandes cantidades de proteínas 7-epizingibereno sintasa, como se describe a continuación. Para una expresión óptima en un huésped, las secuencias de ADN que codifican la 7-epizingibereno sintasa se pueden optimizar en cuanto a codones adaptando el uso de codones a los más preferidos en los genes del huésped (como plantas). En el caso de que el huésped sea una planta, el uso de codones puede adaptarse particularmente a genes nativos del género o la especie de planta de interés (Bennetzen y Hall, 1982, *J. Biol. Chem.* 257, 3026-3031; Itakura *et al.*, 1977 *Science* 198, 1056-1063.) utilizando las tablas de uso de codones disponibles (por ejemplo, más adaptadas a la expresión en algodón, soja, maíz o arroz). Las tablas de uso de codones para varias especies de plantas han sido publicadas, por ejemplo, por Ikemura (1993, en "Plant Molecular Biology Labfax", Croy, ed., *Scientific Publishers Ltd.*) y Nakamura *et al.* (2000, *Nucl. Acids Res.* 28, 292) y en las principales bases de datos de secuencias de ADN (por ejemplo, EMBL en Heidelberg, Alemania). En consecuencia, se pueden construir secuencias de ADN sintético, de modo que se produzcan las mismas proteínas o sustancialmente las mismas. Se pueden encontrar varias técnicas para modificar el uso de codones según lo prefieran las células huésped en la literatura científica y de patentes. El método exacto de modificación del uso de codones no es crítico.

[0061] Se pueden realizar pequeñas modificaciones a una secuencia de ADN, tal y como se ha descrito anteriormente de forma rutinaria, es decir, mediante mutagénesis mediada por PCR (Ho *et al.*, 1989, *Gene* 77, 51-59., White *et al.*, 1989, *Trends in Genet.* 5, 185-189).

[0062] Los "fragmentos" de secuencias de ácidos nucleicos que codifican la 7-epizingibereno sintasa incluyen fragmentos de al menos 10, 12, 15, 16, 18, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 o más nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 2, o de variantes de SEQ ID NO: 2. Los fragmentos cortos se pueden utilizar, por ejemplo, como cebadores o sondas de hibridación de PCR. Se describen cebadores y/o sondas de PCR y kits para detectar las secuencias de ADN o ARN que codifican la 7-epizingibereno sintasa. Los pares de cebadores de PCR degenerados o específicos para amplificar el ADN que codifica la 7-epizingibereno sintasa a partir de muestras se pueden sintetizar basándose en la SEQ ID NO: 2 (o variantes de la misma) como se conoce en la técnica (véase Dieffenbach y Dveksler (1995) *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press y McPherson *et al.* (2000) *PCR-Basics: From Background to Bench*, 1^a edición, Springer Verlag, Alemania). Por ejemplo, cualquier tramo de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18 o más nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 2 (o la cadena complementaria) se puede usar como cebador o sonda. Asimismo, los fragmentos de ADN de SEQ ID NO: 2 (o variantes de la misma) se pueden usar como sondas de hibridación. Un kit de detección para secuencias codificantes de la 7-epizingibereno sintasa puede comprender iniciadores específicos para secuencias codificantes de la 7-epizingibereno sintasa y/o sondas específicas para secuencias codificantes de la 7-epizingibereno sintasa, y un protocolo asociado para utilizar los cebadores o la sonda para detectar secuencias de ADN específicas para la zingibereno sintasa en una muestra. Dicho kit de detección se puede usar, por ejemplo, para determinar, si una planta ha sido transformada con un gen específico que codifica la 7-epizingibereno sintasa (o parte del mismo). Debido a la degeneración del código genético, algunos codones de aminoácidos pueden ser reemplazados por otros sin cambiar la secuencia de aminoácidos de la proteína.

[0063] Se describe un método para identificar y usar ortólogos o alelos del gen que codifica la 7-epizingibereno sintasa de *Solanum habrochaites* (SEQ ID NO: 2). El método comprende los pasos de:

- a) obtener o identificar una secuencia de ácido nucleico que comprenda al menos un 96,5 % de identidad de ácido nucleico con la SEQ ID NO: 2 (o un porcentaje de identidad de secuencia superior, como se indicó anteriormente),
- b) usar la secuencia de ácido nucleico de a) para generar vectores de expresión y/o silenciamiento,

- c) usar uno o más vectores de b) para transformar una planta o una o más célula(s) vegetal(es), preferiblemente de la especie vegetal de la que se obtuvo el ácido nucleico,
 5 d) analizar la capacidad de la planta o del tejido vegetal transformados para resistir a las plagas con el fin de determinar o verificar la función del gen *in planta* y/o generar plantas transgénicas que tengan una resistencia mejorada a las plagas de insectos;
 e) opcionalmente, seleccionar aquellos alelos u ortólogos para su posterior uso que confieran mayor resistencia de las plagas a la planta transgénica.

Genes químicos, vectores de expresión, células huésped y organismos recombinantes

- [0064] En un aspecto descrito en el presente documento, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas 7-epizingibereno sintasa (incluidos fragmentos o variantes), como se ha descrito anteriormente, se usan para generar genes químicos, y vectores que los comprenden para la transferencia del gen químico a una célula huésped y la producción de la(s) proteína(s) 7-epizingibereno sintasa en células huésped, tales como células, tejidos, órganos u organismos derivados de células transformadas. En un aspecto ventajoso, la producción de 7-epizingibereno sintasa se emplea para la producción de 7-epizingibereno. Los vectores para la producción de la proteína 7-epizingibereno sintasa (o fragmentos o variantes de proteína) en células vegetales se denominan en este caso "vectores de expresión".
- [0065] Las células huésped adecuadas para la expresión de polipéptidos, como la 7-epizingibereno sintasa incluyen procariotas, levaduras o células eucariotas superiores. Los vectores de clonación y expresión adecuados para su uso con huéspedes celulares bacterianos, fúngicos, de levaduras y de mamíferos se describen, por ejemplo, en Pouwels *et al.*, *Cloning vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, N.Y., (1985). También se podrían emplear sistemas de traducción sin células para producir las proteínas de la presente invención utilizando ARN derivados de secuencias de ácidos nucleicos descritas en este documento. En un aspecto, dicha célula huésped sobreproduce farnesil-difosfato (también denominado "FPP"). En un aspecto adecuado, dicha célula huésped produce o sobreproduce 2Z,6Z-farnesildifosfato (también denominado "Z,Z-farnesil pirofosfato" o "zFPP"). El experto en la técnica es capaz de sobreproducir el sustrato de la 7-epizingibereno sintasa de la presente invención para producir 7-epizingibereno.
- [0066] Las células huésped procariotas adecuadas incluyen organismos gramnegativos y grampositivos, por ejemplo, *Escherichia coli* o *Bacilli*. Otra célula huésped procariota adecuada es *Agrobacterium*, en particular *Agrobacterium tumefaciens*.
- [0067] Las proteínas de la presente invención también se puede expresar en células huésped de levadura, por ejemplo, del género *Saccharomyces* (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*). También se pueden emplear otros géneros de levaduras, como *Pichia* o *Kluyveromyces*.
- [0068] Alternativamente, las proteínas de la presente invención pueden expresarse en células huésped eucariotas superiores, incluidas las células vegetales, células fúngicas, células de insectos y células de mamíferos, opcionalmente no humanas.
- [0069] Un aspecto descrito en el presente documento es un organismo no humano modificado para comprender una secuencia de ácido nucleico de la presente invención. El organismo no humano y/o la célula huésped se puede(n) modificar mediante cualquier método conocido en la técnica para la transferencia de genes, incluido, por ejemplo, el uso de dispositivos de administración, tales como lípidos y vectores virales, ADN desnudo, electroporación, métodos químicos y transferencia de genes mediada por partículas. En una forma de realización ventajosa, el organismo no humano es una planta.
- [0070] Cualquier planta puede ser un huésped adecuado, como plantas monocotiledóneas o plantas dicotiledóneas, pero lo más preferible es que la planta huésped pertenezca a la familia Solanaceae. Por ejemplo, la planta pertenece al género *Solanum* (incluido *Lycopersicon*), *Nicotiana*, *Capsicum*, *Petunia* y otros géneros. Se pueden usar adecuadamente las siguientes especies huésped: tabaco (especies de *Nicotiana*, por ejemplo, *N. benthamiana*, *N. plumbaginifolia*, *N. tabacum*, etc.), especies vegetales, como, por ejemplo, el tomate (*L. esculentum*, con *Solanum lycopersicum*) como, por ejemplo, tomate cherry, tomate var. *cerasiforme* o grosella, var. *pimpinellifolium*) o tomate de árbol (*S. betaceum*, con *Cyphomandra betaceae*), patata (*Solanum tuberosum*), berenjena (*Solanum melongena*), pepino (*Solanum muricatum*), cocona (*Solanum sessiliflorum*) y naranjilla (*Solanum quitoense*), pimientos (*Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum baccatum*), especies ornamentales (por ejemplo, *Petunia hybrida*, *Petunia axillaries*, *P. integrifolia*), café (*Coffea*).
- [0071] Alternativamente, la planta puede pertenecer a cualquier otra familia, como a las *Cucurbitaceae* o *Gramineae*. Las plantas huésped adecuadas incluyen, por ejemplo, maíz (especie *Zea*), trigo (especie *Triticum*), cebada (por ejemplo, *Hordeum vulgare*), avena (por ejemplo, *Avena sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*), centeno (*Secale cereale*), soja (*Glycine* spp, por ejemplo, *G. Max*), algodón (especie *Gossypium*, por ejemplo, *G. hirsutum*, *G. barbadense*), *Brassica* spp. (por ejemplo, *B. napus*, *B. juncea*, *B. oleracea*, *B. rapa*, etc), girasol (*Helianthus annus*), cártamo, ñame, mandioca, alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (especie *Oryza*, por ejemplo,

grupo de cultivares *O. sativa* indica o grupo de cultivares japonica), gramíneas forrajeras, mijo perla (*Pennisetum* spp. por ejemplo, *P. glaucum*), especies de árboles (pino, álamo, abeto, plátano, etc.), té, café, palma aceitera, coco, especies vegetales, tales como guisante, calabacín, frijoles (especie *Phaseolus*), pepinos, alcachofa, espárrago, brócoli, ajo, puerro, lechuga, cebolla, rábano, nabo, coles de Bruselas, zanahoria, coliflor, achicoria, apio, espinaca, endibia, hinojo, remolacha, plantas que dan frutos carnosos (uvas, melocotones, ciruelas, fresa, mango, manzana, ciruela, cereza, albaricoque, plátano, mora, arándano, cítrico, kiwi, higos, limón, cal, nectarinas, framuesa, sandía, naranja, pomelo, etc.), especies ornamentales (por ejemplo, rosa, petunia, crisantemo, lirio, especie *Gerbera*), hierbas (menta, perejil, albahaca, tomillo, etc.), árboles leñosos (por ejemplo, especies *Populus*, *Salix*, *Quercus*, *Eucalyptus*), especies de fibra, por ejemplo, lino (*Linum usitatissimum*) y cáñamo (*Cannabis sativa*), u organismos modelo, como *Arabidopsis thaliana*.

[0072] Los huéspedes preferidos son "plantas de cultivo" o "plantas cultivadas", es decir, especies de plantas que son cultivadas y criadas por humanos. Una planta de cultivo puede cultivarse con fines de alimentación humana o animal (por ejemplo, cultivos de campo) o con fines ornamentales (por ejemplo, producción de flores para cortar, hierbas para jardines, etc.). Una planta de cultivo, tal y como se define en el presente documento, también incluye plantas de las que se cosechan productos no alimentarios, como aceite para combustible, polímeros plásticos, productos farmacéuticos, corcho, fibras (como algodón) y similares.

[0073] La construcción de genes y vectores químéricos para la introducción, preferiblemente estable, de secuencias de ácidos nucleicos que codifican la proteína 7-epizingibereno sintasa en el genoma de células huésped se conoce generalmente en la técnica. Para generar un gen químérico, la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína 7-epizingibereno sintasa (o una variante o un fragmento de la misma) se une operativamente a una secuencia promotora, adecuada para la expresión en las células huésped, usando técnicas de biología molecular estándar. La secuencia promotora puede estar ya presente en un vector, de modo que la secuencia de ácido nucleico de la 7-epizingibereno sintasa se inserta simplemente en el vector en dirección hacia el extremo 3' de la secuencia promotora. El vector se usa entonces para transformar las células huésped y el gen químérico se inserta en el genoma nuclear o en el genoma plastídial, mitocondrial o cloroplástico y se expresa allí usando un promotor adecuado (por ejemplo, Mc Bride et al., 1995 *Bio/Technology* 13, 362; US 5,693, 507). En una forma de realización, un gen químérico comprende un promotor adecuado para la expresión en células vegetales o células microbianas (por ejemplo, bacterias), unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína 7-epizingibereno sintasa según la invención, seguido opcionalmente de una secuencia de ácido nucleico 3' no traducida. Las bacterias se pueden usar posteriormente para la transformación de plantas (transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*).

[0074] La secuencia de ácido nucleico de la 7-epizingibereno sintasa, preferiblemente un gen químérico de la 7-epizingibereno sintasa, que codifica una proteína 7-epizingibereno sintasa funcional, se puede insertar de forma estable de manera convencional en el genoma nuclear de una sola célula vegetal, y la célula vegetal transformada de esta manera se puede usar de modo convencional para producir una planta transformada que tiene un fenotipo alterado debido a la presencia de la proteína 7-epizingibereno sintasa en algunas células en un momento determinado. A este respecto, se utiliza un vector de ADN-T, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína zingibereno sintasa, en *Agrobacterium tumefaciens* se puede usar para transformar la célula vegetal, y a continuación, se puede generar una planta transformada a partir de la célula vegetal transformada usando los procedimientos descritos, por ejemplo, en el documento EP 0 116 718, EP 0 270 822, la publicación PCT WO84/02913 y la solicitud de patente europea publicada EP 0 242 246 y en Gould et al. (1991, *Plant Physiol.* 95, 426-434). La construcción de un vector de ADN-T para la transformación de plantas medida por *Agrobacterium* es bien conocida en la técnica. El vector de ADN-T puede ser un vector binario como se describe en los documentos EP 0 120 561 y EP 0 120 515 o un vector cointegrado que se puede integrar en el plásmido Ti de *Agrobacterium* mediante recombinación homóloga, como se describe en el documento EP 0 116 718.

[0075] Los vectores de ADN-T preferidos contienen cada uno un promotor unido operativamente a una 7-epizingibereno sintasa que codifica la 7-epizingibereno sintasa (por ejemplo, que codifica la SEQ ID NO: 2) entre secuencias límitrofes del ADN-T, o al menos ubicadas a la izquierda de la secuencia límitrofe derecha. Las secuencias de borde se describen en Gielen et al. (1984, *EMBO J* 3,835-845). Evidentemente se pueden utilizar otros tipos de vectores para transformar la célula vegetal usando procedimientos, tales como la transferencia directa de genes (como se describe, por ejemplo, en el documento EP 0 223 247), la transformación mediada por polen (como se describe, por ejemplo, en los documentos EP 0 270 356 y WO85/01856), la transformación de protoplastos como, por ejemplo, se describe en el documento US 4,684, 611, la transformación mediada por virus de ARN de plantas (como se describe, por ejemplo en el documento US 4,536, 475) y otros métodos. Para la transformación de tomates o tabaco, véase también An G. et al., 1986, *Plant Physiol.* 81: 301-305; Horsch R.B. et al., 1988, En: *Plant Molecular Biology Manual* A5, Dordrecht, Países Bajos, Kluwer Academic Publishers. pp 1-9; Koornneef M. et al., 1986, En: Nevins D.J. y R.A. Jones, eds. *Tomato Biotechnology*, Nueva York, NY, EE. UU., Alan R. Liss, Inc., págs. 169-178). Para la transformación de la patata, véase, por ejemplo, Sherman y Bevan (1988, *Plant Cell Rep.* 7: 13-16).

[0076] Asimismo, la selección y regeneración de plantas transformadas a partir de células transformadas es bien conocida en la técnica. Obviamente, para diferentes especies e incluso para diferentes variedades o cultivares de una única especie, existen protocolos adaptados específicamente para regenerar transformantes a alta frecuencia.

5 [0077] Además de la transformación del genoma nuclear, también se incluye en la invención la transformación del genoma plastidial, preferiblemente el genoma cloroplástico. Una ventaja de la transformación del genoma cloroplástico es que se puede reducir el riesgo de propagación del/de los transgén(es). La transformación del genoma plastidial se puede llevar a cabo como se conoce en la técnica, véase, por ejemplo, Sidorov VA *et al.* 10 1999, *Plant J.* 19: 209-216 o Lutz KA *et al.* 2004, *Plant J.* 37(6):906-13.

15 [0078] La planta transformada resultante se puede usar en un esquema de cultivo de plantas convencional para producir más plantas transformadas que contengan el transgén. Los transformantes de copia única se pueden seleccionar, usando, por ejemplo, análisis de "Southern blot" o métodos basados en PCR o el ensayo Invader® Technology (Third Wave Technologies, Inc.). Alternativamente, la cantidad de 7-epizingibereno se puede determinar usando métodos analíticos, tales como CG-EM. Las células y plantas transformadas se pueden distinguir fácilmente de las no transformadas por la presencia del gen químérico. Las secuencias del ADN de la planta que flanquean el sitio de inserción del transgén también se pueden secuenciar, por lo que se puede desarrollar un método de detección "específico del evento" para uso rutinario. Véase, por ejemplo, el documento 20 WO0141558, que describe kits de detección de eventos de élite (tales como kits de detección por PCR) basados, por ejemplo, en la secuencia integrada y la secuencia flanqueante (genómica).

25 [0079] La secuencia de ácido nucleico de la 7-epizingibereno sintasa se puede insertar en un genoma de la célula vegetal, de modo que la secuencia codificante insertada se encuentra en dirección hacia el extremo 3' de, y bajo el control de, un promotor que puede dirigir la expresión en la célula vegetal. Esto se logra preferiblemente insertando el gen químérico en el genoma de la célula vegetal, particularmente en el genoma nuclear o plastidial (por ejemplo, cloroplástico).

30 [0080] Como la producción constitutiva de la proteína 7-epizingibereno sintasa puede conducir a la inducción de la muerte celular y/o puede reducir el rendimiento (véase, por ejemplo, Rizhsky y Mittler, *Plant Mol Biol*, 2001 46: 313-23), en una forma de realización preferida, se prefiere usar un promotor cuya actividad sea inducible. Los ejemplos de promotores inducibles son los promotores inducibles por herida, como el promotor MPI descrito por Cordera *et al.* (1994, *The Plant Journal* 6, 141), que se induce por herida (como las causadas por insectos o heridas físicas), o el promotor COMPTII (WO0056897) o el promotor PR1 descrito en el documento US6031151. 35 Alternativamente, el promotor puede ser inducible por una sustancia química, como la dexametasona, como describen Aoyama y Chua (1997, *Plant Journal* 11: 605-612) y en el documento US6063985 o por tetraciclina (promotor TOPFREE o TOP 10, véase Gatz, 1997, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 48: 89-108 y Love *et al.* 2000, *Plant J.* 21: 579-88). Otros promotores inducibles son, por ejemplo, los inducibles por un cambio en temperatura, como el promotor de choque térmico descrito en el documento US 5,447, 858, por condiciones anaeróbicas (por ejemplo, el promotor ADH1S del maíz), por la luz (US6455760), por patógenos (por ejemplo, el promotor de gst1 del documento EP759085 o el promotor de vst1 del documento EP309862) o por senescencia (SAG12 y SAG13, véase el documento US5689042). Obviamente, hay una variedad de otros promotores disponibles.

40 [0081] En una forma de realización, preferiblemente, se usa un promotor inducible por plagas de insectos, ya que, de este modo, la proteína 7-epizingibereno sintasa (o variante o fragmento) solo se producirá después del ataque de la plaga de insectos al tejido vegetal. Especialmente, se desean promotores de genes que se regulan positivamente de manera rápida después del ataque de una plaga de insectos. Los promotores inducibles por una plaga de insectos de plantas particular también pueden identificarse utilizando métodos conocidos, como cDNA-AFLP®.

45 [0082] Preferiblemente, el promotor es inducible por una serie de plagas de insectos, es decir, es inducible por una amplia gama de plagas de insectos de la planta huésped. Para cada especie de planta huésped particular, puede ser más adecuado un promotor diferente. Por ejemplo, cuando se utiliza el tomate como huésped, el promotor se induce preferiblemente en al menos una, pero preferiblemente más de una plaga de insectos del tomate. Especialmente, se prefiere un promotor que sea inducible por una o más plagas de insectos.

50 [0083] Se pueden encontrar descripciones detalladas de plagas de insectos de plantas, los síntomas de enfermedades que causan y sus ciclos de vida para cada especie de planta. Por ejemplo, las plagas de insectos del tomate se describen en "Compendium of Tomato Diseases", editores Jones, Jones, Stall y Zitter, ISBN 0-89054-120-5, APS Press (<http://www.shopapspress.org/>).

55 [0084] Como alternativa, una planta huésped puede comprender varios transgenes de la 7-epizingibereno sintasa, cada uno de ellos bajo el control de un promotor inducible por plagas diferentes, para garantizar que la proteína 7-epizingibereno sintasa se produzca tras el ataque de una variedad de plagas de insectos. Por

ejemplo, para la transformación del tomate, un promotor puede ser inducible por la mosca blanca y otro promotor puede ser inducible por los pulgones.

[0085] La palabra "inducible" no requiere necesariamente que el promotor esté completamente inactivo en ausencia del estímulo inductor. Puede estar presente una actividad no específica de bajo nivel, siempre que no de como resultado una pérdida grave de rendimiento o calidad de las plantas. Por lo tanto, inducible se refiere preferiblemente a un aumento de la actividad del promotor, lo que da como resultado un aumento de la transcripción de la región codificante de la sintasa zingibereno en dirección hacia el extremo 3' tras el contacto con el inductor.

[0086] En otra forma de realización, se pueden utilizar promotores constitutivos, tales como los promotores constitutivos fuertes 35S o los promotores 35S mejorados (los "promotores 35S") del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) de los aislados CM 1841 (Gardner *et al.*, 1981, *Nucleic Acids Research* 9, 2871-2887), CabbB-S (Franck *et al.*, 1980, *Cell* 21, 285-294) y CabbB-JI (Hull y Howell, 1987, *Virology* 86,482-493); el promotor 35S descrito por Odell *et al.* (1985, *Nature* 313, 810-812) o en el documento US5164316, promotores de la familia de la ubiquitina (por ejemplo, el promotor de la ubiquitina del maíz de Christensen *et al.*, 1992, *Plant Mol. Biol.* 18,675-689, EP 0 342 926, véase también Cornejo *et al.* 1993, *Plant Mol. Biol.* 23, 567-581), el promotor gos2 (de Pater *et al.*, 1992 *Plant J.* 2, 834-844), el promotor emu (Last *et al.*, 1990, *Theor. Appl. Genet.* 81,581-588), promotores de la actina de Arabidopsis, como el promotor descrito por An *et al.* (1996, *Plant J.* 10, 107.), promotores de actina de arroz, como el promotor descrito por Zhang *et al.* (1991, *The Plant Cell* 3, 1155-1165) y el promotor descrito en el documento US 5,641,876 o el promotor de actina 2 de arroz, como se describe en WO070067; promotores del virus del mosaico de las nervaduras de la mandioca (WO 97/48819, Verdaguer *et al.* 1998, *Plant Mol. Biol.* 37,1055-1067), la serie pPLEX de promotores del virus del enanismo del trébol subterráneo (WO 96/06932, particularmente el promotor S7), un promotor de la alcohol deshidrogenasa, por ejemplo, pAdh1S (números de acceso a GenBank X04049, X00581), y el promotor TR1 y el promotor TR2 (el "promotor TR1" y el "promotor TR2", respectivamente) que accionan la expresión de los genes 1' y 2', respectivamente, del ADN-T (Velten *et al.*, 1984, *EMBO J* 3, 2723-2730), el promotor del virus del mosaico de la escrofularia descrito en el documento US6051753 y en el documento EP426641, promotores de genes de histonas, tales como el promotor Ph4a748 de Arabidopsis (PMB 8: 179-191), u otros.

[0087] Alternativamente, se puede utilizar un promotor que no sea constitutivo sino más bien específico para uno o más tejidos u órganos de la planta (tejido preferido/tejido específico, incluidos los promotores regulados por el desarrollo), por ejemplo, preferido para la hoja, preferido para la epidermis, preferido para la raíz, tejido floral, por ejemplo, preferido para el tapete o la antera, preferido para la semilla, preferido para la cápsula, etc.), o promotores específicos de tricomas, como MTS1 y MSK1, como se describe en el documento WO2009082208, por lo que el gen de la 7-epizingibereno sintasa se expresa solamente en células del/de los tejido(s) u órgano(s) específico(s) y/o solamente durante una cierta fase de desarrollo. Por ejemplo, el/los gen(es) de la 7-epizingibereno sintasa se puede(n) expresar selectivamente en las hojas de una planta colocando la secuencia codificante bajo el control de un promotor inducible por luz, como el promotor del gen de la subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bisfósfato carboxilasa de la propia planta o de otra planta, como el guisante, como se describe en el documento US 5,254, 799 o *Arabidopsis*, como se describe en el documento US5034322.

[0088] En una forma de realización, se usa el promotor del gen de la 7-epizingibereno sintasa de *Solanum habrochaites* (especie de tomate silvestre) proporcionado por la presente invención. Por ejemplo, el promotor del gen de la 7-epizingibereno sintasa de *S. habrochaites* se puede aislar y unir operativamente a la región codificante que codifica la proteína zingibereno sintasa de SEQ ID NO: 1. El promotor del gen de la 7-epizingibereno sintasa (la región reguladora de la transcripción en dirección hacia el extremo 5' de SEQ ID NO: 2) se puede aislar de las plantas de *S. habrochaites* usando métodos conocidos, como TAIL-PCR (Liu *et al.* 1995, *Genomics* 25(3):674-81; Liu *et al.* 2005, *Methods Mol Biol.* 286:341-8), enlazador de PCR o PCR inversa (PCRI).

[0089] La secuencia codificante de la 7-epizingibereno sintasa se inserta preferiblemente en el genoma de la planta, de modo que la secuencia codificante se encuentre en dirección hacia el extremo 5' de la región no traducida del extremo 3' adecuada ("extremo 3'' o 3' UTR). Los extremos 3' adecuados incluyen los del gen 35S de CaMV ("3' 35S"), el gen de la nopalina sintasa ("3' nos") (Depicker *et al.*, 1982 *J. Molec. Appl. Genetics* 1, 561-573.), el gen de la octopina sintasa ("3' ocs") (Gielen *et al.*, 1984, *EMBO J* 3, 835-845) y el gen 7 del ADN-T ("gen 7 3'") (Velten y Schell, 1985, *Nucleic Acids Research* 13, 6981-6998), que actúan como secuencias de ADN 3' no traducidas en células vegetales transformadas, y otros. En una forma de realización se usa la 3' UTR del gen de la 7-epizingibereno sintasa del tomate de *Solanum habrochaites* (especie de tomate silvestre). La introducción del vector de ADN-T en *Agrobacterium* se puede llevar a cabo usando métodos conocidos, como la electroporación o el acoplamiento triparental.

[0090] Opcionalmente, se puede insertar una secuencia de ácido nucleico que codifica la 7-epizingibereno sintasa en el genoma de la planta como una secuencia de gen híbrido, por medio de la cual la secuencia de la 7-epizingibereno sintasa se une en el marco de lectura a un gen (US 5,254, 799; Vaeck *et al.*, 1987, *Nature* 328, 33-37) que codifica un marcador seleccionable o puntuable, como, por ejemplo, el gen neo (o nptII) (EP 0 242

236) que codifica la resistencia a la kanamicina, de modo que la planta exprese una proteína de fusión que sea fácilmente detectable. Como alternativa, se puede introducir una secuencia de ácido nucleico que codifica 7-epizingibereno mediante cotransformación con un gen que codifica un marcador seleccionable o puntuable, o los dos genes pueden estar presentes en un único ADN-T.

5 [0091] La totalidad o parte de una secuencia de ácido nucleico de la 7-epizingibereno sintasa, que codifica una proteína 7-epizingibereno sintasa (o una variante o un fragmento), también se puede usar para transformar microorganismos, tales como bacterias (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, etc.), hongos, o algas o insectos, o para crear virus recombinantes. La transformación de bacterias, con toda o 10 parte de la secuencia de ácido nucleico que codifica la 7-epizingibereno sintasa de esta invención, incorporada en un vehículo de clonación adecuado, se puede llevar a cabo de manera convencional, preferiblemente usando técnicas de electroporación convencionales, como se describe en Maillon *et al.* (1989, *FEMS Microbiol. Letters* 60, 205-210.) y el documento WO 90/06999. Para la expresión en células huésped procariotas, el uso de 15 codones de la secuencia de ácido nucleico se puede optimizar en consecuencia (como se describió anteriormente para las plantas). Se deberían eliminar las secuencias de intrones y se pueden realizar otras adaptaciones para una expresión óptima según se conoce.

20 [0092] La secuencia de ADN de la secuencia de ácido nucleico que codifica la 7-epizingibereno sintasa se puede cambiar, además, de una manera neutra en cuanto a la traducción para modificar posiblemente las secuencias de ADN inhibidoras presentes en la parte del gen y/o introduciendo cambios en el uso del codón, por ejemplo, adaptando el uso del codón al más preferido por las plantas, preferiblemente el género de planta relevante 25 específico, como se describió anteriormente.

25 [0093] Según una forma de realización de esta invención, las proteínas de la 7-epizingibereno sintasa se dirigen a orgánulos intracelulares, tales como plástidos, preferiblemente cloroplastos, mitocondrias, o se secretan de la célula, optimizando potencialmente la estabilidad y/o expresión de la proteína. De forma similar, la proteína se puede dirigir a las vacuolas. La orientación a los plástidos es particularmente atractiva, ya que la sobreproducción de sesquiterpenos en el citosol es normalmente tóxica para las células, mientras que la sobreproducción de sesquiterpenos en los plástidos no sufre este problema. Para este fin, en una forma de 30 realización de esta invención, los genes químéricos de la invención comprenden una región codificante que codifica un péptido señal o diana, unido a la región codificante de la proteína 7-epizingibereno sintasa de la invención. El péptido señal o diana puede ser, por ejemplo, el péptido natural dirigido a los plástidos de dicha 7-epizingibereno sintasa, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO: 3 (codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4). Otros péptidos preferidos para incluir en las 35 proteínas de esta invención son los péptidos de tránsito para el direccionamiento a cloroplastos u otros plástidos, especialmente regiones de péptidos de tránsito duplicadas de genes vegetales cuyo producto génico está dirigido a los plástidos, el péptido de tránsito optimizado de Capellades *et al.* (US 5,635, 618), el péptido de tránsito de ferredoxina-NADP+oxidoreductasa de espinaca (Oelmuller *et al.*, 1993, *Mol. Gen. Genet.* 237,261-272), el péptido de tránsito descrito en Wong *et al.* (1992, *Plant Molec. Biol.* 20, 81-93) y los péptidos de 40 dirección en la solicitud de patente PCT publicada WO 00/26371. También se prefieren los péptidos que señalan la secreción de una proteína unida a dicho péptido fuera de la célula, como la señal de secreción del inhibidor de la proteinasa II de la patata (Keil *et al.*, 1986, *Nucl. Acids Res.* 14, 5641-5650), la señal de secreción del gen de la alfa-amilasa 3 del arroz (Sutliff *et al.*, 1991, *Plant Molec. Biol.* 16, 579-591) y la señal de secreción de la proteína PR1 del tabaco (Cornelissen *et al.*, 1986, *EMBO J.* 5,37-40). Los péptidos señal particularmente 45 útiles según la invención incluyen el péptido de tránsito de cloroplasto (por ejemplo, Van Den Broeck *et al.*, 1985, *Nature* 313, 358), o el péptido de tránsito de cloroplasto optimizado de los documentos US 5,510, 471 y US 5,635, 618 que provoca el transporte de la proteína a los cloroplastos, un péptido señal secretor o un péptido que dirige la proteína a otros plástidos, mitocondrias, el ER u otro orgánulo. Las secuencias de señal para direccionamiento a orgánulos intracelulares o para la secreción fuera de la célula vegetal o de la pared celular se 50 encuentran en proteínas dirigidas o secretadas naturalmente, preferiblemente las descritas por Klösgen *et al.* (1989, *Mol. Gen. Genet.* 217, 155-161), Klösgen y Weil (1991, *Mol. Gen. Genet.* 225, 297-304), Neuhaus y Rogers (1998, *Plant Mol. Biol.* 38, 127-144), Bih *et al.* (1999, *J. Biol. Chem.* 274, 22884-22894), Morris *et al.* (1999, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 328-333), Hesse *et al.* (1989, *EMBO J.* 8, 2453-2461), Tavladoraki *et al.* (1998, *FEBS Lett.* 426,62-66.), Terashima *et al.* (1999, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52,516-523), Park *et al.* 55 (1997, *J. Biol. Chem.* 272, 6876-6881), Shcherban *et al.* (1995, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92,9245-9249).

60 [0094] Para permitir la secreción de las proteínas 7-epizingibereno sintasa al exterior de la célula huésped transformada, se puede fusionar un péptido señal de secreción apropiado al extremo terminal (extremo N-terminal) de la proteína 7-epizingibereno sintasa. Los péptidos señal putativos se pueden detectar usando un análisis informático que usa programas, tales como el programa Signal Peptide search (SignalP V3.0) (Von Heijne, Gunnar, 1986 y Nielsen *et al.*, 1996).

65 [0095] En una forma de realización, varias secuencias de ácidos nucleicos que codifican la 7-epizingibereno sintasa se coexpresan en un único huésped, preferiblemente bajo el control de diferentes promotores. Alternativamente, varias secuencias de ácidos nucleicos que codifican la proteína 7-epizingibereno sintasa pueden estar presentes en un único vector de transformación o cotransformarse al mismo tiempo utilizando

vectores separados y seleccionando transformantes que comprenden ambos genes químéricos. De manera similar, uno o más genes que codifican la 7-epizingibereno sintasa se pueden expresar en una sola planta junto con otros genes químéricos, por ejemplo, que codifican otras proteínas que mejoran la resistencia a las plagas de insectos, u otros.

[0096] Se entiende que las diferentes proteínas se pueden expresar en la misma planta, o cada una puede expresarse en una sola planta y luego combinarse en la misma planta cruzando las únicas plantas entre sí. Por ejemplo, en la producción de semillas híbridas, cada planta progenitora se puede expresar en una sola proteína. Al cruzar las plantas progenitoras para producir híbridos, ambas proteínas se combinan en la planta híbrida.

[0097] Preferiblemente, para fines de selección pero también para opciones de control de malezas, las plantas transgénicas de la invención también se transforman con un ADN que codifica una proteína que confiere resistencia a herbicidas, como un herbicida de amplio espectro, por ejemplo herbicidas basados en glufosinato de amonio como ingrediente activo (por ejemplo, Liberty® o BASTA; la resistencia es conferida por el gen PAT o bar; véanse los documentos EP 0 242 236 y EP 0 242 246) o el glifosato (por ejemplo, RoundUp®, la resistencia es conferida por los genes de EPSPS, véanse, por ejemplo, los documentos EP0 508 909 y EP 0 507 698). El uso de genes de resistencia a herbicidas (u otros genes que confieren un fenotipo deseado) como marcador seleccionable tiene, además, la ventaja de que se puede evitar la introducción de genes de resistencia a antibióticos.

[0098] Alternativamente, se pueden utilizar otros genes marcadores seleccionables, como los genes de resistencia a antibióticos. Como no se acepta generalmente la retención de genes de resistencia a antibióticos en las plantas huésped transformadas, estos genes se pueden eliminar nuevamente después de la selección de los transformantes. Existen diferentes tecnologías para la eliminación de transgenes. Un método para lograr la eliminación es flanquear el gen químérico con sitios lox y, después de la selección, cruzar la planta transformada con una planta que exprese la recombinasa CRE (véase, por ejemplo, el documento EP506763B1). La recombinación específica del sitio da como resultado la escisión del gen marcador. Otros sistemas de recombinación específica del sitio es el sistema FLP/FRT descrito en los documentos EP686191 y US5527695. Los sistemas de recombinación específicos del sitio, como CRE/LOX y FLP/FRT, también se pueden usar para fines de apilamiento de genes. Además, se han descrito sistemas de escisión de un componente, véase, por ejemplo, el documento WO9737012 o el documento WO9500555).

[0099] La presente divulgación abarca un método para preparar una 7-epizingibereno sintasa que comprende el paso de cultivar una célula huésped que comprende al menos una molécula de ácido nucleico según la presente invención en condiciones que permitan la producción de dicha 7-epizingibereno sintasa.

[0100] Además, la presente invención proporciona un método para preparar 7-epizingibereno y/o R-curcumeno que comprende los pasos de: a) transformar una célula huésped con una molécula de ácido nucleico, un gen químérico o un vector de la presente invención; b) cultivar dicha célula huésped en condiciones que permitan la producción de 7-epizingibereno; c) opcionalmente, aislar el 7-epizingibereno producido en el paso b); y d) opcionalmente, deshidrogenar el 7-epizingibereno para producir R-curcumeno. El experto será capaz de seleccionar rutinariamente las condiciones que permitan la producción de 7-epizingibereno. La célula huésped puede haber sido modificada metabólicamente para producir o sobreproducir Z,Z-farnesil-difosfato (zFPP), el sustrato para la 7-epizingibereno sintasa de la presente invención, para producir 7-epizingibereno. El experto es capaz de realizar la sobreproducción del sustrato de la 7-epizingibereno sintasa de la presente invención para producir 7-epizingibereno. De manera similar, un experto en la técnica será capaz de aislar el 7-epizingibereno producido usando métodos rutinarios de aislamiento de volátiles.

[0101] Cuando se expone al aire, el 7-epizingibereno aislado puede convertirse de manera espontánea en R-curcumeno. Esto fue observado previamente por Bleeker *et al.* (*Phytochemistry*. 2011 Jan;72(1):68-73). Además, los mismos autores muestran que la conversión, por ejemplo, mediante deshidrogenación controlada de 7-epizingibereno, dio como resultado R-curcumeno puro. El experto es capaz de seleccionar condiciones que permitan la conversión de 7-epizingibereno en R-curcumeno.

[0102] zFPP, el sustrato para la 7-epizingibereno sintasa de la presente invención, se puede producir o sobreproducir mediante cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede producir naturalmente en la célula huésped elegida. Como alternativa, se puede introducir una secuencia de ácido nucleico que codifica una Z,Z-farnesil difosfato sintasa (en adelante también denominada "zFPS") en una célula huésped para lograr la expresión de zFPP en dicha célula huésped. Preferiblemente, dicha célula huésped comprende una fuente de isopentenil difosfato ("IPP") y dimetilalil difosfato ("DMAPP").

[0103] Una proteína aislada o recombinante que tiene una actividad de Z,Z-FPS ("zFPS") derivada de *Solanum habrochaites* se describe en el documento WO 2008/142318 y se puede encontrar, además, en el GenBank con n.º de acceso ACJ38408.1. Como se usa en el contexto de la presente descripción, el término "Z,Z-farnesil difosfato sintasa" o "zFPS" denota una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6 o una variante de la misma que tiene al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95

%, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, preferiblemente a lo largo de toda la longitud.

5 [0104] Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un método para producir 7-epizingibereno a partir de zFPP en una célula huésped, que comprende:

- a) introducir en dicha célula huésped una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una zFPS como se describe en este caso y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la 7-epizingibereno sintasa de la presente invención;
- 10 b) cultivar la célula transformada en condiciones adecuadas para la expresión de dichas primera y dicha segunda secuencias de ácidos nucleicos; y,
- c) opcionalmente, recoger zFPP y/o el 7-epizingibereno contenido en dicha célula y/o en el medio de cultivo.

15 [0105] La primera secuencia de ácido nucleico y la segunda secuencia de ácido nucleico puede estar presente en un único vector o puede estar presente en vectores separados.

Células/plantas/semillas vegetales transformadas y usos de la secuencia de ácido nucleico y proteínas según la invención

20 [0106] En la siguiente parte se describe el uso de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la 7-epizingibereno sintasa según la invención para generar células vegetales, plantas, semillas vegetales transgénicas, etc. y cualquier derivado/progenie de las mismas, con un fenotipo de resistencia mejorada a las plagas de insectos.

25 [0107] Una planta transgénica con resistencia mejorada a las plagas de insectos se puede generar transformando una célula huésped vegetal con una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína 7-epizingibereno sintasa bajo el control de un promotor adecuado, como se ha descrito anteriormente, y regenerando una planta transgénica a partir de dicha célula.

30 [0108] Los promotores preferidos son promotores que son inducibles por plagas de insectos, como se ha descrito anteriormente.

35 [0109] Preferiblemente, las plantas transgénicas de la invención comprenden una resistencia mejorada a las plagas de insectos contra una o más plagas de insectos, especialmente. Por lo tanto, por ejemplo, las plantas de tomate o patata transgénicas comprenden una resistencia mejorada a al menos una, o más, de las especies de insectos mencionadas anteriormente.

40 [0110] La "resistencia a las plagas de insectos" o la "resistencia aumentada/mejorada a las plagas de insectos" se utiliza en este documento para referirse a una capacidad mejorada de las plantas que albergan la secuencia de nucleótidos de la presente invención (en comparación con plantas de tipo silvestre o de control que no albergan la secuencia de nucleótidos de la presente invención) para resistir al ataque de una o más plagas de insectos de plantas o, en otras palabras, se refiere a una reducción significativa de los síntomas de la enfermedad en plantas que albergan la secuencia de nucleótidos de la presente invención en comparación con plantas que no albergan la secuencia de nucleótidos de la presente invención (o controles transformados con vector vacío). La resistencia a las plagas de insectos o la resistencia mejorada a las plagas de insectos se puede determinar usando una variedad de métodos. A menudo, los síntomas de la enfermedad se puntúan visualmente (ya sea en bioensayos o en el campo) evaluando los síntomas de la enfermedad en uno o más puntos temporales después de la infestación o el contacto con una plaga de insectos. Los métodos alternativos incluyen métodos mediante los cuales se detecta la plaga de insectos y opcionalmente se cuantifica. Por lo tanto, una planta (transgénica) puede mostrar una resistencia mejorada a las plagas de insectos si la cantidad o el número de plagas de insectos detectadas en/sobre el tejido es significativamente menor en comparación con los controles, o si la propagación de la plaga de insectos es significativamente más lenta que en los controles. En última instancia, un aumento significativo en el rendimiento promedio de las plantas que albergan la secuencia de nucleótidos de la presente invención (por ejemplo, al menos un 1 %, 2 %, 5 %, 10 % o más) en comparación con los controles, cuando se cultivan bajo una presión de plagas de insectos equivalente (preferiblemente en el campo) proporciona una medición indirecta de la resistencia mejorada a las plagas de insectos.

60 [0111] Por lo tanto, una pluralidad de plantas que albergan la secuencia de nucleótidos de la presente invención, por ejemplo, plantas transgénicas, que expresan la proteína 7-epizingibereno sintasa de la invención muestra una resistencia mejorada a las plagas de insectos si muestran una reducción significativa de los síntomas de la enfermedad, en comparación con las plantas que no albergan la secuencia de nucleótidos de la presente invención. Obviamente, se requiere un análisis estadístico para determinar si existe una diferencia significativa. Preferiblemente, uno o más síntomas de enfermedad son en promedio al menos un 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, o incluso 100 % más bajos en plantas que albergan secuencias de ácidos nucleicos que codifican la 7-epizingibereno sintasa que en las plantas de control. Como el ensayo de la enfermedad es diferente para cada combinación de huésped y plaga de insectos, no se puede proporcionar un protocolo

específico, pero el experto sabe cómo determinar si las plantas que albergan la secuencia de nucleótidos de la presente invención muestran una resistencia significativamente mejorada a la enfermedad de una o más plagas de insectos. Se pueden utilizar bioensayos conocidos en la técnica para cada combinación de planta y plaga para comparar la resistencia de las plantas transgénicas a controles adecuados.

- 5 [0112] En general, el papel del 7-epizingibereno producido por la proteína codificada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en la resistencia (toxicidad y/o repelencia) a las plagas de insectos se determinará mediante el uso de experimentos de elección y no elección. En particular, se realizará una prueba de elección. En una prueba de elección, se permitirá que diferentes etapas de la vida (por ejemplo, larvas o adultos) elijan entre plantas (transgénicas) que producen 7-epizingibereno (a través de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) y plantas no transgénicas (o de vector vacío). Esta prueba determinará la actividad repelente del 7-epizingibereno producido por la proteína de SEQ ID NO: 1.
- 10 [0113] También se realizará una prueba sin elección para determinar los efectos tóxicos del 7-epizingibereno producido a través de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En estos experimentos, se obliga a las especies de plagas de insectos a comer plantas (transgénicas) que producen 7-epizingibereno (a través de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) y plantas no transgénicas (o de vector vacío).
- 15 20 Posteriormente, se determinará el comportamiento de los insectos (por ejemplo, crecimiento, desarrollo o aptitud) como una medida de toxicidad.
- [0114] También se prevé generar plantas transgénicas que expresen varias proteínas 7-epizingibereno sintasa, preferiblemente bajo el control de diferentes promotores, como diferentes promotores inducibles por plagas.
- 25 [0115] El fenotipo de resistencia a enfermedades se puede ajustar con precisión expresando una cantidad adecuada de proteína 7-epizingibereno sintasa en un momento y lugar adecuados. Este ajuste se puede realizar determinando el promotor más apropiado para una combinación particular de huésped y plaga y también seleccionando "eventos" transgénicos que muestren el nivel de expresión deseado. Un nivel demasiado bajo de proteína 7-epizingibereno sintasa o una inducción demasiado lenta de la producción de proteína 7-epizingibereno sintasa después del ataque de plagas de insectos puede ser insuficiente para mejorar los niveles de resistencia a enfermedades. Por otro lado, un nivel o expresión de proteína demasiado alto en momento y lugares sin ataques de plagas de insectos puede dar como resultado fenotipos agronómicamente no deseados y penalizaciones en el rendimiento. Sin embargo, el experto puede generar fácilmente plantas que tengan una resistencia mejorada a las enfermedades, pero que al mismo tiempo sean aceptables desde el punto de vista agronómico.
- [0116] Las plantas que albergan la secuencia de nucleótidos de la presente invención que expresa niveles deseados de la proteína 7-epizingibereno sintasa se selecciona, por ejemplo, analizando el número de copias (análisis de "Southern blot"), niveles de transcripción de ARNm, analizando la presencia y el nivel de proteína 7-epizingibereno sintasa en varios tejidos (por ejemplo, SDS-PAGE; ensayos ELISA, etc.), o determinando la cantidad de 7-epizingibereno, que usa métodos analíticos, como CG-EM. Por razones reguladoras, se seleccionan preferiblemente transformantes de copia única y se analizan las secuencias que flanquean el sitio de inserción del gen químérico, preferiblemente se secuencian para caracterizar el "evento". Se seleccionan eventos transgénicos que expresan secuencias de ácidos nucleicos que codifican la 7-epizingibereno sintasa de alto o moderado grado para realizar más cruzamientos/retrocruzamientos/autofecundación hasta obtener un evento de élite de alto rendimiento con un transgén de secuencia de ácido nucleico que codifica la 7-epizingibereno sintasa estable.
- 40 [0117] Los transformantes que expresan uno o más genes de la 7-epizingibereno sintasa según la invención también pueden comprender otros transgenes, como otros genes que confieren resistencia a enfermedades o que confieren tolerancia a otros estreses bióticos y/o abióticos. Para obtener dichas plantas con transgenes "apilados", se pueden introingresar otros transgenes en los transformantes de secuencia de ácido nucleico que codifican la 7-epizingibereno sintasa, o los transformantes de secuencia de ácido nucleico que codifican la 7-epizingibereno sintasa se pueden transformar posteriormente con uno o más genes diferentes, o alternativamente se pueden utilizar varios genes químéricos para transformar una línea o variedad de planta. Por ejemplo, varios genes químéricos pueden estar presentes en un único vector, o pueden estar presentes en diferentes vectores que se cotransforman.
- 45 [0118] En una forma de realización, los siguientes genes se combinan con uno o más genes de 7-epizingibereno sintasa según la invención: genes conocidos de resistencia mejorada a enfermedades, especialmente genes que confieren resistencia mejorada a patógenos, genes de resistencia a virus, genes de resistencia al estrés abiótico (por ejemplo, tolerancia a la sequía, tolerancia a la sal, tolerancia al calor o al frío, etc.), genes de resistencia a herbicidas y similares. Por lo tanto, los transformantes apilados pueden tener una tolerancia al estrés biótico y/o abiótico aún más amplia, a la resistencia a patógenos, resistencia a nematodos, salinidad, estrés por frío, estrés por calor, estrés hídrico, etc. Además, los métodos de silenciamiento de la secuencia de ácido nucleico que codifica la 7-epizingibereno sintasa se pueden combinar con métodos de expresión de la secuencia de ácido

nucleico que codifica la 7-epizingibereno sintasa en una sola planta. Por ejemplo, la sobreexpresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica la 7-epizingibereno sintasa en raíces o tubérculos puede conferir o mejorar la resistencia de las raíces o los tubérculos a las plagas del suelo.

5 [0119] También es posible introducir o introgresar el gen de la 7-epizingibereno sintasa en una línea de cultivo de plantas que ya tiene un determinado nivel de la resistencia a plagas de insectos. Para la durabilidad de la resistencia a las plagas de insectos en el campo, puede ser deseable apilar varios mecanismos de resistencia a enfermedades en una planta, preferiblemente mediante los cuales las fuentes de resistencia tengan diferentes mecanismos moleculares subyacentes.

10 [0120] En el presente documento se incluyen plantas, semillas, células, tejidos y progenie (como híbridos F1, semillas/plantas F2, etc.) completas de cualquiera de las plantas transformadas descritas anteriormente y pueden identificarse por la presencia del transgén en el ADN, por ejemplo, mediante análisis de PCR utilizando ADN genómico total como plantilla y utilizando pares de cebadores de PCR específicos de la secuencia de ácido nucleico que codifican la zingibereno sintasa. También se pueden desarrollar métodos de diagnóstico por PCR "específico/as de eventos", en los que los cebadores de PCR se basan en el ADN de la planta que flanquea el gen químico insertado, véase el documento US6563026. De manera similar, se pueden desarrollar huellas de AFLP o huellas de RFLP específicas de eventos que identifiquen la planta transgénica o cualquier planta, semilla, tejido o células derivadas de la misma.

15 [0121] Se entiende que las plantas transgénicas según la invención preferiblemente no muestran fenotipos no deseados, tales como reducción de rendimiento, mayor susceptibilidad a enfermedades o cambios arquitectónicos no deseados (enanismo, deformaciones), etc. y que, si se observan dichos fenotipos en los transformantes primarios, estos pueden eliminarse mediante métodos normales de reproducción y selección (cruzamiento/retrocruzamiento/autofecundación, etc.). Cualquiera de las plantas transgénicas descritas en el presente documento puede ser homocigótica o hemicigótica para el transgén.

20 [0122] La presente invención también se refiere a una planta, célula vegetal, semilla o fruto de *Solanum lycopersicum* o *Lycopersicon esculentum*, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a lo largo de toda la longitud, que tiene actividad de 7-epozingibereno sintasa. *Solanum lycopersicum* de tipo silvestre no produce cantidades detectables de 7-epi-zingibereno. Utilizando la secuencia de nucleótidos de la presente invención, es posible preparar una planta, célula vegetal, semilla o un fruto de *Solanum lycopersicum* transgénicos o no transgénicos que tenga una resistencia mejorada a las plagas de insectos. Preferiblemente, dicha planta, célula vegetal, semilla o dicho fruto de *Solanum lycopersicum* comprende, además, una secuencia de ácido nucleico que codifica una Z,Z-farnesil difosfato sintasa.

Secuencias a las que se hace referencia en

40 [0123]

SEQ ID NO: 1: Secuencia de aminoácidos de la proteína zingibereno sintasa de plástidos de *Solanum habrochaites*.

45 CSHSTPSSMNGFEDARDRIRESFGKVELSPSSYDTAWVAMVPSKHSNEPCFPQCLDWIIENQREDGSWGLNPSPHPLLLKDSLSSLACLLALTWRVGDEQIKRGLGFIETQSWAIDNKDQISPLGFEEIFPSMIKSAEKLNLNLAINKR DSTIKRALQNEFTRNIEYMSEGFGELCDWKEIILHQ RQNGLSLFDSPATTAAALIYHQHDKKCYEYLNSILQQHKNWVPTMPTKIHSLLCLVDTLQNL GVHRHFKSEIKKALDEIYRLWQQKNEEIFSNVTHCAMA FRLLRISYYDVSSDELAEVDEEHFFATSGKYTSHVEILELHKASQLAIDHEKDDILDKINNWTRTFMEQKLLNNGFIDRMSKKEVELA LRNFYIISDLAENRRYIKSYEENNFKILKAAYRSPNINNKDLFIFSIRDFELCQAQHQEEELQQLK RWFEDCRLDQLGLSEQFISASYLCAPIVPGPELSDARLVYAKYVMLLTIVDDHFESFASTDEC LINIIELVERWDDYASVGYKSERVKVLFSMFYKSIEEIA TAEIKQGRSVKNHLINLWLKVMKL MLMERVEWCSGKTIPRIEEYLYVSSITFGSRLIPLTTQYFIGIKISKDLLESDEIYGLCNFTGIVLRLLNDLQDSKREQKEGSINLVTLLMKSISEEEAIMKMKEILEMKRRELFKMVLVQKKGSQLPQLCKEIFWRTCKWAHFTYSQTDYRFPEEMENHIDEVFYKPLNH

SEQ ID NO: 2: Secuencia de ácido nucleico del gen de la sintasa de zingibereno de *Solanum habrochaites* (secuencia codificante únicamente).

TGCAGCCACAGTACCCCTCATCAATGAATGGTTCGAAGATGCAAGGGATAGAATAAG
GGAAAGTTTGGGAAAGTAGAGTTATCTCCTCTTCCTATGACACAGCATGGGTAGCTAT
GGTCCCTCAAAACATTCACTAAATGAGCCATGTTCCACAATGTTGGATTGGATTATT
GAAAATCAAAGAGAAGATGGATCTGGGGACTAAACCCTAGCCATCCATTGCTTCTTAAG
GAUTCACTTCTTCCACTCTGCATGTTGCTGCACTAACCAATGGAGAGTTGGAGAT
GAGCAAATCAAAAGAGGCCCTGGCTTATTGAAACCCAGAGTTGGCAATTGATAACAA
GGATCAAATTTCACCTCTAGGATTGAAATTATATTCCCAGTATGATCAAGTCTGCAGAA
AAACTAAACTTAAATCTAGCAATTAAACAAAGAGATTCAACAATTAAAGAGCATTACAGA
ATGAGTTCACGAGGAATTGAATATATGAGTGAAGGATTGGTGAATTATGTGATTGGA
AGGAAATAATAAGTTACATCAAAGGAAAATGGTCATTATTGATTCAACCAGCCACTAC
TGCAGCTGCCTTGATTACCATCAGCATGATAAAAAATGCTATGAATATCTTAATTCAATC
TTGCAACAAACACAAAAATTGGTCCCACATGTATCCAACAAAGATACATTCAATTGCTT
GCTTGGTTGATACACTTCAAAATCTGGAGTACATCGCATTAAATCAGAAATAAGAA
AGCCCTAGATGAAATATACAGGCTATGGCAACAAAAGAATGAAGAAATTCTCAAATGT
CACCCATTGTGCTATGGCTTTCGACTTCTAAGGATAAGCTACTATGATGTCTCCTCAGA
TGAACTAGCAGAATTGTGGATGAAGAACATTCTTGCAACAAAGTGGAAATATACAAG

TCATGTTGAAATTCTGAACCTCCACAAAGCATCACAATTGGCTATTGATCATGAGAAAGAT
 GACATTTGGATAAGATTAACAATTGGACAAGAACATTATGGAGCAAAAACCTTAAACA
 ATGGCTCATAGATAGGATGTCAAAAAAGGAGGTGGAACCTGCTTGAGGAATTTTATA
 TCATATCTGATCTAGCAGAAAATAGAAGATATATAAGTCATACGAAGAGAACAACTTAA
 AATCTTAAAGCAGCTTATAGGTACCTAACATTAAACAATAAGGACTTGTATATTTCA
 ATACGCGACTTGAATTATGCCAAGCTCACACCCAAGAACACTCAACAACTCAAGAGG
 TGGTTGAAGATTGTAGATTGGACCAACTCGGACTTCGGAACAAATTATCTGCTAGT
 TACTTATGTGCTATTCCATTGTCCCCGGGCCTGAATTATCCGATGCTCGTCTCGTGTAC
 GCGAAATACGTCATGCTCTGACTATTGTCGATGATCATTGAGAGTTGCATCTACA
 GATGAATGTCTCAACATCATTGAATTAGTAGAAAGGTGGATGACTATGCAAGTGTAGGT
 TATAAACTGAGAGGGTAAAGTTTATTTCAATGTTTACAAATCAATAGAGGAGATTG
 CAACAATTGCTGAAATTAAACAAGGACGATCTGCAAAATCACCTATTAATTGTGGCT
 TAAAGTGATGAAGTTGATGTTGATGGAACGAGTAGAGTGGTGTCTGGCAAGACAATAC
 CAAGAATAGAAGAGTATTGTATGTTAGTTCTATAACATTGGTCAAGATTGATTCTCT
 CACAACACAATATTTATTGGAATAAAAATCCAAAGATCTTAGAAAGTGATGAAATT
 5 ATGGTTATGCAATTTCACCGGTATAGTCTTGAGGCTCCTCAATGATTACAAGATTCAA
 GAGAGAACAAAGGAGGGCTCAATAAATTAGTCACATTACTAATGAAAAGTATCTGTA
 GGAAGAAGCTATAATGAAGATGAAGGAATCTTGGAAATGAAAAGAAGAGAGTTATTAA
 AATGGTTTAGTCAAAAAAAGGAAGCCAATTGCCTCAATTATGCAAAGAAAATTTGG
 AGGACATGCAAATGGCCTACTTCACTTACAAACTGATAGATAGATTCCAGAG
 GAAATGGAGAATCACATTGATGAAGTCTTTACAAACCACTCAATCATTAA

SEQ ID NO: 3. Secuencia de aminoácidos de la secuencia dirigida a los plástidos de la zingibereno sintasa de la invención
 MIVGYRSTIITLSHPKLGNGKTISSNAIFRRSCRVRSEQ

5 ID NO: 4. Secuencia de ácido nucleico de la secuencia dirigida a los plástidos de la zingibereno sintasa de la invención
 ATGATAGTTGGCTATAGAAGCACAATCATAACCCTTCTCATCCTAAGCTAGGCAATGGG
 AAAACAATTCCATCCAATGCAATTTCGGAGATCATGTAGAGTAAGA

10 SEQ ID NO: 5. Secuencia de ácido nucleico de zFPS de S. habrochaites PI127826

GCTCGTGGACTCAACAAGATTGATGCTCACTCAGCTACAAACCGAAAAACTTGTAT
 GAGGATAATGATAATGATCTGATGAAGAACCTATGCCTAACACACATTGCTTGATAATGG
 ATGGTAATAGGAGATGGCAAAGGATAAGGGTTAGACGTATCCGAAGGTACAAACAT
 CTCTTCCAAAATTAAAGAGATTGTGACATTCTTCAAATTGGGAATACAAGTTATCA
 CTGCTTTGCATTCTACTGAAAATTGAAACGAGCCAAGGGGGAGGTTGATTCTTGA
 TGCAAATGTCGAAGAACTCTATGATGAGTTCGAGGTCTGGAGTAAGAGTGTCTATTA

TTGGTTGAAACCGACCTCCCAATGACATTACAAAATGCATAGCATTAACAGAAGAGA
 CTACAAAGGGAAACAAAGGACTTCACCTGTGATTGCACTAAACTATGGTGGATATTATG
 ACATATTGCAAGCAACAAAAGCATTGTTAATAAGCAATGAATGGTTATTAGATGTAGA
 AAATATCAACAAGAATTATTCATCAAGAACCTGAAAGCAAGTGTCCAAATCCTGATT
 CTTATAAGGACAGGAGGTGTTCAAAGAGTTAGTAACCTTTGTTGGCAATTGGCTTAT
 ACTGAATTTACTTCACCAAAACATTGTTCTGATTTGGAGAGGAAGATCTAAAGAGG
 CAATAATAAACTTCAACAAAGGCATAGACGTTGGACACACATATTGA

SEQ ID NO: 6. Secuencia de aminoácidos de zFPS de *S. habrochaites* PI127826

ARGLNKISCSLSLQTEKLCYEDNDNDLDEELMPKHIALIMDGNNRWAKDKGLDVSEGHKHLF
 PKLKEICDISSKLGIQVITAFAFSTENWKRAKGEVDFLMQMFEELYDEFSRSGVRVSIIGCKTD
 LPMTLQKCIALTEETTKGNKGLHLVIALNYGGYYDILQATKSIVNKAMNGLLDVENINKNLFQ
 ELESKCPNPDLIRTGGVQRVSNFLLWQLAYTEFYFTKTLFPDFGEEDLKEAIINFQQRHRRF
 GGHTY

5 SEQ ID NO: 7. Péptido señal de zFPS de *S. habrochaites* PI127826
 MSSVLQCWKLSSPSLILQQNTSISMGAFKGIIHKLQIPNSPLTVS

SEQ ID NO: 8 Secuencia de ácido nucleico del péptido señal de zFPS de *S. habrochaites* PI127826

ATGAGTTCTTGGTTCTCAATGTTGGAAATTATCATCTCCATCTCTGATTTACAACAAAA
 TACATCAATATCCATGGGTGCATTCAAAGGTATTCATAAACTTCAAATCCAAATTCACT
 CTGACAGTGTCT

10 Figuras
 [0124]

15 La figura 1 muestra los resultados de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) de la producción de 7-epizingibereno utilizando zFPP como precursor por *E. coli* transformada con la secuencia de nucleótidos que codifica la 7-epizingibereno sintasa. El 7-epizingibereno se identificó por su huella de masa iónica de MS, tiempo de retención e índice de Kovats.

20 La figura 2 muestra espectros de masas del 7-epizingibereno producido por la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica la 7-epizingibereno sintasa (figura 2A) en *E. coli* y del 7-epizingibereno producido por los tricomas PI127826 de *S. habrochaites* (figura 2B).

La figura 3A muestra la determinación del enantiómero de ShZIS

25 La cromatografía de gases enantioselectiva en la columna recubierta con ciclodextrina permitió la identificación de los diferentes estereoisómeros de zingibereno (columna Astec CHIRALDEXTM B-DM, Supelco). De arriba a abajo:

S. habrochaites = control positivo para 7-epizingibereno;

F2 ShxSI = la F2 produce 7-epizingibereno con zFPP como precursor

aceite de jengibre = control positivo para alfa-zingibereno.

30 ShZIS + aceite de jengibre = ShZIS con zFPP produce 7-epizingibereno y el aceite de jengibre contiene alfa-zingibereno

La figura indica que ShZIS sintetiza 7-epizingibereno cuando se le proporciona zFPP. Además, muestra evidencia de que las plantas F2 usadas en los bioensayos también producen 7-epizingibereno.

35 La figura 3B muestra la determinación del enantiómero del zingibereno producido por ShZIS. La cromatografía de gases enantioselectiva en la columna recubierta con ciclodextrina permitió la identificación de los diferentes estereoisómeros de zingibereno (columna Astec CHIRALDEXTM B-DM, Supelco). De arriba a abajo:

40 *S. habrochaites* = control positivo para 7-epizingibereno;

α ZIS +FPP = la alfa-zingibereno sintasa provista de FPP produce α -zingibereno;

- 5 α ZIS +FPP y ShZIS + zFPP = la alfa-zingibereno sintasa provista de FPP produce alfa-zingibereno y la ShZIS sintetiza 7-epizingibereno cuando está provista de zFPP.
 Aceite de jengibre = control positivo para alfa-zingibereno.
- 10 ShZIS+ zFPP = la proteína ShZIS, cuando está provista de zFPP como precursor produce 7-epizingibereno.
 La figura indica que ShZIS sintetiza 7-epizingibereno cuando está provista de zFPP. La zingibereno sintasa de limón y albahaca (ObZIS; Iijima *et al.*, 2004) es una alfa-zingibereno sintasa auténtica cuando está provista de FPP.
- 15 La figura 4 muestra la producción de 7-epizingibereno en plantas transgénicas de *S. lycopersicum*, cuando tanto zFPS como ShZIS se expresan bajo promotores específicos de tricomas. A. La producción de 7-epizingibereno medida por CG-EM. Se muestran los perfiles de terpenoides de plantas de control no transformadas (*S. lyc*), plantas de *S. lycopersicum* transformadas solo con zFPS y plantas de *S. lycopersicum* transformadas con zFPS y ShZIS bajo promotores específicos de tricomas. 7-epizingibereno se produjo solamente en plantas transformadas con zFPS y ShZIS (ambos bajo promotores específicos de tricoma). B. La cromatografía de gases enantioselectiva en la columna recubierta con ciclodextrina demostró que la producción de zingibereno en plantas de *S. lycopersicum* transformadas con zFPS y ShZIS (*S. lycopersicum* zFPS-ZIS en la figura), al igual que en *S. habrochaites* silvestres, es 7-epizingibereno.
- 20 La figura 5 muestra la concentración de zingibereno (ng de terpenos por mg de PF de la hoja) en tres genotipos diferentes. Se realizó un cruce interespecies entre *S. lycopersicum* y *S. habrochaites* y se probaron las líneas F2 para la producción de zingibereno. Se realizaron esquejes de las líneas F2 productoras de zingibereno, *S. lycopersicum* C32 (Moneymaker) y de *S. habrochaites* (PI127826). Las plantas F2 y de *S. habrochaites* (PI127826) mostraron cantidades similares de 7-epizingibereno; no se detectó 7-epizingibereno en *S. lycopersicum* C32.
- 25 La figura 6A muestra el porcentaje de adultos muertos de *B. tabaci* (mortalidad) en tres genotipos diferentes. Se realizaron experimentos en jaulas de clip en esquejes de líneas F2, *S. lycopersicum* C32 (Moneymaker) y de *S. habrochaites* (PI127826). En comparación con plantas de *S. habrochaites* y F2, el porcentaje de adultos muertos después de 5 días fue significativamente menor en *S. lycopersicum* (figura 4a; ANOVA unidireccional, LSD; p<0,05 para ambas comparaciones).
- 30 La figura 6B muestra el número total de huevos depositados por adultos de mosca blanca en cinco días. Se realizaron experimentos en jaulas de clip en esquejes de líneas F2, *S. lycopersicum* C32 y de *S. habrochaites* (PI127826). La cantidad de huevos depositados por adultos hembra *B. tabaci* fue significativamente mayor en *S. lycopersicum* C32 en comparación con las plantas F2 o de *S. habrochaites* (figura 4b; ANOVA unidireccional, LSD; p<0,05 para ambas comparaciones).
- 35 La figura 7A muestra los niveles de 7-epizingibereno en plantas F2 expresadas como [zingibereno] (ng mg-1 PF de hoja).
 La figura 7B muestra la supervivencia de larvas neonatas del escarabajo de la patata de Colorado (CPB, por sus siglas en inglés) en un bioensayo (24 h de alimentación).
 La figura 7C muestra el daño por alimentación causado por CPB, 24 h de alimentación.
- 40 La figura 7D muestra el daño por alimentación causado por CPB, 24 h de alimentación, el daño se clasifica como unidades arbitrarias (píxeles).
- 45 La figura 8 muestra la preferencia de la mosca blanca de invernadero (*Trialeurodes vaporariorum*) en un ensayo de elección para plantas con baja producción de 7-epizingibereno (línea F2-45) y plantas con alta producción de 7-epizingibereno (línea F2-40).
- 50 La figura 9 muestra el comportamiento del pulgón de la patata/del tomate (*Macrosiphum euphorbiae*) en un ensayo sin elección entre plantas con baja producción de 7-epizingibereno (línea F2-45) y plantas con alta producción de 7-epizingibereno (línea F2-40).
- 55 La figura 10A muestra la oviposición de *Tuta absoluta*. Las polillas *Tuta absoluta* fueron liberadas en una jaula sobre plantas F2 que producían una variedad de 7-epizingibereno. Estas plantas surgieron de un cruce interespecies entre *S. lycopersicum* (C32) y *S. habrochaites* (PI127826). El número de huevos por genotipo de tomate se determinó después de 5 días.
 La figura 10B muestra la producción de 7-epizingibereno en estas plantas F2 surgidas de un cruce interespecies entre *S. lycopersicum* (C32) y *S. habrochaites* (PI127826).
- 60 La figura 11A muestra la fecundidad del ácaro araña (*T. urticae*) en *S. lycopersicum* (C32), *S. lycopersicum* transgénica productora de 7-epi-zingibereno (línea 2) y *S. habrochaites* (PI127826).
 La figura 11B muestra la supervivencia del ácaro araña (*T. urticae*) en *S. lycopersicum* (C32), *S. lycopersicum* transgénica productora de 7-epi-zingibereno (línea 2) y *S. habrochaites* (PI127826).
 La figura 11C muestra la fecundidad del ácaro araña (*T. evansi*) en *S. lycopersicum* (C32), *S. lycopersicum* transgénica productora de 7-epi-zingibereno (línea 2) y *S. habrochaites* (PI127826).
 La figura 11D muestra la supervivencia del ácaro araña (*T. evansi*) en *S. lycopersicum* (C32), *S. lycopersicum* transgénica productora de 7-epi-zingibereno (línea 2) y *S. habrochaites* (PI127826).

65 [0125] Los siguientes ejemplos ilustran aspectos y formas de realización descritas en este documento a menos que se indique lo contrario en los ejemplos, todas las técnicas de ADN recombinante se llevan a cabo de acuerdo con protocolos estándar, como se describe en Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, y Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory*

5 *Manual*, 3^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; y en los volúmenes 1 y 2 de Ausubel *et al.* (1994) "Current Protocols" en *Molecular Biology, Current Protocols*, EE. UU. Los materiales y métodos estándar para el trabajo molecular en plantas se describen en *Plant Molecular Biology Labfax* (1993) de R.D.D. Croy, publicado conjuntamente por BIOS Scientific Publications Ltd. (Reino Unido) y Blackwell Scientific Publications, Reino Unido.

EJEMPLOS

10 Ejemplo 1: Ensayo de expresión de *E. coli* para determinar la producción de 7-epizingibereno

15 [0126] El gen de longitud completa (que comprende la SEQ ID NO: 4 5' de la SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 4-SEQ ID NO: 2)) se clonó en el vector de expresión pGEX-KG (Guan y Dixon 1991). Las construcciones se transformaron en células de *E. coli* C41 (DE3) (Dumont-Seignovert *et al.*, 2004). Como control, se transformó el vector pGEX-KG vacío. Se cultivó un cultivo hasta obtener una DO₆₀₀ de 0,5- 0,6 a 37 °C y se mantuvo a 4 °C durante 30 min. Se indujo la expresión de proteínas con isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) 1 mM. Despues de 16 horas de incubación a 16 °C, se recogieron las células por centrifugación. El sobrenadante se eliminó y el pellet se resuspendió en tampón de ensayo (HEPES 25 mM, pH 7,2, MgCl₂ 10 mM, 10 % (v/v) de glicerol) con lisozima añadida (1 mg mL⁻¹) e inhibidores de proteinasa y se incubó en hielo durante 30 minutos y y posteriormente se sonicó. El lisado se centrifugó y el sobrenadante se almacenó a -80 °C. Los ensayos de actividad se realizaron en 500 μL HEPES 50 mM, pH 7,2, mM 100 KCl, MgCl₂ 7,5 mM, MgCl₂ 20 μM, 5 % (v/v) de glicerol, DTT 5 mM con 50 μL de proteína y cis-FPP 2 mM (2Z-6Z-farnesil difosfato) como sustrato. Los productos enzimáticos se analizaron mediante CG-EM con fibra de microextracción en fase sólida (MEFS). Los productos terpénicos se identificaron usando espectros de iones, tiempo de retención e índice de Kovats (véanse las figuras 1 y 2).

20 Ejemplo 2: Determinación del enantiómero de zingibereno producido por los diversos genes/las diversas proteínas.

25 [0127] Los ensayos de actividad se realizaron en viales de vidrio de 20 mL en un volumen total de 500 μL HEPES 50 mM, pH 7,2, KCl 100 mM, MgCl₂ 7,5 mM, MgCl₂ 20 μM, 5 % (v/v) de glicerol, DTT 5 mM con 50 μL de proteína y cis-FPP 2 mM (2Z-6Z-farnesil difosfato), trans-FPP (difosfato de E-E-farnesilo), GPP (difosfato de geranilo), NDP (difosfato de nerilo), o GGPP (difosfato de geranilgeranilo) como sustrato (*Echelon Biosciences Incorporated*, Salt Lake City, EE. UU.). Los viales se cerraron inmediatamente con una tapa de engarce recubierta con teflón y se incubaron con agitación moderada durante 1 hora a 30 °C.

30 [0128] Los productos enzimáticos se probaron con una fibra de microextracción en fase sólida (MEFS) durante 10 minutos después de agitar el vial y calentarlo a 50 °C. La fibra se desorbió durante 1 minuto en un puerto de inyección óptica (ATAS GL Int. Zoeterwoude, NL) que se mantuvo a 220 °C. Para la inyección de líquido, se inyectaron 1-3 μL de muestra en hexano.

35 [0129] Para separar el alfa-zingibereno del 7-epizingibereno, se seleccionó la columna Astec CHIRALDEX™ B-DM (espesor de película de 30 m x 0,25 mm x 0,12 μm; Supelco). La columna se colocó en un cromatógrafo de gas 6890 N (Agilent, Amstelveen, NL). El programa se estableció inicialmente a 115 °C durante 3 minutos y se aumentó a 140 °C a razón de 4 °C min⁻¹, donde se mantuvo durante un minuto adicional, después del cual la temperatura aumentó lentamente (2 °C min⁻¹) a 166 °C, donde se mantuvo durante 5 minutos antes de un aumento rápido con 40 °C min⁻¹ a 220 °C. Se utilizó helio como gas portador. Los espectros de masas se generaron con la fuente iónica establecida a -70 V a 200 °C y se obtuvieron con un espectrofotómetro de tiempo de vuelo (Leco, Pegasus III, St. Joseph, MI, EE. UU.) a 1850 V, con una velocidad de adquisición de 20 exploraciones por segundo.

40 [0130] Tiempo de ejecución 1800 s; Temperatura inicial del inyector: 220 °C; Temperatura final del inyector: 220 °C; Flujo de la columna de transferencia: 1,5 ml min⁻¹; Tiempo de transferencia: 120 s; Flujo inicial de la columna: 1 ml min⁻¹; Flujo final de la columna: 1 ml min⁻¹; Flujo dividido: 25 ml min⁻¹

45 [0131] Se pueden obtener más detalles de las columnas a través del proveedor o en: http://www.sigmaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&N4=66023AST|SUPELCO&N25=0&QS=ON&F=SPEC

Resultados

50 [0132] La cromatografía de gases enantioselectiva en la columna recubierta con ciclodextrina permitió la identificación de los diferentes estereoisómeros de zingibereno en *S. habrochaites* y jengibre, que previamente no se habían podido separar mediante nuestro análisis de CG-EM. Mediante RMN se determinó que *S. habrochaites* PI127826 produce 7-epizingibereno, mientras que el aceite de jengibre contiene alfa-zingibereno (Bleeker *et al.*, 2011). Se utilizaron extractos de *S. habrochaites* y aceite de jengibre como controles positivos para estudiar el estado enantiomérico del zingibereno sintetizado por ObZIS (zingibereno sintasa de albahaca

limón dulce; Iijima *et al.*, 2004) y ShZIS. El análisis (tanto líquido como de MEFS) indicó que las enzimas sintetizan diferentes estereoisómeros. ShZIS es responsable de la producción de 7-epizingibereno (similar al enantiómero encontrado en *S. habrochaites*), mientras que ObZIS es una alfa-zingibereno sintasa genuina (figura 3A,B).

Figura 3A:

[0133] Inyección líquida de muestras en hexano. Lavado de hojas de *S. habrochaites*: estándar para 7-epizingibereno (RT:844). Aceite de jengibre: estándar para alfa-zingibereno (RT:851) y S-curcumeno (RT:829). Mezcla de lavado de hojas y aceite de jengibre: S-curcumeno (RT:829), 7-epizingibereno (RT:844) y alfa-zingibereno (RT:851). Superposición de hexano de *E. coli* C41 (DE3) transformada con pGEX:ZIS2 incubada con zPPP: 7-epizingibereno (RT:844). Este experimento muestra la separación de 7-epizingibereno y alfa-zingibereno (identificado previamente con RMN en Bleeker *et al.*, 2011) en la columna quiral y demuestra que la 7-epizingibereno sintasa (ShZIS) expresada de forma heteróloga es responsable del 7-epizingibereno en PI127826. También muestra que la planta F2 produce 7-epizingibereno.

Figura 3B:

[0134] MEFS: material de hoja de *S. habrochaites* como estándar para 7-epizingibereno (RT: 850) y R-curcumeno (RT:841). Aceite de jengibre como estándar para alfa-zingibereno (RT:856) y S-curcumeno (RT:835). Albahaca limón dulce ObZIS (Iijima, R. Davidovich-Rikanati, E. Fridman, D.R. Gang, E. Bar, E. Lewinsohn y E. Pichersky (2004). La base bioquímica y molecular de los patrones divergentes en la biosíntesis de terpenos y fenilpropenos en las glándulas peltadas de tres cultivares de albahaca. (*Plant Physiology* 136; 3724-3736) expresado de forma heteróloga y provisto de E-E-FPP, produjo alfa-zingibereno (RT:856). ShZIS PI127826 expresado de forma heteróloga y provisto de Z-Z-FPP produjo 7-epizingibereno (RT:850). ObZIS y ShZIS mezclados mostraron ambos picos. Estos experimentos muestran que ShZIS produce un estereoisómero de zingibereno diferente al de la zingibereno sintasa vegetal conocida, ObZIS.

Ejemplo 3: Desarrollo de plantas transgénicas de *S. lycopersicum*

Experimentos de transformación de explantes de cotiledones de tomate

[0135] La línea C32 de tomate (*S. lycopersicum*) se usó para las transformaciones con *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101). El protocolo de transformación del tomate ha sido descrito en Koornneef *et al.* (1986) (Koornneef, Maarten, Jongsma, Maarten, Weide, Rob, Zabel, Pim, y Hille, Jacques. (1986); "Transformation of grapefruit". En: *Tomato Biotechnology*, Donald Nevins y Richard Jones, eds. Alan Liss Inc., Nueva York, EE. UU., págs. 169-178.) y en Koornneef *et al.* (1987) (Koornneef, M., Hanhart, C. J., y Martinelli, L. (1987); "A genet analysis of cell culture characters in grapefruit". *Theor. Appl. Genet.* 74: 633-641). El direccionamiento específico de los tricomas se aseguró utilizando MKS1 (metilcetona sintasa 1; Fridman *et al.*, 2005 (Fridman E, Wang J, Iijima Y, Froehlich JE, Gang DR, Ohlrogge J, Pichersky E (2005). Los análisis metabólicos, genómicos y bioquímicos de los tricomas glandulares de la especie de tomate silvestre *Lycopersicon hirsutum* identifican una enzima clave en la biosíntesis de metilcetonas. *Plant Cell* 17: 1252-1267)) y MTS1 (monoterpeno sintasa 1; WO2009082208) de *S. habrochaites* y *S. lycopersicum*, respectivamente. Para la cotransformación, se diluyeron cultivos diluidos de *Agrobacterium* que llevaban un vector binario con pMKS1:zFPS y pMTS1:ShZIS y se mezclaron en una proporción de 1:1. El resto del protocolo descrito no se modificó. Cuando aparecieron los brotes de tomate, se cosecharon y se enraizaron en medio sólido MS20 que contenía 1 mg L⁻¹ de AIB, 200 mg L⁻¹ de cefotaxima, 200 mg L⁻¹ de vancomicina y 100 mg L⁻¹ de kanamicina.

[0136] Se aisló el ADN genómico de las plantas transgénicas y se realizó una PCR en las plantas T0 para confirmar la inserción exitosa de los plásmidos. El material de las hojas de las plantas T0 se cosechó y se analizó mediante CG-EM, como se ha descrito anteriormente.

Resultados:

[0137] Bleeker *et al.* (2009) han mostrado previamente que el 7-epizingibereno es producido por *S. habrochaites* PI127826. El gen responsable de la producción de 7-epizingibereno, llamado ShZIS, fue aislado de *S. habrochaites* PI127826. Las plantas transgénicas se produjeron mediante la transformación mediada por *Agrobacterium* de *S. lycopersicum* C32. Mientras que no se formó 7-epizingibereno en las plantas de control de *S. lycopersicum* (C32) o en las plantas transformadas solo con MKS1:zFPS, el 7-epizingibereno estaba presente en las plantas transgénicas de *S. lycopersicum* con zFPS y ShZIS insertadas en su genoma (figura 4).

Ejemplo 5: Efecto de la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica la 7-epizingibereno sintasa sobre la resistencia a las plagas de insectos

65 **Metodología de los bioensayos:**

[0138] Se realizó un cruce interespecies entre *S. lycopersicum* y *S. habrochaites* y las líneas F2 se transfirieron al invernadero de la Universidad de Ámsterdam. Las plantas F2 se analizaron para determinar su producción de 7-epizingibereno. Se realizaron esquejes de las líneas F2 productoras de 7-epizingibereno, *S. lycopersicum* C32 (Moneymaker) y de *S. habrochaites* (PI127826). Ambas son líneas parentales del cruce inicial.

5 **Bioensayo de *B. tabaci* (mosca blanca)**

[0139] Dos esquejes de los genotipos PI127826 y C32 y las respectivas F2 recibieron 4 jaulas de clip, cada una de las cuales contenía 20 adultos de *B. tabaci* (biotipo Q) recogidos inicialmente en Almería (España) y criados continuamente en el pepino en condiciones de laboratorio (véase Bleeker *et al.*, 2009 - *Plant Physiol.*). Despues de 5 días, se determinó el número total y el porcentaje de moscas muertas y el número total de huevos (lado abaxial y adaxial combinados de las hojas).

10 [0140] Además, se utilizó material de hojas del mismo folíolo para determinar las concentraciones de terpenos.

15 [0141] Las plantas F2 tienen niveles de 7-epizingibereno comparables a *S. habrochaites* (PI127826). No se detectó 7-epizingibereno en *S. lycopersicum* (C32).

20 **Resultados del bioensayo de *B. tabaci*:**

[0142] Los esquejes de una planta F2 y *S. habrochaites* (PI127826) mostraron cantidades similares de 7-epizingibereno. No se detectó 7-epizingibereno en *S. lycopersicum* C32 (figura 5). Además, se observó una mayor resistencia a las moscas blancas en los esquejes de la planta F2 y *S. habrochaites* (PI127826) (figura 6A,B). En comparación con *S. habrochaites* y plantas F2, el porcentaje de adultos muertos después de 5 días fue significativamente menor en *S. lycopersicum* (figura 6A; ANOVA unidireccional, LSD; p<0,05 para ambas comparaciones). Además, el número de huevos depositados por hembras adultas de *B. tabaci* fue significativamente mayor en *S. lycopersicum* C32 en comparación con plantas F2 o de *S. habrochaites* (figura 6B; ANOVA unidireccional, LSD; p<0,05 para ambas comparaciones). Tanto las características de mortalidad como las de oviposición muestran que el 7-epizingibereno producido por las plantas mejora la resistencia a las moscas blancas.

30 **Bioensayo del escarabajo de la patata de Colorado (CPB)**

[0143] Las larvas del CPB, *Leptinotarsa decemlineata* (orden: Coleoptera) se criaron en la patata (cultivar Bintje). Se realizó un ensayo de no elección durante 24 horas. Se permitió que las larvas (neonatos) del CPB se alimentaran de discos de hojas (1,2 cm de diámetro) de plantas F2 surgidas de un cruce interespecies entre *S. lycopersicum* (C32) y *S. habrochaites* (PI127826).

[0144] La planta F2 40 muestra altos niveles de zingibereno (similar a *S. habrochaites*), mientras que la planta F2 45 solo produjo niveles mínimos de zingibereno. Los discos de hojas de ambos genotipos se colocaron sobre papel de filtro humedecido en una placa de Petri y se dejó que una larva se alimentara durante 24 horas (10 réplicas biológicas por genotipo de planta). Posteriormente se evaluó la supervivencia de las larvas y los daños ocasionados por la alimentación.

45 **Resultado del bioensayo de CPB**

[0145] Los niveles de 7-epizingibereno se midieron usando el método descrito anteriormente. La planta F2 40 muestra una alta concentración de 7-epizingibereno, mientras que la planta F2 45 produce solo niveles mínimos de 7-epizingibereno (concentración en el límite de detección; figura 7A).

[0146] La supervivencia de las larvas después de 24 horas de alimentación fue significativamente diferente en los dos genotipos. Solo el 20 % de las larvas sobrevivieron en la planta F2-40 con alto contenido de 7-epizingibereno. Por el contrario, la mayoría de las larvas sobrevivieron (70 %) y se alimentaron de la planta de baja producción (F2-45;

55 figura 7B).

[0147] El daño por alimentación se evaluó escaneando los discos de hojas. Se observó un daño significativamente mayor en las plantas con bajo contenido de 7-epizingibereno (planta F2-45; figura 7C). Además, el daño debido a la alimentación con CPB se cuantificó usando imágenes. El análisis determina la cantidad de píxeles (unidades arbitrarias) de los discos de hojas escaneados. El daño se determinó como el número de píxeles de los discos de hojas no dañados en comparación con el de los discos de hojas dañados por CPB. La figura 7D indica que se observó un daño significativamente mayor en los discos de hojas de la planta F2-45, en comparación con F2-40 (alta producción de 7-epizingibereno).

65 **Bioensayo de *Trialeurodes vaporariorum* (mosca blanca de invernadero)**

[0148] *Trialeurodes vaporariorum* (orden: *Hemiptera*) se crió en el tomate (*S. lycopersicum*). Se realizó un ensayo de selección durante 24 horas. Los adultos fueron liberados en una jaula con dos plantas F2 surgidas de un cruce interespecies entre *S. lycopersicum* (C32) y *S. habrochaites* (PI127826). Posteriormente, se determinó la preferencia de asentamiento de los adultos en las hojas de las siguientes plantas F2 (10 hojas por planta). La planta F2 40 mostró altos niveles de 7-epizingibereno (similar a *S. habrochaites*), mientras que la planta F2 45 solo produjo niveles mínimos de 7-epi-zingibereno (figura 7A).

Resultados del bioensayo de *Trialeurodes vaporariorum*

[0149] La preferencia de la mosca blanca de invernadero fue diferente en los dos genotipos (figura 8). En comparación con las plantas con una alta producción de 7-epizingibereno (F2-40), el doble de adultos de mosca blanca de invernadero se asentó en las plantas con baja producción de 7-epizingibereno (F2-45).

Bioensayo de *Macrosiphum euphorbiae* (pulgón de la patata/del tomate)

[0150] *Macrosiphum euphorbiae* (orden: *Hemiptera*) se criaron en el tomate (*S. lycopersicum*). Se realizó un ensayo de no elección durante 48 horas. Se colocó un pulgón adulto en una jaula de clip en cualquiera de las dos plantas F2 surgidas de un cruce interespecies entre *S. lycopersicum* (C32) y *S. habrochaites* (PI127826). Posteriormente, se determinó el comportamiento del pulgón (supervivencia y número de crías) en las siguientes plantas F2 (3 jaulas de clip por planta; 6 plantas por genotipo). La planta F2 40 muestra altos niveles de 7-epizingibereno (similar a *S. habrochaites*), mientras que la planta F2 45 solo produjo niveles mínimos de 7-epizingibereno (figura 7A).

Resultados del bioensayo de *Macrosiphum euphorbiae*

[0151] El comportamiento de los pulgones fue diferente en los dos genotipos (figura 9). En comparación con las plantas con alta producción de 7-epizingibereno (F2-40), los pulgones tuvieron un mejor comportamiento en términos de supervivencia y número de crías producidas en las plantas con baja producción de 7-epizingibereno (F2-45).

Bioensayo de *Tuta absoluta*

[0152] Se criaron *Tuta absoluta* (orden: *Lepidoptera*) en el tomate (*S. lycopersicum*). Se realizó un ensayo de no elección durante 7 días. Se permitió que 5 adultos depositaran sus huevos en plantas de *S. lycopersicum* (C32) y en plantas F2 surgidas de un cruce interespecies entre *S. lycopersicum* (C32) y *S. habrochaites* (PI127826). Despues de 7 días, se determinó la oviposición de *Tuta absoluta* (número de huevos depositados) en el lado abaxial y adaxial de seis hojas por genotipo de planta. Las plantas F2 se caracterizaron por su contenido de 7-epizingibereno después del ensayo y la oviposición de *Tuta absoluta* (número de huevos depositados) se correlacionó con el contenido de 7-epizingibereno.

Resultados del bioensayo de *Tuta absoluta*

[0153] La oviposición de las hembras de *Tuta absoluta* se redujo significativamente en las plantas F2 que producían 7-epizingibereno (figura 10a). La figura 10b indica la concentración de 7-epizingibereno en las plantas F2 analizadas para detectar la oviposición de *Tuta absoluta*. La oviposición se correlacionó negativamente con el contenido de 7-epizingibereno (combinación de las figuras 10A y 10B).

Bioensayo de los ácaros araña

[0154] Los ácaros araña, al igual que los insectos, pertenecen a los artrópodos, pero son una clase diferente de organismos. Se probó el efecto del 7-epizingibereno en dos especies de ácaros araña, *Tetranychus urticae* y *T. evansi*. Ambas especies de artrópodos se criaron en los frijoles comunes. Se realizó un ensayo de no elección de 4 días con poblaciones sincronizadas de *T. urticae* y *T. evansi*. Los ácaros se colocaron sobre discos de hojas de plantas de control susceptibles (*S. lycopersicum*), plantas de *S. habrochaites* PI127826 y en plantas transgénicas de *S. lycopersicum* productoras de 7-epizingibereno (línea 2). Posteriormente, se evaluó la supervivencia y fecundidad (número de huevos/ácaro) de los ácaros. Se obtuvieron plantas transgénicas como se ha descrito anteriormente. En resumen, las plantas se cotransformaron con dos construcciones para producir 7-epizingibereno en tricomas glandulares de *S. lycopersicum* (pMKS1:zFPS y pMTS1:ShZIS). En este experimento se utilizó una línea transgénica (línea 2).

Resultados del bioensayo de los ácaros araña

[0155] La fecundidad de los ácaros se redujo por la producción de 7-epi-zingibereno en plantas transgénicas de *S. lycopersicum*. En comparación con *S. lycopersicum*, las plantas transgénicas que produjeron 7-epi-zingibereno mostraron una supervivencia reducida de los ácaros (ambas especies). Además, la figura 11A y 11C indican una

fuerte reducción de la fecundidad de los ácaros (huevos/ácaro) tanto para *T. urticae* como para *T. evansi*, una reducción del 81 % y del 54 %, respectivamente.

[0156] La supervivencia general también se vio afectada para ambas especies de ácaros araña. Las figuras 11B y 11D indican que el porcentaje de ácaros araña muertos fue mayor en plantas transgénicas productoras de 7-epizingibereno en comparación con plantas de *S. lycopersicum* que no producen 7-epizingibereno (*S. lyc* 32).

Ejemplo 5: producción de 7-epi-zingibereno en varias plantas

[0157] *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Cucumis melo*, *Lactuca sativa*, *Glycine max* y *Gossypium hirsutum* se cotransforman con ShzFPS (precursor adicional de ZFPP) y ShZIS (que codifica la 7-epizingibereno sintasa). La producción de 7-epi-zingibereno en las hojas de las plantas cotransformadas se compara con la producción de 7-epi-zingibereno en plantas de la misma especie transformadas de forma simulada. *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Cucumis melo*, *Lactuca sativa*, *Glycine max* y *Gossypium hirsutum* son capaces de producir 7-epi-zingibereno.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proteína aislada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a lo largo de toda la longitud, que tiene una actividad de 7-epizingibereno sintasa.
- 10 2. Proteína según la reivindicación 1, donde la proteína está precedida por un péptido de direccionamiento.
- 15 3. Proteína según la reivindicación 1, donde la proteína está precedida por un péptido dirigido a los plástidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.
- 20 4. Proteína según la reivindicación 1 o 3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 precedida por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.
- 25 5. Molécula de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que comprende:
 - a) la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2;
 - b) una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;
 - c) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1-4; y
 - d) una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 97 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de (a), y que codifica una 7-epizingibereno sintasa.
- 30 6. Gen químérico que comprende un promotor unido operativamente a una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 5.
- 35 7. Vector que comprende el gen químérico según la reivindicación 6.
- 40 8. Célula huésped que comprende el vector según la reivindicación 7.
- 45 9. Método para preparar 7-epizingibereno y/o R-curcumeno que comprende los pasos de:
 - a) transformar una célula huésped con la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 5, un gen químérico según la reivindicación 6 o un vector según la reivindicación 7;
 - b) cultivar dicha célula huésped en condiciones que permitan la producción de 7-epizingibereno; y
 - c) opcionalmente, aislar el 7-epizingibereno producido en el paso b);
 - d) opcionalmente, deshidrogenar dicho 7-epizingibereno para producir R-curcumeno.
- 50 10. Método para producir 7-epizingibereno a partir de zFPP en una célula huésped, que comprende:
 - a) introducir en dicha célula huésped un primera secuencia de ácido nucleico que codifica una zFPS como se muestra en SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 a lo largo de toda la longitud, y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una 7-epizingibereno sintasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;
 - b) cultivar la célula transformada en condiciones adecuadas para la expresión de dicha primera y dicha segunda secuencias de ácidos nucleicos; y,
 - c) opcionalmente, recoger zFPP y/o el 7-epizingibereno contenido en dicha célula y/o en el medio de cultivo.
- 55 11. Planta, célula vegetal, semilla o fruto transgénicos, que comprende un transgén que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína 7-epizingibereno sintasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a lo largo de toda la longitud, que tiene actividad de 7-epizingibereno sintasa.
- 60 12. Progenie de la planta transgénica según la reivindicación 11, donde la progenie comprende el transgén en el ADN.
- 65 13. Planta, célula vegetal, semilla o fruto de *Solanum lycopersicum*, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína 7-epizingibereno sintasa funcional que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a lo largo de toda la longitud, que tiene actividad 7-epizingibereno sintasa.

- 5 14. Planta, célula vegetal, semilla o fruto de *Solanum lycopersicum* según la reivindicación 13, que comprende, además, una secuencia de ácido nucleico que codifica una zFPS como se muestra en SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 a lo largo de toda la longitud.
- 10 15. Planta, célula vegetal, semilla o fruto de *Solanum lycopersicum* según la reivindicación 13 o 14, que tiene una resistencia mejorada a las plagas de insectos en comparación con una planta de *Solanum lycopersicum* de tipo silvestre.
16. Planta, célula vegetal, semilla o fruto de *Solanum lycopersicum* según cualquiera de las reivindicaciones 13-15, que tiene una producción mejorada de 7-epizingibereno en comparación con una planta de *Solanum lycopersicum* de tipo silvestre.
- 15 17. Método para producir una planta transgénica que tiene una resistencia mejorada a las plagas de insectos en comparación con una planta de control no transgénica, donde dicho método comprende los pasos de:
- 20 (a) transformar una planta o célula vegetal con una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína 7-epizingibereno sintasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a lo largo de toda la longitud y que tiene actividad de 7-epizingibereno sintasa, unida operativamente a un promotor activo en células vegetales, y
25 (b) regenerar una planta.
18. Método según la reivindicación 17, donde dicha molécula de ácido nucleico se integra en el genoma de dicha planta.
- 30 19. Método según la reivindicación 17 o 18, que comprende, además, el paso de (c) examinar la planta regenerada para determinar su resistencia a una o más plagas de insectos e identificar una planta que comprenda una resistencia mejorada a una o más de dichas plagas de insectos.
20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 17-19, donde dicho promotor es un promotor inducible por plagas de insectos.
- 35 21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 17-20, donde la planta pertenece a la familia *Solanaceae*.
22. Método según la reivindicación 21, donde la planta es del género *Solanum*.
23. Método según cualquiera de las reivindicaciones 17-22, donde el método comprende, además, el paso de:
- 40 - transformar la planta o célula vegetal con una molécula de ácido nucleico que codifica una zFPS como se muestra en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 a lo largo de toda la longitud, unida operativamente a un promotor activo en células vegetales.

45

Figura 1

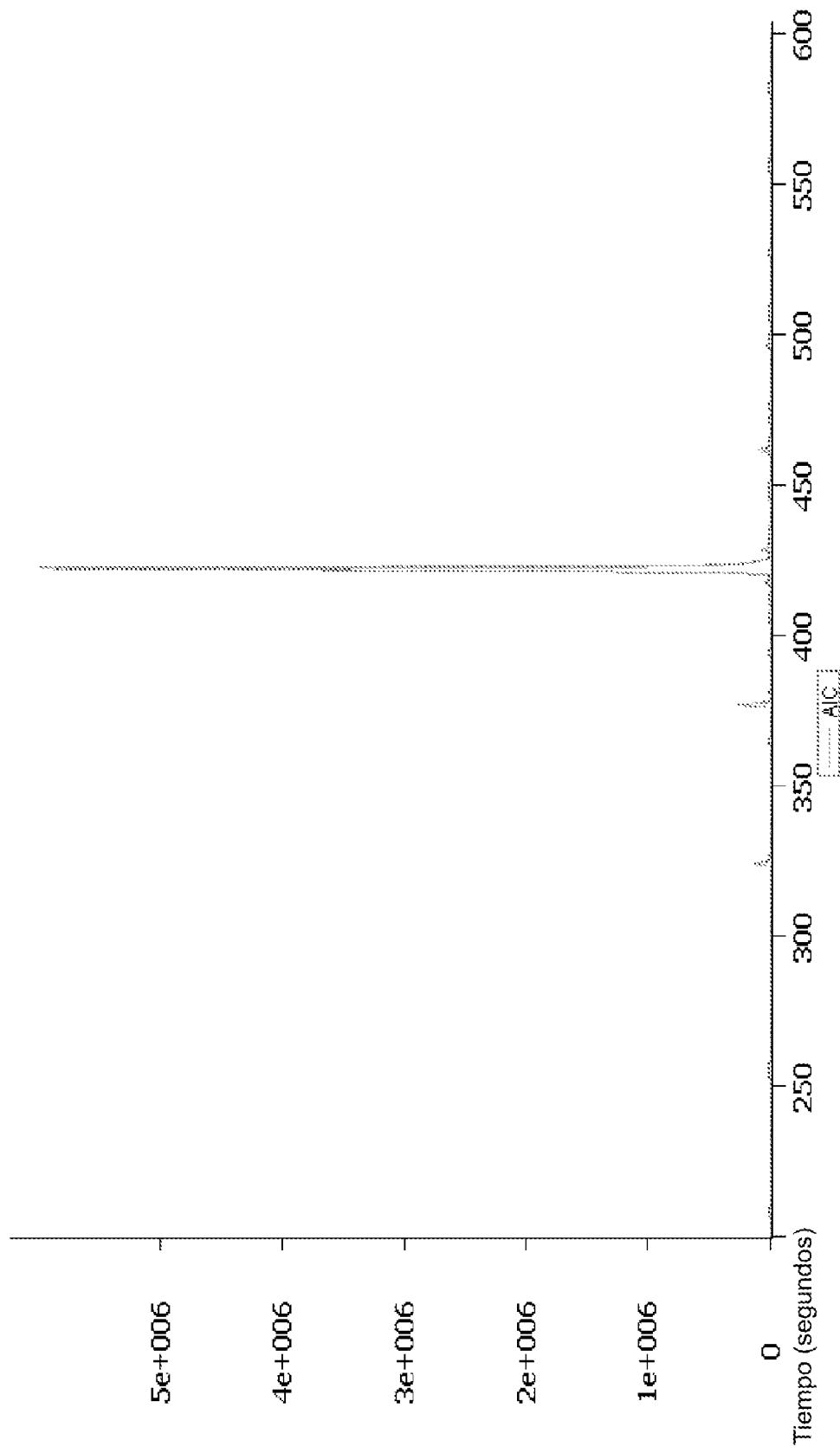
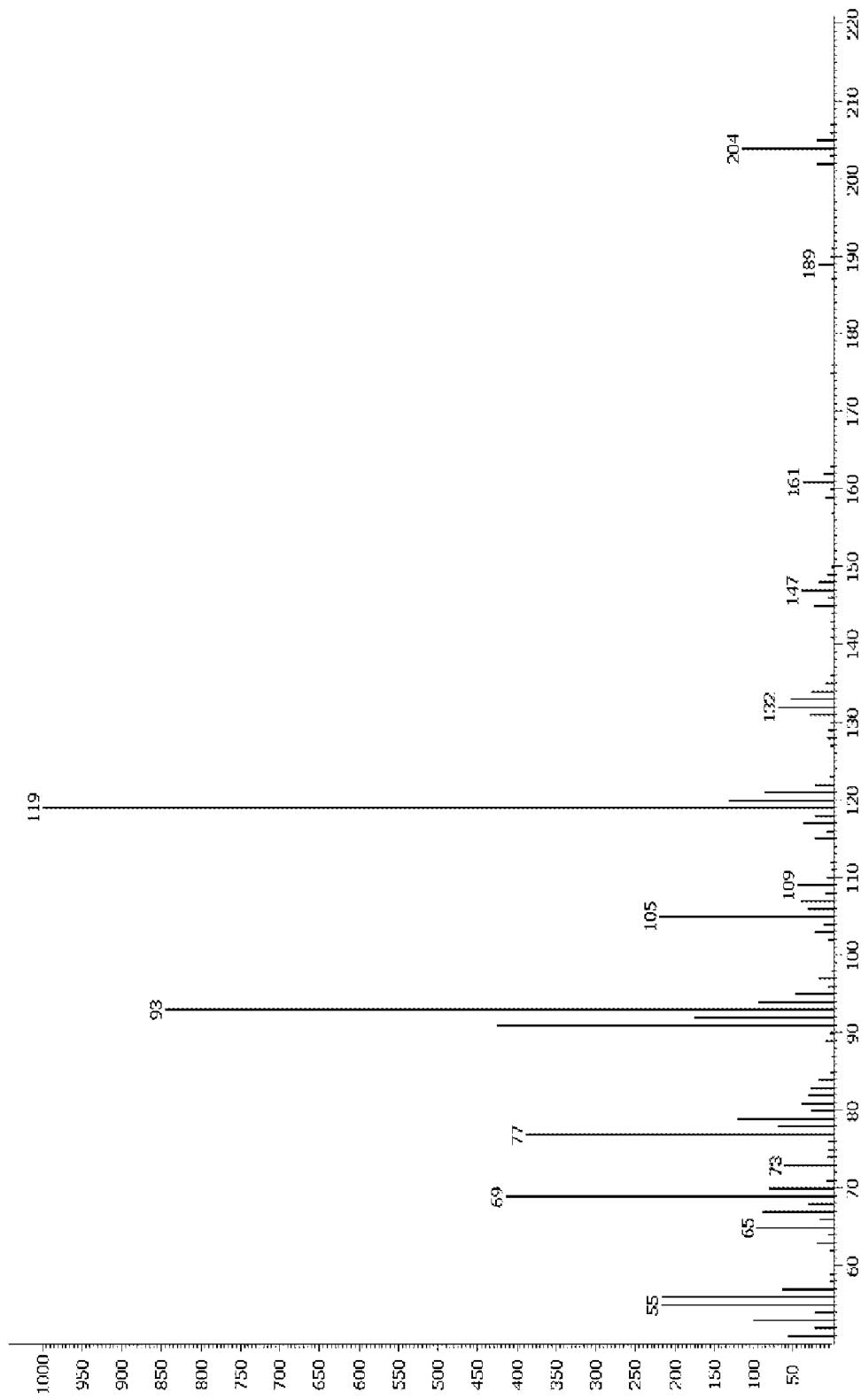


Figura 2A



ES 2 997 261 T3

Figura 2B

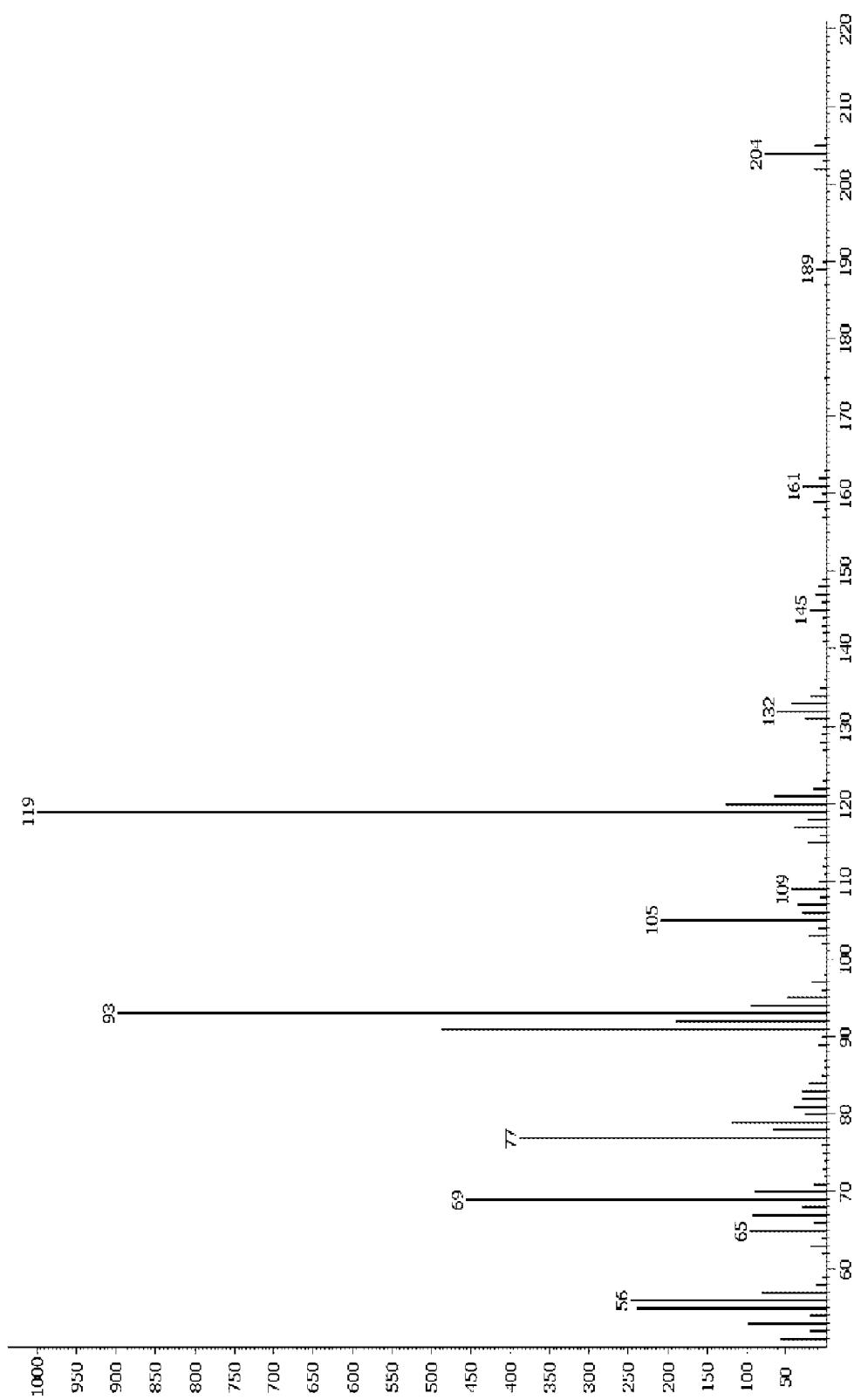


Fig 3A

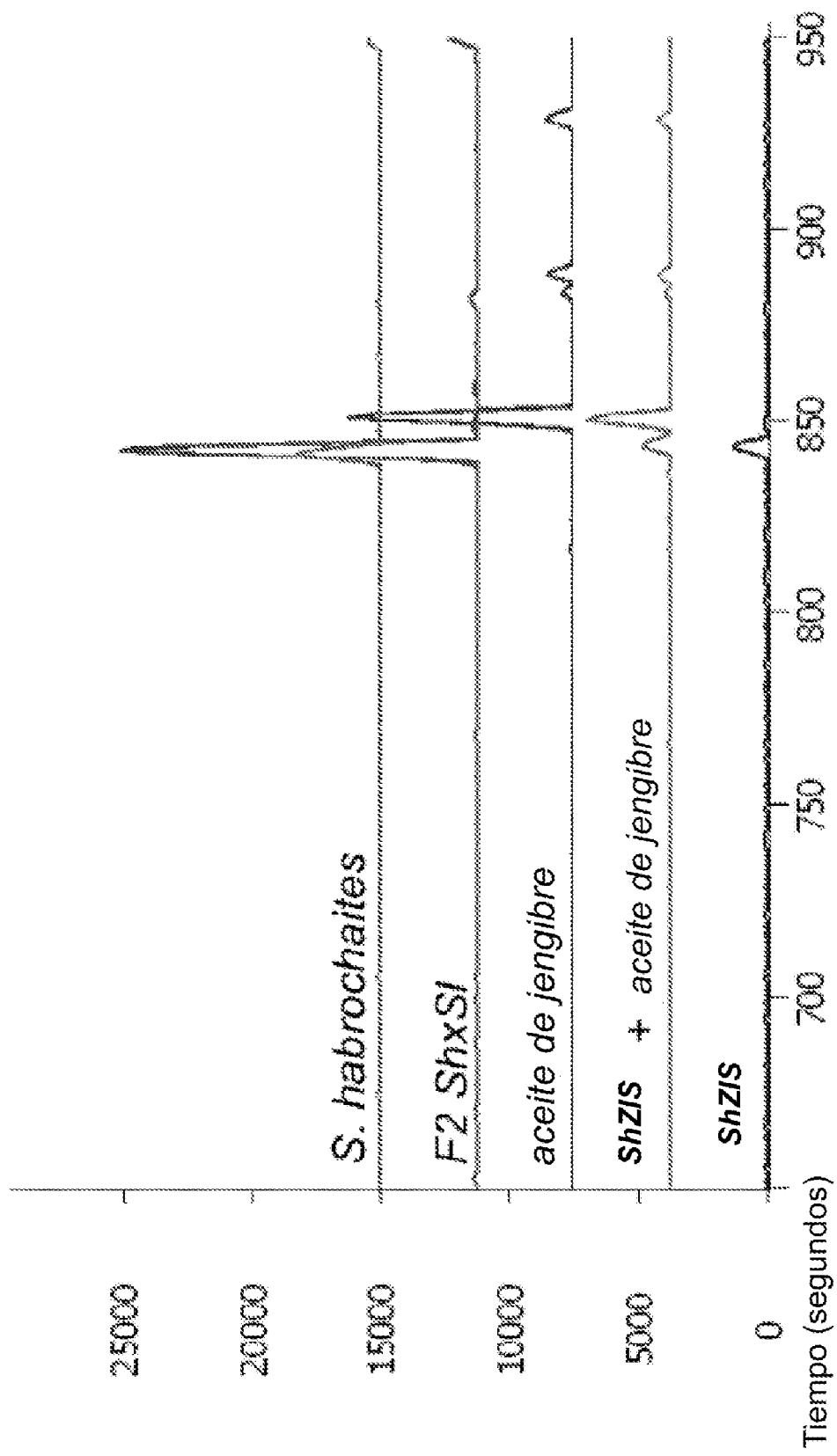


Fig 3B

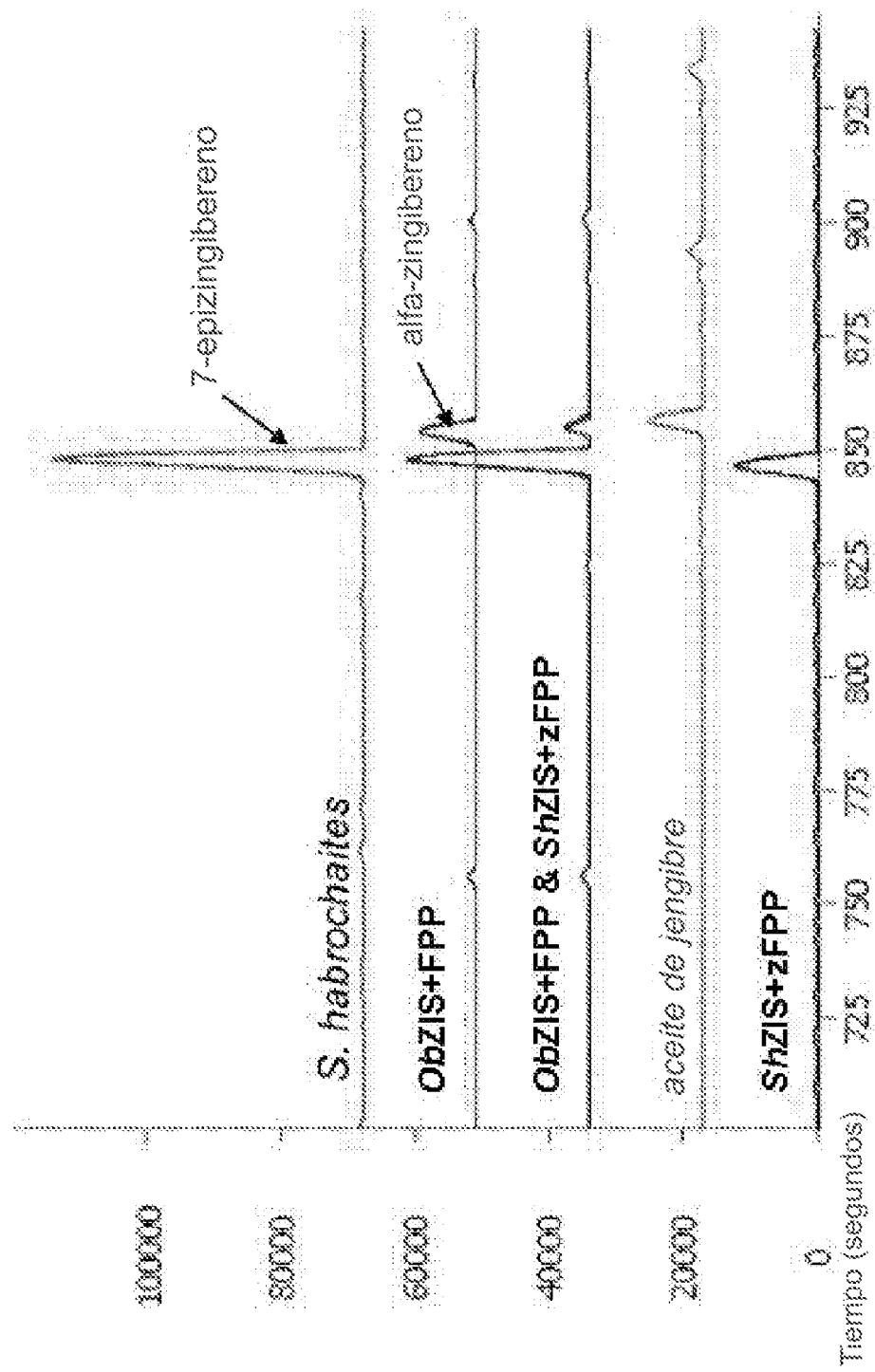


Figura 4A

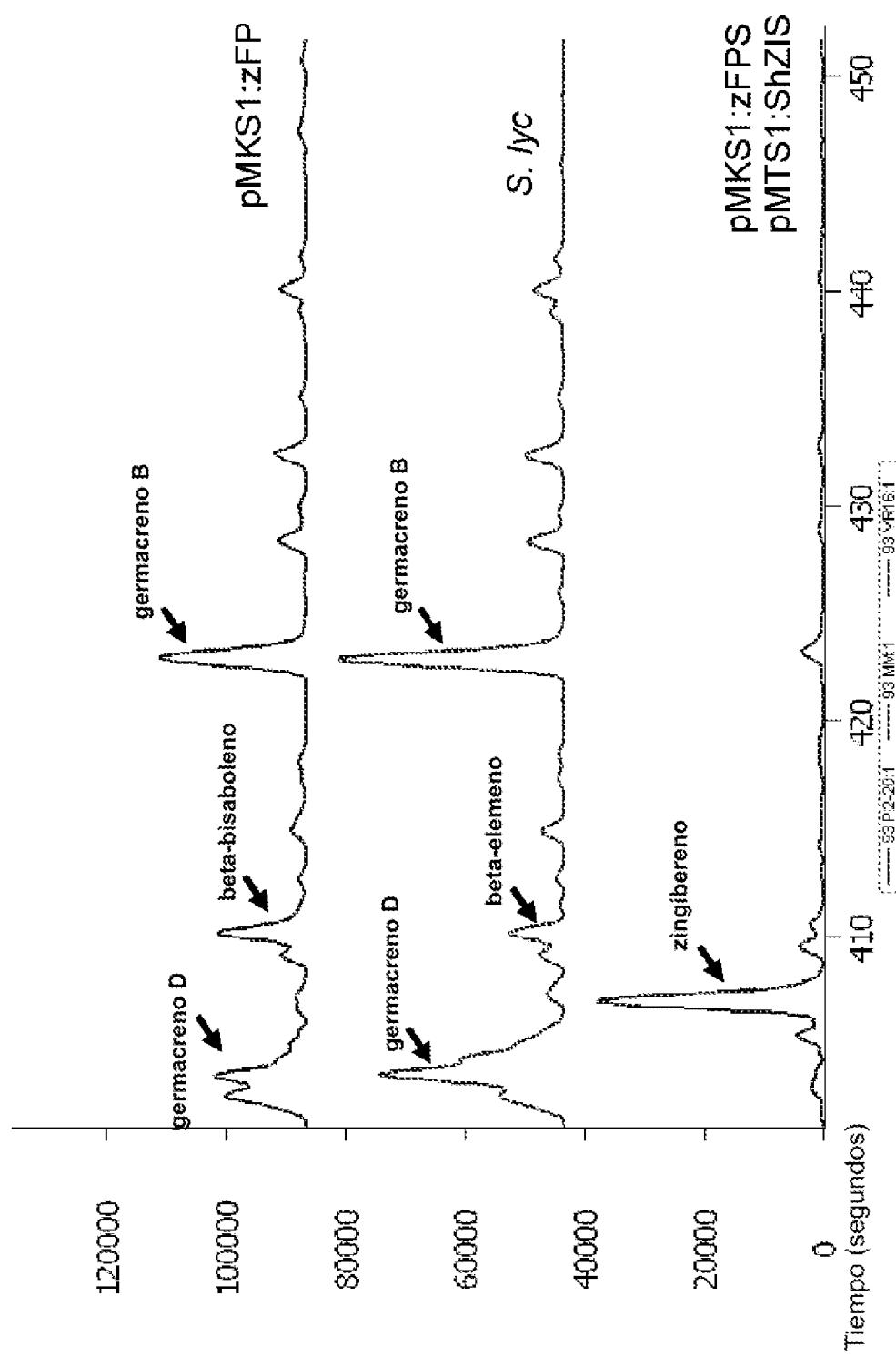


Figura 4B

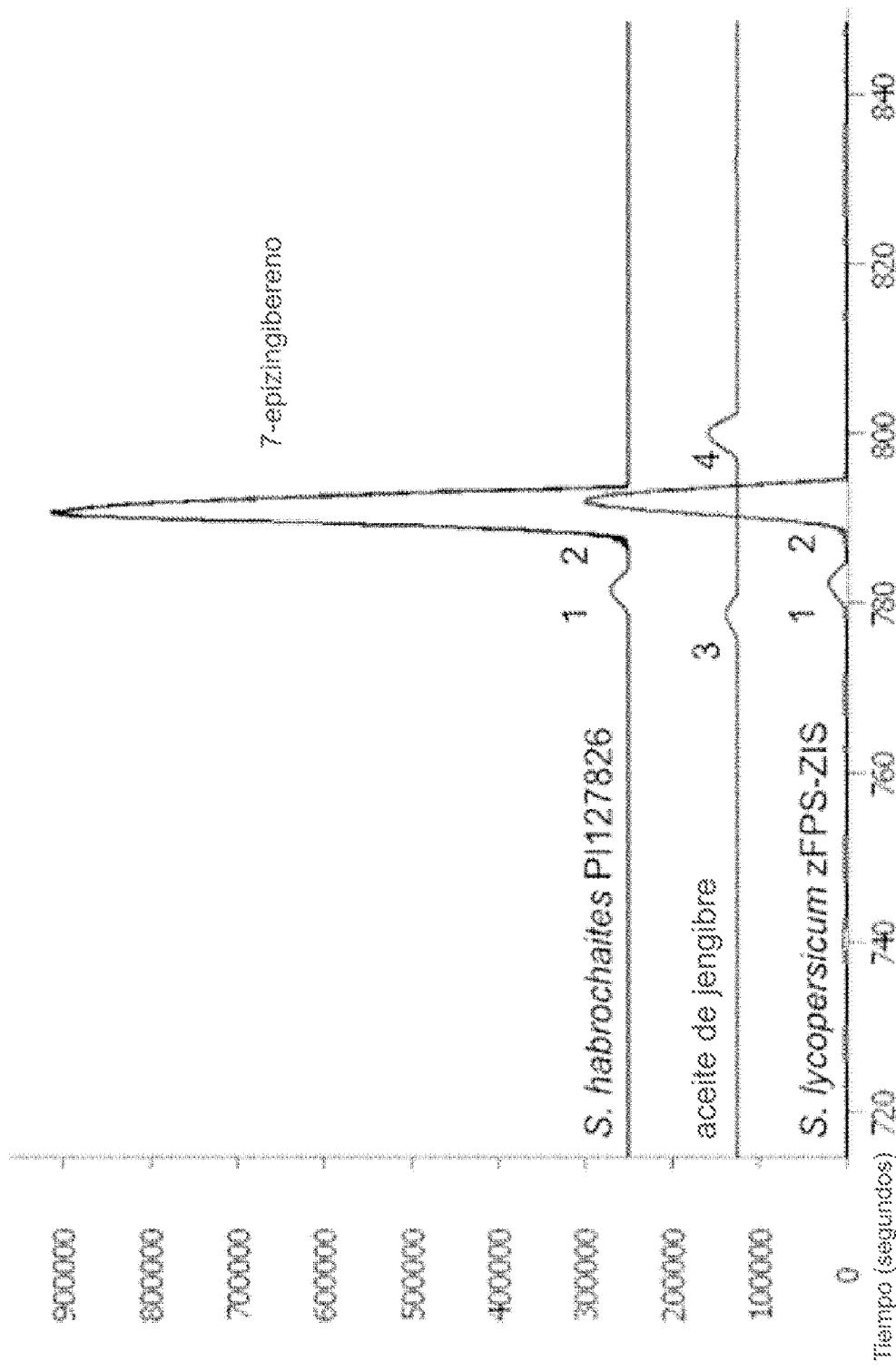


Figura 5

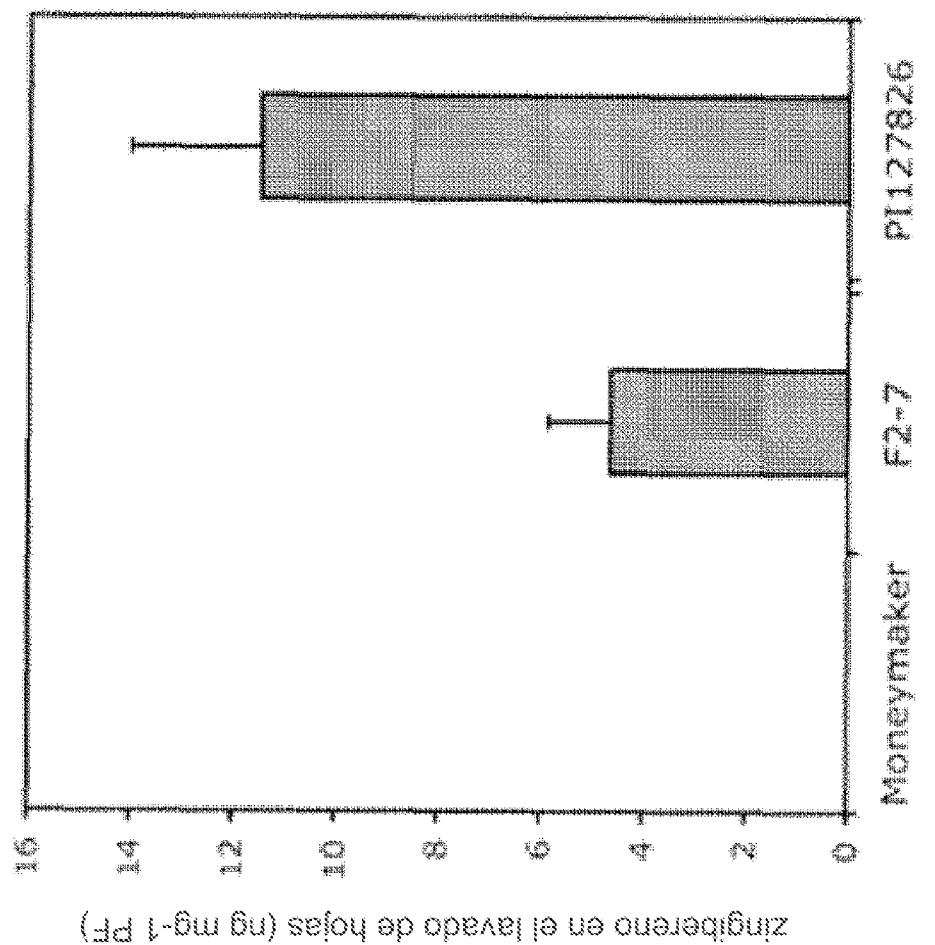


Figura 6A

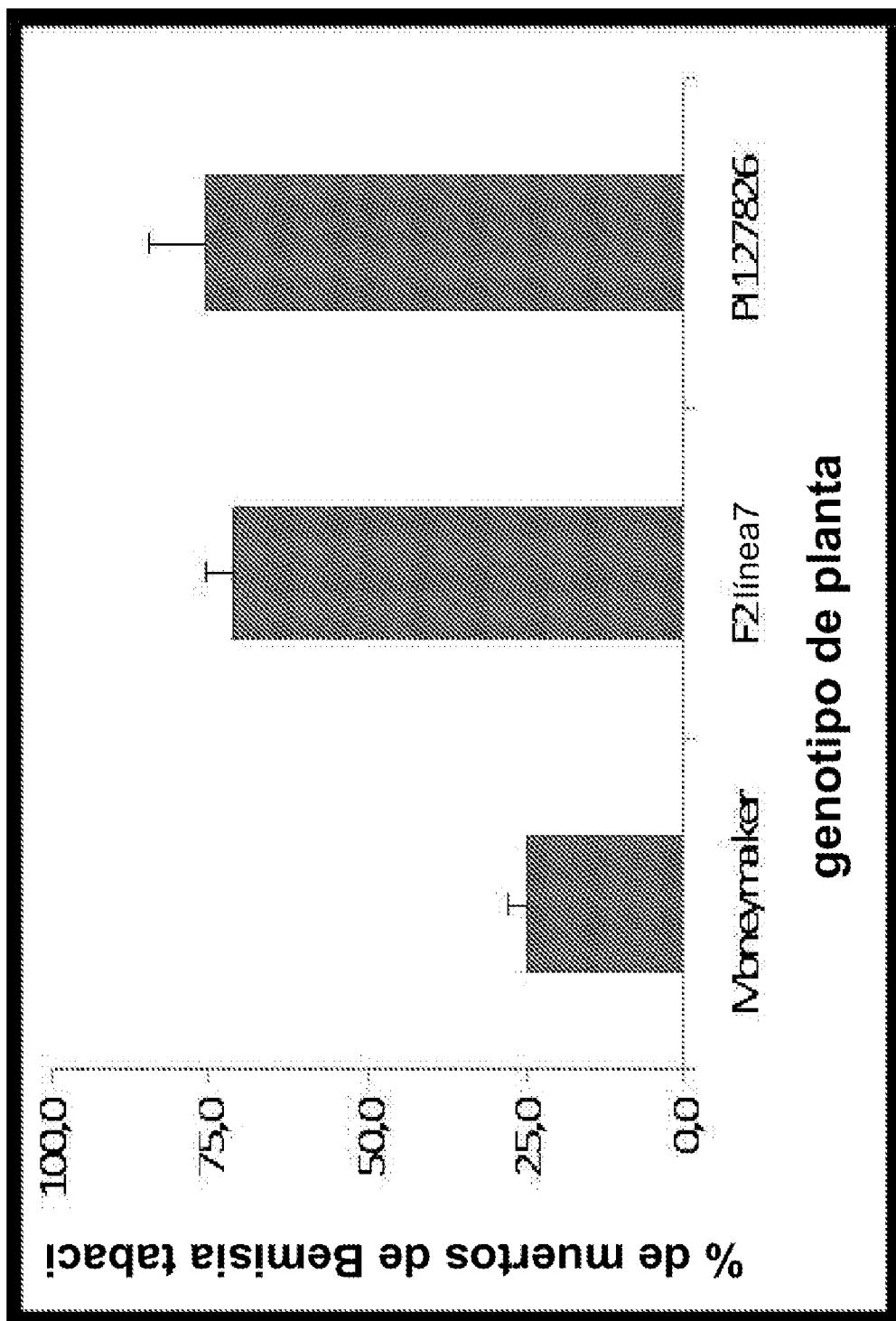


Figura 6B

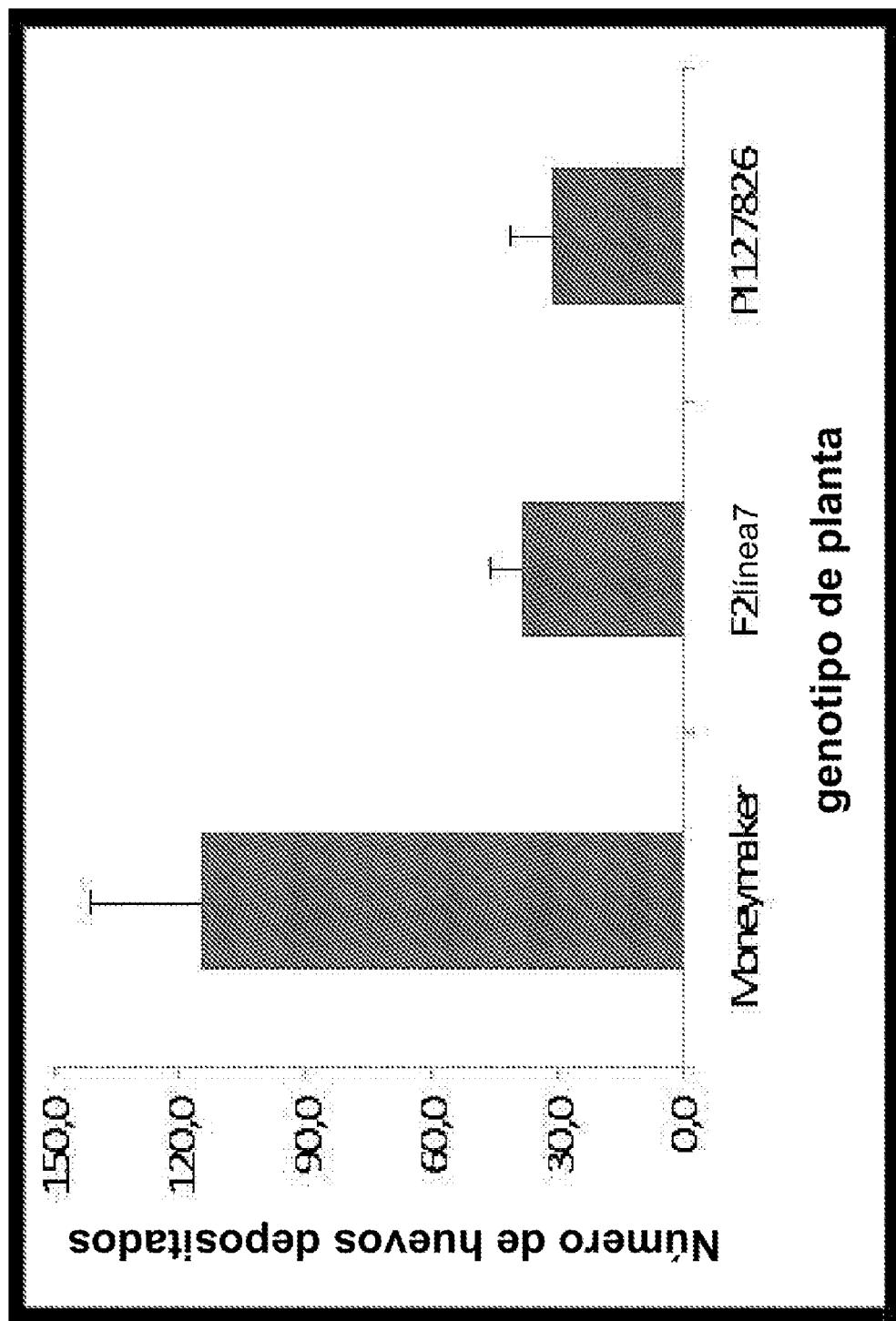


Figura 7A

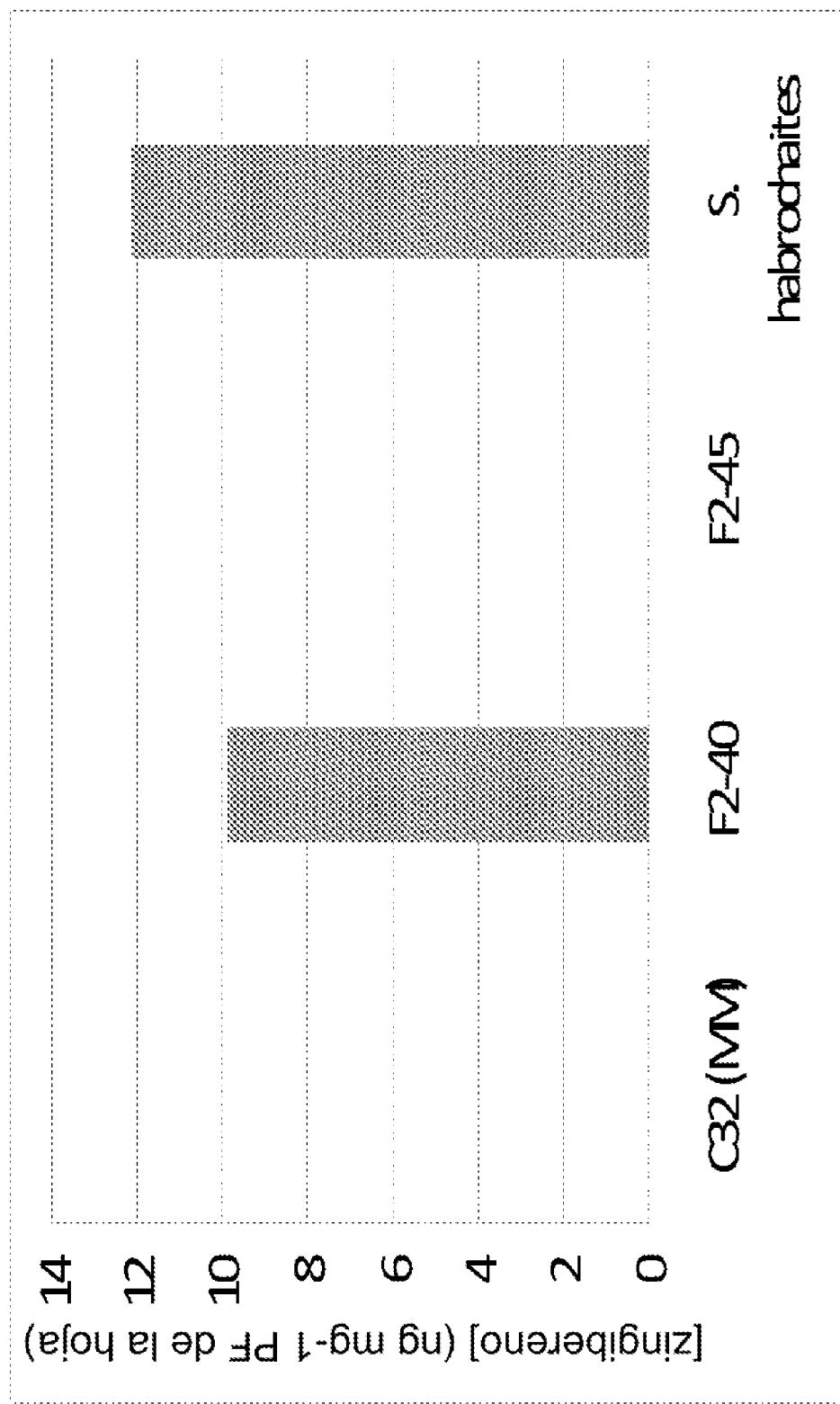


Figura 7B

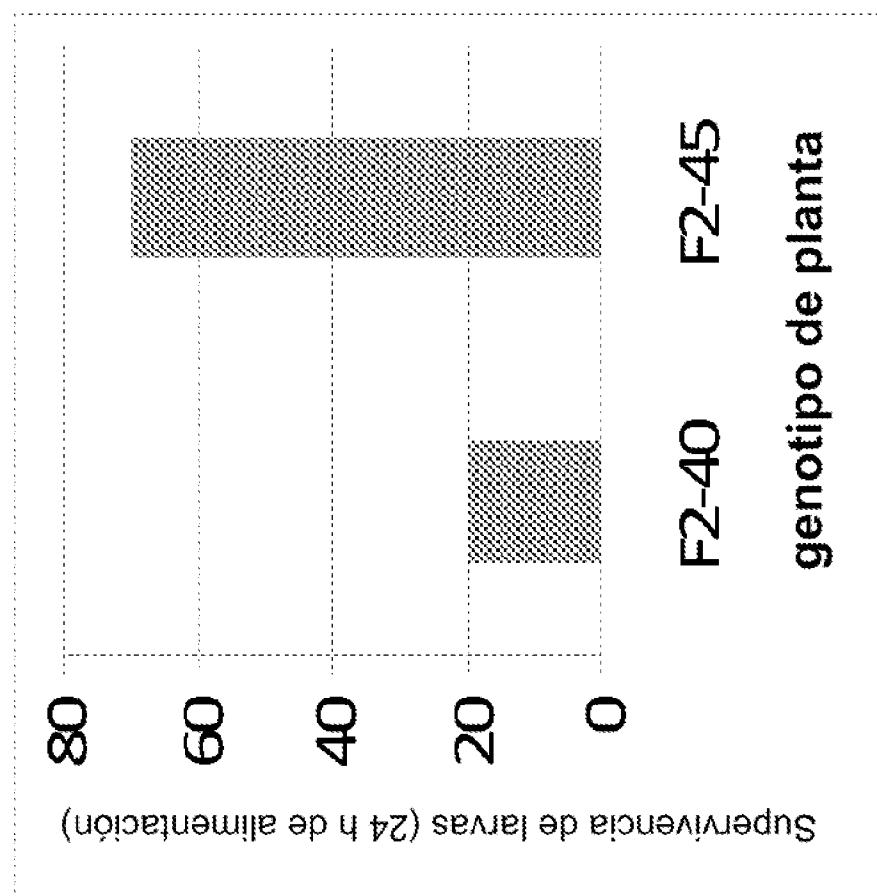


Figura 7C

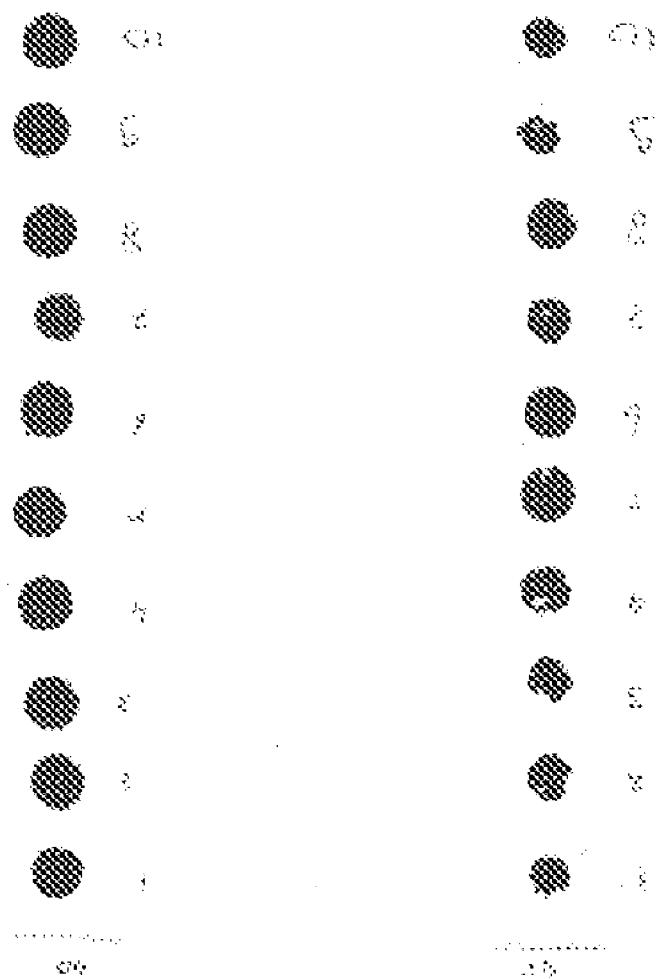


Figura 7D

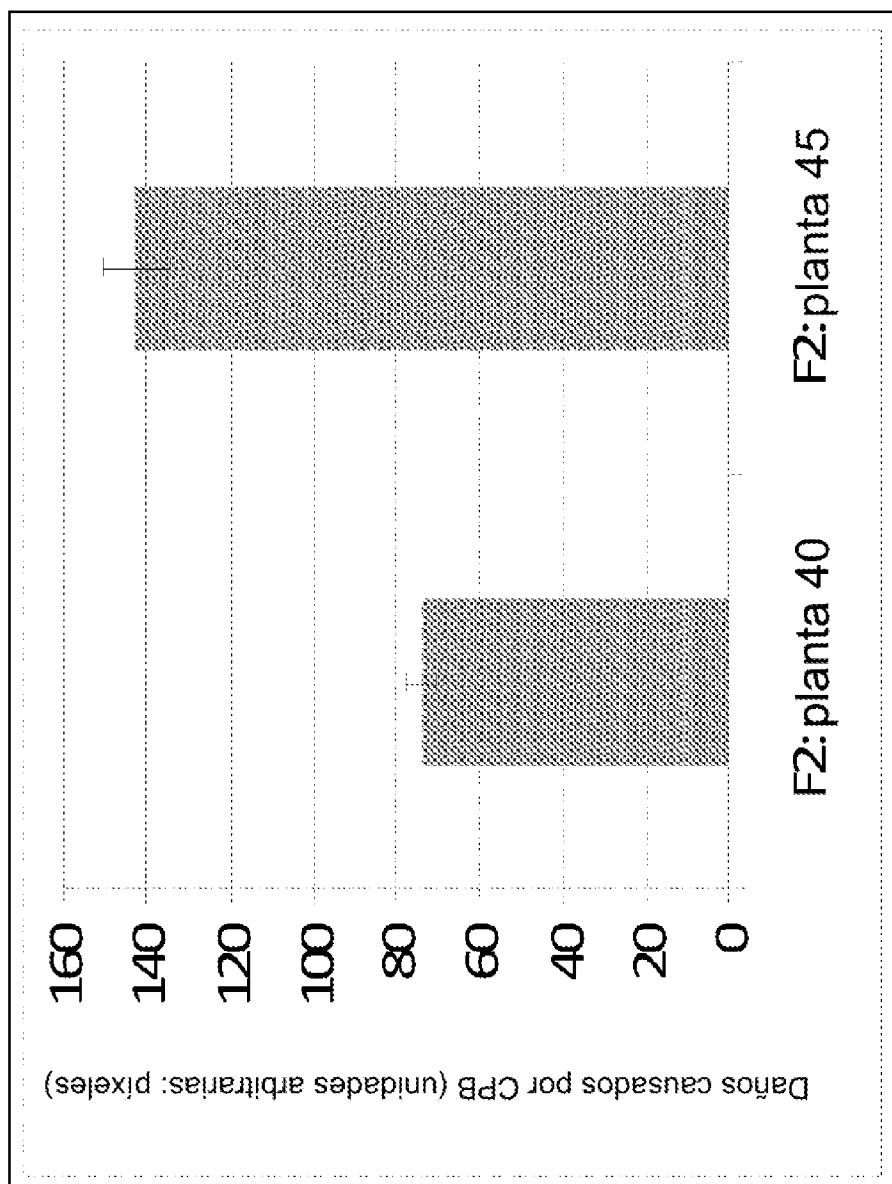


Figura 8

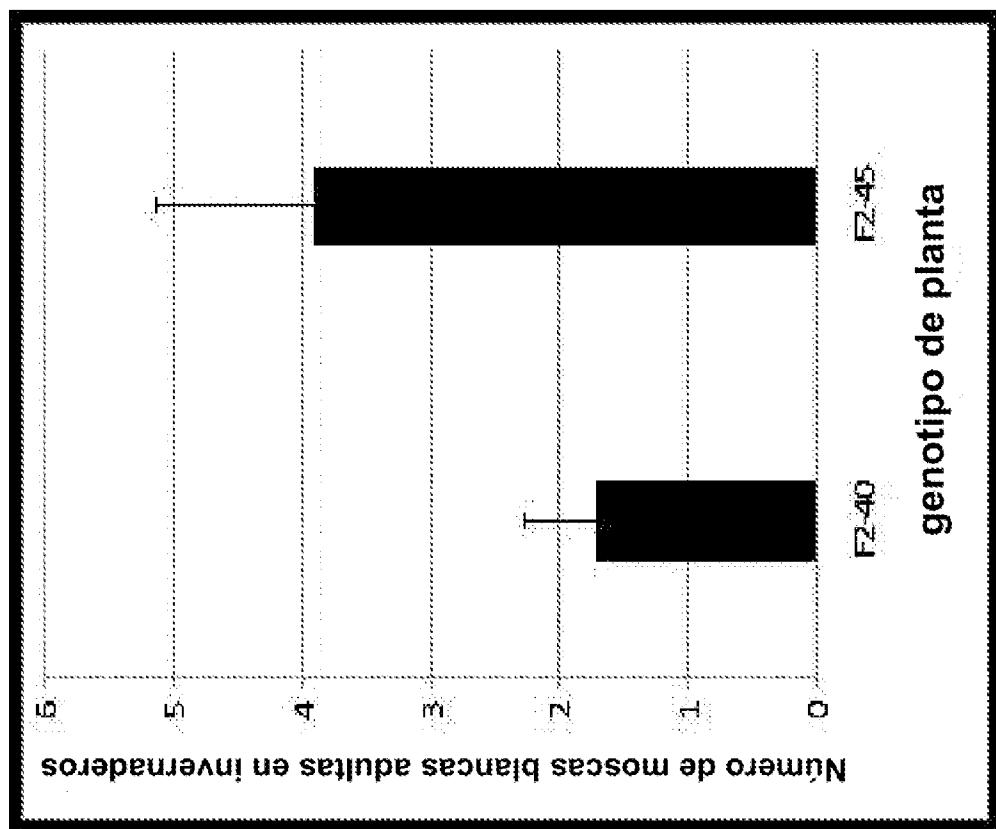


Figura 9

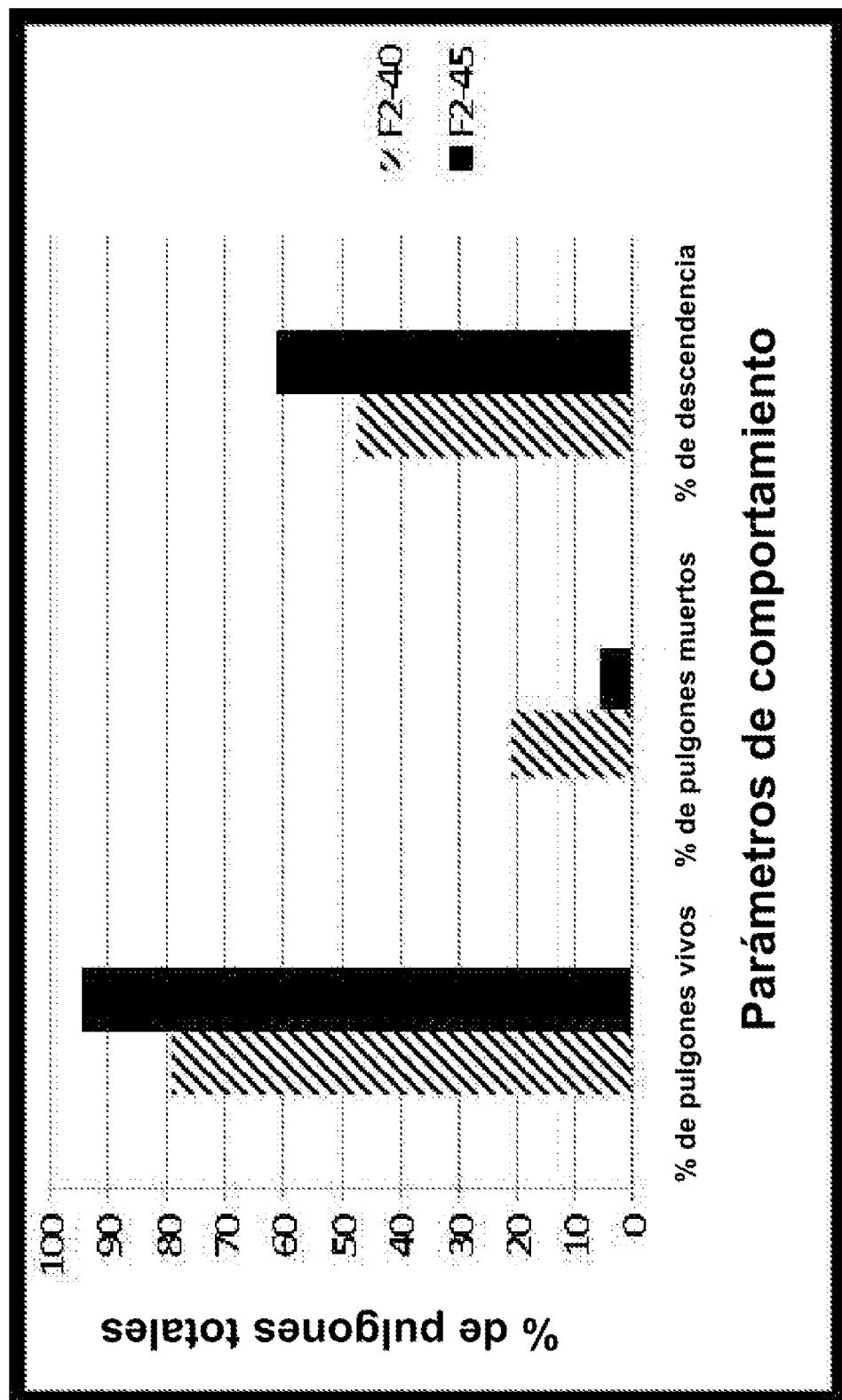


Figura 10A

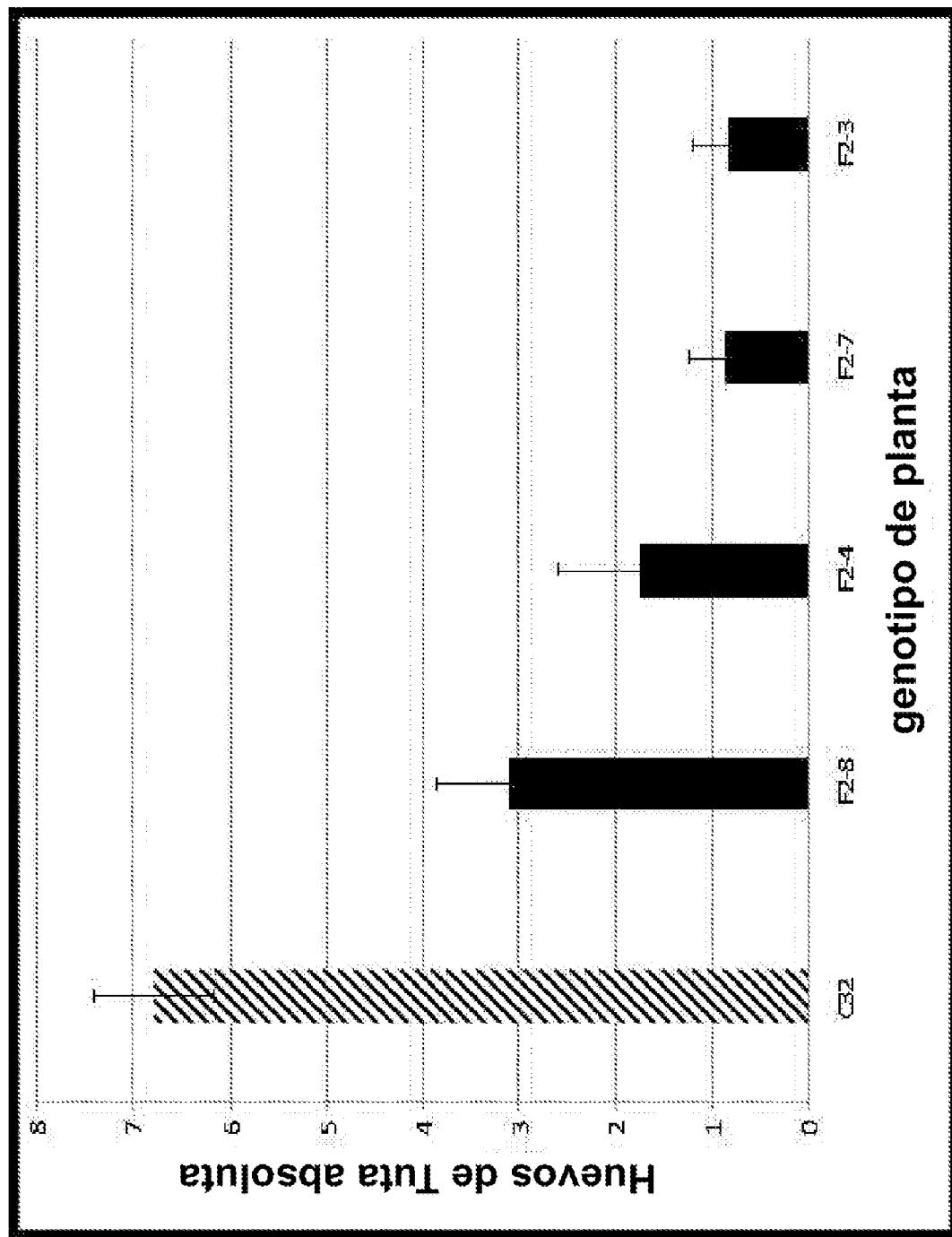


Figura 10B

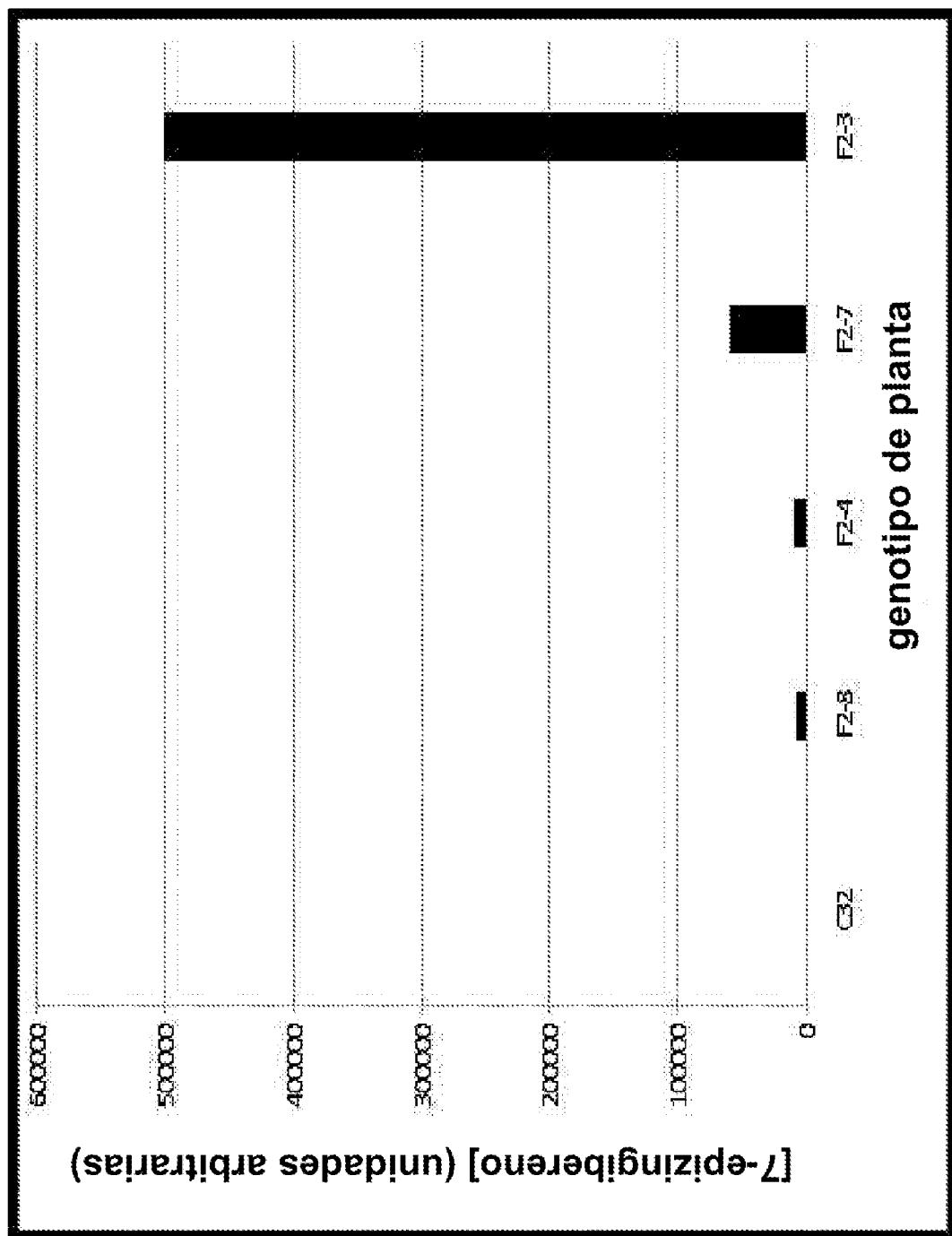


Figura 11A

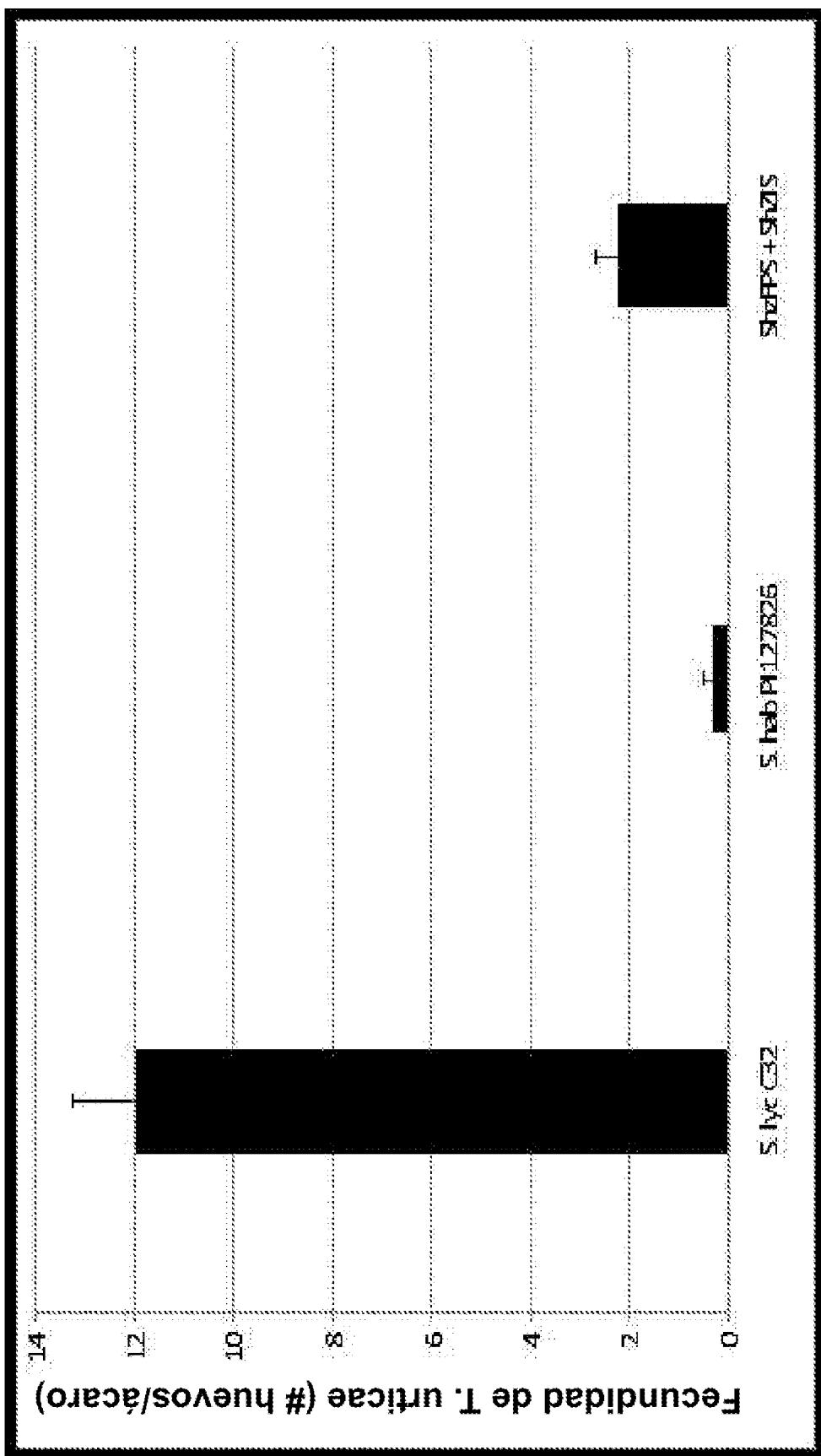


Figura 11B

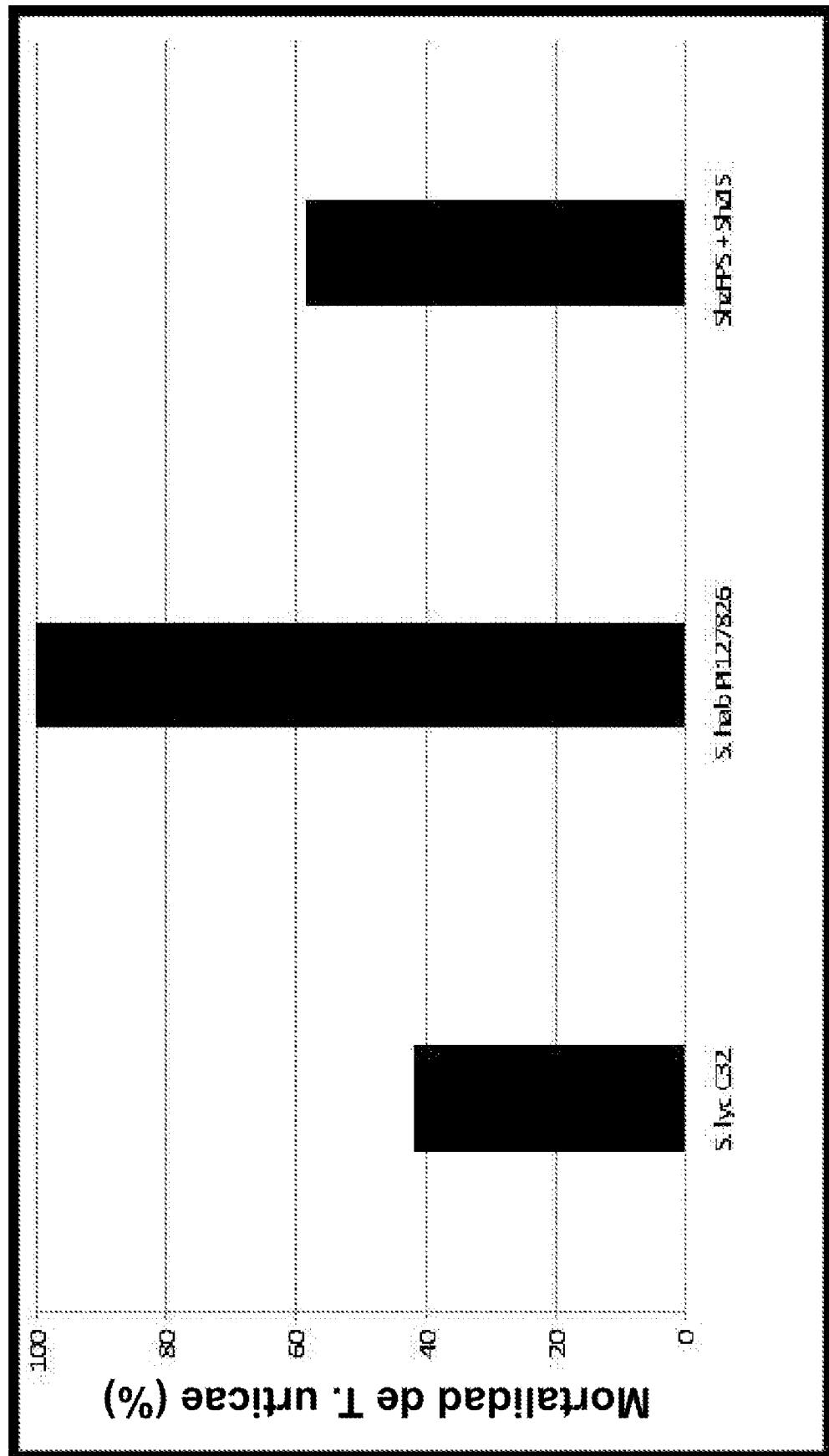


Figura 11C

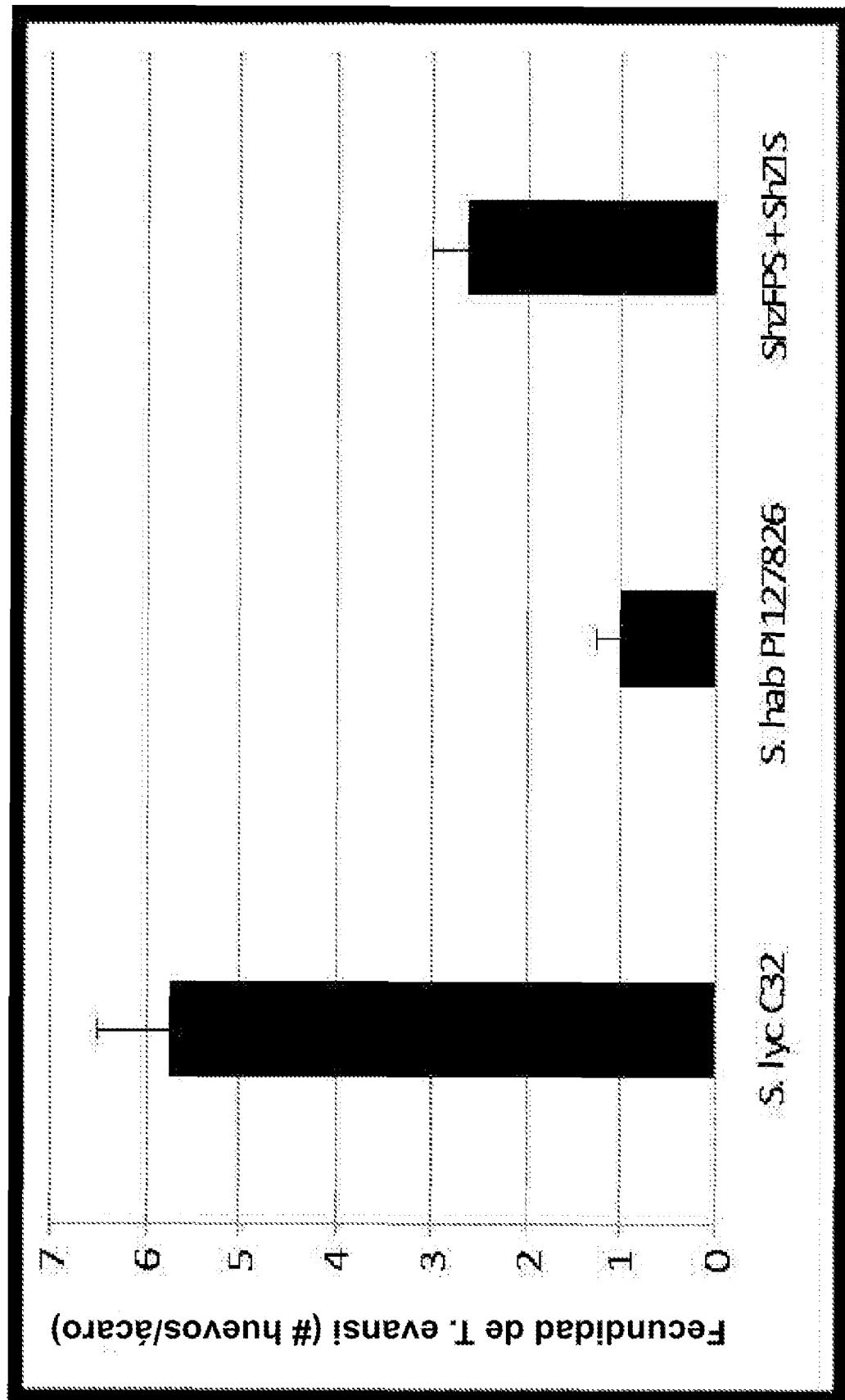


Figura 11D

