



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 363 325**

② Número de solicitud: 200902183

⑤ Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **18.11.2009**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **29.07.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
29.07.2011

⑦ Solicitante/s: **INSTITUTO VALENCIANO DE
INVESTIGACIONES AGRARIAS**
Crta. Moncada-Náquera, Km. 4,500
46113 Moncada, Valencia, ES

⑦ Inventor/es: **Rodríguez Baixauli, Ana;**
Cervera Ocaña, Magdalena;
Shimada, Takehiko;
Redondo Puntonet, Ana;
Rodrigo Esteve, María Jesús;
San Andrés Aura, Victoria;
Palou Vall, Lluís;
Zacarias García, Lorenzo;
López González, María Milagros;
Castañera Domínguez, Pedro y
Peña García, Leandro

⑦ Agente: **González Palmero, Fe**

⑤ Título: **Método para conseguir resistencia frente a enfermedades de los cítricos causadas por insectos, por hongos u omicetos o por bacterias o nematodos.**

⑤ Resumen:

Método para conseguir resistencia frente a enfermedades de los cítricos causadas por insectos, por hongos u omicetos o por bacterias o nematodos.

Consiste en modificar los niveles de acumulación y emisión de monoterpenos y sesquiterpenos en cítricos como mecanismo de resistencia contra patógenos y plagas. La alteración del contenido de d-limoneno y de otros terpenos se consigue mediante la introducción vía transformación genética de un gen que codifica una enzima con actividad d-limoneno sintasa, bien procedente de un cítrico o bien procedente de otra planta u organismo vivo, en antisentido o en forma de molécula inductora de interferencia de RNA (RNAi). La modificación genética se consigue bien mediante *Agrobacterium tumefaciens* o cualquier otro método de transformación genética de plantas, a partir de protoplastos o explantes procedentes de la planta. La construcción se incorpora en genotipos cítricos o géneros afines de la familia Rutáceas con el fin de reducir los niveles de acumulación y emisión de dicho monoterpeno y compuestos precursores y/o derivados tanto a nivel de hojas, como de flores y fruto.

ES 2 363 325 A1

DESCRIPCIÓN

Método para conseguir resistencia frente a enfermedades de los cítricos causadas por insectos, por hongos u omicetos o por bacterias o nematodos.

5

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un método para conseguir resistencia frente a enfermedades de los cítricos causadas por insectos, por hongos u omicetos o por bacterias o nematodos, especialmente aplicable en el ámbito de la fitopatología, entomología, infecciones de hongos, infecciones de bacterias, tecnología post-cosecha, podredumbres, patógenos de plantas, industria agroalimentaria, características organolépticas, mejora de aroma, mejora de sabor.

10

Antecedentes de la invención

Las plantas producen una amplia gama de metabolitos secundarios, muchos de los cuales son compuestos volátiles emitidos por las hojas, las flores, las raíces y los frutos con diferentes funciones entre las que se encuentran las de actuar como moléculas señalizadoras en las interacciones de las plantas con otras plantas del entorno o con zonas distantes de la zona emisora de la misma planta, de defensa frente a insectos plaga y frente a patógenos, como atrayentes de insectos predadores de herbívoros en las hojas y en las raíces, como atrayentes de insectos polinizadores por las flores, o como atrayentes de dispersores de semillas por los frutos (Gershenzon y Dudareva, 2007). Además, los compuestos volátiles emitidos por las flores contribuyen de forma fundamental al éxito reproductivo de las plantas y a su supervivencia en ecosistemas naturales (Kessler y col., 2008). Por último, los aromas de las plantas, y más concretamente de sus frutos, han contribuido enormemente a la selección de los mejores genotipos y a su utilización por el hombre con fines nutricionales, medicinales e industriales (Goff y Klee, 2006).

25

En los últimos tiempos se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de las rutas biosintéticas, en la clonación de genes reguladores importantes, en la purificación de enzimas implicadas y en el descubrimiento de los mecanismos reguladores que conducen a la formación de estos compuestos volátiles y a su emisión por los diferentes tejidos u órganos de las plantas. Consiguientemente, se ha propuesto la utilización de los conocimientos adquiridos para la mejora de las plantas mediante ingeniería genética con fines principalmente agronómicos y nutricionales.

30

Los cítricos son los árboles frutales de mayor importancia económica en el mundo, con una producción que excedió los 105 millones de toneladas en 2008 en una superficie superior a los 7,6 millones de Ha. (FAO, 2009). Se cultivan en más de 130 países en zonas tropicales y subtropicales (hasta 40° de latitud a ambos lados del ecuador) en las que se dan condiciones edafoclimáticas favorables. Los mayores productores son Brasil, EE.UU., China, España y México, que representan aproximadamente el 55% de la citricultura mundial.

35

Los cítricos se ven afectados tanto por plagas importantes como por enfermedades causadas por nematodos, hongos, omicetos, bacterias, espiroplasmas, fitoplasmas, virus, viroides y por enfermedades de etiología desconocida. Algunas de estas enfermedades afectan a la mayoría de áreas cítricas, como las causadas por el omiceto *Phytophthora sp.* o por el virus de la tristeza de los cítricos también conocido como *Citrus Tristeza Virus* (CTV), que impiden el uso de determinados excelentes portainjertos y que restringen la producción y la calidad de la fruta en ciertos países. Otras, como la cancrrosis, causada por la bacteria *Xanthomonas citri* subesp. *citri*, y que afecta a la mayoría de variedades importantes, se encuentra ampliamente expandida y actualmente constituye una seria amenaza para las citriculturas de Florida y de la mayoría de países sudamericanos. Otras enfermedades se encuentran localizadas en áreas geográficas específicas, como las producidas por la bacteria *Xylella fastidiosa* en Sao Paulo (Brasil). Finalmente, hay enfermedades que han sido localmente importantes y que en tiempos recientes se han propagado por otras zonas cítricas, como es el caso del Huanglongbing, causado por la bacteria *Candidatus Liberibacter spp.*, que afecta a todas las variedades. Esta bacteria ha impedido el desarrollo de una industria cítrica en países del sudeste asiático y actualmente está matando a millones de árboles en Florida y Brasil. En el caso de las tres bacterias mencionadas, no existen medios eficaces de control. También hay enfermedades muy importantes durante el mantenimiento post-cosecha de los frutos, como las producidas por hongos del género *Penicillium*.

50

Referente a las plagas, las hay que afectan directamente al árbol y/o a la fruta producida, como la mosca del mediterráneo (*Ceratitis capitata*) o el piojo rojo de California (*Aonidiella aurantii*), y las que son transmisoras de enfermedades, como la psila *Diaphorina citri*, transmisoras de las bacterias *Candidatus Liberibacter spp.*, o el pulgón *Toxoptera citricidus*, muy eficaz transmisor de CTV. Aunque actualmente se utilizan fundamentalmente agresivos tratamientos agroquímicos para el control de las plagas de los cítricos, éstos no suponen una solución duradera, ni económica ni ecológicamente sostenible a medio plazo.

60

Ante estas serias amenazas de la citricultura en todo el mundo, resulta prioritaria la búsqueda de soluciones alternativas, como las basadas en la mejora genética. A pesar de los esfuerzos realizados en los programas de mejora genética tradicional a lo largo de más de un siglo, la citricultura actual está basada en un pequeño grupo de variedades de excelente calidad que se injertan sobre una gama no demasiado amplia de portainjertos. La gran mayoría de estos genotipos se han producido al azar, es decir se han conseguido a partir de la selección de mutaciones espontáneas detectadas en el campo por los agricultores o a partir del cultivo de semillas y germinación de plantas de interés de manera fortuita. Además, los programas de mejora se ven muy limitados por la compleja biología reproductiva de los cítricos. En este contexto, la modificación genética mediante transgenia ofrece enormes posibilidades para la mejora,

65

ya que permite introducir caracteres únicos en genotipos élite sin alterar su fondo genético. Aunque existe controversia social sobre el uso de esta tecnología para la mejora de las plantas, consideramos que el uso de transgenes de interés procedentes del propio cítrico que se desea modificar superaría las reticencias de ciertos sectores y más aún si la estrategia propuesta resultase superior en términos medioambientales a las que se emplean actualmente para el control de plagas y patógenos.

En la última década, se ha publicado una serie de trabajos fundamentales sobre el papel de los compuestos volátiles de las plantas como repelentes de plagas y como atrayentes de predadores de herbívoros (Aharoni y col., 2003; Arimura y col., 2000; De Moraes y col., 2001). Esto llevó a pensar que era posible modular la emisión de volátiles por las plantas mediante ingeniería metabólica con fines de mejora de la respuesta de defensa de las plantas frente a plagas. Así, la sobreexpresión del gen precursor de una linalol/nerolidol sintasa de fresa en plantas transgénicas de *Arabidopsis* condujo a la acumulación de altos niveles de linalol y consiguientemente a la inducción de repelencia frente a pulgones (Aharoni y col., 2003). La sobreexpresión de este mismo transgén en *Arabidopsis*, pero esta vez dirigido a la mitocondria, condujo a la acumulación de nerolidol y un homoterpeno derivado, (E)-DMNT, que hizo a las plantas atrayentes de insectos predadores carnívoros, enemigos naturales de ácaros plaga (Kappers y col., 2005). En este mismo sentido, la sobreexpresión del gen precursor de una sesquiterpeno sintasa, TPS10, en plantas transgénicas de *Arabidopsis* las hizo atrayentes de abejas parásitas de insectos plaga, debido a la emisión a altos niveles de sesquiterpenos que se liberan normalmente cuando las larvas de esas abejas mastican las hojas (Schnee y col., 2006). Más recientemente, la sobreexpresión del gen precursor de una trans-cariofileno sintasa de orégano en maíz transgénico hizo a las raíces de las plantas atrayentes de nematodos que las protegen del ataque de coleópteros plaga (Degenhardt y col., 2009). La sobreexpresión en tabaco transgénico del gen de una pachulol sintasa junto a la del gen de una farnesil difosfato sintasa, precursora de sesquiterpenos, condujo a una elevada acumulación de pachulol y otros 13 sesquiterpenos, que hicieron a las plantas muy resistentes a larvas de insectos plaga (Wu y col., 2006).

El papel de distintos compuestos terpenoides para conferir resistencia frente a microorganismos patógenos está también documentado, sobre todo en forestales, pero no se ha usado la sobreexpresión de genes precursores de dichos compuestos como estrategia biotecnológica de protección hasta la fecha (Trapp y Croteau, 2001).

En definitiva, todos estos trabajos indican que la ingeniería metabólica para conseguir resistencia frente a agentes bióticos representa una tecnología alternativa a la utilización de costosos productos fungicidas, bactericidas y plaguicidas, altamente tóxicos, y que su uso redundaría en un aumento de la calidad del producto.

Por otra parte, los compuestos volátiles son importantes determinantes de la percepción del aroma y el gusto de la fruta por el hombre (Goff y Klee, 2006). La mejora genética tradicional de las plantas se ha preocupado de maximizar atributos como la productividad o el vigor, en detrimento de otros como el aroma, y esto ha llevado a que las nuevas variedades de muchas frutas hayan ido perdiendo progresivamente su aroma y sabor. Además, se ha propuesto que algunos de los compuestos determinantes de estas características en las frutas son beneficiosos para la salud (Bisignano y Saija, 2002). Hoy en día, el aroma es considerado un atributo de calidad que debería reincorporarse a las nuevas variedades de frutas. De nuevo, la ingeniería metabólica se muestra como una tecnología adecuada para ello. Además, ésta podría permitir la producción de nuevas combinaciones de aromas por las plantas, con interés industrial tanto para alimentación, perfumería, cosmética, limpieza, etc.

Descripción de la invención

Esta invención se relaciona con la utilización de secuencias de ADN que codifican una enzima con actividad d-limoneno sintasa en antisentido o RNAi para la transformación genética de plantas del género *Citrus* spp. y géneros y especies afines de la familia Rutáceas, con el fin de reducir la acumulación de compuestos monoterpenos en estas plantas para conseguir resistencia sistémica o repelencia frente a plagas, particularmente *Ceratitidis capitata* Wied., *Tetranychus urticae* Koch., *Panonychus citri* (McGregor), *Dialeurodes citri* Ash, *Parabemisia myricae* (Kuw.), *Trioza erythrae* (Del Guercio), *Coccus hesperidum* L., *Insulapsis gloverii* (Pack), *Chrysomphalus dyctiospermi*, *Ceroplastes sinensis*, *Paraleyrodes minei* Laccarino, *Aspidiotus nerii* Bouché, *Parlatarioa pergandei* Const., *Cornuaspis beckii* New., *Diaphorina citri* Kuwayama, *Aonidiella aurantii* (Mask.), *Planococcus citri* (Risso), *Pseudococcus adoidum* L., *P. maritimus* (Ehrhom), *Prays citri* Mill., *Aphys gossypii* Glover, *Mizus persicae* Sulzer, *Aphys spiraeoia* (Patch.), *Toxoptera aurantii* (B. de F.), *Aleurothrixus floccosus* Mask, *Icerya purchasi* Mask, *Saissetia oleae* Oliver, cicadélidos vectores de CVC (Familia Cicadellidae: Subfamilia Cicadellinae), *Anastrepha* spp., *Gymnandrosoma aurantiana* Lima, *Phyllocnistis citrella* Stainton, *Orthezia praelonga* Douglas, *Unaspis citri* (Comstock), *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes), o *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead), resistencia frente a patógenos, particularmente bacterias como *Xanthomonas campestris* (Pammel), *Pseudomonas syringae* Van Hall, *Xanthomonas citri* subesp. *citri* (ex Hasse), *Xylella fastidiosa* Wells, *Candidatus Liberibacter* spp., hongos y omicetos como *Alternaria citri* Ell. & Pierce, *Alternaria altarnata* (Fries) Keissler, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sacc., *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn, *Aspergillus niger* P.E.L. van Tieghem, *Guignardia citricarpa* Kiely, *Penicillium italicum* Wehmer, *Botrytis cinerea* Pers.:Fr., *Sphaeropsis tumefaciens* Hedges, *Phytophthora* spp., *Pythium* sp., *Fusarium oxysporum* f.sp. *citri* Timmer, *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc., *Phoma tracheiphila* (Petri) L.A. Kantsch. & Gikaschvili, *Alternaria limicola* E.G. Simmons & M.E. Palm, *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm., *Phanerochaete salmonicolor* (Berk. & Broome) Jülich, *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds, *Oidium tingitaninum* J.C. Carter, *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill., *Pythium ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Geotrichum candidum* Link., *Rosellinia* sp., *Elsinoë fawcettii* Bitan. and Jenk., *Elsinoë australis* Bitan. and Jenk., *Pseudocercospora angolensis* (T. Carvalho & O. Mendes) Crous & U. Braun, *Diaporthe citri* Wolf, *Mycosphaerella citri* Whiteside, *Septoria* spp., o nematodos como *Pratylenchus* spp.,

ES 2 363 325 A1

Xiphinema spp., *Meloidogyne* spp., o *Tylenchulus semipenetrans*, así como obtener nuevos compuestos aromáticos de los tejidos de estas plantas y mejorar las características organolépticas de frutos, flores y hojas.

Descripción de los dibujos

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características del invento, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica del mismo, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

La Figura 1.- Muestra una secuencia nucleotídica del gen precursor de una enzima con actividad d-limoneno sintasa, base de los módulos de expresión que se utilizan para transformar genéticamente plantas de *Citrus* spp. en la presente invención.

La Figura 2.- Muestra una secuencia polipeptídica de la d-limoneno sintasa producto de la traducción de la secuencia nucleotídica representada en la Figura 1.

La Figura 3.- Muestra la construcción antisentido, generada a partir de la secuencia nucleotídica de la Figura 1, en el vector de transformación pBIN 19.

La Figura 4.- Muestra la construcción RNAi, generada a partir de la secuencia nucleotídica de la Figura 1, en el vector de transformación pBIN 19.

La Tabla IA.- Muestra secuencias de cebadores empleados para clonar un gen precursor de d-limoneno sintasa de naranjo dulce.

La Tabla IB.- Recoge las condiciones de PCR, utilizadas para clonar un gen precursor de d-limoneno sintasa de naranjo dulce.

Realización preferente de la invención

En la presente invención se describe un método para lograr resistencia frente a plagas y patógenos de árboles cítricos y afines mediante la generación de plantas transgénicas en las que se activa la respuesta de defensa de las plantas mediante la reducción en los niveles de acumulación de determinados compuestos volátiles monoterpenos y sesquiterpenos y un aumento de monoterpenos acíclicos alcohólicos. Esto se obtiene por medio de la supresión parcial de la acumulación de una o varias d-limoneno sintasa/s de *Citrus* spp. gracias a la expresión recombinante en antisentido o RNAi de un gen precursor en plantas de *Citrus* spp. y afines.

Los terpenos constituyen el mayor grupo de productos naturales derivados de las plantas, con más de 30.000 compuestos conocidos. Son hidrocarburos insaturados basados en un esqueleto de isopreno (C₅H₈). En plantas, la producción de grandes cantidades de terpenos, así como su subsiguiente acumulación, emisión, o secreción, está asociada a la presencia de estructuras anatómicas altamente especializadas, como por ejemplo las glándulas de aceite del flavedo de los frutos cítricos.

Todos los terpenos son derivados de un precursor de cinco carbonos, el isopentenil difosfato (IPP). El IPP se forma a partir de la acetil-CoA siguiendo la ruta clásica del acetato/mevalonato en el citosol y retículo endoplasmático, mientras que en los plastidios se forma a partir del gliceraldehído fosfato y piruvato siguiendo la ruta del metileritritol-4-fosfato (MEP).

La isomerización del IPP por la IPP isomerasa produce el isómero alílico dimetilalil difosfato (DMAPP), que es considerado como el primer prenil difosfato. El DMAPP experimenta una condensación con el IPP para dar el intermediario de diez carbonos, el geranyl difosfato (GPP o GDP) (C₁₀). La repetición de esta reacción con la adición de una o dos moléculas de IPP proporciona el farnesil difosfato (FPP o FDP) (C₁₅) o el geranylgeranyl difosfato (GGPP o GGDP) (C₂₀), respectivamente. Las reacciones de elongación electrofílica que producen C₁₀, C₁₅ y C₂₀ prenil difosfatos son catalizadas por enzimas preniltransferasas. Estas enzimas pueden usar el IPP o el DMAPP indistintamente.

Las reacciones que estos compuestos experimentan (normalmente ciclaciones), catalizadas por terpeno sintasas, producen una gran variedad de compuestos terpénicos. La familia de enzimas responsable de la formación de los terpenoides a partir del GPP, FPP y GGPP son conocidas como monoterpeno, sesquiterpeno y diterpeno sintasas, respectivamente. Muchos terpenoides son cíclicos, y muchos contienen múltiples sistemas de anillos, aunque existen también terpenoides acíclicos. Las terpeno sintasas que producen productos cíclicos son conocidas también como ciclasas. Estas enzimas poseen propiedades similares y contienen elementos de secuencia conservados.

Los monoterpenos, formados por dos unidades de isopreno (C₁₀), son componentes volátiles de esencias de flores y aceites esenciales de hierbas y especias, de las cuales pueden suponer hasta el 5 % del peso seco de la planta. Son aislados por destilación o extracción y tienen un considerable uso industrial en perfumes y saborizantes. Las glándulas de aceites esenciales de los frutos cítricos son ricas en monoterpenos. De ellos, el d-limoneno supone aproximadamente entre el 90 y el 98% del total de los aceites presentes en la piel de naranja dulce, naranja amarga y pomelos. En las

ES 2 363 325 A1

flores de los cítricos, el d-limoneno también es uno de los componentes principales pero no alcanza la concentración de más del 90% observado en la piel de los frutos. También se cita como un componente importante en hojas de cítricos. El d-limoneno es un monoterpene monocíclico (1-metil-4-(1-metiletienil)ciclohexeno), cuya composición química es C₁₀H₁₆. Su peso molecular es 136.24. Se forma a partir de la unión de dos moléculas de isopreno. Es un compuesto líquido con olor similar al aroma del limón, insoluble en agua y miscible en alcohol. Se encuentra comúnmente en la forma de su d-isómero.

En los últimos años se han clonado dos d-limoneno sintasas de limón (*CILIMS1* y *CILIMS2*) (Lücker y col., 2002) y otras dos de mandarina satsuma (*CitMTSE1* y *CitMTSE2*) (Shimada y col., 2004; 2005). Lücker y col. (2004) han sobreexpresado *CILIMS1* junto a una γ -terpineno sintasa y una β -pineno sintasa también de limón en tabaco mediante transformación genética y han logrado incrementar ligeramente el contenido de d-limoneno y otros monoterpenos en las flores de estas plantas. Endo y col. (2009) han sobreexpresado *CitMTSE1* en antisentido en *Poncirus trifoliata*, un afín a *Citrus* spp. Para superar el largo periodo juvenil de esta planta, sobre-expresaron también un módulo de floración rápida que les permitió obtener fruta al cabo de sólo dos años pero las plantas eran en general aberrantes. En cualquier caso, la utilización de *CitMTSE1* en antisentido les permitió reducir ligeramente los niveles de d-limoneno en la piel de la fruta de *Poncirus trifoliata*. No se alteró el nivel de ningún otro terpeno en esas frutas. Ninguno de estos trabajos pioneros, ni de otros realizados con otros genes precursores de d-limoneno incorporados mediante transformación genética a otras plantas, menciona ningún otro tipo de efecto biológico derivado de la utilización transgénica de genes precursores de d-limoneno sintasas.

Un aspecto de la presente invención se refiere al aislamiento de ácidos nucleicos que codifican enzimas con actividad d-limoneno sintasa, que proceden de *Citrus* spp. o de afines de la familia Rutáceas, o de cualquier otro organismo vivo. Se entiende que una d-limoneno sintasa es una enzima que cataliza la síntesis de d-limoneno. Esto se puede determinar mediante un ensayo enzimático bien conocido por aquéllos familiarizados con el arte.

En una parte de la presente invención, el ácido nucleico elegido comprende una secuencia nucleotídica sustancialmente homóloga a la que se presenta en la Figura 1, el cual codifica un polipéptido sustancialmente homólogo y funcionalmente equivalente al que se presenta en la Figura 2, con actividad d-limoneno sintasa.

Preferiblemente el ácido nucleico de la presente invención procede de *Citrus* spp. En otra aplicación de la invención, se utiliza un ácido nucleico procedente de cualquier organismo vivo que sea codificante de una enzima funcionalmente equivalente, es decir con actividad d-limoneno sintasa.

En esta invención el término ácido nucleico se refiere a ácido desoxirribonucleico (ADN - DNA en inglés), bien en forma de cadena simple o doble, aislado de una molécula de ADN mayor o sintetizado a partir de ella por PCR, en cantidad y concentración suficiente para permitir su identificación y su manipulación utilizando procedimientos estándar en bioquímica. De este modo el término ADN incluye por ejemplo ADN copia, ADN genómico, ADN sintetizado químicamente, ADN amplificado por PCR, y combinaciones de los anteriores. En general, los ácidos nucleicos de la invención incluyen secuencias que hibridan con la secuencia nucleotídica de la invención a temperaturas de 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C o 30°C por debajo de la temperatura de unión de ADN dúplex de las secuencias de la invención, incluyendo los rangos intermedios entre esas temperaturas.

De otro modo, los ácidos nucleicos de la invención comprenden secuencias sustancialmente homólogas a la de la Figura 1. En otra aplicación, los ácidos nucleicos son al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% idénticos a la secuencia de la Figura 1, codificando cada una de las secuencias proteínas con actividad d-limoneno sintasa.

En otra aplicación, los ácidos nucleicos comprenden un tramo de al menos 50, al menos 100, al menos 250, al menos 500, o al menos 750 nucleótidos contiguos de la secuencia de la Figura 1. Dichos fragmentos contiguos de nucleótidos podrían tener al menos una mutación, de tal modo que aún con ello retuviesen su funcionalidad original y su capacidad para hibridar con los nucleótidos originales en condiciones tanto de baja como de alta astringencia. Dicho fragmento podría derivar por ejemplo de los nucleótidos 200 a 1800, de 800 a 1800, de 1000 a 1800, de 200 a 1000, de 200 a 800, de 400 a 1600, o de 400 a 1000 de la secuencia de la Figura 1.

Los ácidos nucleicos de la invención codifican un polipéptido sustancialmente homólogo y funcionalmente equivalente al de la Figura 2. En otra aplicación de la presente invención, los polipéptidos son al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% idénticos a la secuencia de la Figura 2, y tienen actividad d-limoneno sintasa.

Debido a la característica del código genético según la cual más de un codón puede codificar un mismo aminoácido, múltiples secuencias nucleotídicas codificarían un mismo polipéptido. Estas variantes de secuencia se podrían generar natural o artificialmente en la presente invención. Todas ellas codificarían un polipéptido sustancialmente homólogo al representado en la Figura 2. En otra aplicación de la invención se contempla la posibilidad de usar ácidos nucleicos que codificasen variantes del polipéptido de la Figura 2. Se entiende por variante tanto de los ácidos nucleicos como de los polipéptidos una o más deleciones, una o más sustituciones o una o más inserciones nucleotídica y aminoacídica, respectivamente. En cualquier caso, el producto traducido conservaría su actividad d-limoneno sintasa.

ES 2 363 325 A1

En una aplicación de la invención, el ADN copia se transcribe en ARN antisentido. ARN antisentido es aquel ARN cuya secuencia es el complemento reverso del ARN mensajero (ARN sentido) codificado por un gen. Un vector que lleve a la expresión de un ARN en antisentido es aquél en el cual el ARN copia está dispuesto en “orientación reversa” con respecto al promotor tal que la cadena no codificante es transcrita. La expresión de ARN en antisentido se utiliza para reducir la acumulación de la proteína codificada por el ARN mensajero del cual el ARN antisentido es complementario. Los vectores que producen el ARN antisentido son utilizados para producir plantas transgénicas en la presente invención.

En otra aplicación de la invención, con la intención de reducir aún más los niveles de acumulación de d-limoneno sintasa, el ADN copia se expresa en forma de ARN antisentido seguido de ARN sentido, separados ambos por una secuencia intermedia, preferiblemente un intrón, para generar interferencia de ARN (RNAi). Ésta se da al expresarse el ARN transcrito en forma reversa y directa en una misma molécula, de modo que ambas formas complementarias se aparean y dan lugar a una molécula de ARN bicatenario perfectamente complementario. Éste es reconocido por el complejo DICER de la célula que digiere la molécula en pequeños fragmentos de ARN de entre 20 y 26 nucleótidos, que a su vez son reconocidos y dirigidos por el complejo RISC para reconocer la secuencia del ARN mensajero perfectamente complementario a estos ARN pequeños. De este modo, se generan zonas de ARN bicatenario en el ARN mensajero que bien son utilizados como cebadores para generar nuevas moléculas de ARN aberrante (reconocibles por DICER) o bien son degradadas directamente por endonucleasas (SLICER) del complejo RISC. Los vectores inductores de RNAi también son utilizados para transformar plantas genéticamente en la presente invención.

Con las estrategias de ARN antisentido y RNAi se consigue el silenciamiento de la expresión de los transgenes y de moléculas de ARN mensajero complementarias a las moléculas inductoras, de manera que se reduce o se bloquea la expresión de las d-limoneno sintasas endógenas y con ello se produce una reducción más o menos importante en los niveles de acumulación y emisión de d-limoneno en las células.

En una aplicación de esta invención el ADN copia del ARN antisentido que se utiliza tiene al menos 50 nucleótidos, al menos 100, al menos 200, al menos 500, al menos 750, al menos 1000, al menos 1500 o la secuencia nucleotídica entera inversa complementaria al gen precursor de d-limoneno sintasa.

En otra aplicación, los fragmentos de ADN copia precursores de ARN antisentido y ARN sentido de la construcción generadora de RNAi son de al menos 50 nucleótidos, al menos 100, al menos 200, al menos 500, al menos 750, al menos 1000, al menos 1500 o de la secuencia nucleotídica entera (ya sea en sentido o en antisentido) del gen precursor de d-limoneno sintasa.

En la presente invención, los ADN copia precursores de las construcciones para las diferentes aplicaciones se subclonan en plásmidos vectores de transformación genética de plantas, como los que se representan en las Figuras 3 y 4, referidos a construcciones antisentido y RNAi, respectivamente, mostradas a modo de ejemplo.

En la invención, las construcciones genéticas se encuentran clonadas en el vector de transformación preferiblemente bajo el control de secuencias reguladoras constitutivas y que confieren expresión alta, como el promotor 35S del *virus del mosaico de la coliflor* (CaMV) y el terminador del gen de la nopalina sintasa (NOS) o del 35S, o similares. En otra aplicación, las construcciones están clonadas bajo el control de las propias secuencias promotora y terminadora del gen de d-limoneno sintasa cuya expresión se pretende reprimir. En otra aplicación, se utilizan secuencias reguladoras que confieren expresión inducible o específica bien en fruto, bien en tejido verde, o bien en tejidos florales, conocidas por aquéllos familiarizados con el arte.

Estos vectores de transformación con sus correspondientes módulos de expresión de interés se utilizan en la presente invención para transformar plantas genéticamente. Existen numerosos procedimientos para transformar genéticamente células vegetales y regenerar plantas enteras a partir de ellas. Éstas incluyen (pero no se limitan a ellas) la transformación: mediada por bacterias del género *Agrobacterium*, balística, por microinyección, por electroporación, mediada por virus vegetales, mediada por fibras de carburo de silicio, por infiltración de tejidos florales, mediada por liposomas, mediada por polietilenglicol y mediada por otras bacterias, entre otras.

En la aplicación preferible de la presente invención se emplea *Agrobacterium tumefaciens* como vector de transformación, sin descartar ninguna de las otras posibles vías de modificación genética. La transformación genética de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el método más común de transformación de cítricos y afines.

A. tumefaciens utiliza normalmente la transformación como sistema para insertar fragmentos concretos de su ADN en el genoma de las células vegetales. En dicho ADN residen genes implicados en la biosíntesis de fitohormonas, de modo que su expresión en las células conlleva la formación de tumores en las zonas infectadas. Los genes que se transfieren residen en el llamado ADN-T, que a su vez forma parte de un megaplásmido llamado Ti (de tumor-inducing, inductor del tumor). Mediante ingeniería genética es posible sustituir en *A. tumefaciens* el ADN-T oncogénico del plásmido Ti por otro en que residen los genes de interés que se pretende integrar en las células vegetales. De este modo, se utiliza a la bacteria desarmada como vector para incorporar genes foráneos en las células vegetales. A partir de las células transformadas se puede regenerar plantas enteras utilizando sistemas de regeneración *in vitro* estándar, bien conocidos por aquéllos familiarizados con el arte.

ES 2 363 325 A1

En la invención, se utilizan protoplastos, células en suspensión o explantes procedentes de hojas, entrenudos, nudos, cotiledones, semillas, epicotilos, flores, raíces, segmentos de fruto, o cualquier otro órgano o tejido de la planta para la transformación.

5 En la invención, las construcciones genéticas de interés se utilizan para transformar genéticamente plantas de naranjo dulce, de mandarino, de clementino, de satsuma, de naranjo amargo, de limón, de lima, de pummelo, de cidro, de alemow, de pomelo o de cualquier otra especie del género *Citrus*, de *Poncirus trifoliata*, de *Fortunella* spp., o de cualquier otra Rutáceo, de citrange, de citrumelo, de tangelo, de tangor, o de cualquier otro híbrido entre cítricos o cítricos y Rutáceas.

10 En la invención, se utiliza preferiblemente material adulto para transformar siguiendo los procedimientos de la patente española número 9700491/X (patente norteamericana número 6.103.955) y de Peña y col. (2008).

15 De este modo, se generan plantas transgénicas, preferentemente adultas, que se caracterizan mediante análisis moleculares convencionales como PCR, Southern blot, Northern blot y similares. En la invención, se lleva a cabo el análisis por cromatografía de gases - espectrometría de masas de diferentes tejidos de las plantas transgénicas obtenidas como hojas, pétalos, flavedo, vesículas de los frutos y tejidos similares, o mediante otra técnica similar, que permite determinar que se ha modificado el contenido y emisión de terpenos volátiles por los tejidos de las plantas transgénicas.

20 En la invención, la utilización de las estrategias antisentido y RNAi conduce a una reducción en la acumulación de transcrito del gen de la d-limoneno sintasa introducido y de transcritos de genes suficientemente homólogos de la especie transformada. Ello conduce a una reducción drástica en la acumulación de las enzimas con actividad d-limoneno sintasa. Con ello, se produce en la presente invención un descenso en la síntesis, acumulación y emisión de d-limoneno y de otros monoterpenos cíclicos tales como sabineno, delta-3-careno, beta-mirceno, ocimeno, alfa-terpinoleno, óxidos de limoneno, entre otros y de sesquiterpenos tales como alfa-copaeno, beta-cubeno, germacreno-D, beta-elemeno, cariofileno, beta-farneseno, alfa-farneseno, o beta-sinensal entre otros.

30 En la invención, el descenso en la acumulación de d-limoneno conlleva un incremento en la acumulación y emisión de monoterpenos acíclicos alcohólicos como beta-citronelol, nerol, geraniol, aldehídos como citronelal y ésteres como geranil acetato entre otros.

En la invención, la alteración en la acumulación y emisión de compuestos terpenos hace a las plantas transgénicas repelentes o resistentes frente a insectos plaga como *Ceratitidis capitata* Wied., *Tetranychus urticae* Koch., *Panonychus citri* (McGregor), *Dialeurodes citri* Ash, *Parabemisia myricae* (Kuw.), *Trioza erytrae* (Del Guercio), *Coccus hesperidum* L., *Insulapsis gloverii* (Pack), *Chrysomphaius dyctiospermi*, *Ceroplastes sinensis*, *Paraleyrodes minei* Laccarino, *Aspidiotus nerii* Bouché, *Parlatarioa pergandei* Const., *Cornuaspis beckii* New., *Diaphorina citri* Kuwayama, *Aonidiella aurantii* (Mask.), *Planococcus citri* (Risso), *Pseudococcus adoidum* L., *P. maritimus* (Ehrhom), *Prays citri* Mill., *Aphys gossypii* Glover, *Mizus persicae* Sulzer, *Aphys spiraecola* (Patch.), *Toxoptera aurantii* (B. de F.), *Aleurothrixus floccosus* Mask, *Icerya purchasi* Mask, *Saissetia oleae* Oliver, cicadélidos vectores de CVC (Familia Cicadellidae: Subfamilia Cicadellinae), *Anastrepha* spp., *Gymnandrosoma aurantiana* Lima, *Phyllocnistis citrella* Stainton, *Orthezia praelonga* Douglas, *Unaspis citri* (Comstock), *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes), o *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead), resistencia frente a patógenos, particularmente bacterias como *Xanthomonas campestris* (Pammel), *Pseudomonas syringae* Van Hall, *Xanthomonas citri* subesp. *citri* (ex Hasse), *Xylella fastidiosa* Wells, *Candidatus Liberibacter* spp., hongos y omicetos como *Alternaria citri* Ell. & Pierce, *Alternaria alternata* (Fries) Keissler, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sacc., *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn, *Aspergillus niger* P.E.L. van Tieghem, *Guignardia citricarpa* Kiely, *Penicillium italicum* Wehmer, *Botrytis cinerea* Pers.:Fr., *Sphaeropsis tumefaciens* Hedges, *Phytophthora* spp., *Pythium* sp., *Fusarium oxysporum* f.sp. *citri* Timmer, *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc., *Phoma tracheiphila* (Petri) L.A. Kantsch. & Gikaschvili, *Alternaria limicola* E.G. Simmons & M.E. Palm, *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm., *Phanerochaete salmonicolor* (Berk. & Broome) Jülich, *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds, *Oidium tingitaninum* J.C. Carter, *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill., *Pythium ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Geotrichum candidum* Link., *Rosellinia* sp., *Elsinoë fawcettii* Bitan. and Jenk., *Elsinoë australis* Bitan. and Jenk., *Pseudocercospora angolensis* (T. Carvalho & O. Mendes) Crous & U. Braun, *Diaporthe citri* Wolf, *Mycosphaerella citri* Whiteside, *Septoria* spp., o nematodos como *Pratylenchus* spp., *Xiphinema* spp., *Meloidogyne* spp., o *Tylenchulus semipenetrans*. En otra aplicación de la presente invención, el descenso en la acumulación de d-limoneno conlleva el aumento en la producción de determinados monoterpenos acíclicos alcohólicos y genera nuevas mezclas de aceites esenciales que resultan de interés industrial, farmacéutico y/o médico.

Ejemplos de la invención

60 Los datos numéricos, porcentajes, ingredientes concretos y organismos que se detallan a continuación deben considerarse sólo a modo de ejemplos, sin limitar en forma alguna el alcance y las reivindicaciones de la patente. Todos los términos científicos mencionados tienen el mismo significado con que son usados en la bibliografía y que resultan familiares para aquéllos familiarizados con el arte.

65 Materiales

El material cítrico utilizado en los ejemplos que se detallan a continuación se obtuvo del Banco de Germoplama de Cítricos del IVIA (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Moneada, Valencia, España).

ES 2 363 325 A1

Ejemplo 1

Construcción de los módulos de expresión

5 A partir de 2 gramos de flavedo de fruta de naranjo dulce, se extrajo ARN total mediante el procedimiento descrito por Rodrigo y col. (2004) y que se detalla a continuación:

10 Añadir los 2 gramos de tejido en un tubo de centrífuga, 10 mL de tampón de extracción (200 mM Tris-HCl pH8, 400 mM NaCl, 50 mM EDTA pH8, 2% Sarkosyl, 1% PVP-40), 100 μ L de β -Mercaptoetanol y 5 mL de Fenol (equilibrado con Tris). Agitar e incubar durante 15 minutos a 65°C. Atemperar y añadir 5 mL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Centrifugar a 4500 rpm durante 20 minutos y 4°C. Recuperar la fase acuosa a un nuevo tubo. Añadir de nuevo 5 mL de Fenol y 5 mL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Centrifugar a 4500 rpm durante 20 minutos y 4°C. Recuperar de nuevo la fase acuosa y pasar a un nuevo tubo de centrífuga. Añadir 1,5 volúmenes de etanol 100%,
15 de etanol al 70% (frío). Centrifugar a 15000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 7,5 mL de TESa (10 mM de Tris-HCl pH8, 5 mM EDTA, 0,1% Sarkosyl). Incubar 15 minutos en baño a 65°C para completar la resuspensión. Añadir 7,5 mL de agua milli-Q estéril. Centrifugar a 8000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de centrífuga. Añadir 0,33 volúmenes de cloruro de Litio 12M e incubar a 4°C durante una noche. Centrifugar a 15000 rpm durante 30 minutos y 4°C. Eliminar el sobrenadante y lavar el sedimento con 1,5 mL de etanol al 70%. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos. Resuspender el sedimento con 1 mL de acetato sódico 3M pH 6. Centrifugar a 15000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. Lavar el sedimento con 0,5 mL de etanol al 70%. Centrifugar a 15000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Secar el sedimento y resuspender en 100 μ L de agua milli-Q estéril.

25 Posteriormente, el ARN se purificó mediante un kit de purificación de ARN y se realizó un tratamiento con ADNasa en columna para evitar contaminación por ADN en las muestras.

A partir del ARN tratado con ADNasa, se realizó la transcripción reversa del ARN para obtener el ADN copia. Para la clonación de la d-limoneno sintasa procedente de naranjo dulce, se diseñaron cebadores específicos (LAS-F Y LS1R) a los que se añadió un sitio de restricción *Bam*HI para su posterior clonaje en un plásmido binario. Los
30 cebadores empleados están descritos en la Tabla IA. Se empleó como cebador reverso el LS1-R. Para la amplificación de la d-limoneno sintasa, se empleó la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en la que se utilizaron los cebadores LAS-F y LS1-R y las condiciones expuestas en la Tabla IB. Este fragmento se clonó en el plásmido binario pBIN 19 mediante digestión con la enzima *Bam*HI, entre las secuencias del terminador del gen de la nopalina sintasa (NOS) y del promotor 35S del *virus del mosaico de la coliflor*, introducidas previamente al plásmido. La orientación de los fragmentos se evaluó mediante secuenciación.

Para sintetizar la construcción generadora de RNAi, se clonaron secuencialmente un intrón, el ADN copia en antisentido y el ADN copia en sentido en un plásmido intermedio pGEM-T.
40

Ejemplo 2

45 *Transformación genética de cítricos con las construcciones de interés precursoras de d-limoneno sintasa en antisentido y RNAi y regeneración de plantas transgénicas enteras*

Las construcciones genéticas de interés se clonaron en el vector de transformación pBIN 19 bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y del terminador del gen de la nopalina sintasa (NOS). Además del módulo de expresión de interés, el plásmido de transformación contenía el módulo del gen de la neomicina fosfotransferasa II (*nptII*), que confiere resistencia a kanamicina a las células transformadas, bajo el control del promotor y terminador del gen NOS. Los plásmidos de interés pBIN19/AS y pBIN19/RNAi se introdujeron en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 (derivada desarmada de la cepa A281).
50

55 Como material de partida se utilizaron yemas adultas de naranjo dulce injertadas sobre portainjertos vigorosos en invernadero. Una vez brotadas, se cortaron las varetas de unos 30-40 cm, se les quitaron las hojas y las espinas y se lavaron con jabón y posteriormente con lejía al 2%. En condiciones estériles, se cortaron segmentos de entrenudo de aproximadamente 1 cm que se utilizaron como explantes para la transformación. Se sumergieron aproximadamente 40 explantes por cada placa de 30 mL en el cultivo de *A. tumefaciens* durante 15 minutos con agitación en medio de inoculación (4,3 gL⁻¹ de sales Murashige y Skoog (1962), 10 mL⁻¹ de solución vitamínica (100 mg L⁻¹ de mioinositol, 0,2 mgL⁻¹ de tiamina-HCl, 1 mgL⁻¹ de piridoxina-HCl, 1 mgL⁻¹ de ácido nicotínico), 30 gL⁻¹ de sacarosa, pH 5.7.). Una vez transcurrido ese tiempo, se secaron sobre papel de filtro estéril. Se inocularon algunos explantes en medio de inoculación sin bacteria, para controlar que la regeneración de brotes se produce normalmente. Pasado el tiempo de inoculación, se colocaron unos 40 explantes por placa en medio de cocultivo (Medio de inoculación más 2 mgL⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 2 mgL⁻¹ de ácido indolacético (IAA), 1 mgL⁻¹ de 2-isopenteniladenina (2,i-P), 8 gL⁻¹ de agar, pH 5.7) y se incubaron en semi-oscuridad durante 3 días a 26°C (10 μ Em⁻²s⁻¹, 16 h de fotoperiodo). Después del cocultivo, se transfirieron los explantes a medio de selección (Medio de inoculación más 1-3 mgL⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), 10 gL⁻¹ de agar, pH 5.7, 250 mgL⁻¹ de cefotaxima y 250 mgL⁻¹ de vancomicina) (10 explantes/placa), con sulfato de kanamicina a 100 mgL⁻¹. Se mantuvieron los explantes en oscuridad
65

durante un periodo de aproximadamente 4 semanas a 26°C, hasta observar la formación de callo en las zonas de corte de los explantes. Se transfirieron posteriormente a cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 h, 45 μErrfV1 de iluminación y 26°C. Los brotes comenzaron normalmente a formarse transcurridas 7-9 semanas del cocultivo. Se realizó un chequeo de los mismos mediante análisis PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) con cebadores específicos de los transgenes (P35S-F, LAS-F para el chequeo de la construcción en antisentido y RNAi, Tabla IA y IB) lo que permitió diferenciar los brotes positivos de los negativos.

Los brotes positivos se injertaron *in vitro* sobre portainjertos de citrange Troyer o Carrizo, procedentes de semillas germinadas *in vitro*. Estos injertos se pasaron a cámara de cultivo a 25°C, 16 h de fotoperiodo, 45 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ de iluminación. Los brotes desarrollaron 2 ó 3 hojas expandidas 3-4 semanas después de injertarlos. Una vez alcanzaron este desarrollo, se injertaron de nuevo sobre patrones vigorosos en el invernadero bajo malla de sombreado y cubiertos con una bolsa de plástico durante las tres primeras semanas, lo que permitió una rápida aclimatación y desarrollo de las plantas. Aproximadamente a las 4-5 semanas de ser injertada en invernadero, cada planta se trasladó a una zona sin malla, donde prosiguió su crecimiento.

Las plantas se caracterizaron posteriormente mediante análisis Southern blot y Northern blot para confirmar la integración estable y averiguar el patrón de integración de los transgenes en cada línea transgénica independiente y los niveles de acumulación de transcrito, respectivamente.

Ejemplo 3

Se llevó a cabo el análisis por cromatografía de gases - espectrometría de masas de diferentes tejidos de las plantas transgénicas obtenidas (hojas, pétalos, flavedo y vesículas de los frutos). La utilización de las estrategias antisentido y RNAi condujo a la obtención de líneas transgénicas independientes en las que produjo una reducción en la acumulación de transcrito del gen de la d-limoneno sintasa introducido y de genes homólogos del naranjo. Ello llevó a una reducción drástica en la acumulación de las enzimas con actividad d-limoneno sintasa. Con ello, se produjo un descenso en la síntesis, acumulación y emisión de d-limoneno y de otros monoterpenos cíclicos tales como sabineno, delta-3-careno, beta-mirceno, ocimeno, alfa-terpinoleno, óxidos de limoneno, sabineno hidrato, linalil propionato, perilla aldehído, octanal, nonanal, decanal o undecanal, isopiperitenona, y de sesquiterpenos tales como alfa-copaeno, beta-cubeneno, germacreno-D, beta-elemeno, cariofileno, beta-farneseno, alfa-farneseno, muuroleno, elemol o beta-sinensal en frutos, por ejemplo.

El descenso en la acumulación de d-limoneno conllevó un incremento en la acumulación y emisión de monoterpenos acíclicos alcohólicos como beta-citronelol, nerol, geraniol, aldehídos como citronelal y ésteres como geranil acetato.

Ejemplo 4

Ensayos de infección con hongos post-cosecha, con objeto de demostrar la actividad antifúngica de las plantas transformadas genéticamente con las construcciones de la d-limoneno sintasa en antisentido y RNAi

En los experimentos de infección de frutos cítricos por *P. digitatum* y *P. minioluteum* se emplearon frutos de dos campañas diferentes. Se utilizaron naranjas de las variedades Navelina y Pineapple. Todos los frutos se recogieron antes de recibir ningún tratamiento post-cosecha y se procesaron el mismo día de su recolección. Se seleccionaron frutos que no presentaban daños o podridos y se desinfectaron sumergiéndolos en una solución de lejía (0,5% NaClO) durante 1 minuto. A continuación se enjuagaron con agua abundante y se secaron con papel para su inmediata utilización.

Los frutos se infectaron con el hongo *P. digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. (PD), agente causal de la podredumbre verde de los frutos cítricos durante la post-cosecha. Se empleó la cepa NAV-7 del laboratorio de tecnología de post-cosecha del IVIA. Además, se empleó otro hongo no patógeno de cítricos, *Penicillium minioluteum* (PM), obtenido en el mismo laboratorio para comprobar la ausencia de infección por parte de éste.

El hongo *P. digitatum* (10^4 esporasmL⁻¹) se inoculó en 3 puntos equidistantes de la zona ecuatorial del fruto utilizando el punzón clásico de inoculación de cítricos mojado en la suspensión de esporas. Una de las zonas de inoculación se marcó como zona 1 para facilitar las lecturas. El hongo *P. minioluteum* (10^4 esporasmL⁻¹) se inoculó en 8 puntos de la corteza utilizando la misma metodología. La fruta identificada e inoculada se mantuvo en cajas sin cierre hermético con alvéolos (1 bandeja por tratamiento) y se incubó en cámara termostata a 20°C. A los tres días y hasta aproximadamente 14 días tras la inoculación, se midió el diámetro de podredumbre y se calculó el área de progreso de la enfermedad (AUDPC). Sólo las heridas con síntomas se utilizaron para determinar la severidad de la enfermedad. Para los análisis también se utilizó el porcentaje de heridas infectadas y esporuladas a lo largo del tiempo.

Los datos de incidencia y severidad de las lesiones correspondieron al valor medio de al menos 15 frutos con 3 heridas por fruto. El análisis de los datos se realizó utilizando el paquete estadístico "Statgraphics Plus 5.1" (Manugistics, Inc.) aplicando el análisis de la varianza (ANOVA). Se realizó un estudio de la homogeneidad de la varianza y, si ésta era homogénea, se empleó el test LSD, considerándose significativas diferencias de $p < 0,05$.

ES 2 363 325 A1

Los resultados indicaban que existen diferencias significativas para la incidencia de la enfermedad entre los tratamientos de las líneas transformadas genéticamente con las construcciones de la d-limoneno sintasa en antisentido o RNAi y las líneas control. Se produce una reducción muy importante en la aparición de heridas con síntomas en las líneas antisentido y RNAi.

5

Ejemplo 5

10 *Ensayos de infección con bacterias fitopatógenas, con objeto de demostrar la actividad antibacteriana de las plantas transformadas genéticamente con las construcciones de la d-limoneno sintasa en antisentido y RNAi*

En los experimentos de infección de frutos cítricos por *Xanthomonas citri* subesp. *citri* se emplearon frutos en dos estadios de maduración diferentes. Se utilizaron naranjas de las variedades Navelina y Pineapple. Todos los frutos se recogieron antes de recibir ningún tratamiento post-cosecha y se procesaron el mismo día de su recolección. Se seleccionaron frutos intactos y se desinfectaron mediante un lavado en una solución de alcohol al 70% y se secaron con papel para su inmediata utilización.

15

En el primer ensayo se utilizó fruta verde de 5-6 cm de diámetro, mientras que para el segundo ensayo, se utilizó fruta en estadio de cambio de color de 7-8 cm de diámetro. Para la inoculación se utilizó el aislado brasileño de *X. citri* (cepa 306) a una concentración de 10^6 células mL⁻¹. Se realizaron entre 5 y 7 puntos de inoculación por fruto mediante presión por jeringuilla. Los frutos se cultivaron en una cámara de incubación con condiciones controladas, a una temperatura de 30°C y 55% de HR. Se evaluó el diámetro de halo y la formación o no de chancro en la herida.

20

Los resultados indicaban que existen diferencias significativas para la incidencia de la enfermedad entre los tratamientos de las líneas transformadas genéticamente y las líneas control. Se produjo una reducción importante de la aparición de síntomas en las líneas antisentido y RNAi.

25

Ejemplo 6

30

Ensayos de repelencia frente a insectos con objeto de demostrar la actividad que ejercen los volátiles de las plantas transformadas genéticamente con las construcciones de la d-limoneno sintasa en antisentido y RNAi sobre el comportamiento de los mismos. Se realizan los ensayos biológicos apropiados tomando la mosca de la fruta del Mediterráneo (*Ceratitis capitata* Wied.) como ejemplo. Experimentos con jaulones.

35

En los ensayos realizados sobre el comportamiento de la mosca de la fruta (*Ceratitis capitata* Wied.) se emplearon plantas de naranjo dulce fructificadas, con una fruta por planta en estadio de cambio de color. Se utilizaron naranjas de la variedad Navelina procedentes de plantas propagadas en invernadero, tanto plantas sin transformar como plantas transformadas con las construcciones de la d-limoneno sintasa en antisentido y RNAi. Además, se incluyó en cada ensayo una planta control a la que se le ató una manzana como control de puesta de *Ceratitis*. Las plantas se individualizaron en jaulones específicos en invernadero junto con 40 machos y 40 hembras de *C. capitata* de 5-6 días de edad criadas en laboratorio. Las moscas permanecieron 3 días en los jaulones junto con comida y agua para realizar la puesta. A los 3 días, se cortó la fruta y se llevó a cámara de incubación para el posterior desarrollo de las pupas. Se evaluó la afluencia de las moscas a la fruta, el número de picadas por fruto, el número total de pupas por fruto y el número de adultos emergidos (tanto machos como hembras).

40

45

Los ensayos realizados mostraron una preferencia de la mosca de la fruta hacia el aroma de los frutos de plantas sin transformar frente a los frutos de las plantas transformadas que reducen drásticamente los niveles del monoterpeno d-limoneno y otros terpenos e incrementan los niveles de monoterpenos acíclicos.

50

Ejemplo 7

Ensayos de repelencia frente a insectos, con objeto de demostrar la actividad que ejercen los volátiles de las plantas transformadas genéticamente con las construcciones de la d-limoneno sintasa en antisentido y RNAi sobre el comportamiento de los mismos. Se realizan los ensayos biológicos apropiados tomando la mosca de la fruta del Mediterráneo (*Ceratitis capitata* Wied.) como ejemplo. Experimentos con túnel de viento.

55

En los ensayos realizados sobre el comportamiento de la mosca de la fruta (*Ceratitis capitata* Wied.) se emplearon frutos cortados de naranjo dulce en estadio de cambio de color. Se utilizaron naranjas de la variedad Navelina procedentes de plantas propagadas en invernadero, tanto plantas sin transformar como plantas transformadas con las construcciones de la d-limoneno sintasa en antisentido y RNAi. Se realizaron varios ensayos en túnel de viento, en el que se colocó un fruto procedente de una planta transformada y otro fruto control. En cada ensayo se liberaron 50 machos de *C. capitata* de 5-6 días de edad criadas en laboratorio. Los machos de *C. capitata* permanecieron 30 minutos dentro del túnel de viento. Se evaluó su comportamiento mediante la afluencia de las moscas a cada una de las frutas.

60

65

ES 2 363 325 A1

Los ensayos realizados mostraron una preferencia de la mosca de la fruta hacia el aroma de los frutos de plantas sin transformar frente a los frutos de las plantas transformadas que reducen drásticamente los niveles del monoterpeno d-limoneno y otros terpenos e incrementan los niveles de monoterpenos acíclicos.

5

Ejemplo 8

Mejora de las características organolépticas

10 La modificación de las características organolépticas tanto de frutos, como hojas y flores de los cítricos, se confirmó mediante los análisis por cromatografía de gases - espectrometría de masas de las plantas de naranjo dulce transformadas con las construcciones de la d-limoneno sintasa en antisentido y RNAi.

15 La utilización de las construcciones de la d-limoneno sintasa en antisentido y RNAi llevó a una variación total del perfil de volátiles de los frutos de las plantas de naranjo dulce transformadas. Se redujeron los niveles de d-limoneno hasta 50 veces y también se redujeron los niveles de otros monoterpenos tales como sabineno, delta-3-careno, beta-mirceno, ocimeno, alfa-terpinoleno, óxidos de limoneno, sabineno hidrato, linalil propionato o isopiperitenona. Igualmente, se redujeron los niveles de monoterpenos del grupo de los aldehídos tales como perilla aldehído, octanal, nonanal, decanal o undecanal y de sesquiterpenos como alfa-copaeno, beta-cubeno, germacreno-D, beta-elemeno, 20 cariofileno, beta-farneseno, alfa-farneseno, muuroleno, elemol o beta-sinensal. Por otra parte, se produjo un aumento en el contenido de monoterpenos acíclicos alcohólicos, como beta-citronelol, nerol, geraniol, aldehídos como citroneal o ésteres como geranil acetato.

25 Estas características dieron lugar a plantas con un perfil de volátiles completamente alterado y que llevó a la obtención de un producto aromático novedoso para el mercado. El aumento de los alcoholes típicos de fragancias florales, dio lugar a la obtención de productos más atractivos para el consumidor, según revelaron las catas de aroma realizadas, y con posibles propiedades medicinales.

30 Ejemplo 9

Obtención de nuevos aromatizantes con posibilidades en industrias de perfumes, saborizantes, limpieza, farmacéuticas y médicas

35 La modificación de las características organolépticas tanto de frutos, como hojas y flores de los cítricos transformados con las construcciones en antisentido y RNAi llevó a la obtención de aceites esenciales con diferente composición a los comercializados actualmente procedentes de tejidos cítricos. La destilación de los aceites esenciales de estas plantas dio lugar a nuevos productos que pueden combinarse perfectamente con los componentes usuales de los perfumes y con otros productos. Las composiciones preparadas de este modo pueden emplearse bien directamente en la 40 perfumería o emplearse para el perfumado de preparados cosméticos tales como cremas, lociones, aguas de colonia, aerosoles, jabones, agentes para el cuidado de la boca así como para mejorar el olor de productos tales como suavizantes para la colada, agentes de lavado y de limpieza así como agentes desinfectantes. También pueden utilizarse en la industria alimentaria, como aromatizantes y conservantes de bebidas y comidas. El aumento en el contenido de determinados compuestos terpenos con posibles propiedades medicinales permite proponer el uso de sus aceites 45 esenciales en preparados farmacéuticos.

50 Las aplicaciones y los ejemplos mostrados y discutidos arriba tienen la intención de enseñar a aquellos familiarizados con el arte, la mejor manera conocida por los inventores para hacer uso de la invención. Eso no quita para que, partiendo de la invención, se puedan encontrar otras aplicaciones fácilmente deducibles por aquellos familiarizados con el arte. Por lo tanto, todas las modificaciones que pudieren hacerse de los procedimientos por cualquier familiarizado con el arte o como resultado de experimentaciones rutinarias se considera que se encuentran dentro del espíritu y del alcance de la patente según se define en sus reivindicaciones.

Bibliografía

55

Aharoni, A., Giri, A.P., Deurlein, S., Griepink, F., Kogel, W., Verstappen, F.W.A., Verhoeven, H.A., Jongsma, M.A., Schwab, W. & Bouwmeester, H.J. Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic Arabidopsis plants. *Plant Cell* 15, 2866-2884 (2003).

60

Arimura, G., Ozawa, R., Shimoda, T., Nishioka, T., Boland, W. and Takabayashi, J. Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature* 406, 512-515 (2000).

65

Bisignano, G. and Saija, A. The biological activity of citrus oils. Citrus. Medicinal and aromatic plants-Industrial profiles. (Dugo, G. and Di Giacomo, A. Eds.). Chapter 28, pp. 602-630. *Taylor & Francis Group*, Florida, USA (2002).

De Moraes, C.M., Mescheer, M.C. and Tumlinson, J.H. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel non-specific females. *Nature* 410, 577-580 (2001).

- Degenhardt, J., Hiltbold, I., Köllner, T.G., Frey, M., Gieri, A., Gershenzon, J., Hibbard, B.E., Ellersieck, M.R. and Turlings, T.C.J.** Restoring a maize root signal that attracts insect-killing nematodes to control major pest. *PNAS* 106 (32), 13213-13218 (2009).
- 5 **Endo, T., Shimada, T., Fujii, H., Nishikawa, F., Sugiyama, A., Nakano, M., Shimizu, T., Kobayashi, Y., Araki, T., Peña, L. and Omura, M.** Development of a ciFT co-expression system for functional analysis of genes in citrus flowers and fruit. *J. Japan. Soc. Hort. Sci* 78(1), 74-83 (2009).
- Gershenzon, J. and Dudareva, N.** The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.* 10 3, 408-414 (2007).
- Goff, S. and Klee, H.** Plant volatile compounds: sensory cues for health and nutritional value?. *Science* 311, 815-819 (2006).
- 15 **Kappers, I.F., Aharoni, A., van Herpen, T.W.J.M., Luckerhoff, L.L.P., Dicke, M. and Bouwmeester, H.J.** Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to Arabidopsis. *Science* 309, 2070-2072 (2005).
- Kessler, D., Gase, K. and Baldwin, T.** Field experiments with transformed plants reveal the sense of floral scents. *Science* 321, 1200-1202 (2008).
- 20 **Lücker, J., El Tamer, M.K., Schwab, W., Verstappen, F.W.A., van der Plas, L.H.W., Bouwmeester, H.J., Verhoeven, H.A.** Monoterpene biosynthesis in lemon (*Citrus limon*) - cDNA isolation and functional analysis of four monoterpenes synthases. *Eur. J. Biochem.* 269, 3160-3171 (2002).
- 25 **Lücker, J., W. Schwab, B.V. Hautum, J. Blass, L.H.W. van der Plas, H.J. Bouwmeester and H.A. Verhoeven.** Increased and altered fragrance of tobáceo plants after metabolic engineering using three monoterpene synthases from lemon. *Plant Physiol.* 134: 510-519 (2004).
- 30 **Peña, L., Cervera, M., Fagoaga, C., Romero, J., Ballester, A., Soler, N., Pons, E., Rodríguez, A., Peris, J., Juárez, J. and Navarro, L.** Citrus. Compendium of Transgenic Crop Plants: Transgenic Tropical and Subtropical Fruits and Nuts, Volume 5. (Kole, C. and Hall, T. C. Eds.), Chapter 1, pp. 1-62. *Wiley-Blackwell Publishing*, Oxford, UK (2008).
- 35 **Rodrigo, M.J., Marcos, J.F. and Zacarias, L.** Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. *J. Agric. Food Chem.* 52, 6724-6731 (2004).
- Schnee, C., Kollner, T.G., Held, M., Turlings, T.C.J., Gershenzon, J. & Degenhardt, J.** The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 1129-1134 (2006).
- 40 **Shimada, T., Endo, T., Fujii, H., Hara, M., Ueda, T., Kita, M., Omura, M.** Molecular cloning and functional characterization of four monoterpenes synthase genes from Citrus unshiu Marc. *Plant Sci.* 166, 49-58 (2004).
- 45 **Shimada, T., Endo, T., Fujii, H., Omura, M.** Isolation and characterization of a new d-limonene synthase gene with a different expression pattern in Citrus unshiu Marc. *Sci. Hortic.* 105, 507-512 (2005).
- Trapp, S. & Croteau, R.** Defensive resin biosynthesis in conifers. *Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 52, 689-724 (2001).
- 50 **Wu, S., Schalk, M., Clark, A., Miles, R.B., Coates, R. & Chapell, J.** Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants. *Nat. Biotech.* 24, 1441-1447 (2006).

55 www.fao.org

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Método para conseguir resistencia frente a enfermedades de los cítricos causadas por insectos, por hongos u
omicetos o por bacterias o nematodos **caracterizado** porque consiste en la incorporación mediante transformación
genética de un transgén que codifica un transcrito antisentido o activador de RNAi frente a ARN mensajero/s de al
menos un polipéptido endógeno con actividad d-limoneno sintasa, de modo que se reduce la actividad d-limoneno
sintasa endógena y la acumulación de d-limoneno a niveles que activan la respuesta de defensa de la planta frente a
patógenos.

10 2. El método de la reivindicación 1ª, **caracterizado** porque la secuencia precursora del gen de interés que codifica
una enzima con actividad d-limoneno sintasa procede de *Citrus* spp. o de la familia Rutáceas.

15 3. El método de la reivindicación 1ª, **caracterizado** porque el transgén de interés comprende sólo una parte del
gen endógeno cuya expresión se pretende silenciar, o la secuencia completa pero con al menos una mutación de la
secuencia nucleotídica, o la secuencia con inserciones o deleciones, de modo que en cualquier caso se reduzca o
bloquee la expresión del gen precursor de al menos una d-limoneno sintasa endógena en las células transformadas
genéticamente.

20 4. El método de la reivindicación 1ª, **caracterizado** porque la reducción de la actividad d-limoneno sintasa y la
bajada en la acumulación y emisión de d-limoneno conlleva la alteración drástica del perfil de contenido y emisión
de terpenos volátiles en frutos, hojas, flores o en todos los tejidos de las plantas, tales como monoterpenos, sesquiter-
penos u otros derivados de los precursores geranil difosfato, farnesil difosfato o geranilgeranil difosfato, de manera
que se sintetizan nuevas combinaciones de aromas y nuevos aceites esenciales con nuevas propiedades industriales,
farmacéuticas y médicas.

25 5. El método de la reivindicación 1ª, **caracterizado** porque los transgenes de interés se encuentran clonados bajo
el control de promotores fuertes y constitutivos, para reducir los niveles de d-limoneno sintasa en todas las células de
las plantas transformadas.

30 6. El método de la reivindicación 1ª, **caracterizado** porque los transgenes de interés se encuentran clonados bajo
el control de su propio promotor y terminador o bajo el control de regiones promotoras y terminadoras específicas
de tejido o inducibles, con objeto de reducir los niveles de acumulación del monoterpeno d-limoneno y alterar los de
otros compuestos volátiles.

35 7. El método de la reivindicación 1ª, **caracterizado** porque los transgenes de interés se incorporan a plantas del
género *Citrus* o Rutáceas mediante transformación genética de células o tejidos y regeneración de plantas enteras
mediante organogénesis o mediante embriogénesis somática.

1 ATGTCTTCTT GCATTAATCC CTCAACCTTG GCTACCTCTG TAAATGGTTT
 51 CAAATGTCTT CCTCTTGCAA CAAATAGAGC AGCCATCAGA ATCATGGCAA
 101 AAAATAAGCC AGTCCAATGC CTTGTCAGCA CCAAATATGA TAATTTGACA
 151 GTTGATAGGA GATCAGCAA CTACCAACCT TCAATTTGGG ACCATGATTT
 201 TTTGCAGTCA CTGAATAGCA ACTATACGGA TGAAACATAC AAAAGACGAG
 251 CAGAAGAGCT GAAGGGAAAA GTGAAGACAG CGATTAAGGA TGTAACCGAG
 301 CCTCTGGATC AGTTGGAGCT GATTGATAAT TTGCAAAGAC TTGGATTGGC
 351 TTATCATTTT GAGCCTGAGA TCGGAACAT ATTGCGTAAT ATCCACAACC
 401 ATAATAAAGA TTATAATTGG AGAAAAGAAA ATCTGTATGC AACCTCCCTT
 451 GAATTCAGAC TACTTAGACA ACATGGCTAT CCTGTTTCTC AAGAGTTTTT
 501 CAGTGGTTTT AAAGACGACA AGGTAGGCTT CATTGTGTAT GATTTCAAGG
 551 GAATACTGAG CTTGCATGAA GCCTCGTATT ACAGCTTAGA AGGAGAAAGC
 601 ATCATGGAGG AGGCCTGGCA ATTCACCAGT AAGCATCTTA AAGAAATGAT
 651 GATCATCAGC AACAGCAAGG AAGAGGATGT ATTTGTAGCA GAACAAGCGA
 701 AGCGGGCGCT GGAGCTCCCT CTGCATTGGA AAGTGCCTAT GTTAGAGGCA
 751 AGGTGGTTCA TACACGTTTA TGAGAAAAGA GAGGACAAGA ACCACCTTTT
 801 ACTTGAGCTC GCTAAGTTGG AGTTTAACAC TTTGCAGGCA ATTTACCAGG
 851 AAGAACTTAA AGACATTTCA GGGTGGTGA AGGATACAGC TCTTGGAGAG
 901 AAATTGAGCT TTGCGAGGAA CAGGTTGGTA GCGTCCTTCT TATGGAGCAT
 951 GGGGATCGCG TTTGAGCCTC AATTCGCCA CTGCAGGAGA GTGCTCACAA
 1001 TCTCGATAGC CCTAATTACA GTGATTGATG ACATTTATGA TGTCTATGGA
 1051 ACATTGGATG AACTTGAGAT ATCACTGAT GCTGTTGAGA GGTGGGACAT
 1101 CAATTATGGT TTGAAGCACC TTCCGGGCTA TATGAAAATG TGTTTTCTTG
 1151 CCCTTTACAA CTTTGTTAAT GAATTTGCTT ATTACGTTCT CAAACAACAG
 1201 GATTTTGATA TGCTTCTGAG CATAAAACAT GCATGGCTTG GCTTAATACA
 1251 AGCCTACTTG GTGGAGGCGA AATGGTACCA TAGCAAGTAC ACACCGAAAC
 1301 TGGAAGAATA CTTGGAAAAT GGATTGGTAT CAATAACGGG CCCTTTAATT
 1351 ATAACGATTT CATATCTTTC TGGTACAAAT CCAATCATT AAGAGGAACT
 1401 GGAATTTCTA GAAAGTAATC CAGATATAGT TCACTGGTCA TCCAAGATTT
 1451 TCGTCTGCA AGATGATTTG GGAACTTCAT CGGACGAGAT ACAGAGAGGG
 1501 GATGTTCCGA AATCAATCCA GTGTTACATG CATGAAACTG GTGCCTCGGA
 1551 GGAAGTTGCT CGTGAACACA TCAAGGATAT GATGAGACAG ATGTGGAAGA
 1601 AGGTGAATGC ATACACAGCC GATAAAGACT CTCCCTTGAC TCGAACAACT
 1651 GCTGAGTTCC TCTTGAATCT TGTGCGAATG TOCCATTTTA TGTATCTACA
 1701 TGGAGATGGG CATGGTGTTC AAAACCAAGA GACTATCGAT GTCGGCTTTA
 1751 CATTGCTTTT TCAGCCCAT CCCTTGAGG ACAAGACAT GGCTTTCACA
 1801 GCATCTCCTG GCACCAAAGG CTGA

FIGURA 1

MSSCNSTATSVNGKCATNRAARMAKNKVCVSTKYDNTVDRRSANYS
WDHDSNSNYTDITYKRRRAKGKVKTAKDVTDDNRGAYHRNRNHNHNKD
YNWRKNYATSRRHGYVSVSGKDDKVGCDKGS HASYYSGSMAWTSK
HKMMSNSKDVVAAKRAHWKVMARWHVYKRDKNHAKNTAYKDSGWWK
DTAGKSARNRVASWSMGAA YCRRVTSATVDDYDVYGTDTDAVRWDN
YGKHGYMKMCAYNVNAYYVKDDMSKHAWGAYVAKWYHSKYTKYNGV
STGTSYSGTNKKSNDVHWSSKRDDGTS SDRGDVKSCYMHTGASVAR
HKDMMRMWKKVNAYTADK DSTRTTANVRMSHMYHGDGHGVNTDVGT
DKDMATASGTKG

FIGURA 2

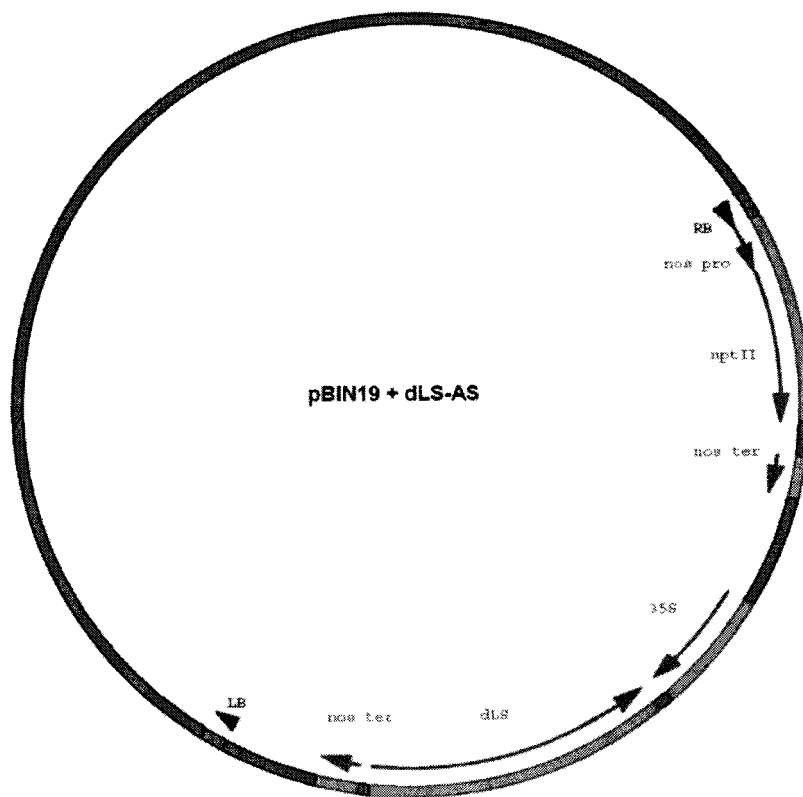


FIGURA 3

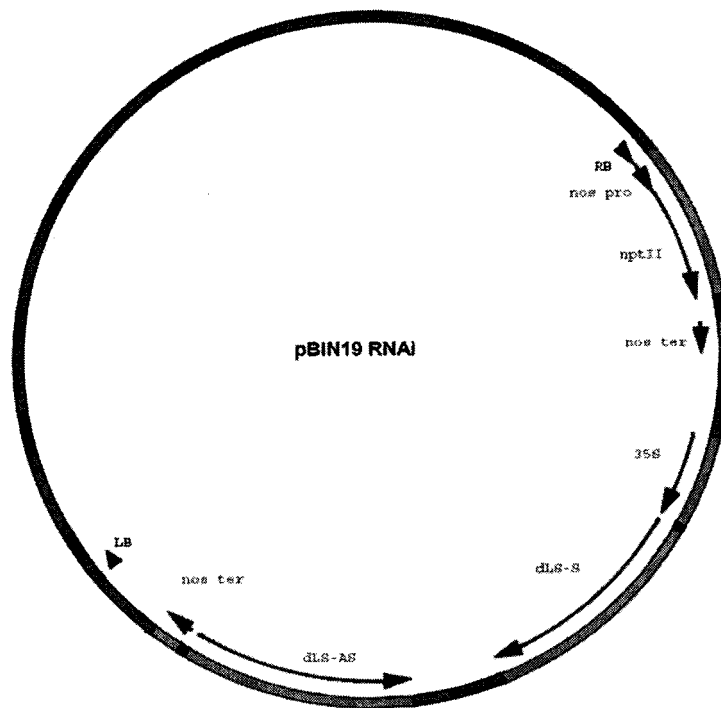


FIGURA 4

Nombre cebador	Secuencia 5' – 3'
LAS-F	GAGAGGATCCATGTCTTCTTGCCATTA
LS1-R	GAGAGGATCCTCAGCCTTTGGTGCC
P35S-F	ATCTCCACTGACGTAAGGGATGACG

TABLA IA

Etapa	N ciclos	Tiempo	Temperatura
DESNATURALIZACIÓN	1	5 minutos	95 °C
DESNATURALIZACIÓN	35	30 segundos	95 °C
ANILLAMIENTO		30 segundos	58 °C
ELONGACIÓN		90 segundos	72 °C
ELONGACIÓN	1	10 minutos	72 °C

TABLA IB



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 200902183

②² Fecha de presentación de la solicitud: 18.11.2009

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ENDO, T. et al. Development of a CiFT Co-expression System for Functional Analysis of Genes in Citrus Flowers and Fruit. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. Enero 2009. Vol. 78(1). Págs. 74-83. Todo el documento	1-7
A	US 6291745 B1 (MEYER, T.E. et al.) 18.09.2001, resumen; reivindicación 1.	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
07.07.2011

Examinador
M. Martín-Falquina Garre

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N15/82 (2006.01)

A01N63/00 (2006.01)

C12N9/88 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 07.07.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-7	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-7	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

Los documentos de la solicitud de patente sobre los que se basa esta Opinión Escrita son el resultado de las modificaciones efectuadas durante el proceso de examen formal y técnico de la solicitud de patente.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ENDO, T. et al. Development of a CiFT Co-expression System for Functional Analysis of Genes in Citrus Flowers and Fruit. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. Vol. 78(1). Págs. 74-83. Todo el documento	Enero 2009
D02	US 6291745 B1 (MEYER, T.E. et al.)	18.09.2001

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El documento D01 se refiere a un sistema de co-expresión que permite la evaluación de los efectos de la transgénesis de manera rápida en flores y frutos en plantas de periodo juvenil largo, concretamente cítricos. Cuando el sistema se utiliza para estudiar el metabolismo de los aromas en naranja amarga japonesa, el gen de la limoneno sintasa de mandarina satsuma se inserta en orientación antisentido con un vector de coexpresión CiFT (Citrus Flowering locus T) en plantas de naranjo amargo japonés. Las plantas transformadas florecen y dan fruto muy rápidamente, observándose que los niveles de limoneno en flores y frutos se reducen considerablemente. El artículo señala que es conocido que los terpenoides presentes en la piel de los cítricos están implicados en interacciones con insectos y otros patógenos. También menciona que la modificación genética del metabolismo de varios monoterpenos puede tener interés agronómico.

En el documento D02 se hace referencia a un procedimiento para manipular las rutas metabólicas de los monoterpenos en plantas con el fin de incrementar su resistencia a los insectos. Las plantas se transforman con secuencias que codifican las enzimas implicadas en dichas rutas metabólicas (por ejemplo limoneno sintasa) o con las correspondientes secuencias antisentido cuando se pretende inhibir alguna de ellas. De este modo, combinando el uso de secuencias sentido y antisentido se puede desviar la ruta metabólica hacia la producción de uno u otro monoterpeno.

Sin embargo, ni en D01 ni en D02 se divulga ni siquiera se insinúa, un método para proporcionar resistencia a patógenos en cítricos que consista en la inhibición de la expresión de la limoneno sintasa.

En consecuencia, la reivindicación 1 cumple con los requisitos de novedad y actividad inventiva (arts. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986) Las reivindicaciones 2-7 en tanto que dependientes de la reivindicación 1 son igualmente nuevas e inventivas (arts. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986).