

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 718**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03769603 .6**
96 Fecha de presentación: **10.09.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1537216**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.06.2005**

54 Título: **PLANTAS TRANSFORMADAS CON BIOSÍNTESIS DE PRENILQUINONAS MEJORADA.**

30 Prioridad:
11.09.2002 FR 0211209

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.03.2012

73 Titular/es:
BAYER S.A.S.
16 rue Jean-Marie Leclair
69009 LYON, FR

72 Inventor/es:
MATRINGE, Michel;
RIPPERT, Pascal;
DUBALD, Manuel y
DUMAS, Renaud

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 375 718 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 transformadas con biosíntesis de prenilquinonas mejorada

La presente invención se refiere a plantas transformadas, en particular a plantas transformadas que producen cantidades mayores de plastoquinonas, tocotrienoles y tocoferoles que las plantas idénticas no transformadas. Esta invención se refiere igualmente a un procedimiento de producción de estas plantas, así como a un procedimiento de cultivo de estas plantas. Las plantas según la invención tienen igualmente la propiedad de ser tolerantes a herbicidas inhibidores de la enzima piruvato de p-hidroxifenilo dioxigenasa (denominada de aquí en adelante HPPD).

Las prenilquinonas son un amplio grupo de compuestos con afinidades lipídicas que comprenden, entre otros, plastoquinonas, tocoferoles y tocotrienoles. En las plantas, las prenilquinonas se sintetizan por la ruta del homogentisato.

La prenilquinona más conocida es la vitamina E o α -tocoferol, elemento esencial de la alimentación humana y animal, en particular de la de mamíferos que no la producen naturalmente, pero que tienen una necesidad alimentaria de ella. El efecto más reconocido de la vitamina E es su acción antioxidante sobre los lípidos de las membranas celulares (Epstein *et al.*, 1966, Radical Research 28: 322-335; Kamel-Eldin y Appelqvist, 1996, Lipids 31: 671-701).

Más allá de la vitamina E, se ha demostrado que los tocotrienoles, aunque no esenciales en la alimentación humana y animal, poseen propiedades antioxidantes particularmente interesantes, mayores que las de la vitamina E (Kamat *et al.*, 1997, Mol. Cell. Biochem. 170, 131-137). Estos compuestos son especialmente conocidos por proteger a las células contra los radicales libres, así como por prevenir la aparición de enfermedades cardiovasculares o cánceres (Packer *et al.*, 2001, J. Nutr. 131(2): 369S-373S). Además, los tocotrienoles presentan una actividad anticancerosa por la inhibición de la proliferación de los receptores de estrógenos, actividad que no poseen los tocoferoles (Guthrie *et al.*, 1997, J. Nutr. 127: 544-548). Presentan igualmente una actividad hipocolesterolémica bastante mejor que los tocoferoles (Pearce *et al.*, 1992, J. Med. Chem. 35: 3595-3606; Qureshi *et al.*, 2001, J. Nutr. 131: 2606-2618), lo que las hace más aptas para luchar contra la arteriosclerosis.

Las plastoquinonas no tienen un papel conocido en la salud humana o animal, pero desempeñan un papel clave en las plantas. Estas moléculas están presentes en las membranas de cloroplastos y tienen como función el transporte de electrones a lo largo de la reacción de fotosíntesis (Grumbach, 1984, "Structure Function and Metabolism of plant lipids", Siegenthaler and Eichenberger eds).

Además, un aumento de la cantidad de prenilquinonas debería conferir a las plantas una mejor resistencia frente a los estreses oxidativos, en particular frío, sequía o una iluminación fuerte.

En las plantas y los organismos fotosintéticos en general, el homogentisato constituye el precursor aromático de las prenilquinonas. El homogentisato es el producto de la enzima piruvato de p-hidroxifenilo dioxigenasa (denominada de aquí en adelante HPPD). En la mayoría de organismos, las HPPD son enzimas implicadas en la ruta de degradación catabólica del aminoácido aromático tirosina (Goodwin, 1972, en "Tyrosine Metabolism: The biochemical, physiological, and clinical significance of p-hydroxyphenylpyruvate oxygenase", Goodwin B.L., ed., Oxford University Press, 1-94). Las HPPD catalizan la reacción de transformación de piruvato de para-hidroxifenilo (HPP), producto de degradación de la tirosina, en homogentisato.

La mayoría de las plantas sintetizan la tirosina a través del arogenato (Abou-Zeid *et al.* 1995 Applied Env. Microb. 41: 1298-1302.; Bonner *et al.*, 1995 Plant Cells Physiol. 36, 1013-1022; Byng *et al.*, 1981 Phytochemistry 6: 1289-1292; Connely y Conn 1986 Z. Naturforsch 41c: 69-78; Gaines *et al.*, 1982 Planta 156: 233-240). En estas plantas, el HPP deriva únicamente de la degradación de la tirosina. En contraposición, en organismos como la levadura *Sacharomyces cerevisiae* o la bacteria *Escherichia coli*, el HPP es un precursor de tirosina y se sintetiza mediante la acción de una enzima preferato deshidrogenasa (de aquí en adelante PDH) que transforma el preferato en HPP (Lingens *et al.*, 1967 European J. Biochem 1: 363-374; Sampathkumar y Morrisson 1982 Bioch. Biophys. Acta 702: 204-211). En estos organismos, la producción de HPP está ligada por tanto directamente a la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos (ruta del shikimato) y no a la ruta de degradación de tirosina (véase la Figura 1).

Con el fin de aumentar la biosíntesis de prenilquinonas por plantas, los inventores de la presente publicación de patente han intentado aumentar el flujo del precursor HPP en las células de estas plantas conectando la síntesis de dicho precursor con la ruta denominada del shikimato mediante la sobreexpresión de una enzima PDH. El efecto esperado es un flujo mayor del precursor HPP que debe aumentar globalmente la biosíntesis de prenilquinonas

Se ha comprobado efectivamente que la transformación de plantas con un gen que codifica una enzima PDH permite aumentar la producción de prenilquinonas por dichas plantas. Este aumento es muy significativo cuando las plantas transformadas con un gen que codifica un enzima PDH son plantas que sobreexpresan igualmente una enzima HPPD. Se realiza una comprobación similar en el documento WO 02/089561 con la enzima PDH codificada por el gen TyrA de *Erwinia herbicola*.

Se ha comprobado igualmente que la transformación de plantas con un gen que codifica una enzima PDH permitía aumentar la tolerancia de dichas plantas a los inhibidores de HPPD. Este aumento de tolerancia es muy significativo

cuando las plantas transformadas con un gen que codifica una enzima PDH son plantas que sobreexpresan igualmente una enzima HPPD.

Desde hace varios años, ha crecido considerablemente el interés por las HPPD a causa de la demostración de que esta enzima es la diana de nuevas familias de herbicidas llamados "blanqueantes". Dichos herbicidas que tienen como diana HPPD son especialmente isoxazoles (documentos EP 418.175, EP 470.856, EP 487.352, EP 527.036, EP 560.482, EP 682.659, US 5.424.276) en particular isoxaflutol, herbicida selectivo de maíz, dicetonitrilos (documentos EP 496.630, EP 496.631), en particular 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃-fenil)propano-1,3-diona y 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3Cl₂-fenil)propano-1,3-diona, tricetonas (documentos EP 625.505, EP 625.508, US 5.506.195), en particular sulcotriona o mesotriona, o también pirazolinatos.

Una de las ventajas de los herbicidas que tienen como diana enzimas implicadas en las rutas metabólicas vitales de las plantas es su amplio espectro de actividad sobre plantas de orígenes filogenéticos alejados. Sin embargo, dichos herbicidas presentan igualmente el inconveniente principal, cuando se aplican sobre cultivos para eliminar los vegetales indeseables o "malas hierbas", de actuar igualmente sobre las plantas cultivadas. Este inconveniente puede paliarse mediante la utilización de plantas cultivadas tolerantes a dichos herbicidas. Dichas plantas se obtienen generalmente mediante ingeniería genética introduciendo en su genoma un gen que codifica una enzima de resistencia a dicho herbicida de manera que sobreexpresen dicha enzima en sus tejidos.

Hasta ahora, se han empleado tres estrategias principales que utilizan la ingeniería genética para volver las plantas tolerantes a herbicidas. La primera consiste en detoxificar el herbicida mediante la transformación de la planta con un gen que codifica una enzima de detoxificación. Esta enzima transforma el herbicida, o su metabolito activo, en productos de degradación no tóxicos, como por ejemplo las enzimas de tolerancia de bromoxinilo o basta (documentos EP 242.236, EP 337.899). La segunda estrategia consiste en transformar la planta con un gen que codifica la enzima diana mutada de manera que sea menos sensible al herbicida, o a su metabolito activo, como por ejemplo las enzimas de tolerancia a glifosato (documentos EP 293.356; Padgett *et al.*, 1991, *J. Biol. Chem.*, 266: 33). La tercera estrategia consiste en sobreexpresar la enzima diana sensible, de manera que se produzcan en la planta cantidades elevadas de la enzima diana, si es posible muy superiores a la cantidad de herbicida que penetra en la planta. Esta estrategia permite mantener un nivel suficiente de enzima funcional a pesar de la presencia de su inhibidor.

Se ha puesto en aplicación esta tercera estrategia y ha permitido obtener plantas tolerantes a los inhibidores de HPPD (documento WO 96/38567). Además, esta estrategia de sobreexpresión sencilla de la enzima diana sensible (no mutada) se empleó por primera vez con éxito para conferir a plantas tolerancia a un nivel agronómico de un herbicida.

Se sabe igualmente que la mayoría de los herbicidas inhibidores de HPPD son inhibidores competitivos frente al sustrato, de fijación lenta y casi irreversible (Ellis *et al.*, 1996, *Chem. Res. Toxicol.* 9: 24-27; Viviani *et al.*, 1998, *Pestic. Biochem. Physiol.* 62: 125-134). Su modo de acción consiste por tanto en entrar en competición con el HPP fijándose de manera preferida sobre su sitio de fijación. El resultado de esta fijación es la detención de la síntesis de homogentisato por la célula.

La presente invención, al poner en aplicación un aumento del flujo del sustrato HPP de la HPPD mediante sobreexpresión de una enzima PDH, parece constituir una cuarta estrategia posible para obtener plantas tolerantes a herbicidas, en particular a herbicidas inhibidores de HPPD.

La presente invención se refiere por tanto a plantas transformadas, caracterizadas porque comprenden:

(1) un gen quimérico que comprende un promotor funcional en plantas y una secuencia que codifica una enzima preferato deshidrogenasa (PDH), con la excepción de la secuencia que codifica el gen TyrA de *Erwinia herbicola*,

(2) un gen quimérico que comprende un promotor funcional en plantas y una secuencia que codifica una enzima piruvato de p-hidroxifenilo dioxigenasa (HPPD).

Según un modo particular de realización de la invención, las plantas transformadas según la invención pueden representarse por células vegetales transformadas.

Se entiende por plantas transformadas o células vegetales transformadas las plantas o células vegetales han integrado de manera estable en su genoma al menos un transgén, pudiendo proceder dicho transgén de la planta transformada o de cualquier otro organismo. Preferiblemente, un transgén se representa por un gen quimérico que comprende elementos procedentes de al menos un organismo distinto de la planta transformada. En particular, un transgén puede contener, entre otros elementos, al menos un promotor, una secuencia que codifica y un terminador procedente de organismos diferentes, siendo dichos organismos igualmente diferentes de la planta transformada.

El término PDH debe interpretarse que hace referencia a cualquier enzima PDH nativa, o mutada, que presente actividad PDH de transformación de preferato en HPP. En particular, dicha enzima PDH puede proceder de cualquier tipo de organismo. La identificación de una enzima con actividad PDH puede realizarse mediante cualquier procedimiento que permita medir la reducción de la cantidad de sustrato preferato o bien medir la acumulación de un producto resultante de la reacción enzimática, a saber HPP o uno de los cofactores NADH o NADPH. En particular, la medida de la actividad PDH puede realizarse mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 2.

Se describen en la bibliografía numerosos genes que codifican enzimas PDH y sus secuencias pueden identificarse en el sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>. Se conoce especialmente el gen que codifica la enzima PDH de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (nº de acceso S46037) tal como se describe en Mannhaupt *et al.* (1989, Gene 85, 303-311), de bacterias del género *Bacillus*, en particular de la especie *B. subtilis* (nº de acceso P20692) tal como se describe en Henner *et al.* (1986, Gene 49 (1), 147-152), de bacterias del género *Escherichia*, en particular de la especie *E. coli* (nº de acceso KMECTD) tal como se describe en Hudson *et al.* (1984, J. Mol. Biol. 180(4), 1023-1051), o bacterias del género *Erwinia*, en particular de la especie *E. herbicola* (nº de acceso S29934) tal como la descrita en Xia *et al.* (1992, J. Gen. Microbiol. 138(7), 1309-1316).

El término HPPD debe interpretarse que hace referencia a cualquier enzima HPPD nativa, mutada o quimérica que presente actividad HPPD de transformación de HPP en homogentisato. Puede realizarse una medida de la actividad enzimática de las HPPD mediante cualquier procedimiento que permita medir la reducción de la cantidad de sustrato HPP o bien medir la acumulación de producto resultante de la reacción enzimática, a saber homogentisato. En particular, la medida de la actividad HPPD puede realizarse mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 1 y en García *et al.* (1997, Biochem. J. 325, 761-769) o García *et al.* (1999, Plant Physiol. 119, 1507-1516).

En particular, dicha enzima HPPD puede proceder de cualquier tipo de organismo. Se describen en la bibliografía numerosos genes que codifican enzimas HPPD, especialmente los genes de bacterias como *Pseudomonas* (Rüetschi *et al.*, 1992, Eur. J. Biochem., 205, 459-466, WO 96/38567), de plantas como *Arabidopsis* (documento WO 96/38567, Genebank AF047834) o de zanahoria (documento WO 96/38567, Genebank 87257), de *Coccicooides* (Genebank COITRP) o de mamíferos como ratón o cerdo.

Se entiende por HPPD mutada una HPPD que posee al menos una mutación con relación a una HPPD nativa, y que posee la propiedad de ser más tolerante a herbicidas inhibidores de HPPD que la HPPD nativa correspondiente. Ventajosamente, la HPPD mutada es una HPPD mutada en su parte C-terminal tal como se describe en la solicitud de patente WO 99/24585. Preferiblemente, la HPPD mutada comprende la mutación W336 tal como se describe en la solicitud de patente WO 99/24585.

Se entiende por HPPD quimérica una HPPD que comprende elementos procedentes de diferentes HPPD. Dichas HPPD quiméricas se describen especialmente en la solicitud de patente WO 99/24586.

Ventajosamente, la HPPD es una HPPD de *Pseudomonas fluorescens* (documento WO 96/38567) o de *Arabidopsis thaliana* (documento WO 96/38567).

En la expresión “gen funcional en plantas que permite la sobreexpresión de una enzima fitilprenil transferasa”, el término “fitilprenil transferasa” debe interpretarse que hace referencia a una enzima fitilprenil transferasa tal como la descrita en la solicitud de patente WO 02/089561. En particular, dicho “gen funcional en plantas que permite la sobreexpresión de una enzima fitilprenil transferasa”, consiste en un gen seleccionado entre el gen slr1736 de *Synechocystis* (secuencia descrita en la Cyanobase del sitio web <http://www.kazusa.or.jp/cyanobase>) y el gen ATPT2 de *Arabidopsis* (Smith *et al.*, 1997, Plant J. 11, 83-92).

Las plantas o células vegetales transformadas según la invención producen cantidades de prenilquinonas superiores a las de plantas no transformadas. Preferiblemente, las plantas o células vegetales transformadas según la invención producen cantidades de prenilquinonas superiores a las de plantas transformadas con uno solo de los genes funcionales en plantas que permiten la sobreexpresión de una enzima PDH o HPPD. Preferiblemente, las prenilquinonas producidas por plantas o células vegetales transformadas según la invención son tocoferoles y/o tocotrienoles y/o plastoquinonas. Son conocidos numerosos procedimientos de medida de la cantidad de tocoferoles, tocotrienoles y plastoquinonas y están a disposición del especialista en la materia. A modo de ejemplo, los tocoferoles, tocotrienoles y plastoquinonas pueden medirse mediante el procedimiento de Frazer *et al.* (2000, Plant J. 24: 551-558). Se entiende por cantidades superiores según la presente invención, las cantidades preferiblemente al menos 2 veces superiores, preferiblemente al menos 5 veces superiores, preferiblemente al menos 10 veces superiores, preferiblemente al menos 50 veces superiores, preferiblemente al menos 100 veces superiores, preferiblemente al menos 500 veces superiores y preferiblemente al menos 1000 veces superiores.

Las plantas transformadas según la invención tienen igualmente el efecto de ser tolerantes a los inhibidores de HPPD.

Se entiende por plantas transformadas tolerantes a los inhibidores de HPPD las plantas transformadas tales como se describen anteriormente que presentan al menos la característica de ser tolerantes frente a una dosis de inhibidor de HPPD normalmente tóxica para plantas idénticas no transformadas. La dosis de inhibidor de HPPD normalmente tóxica para una planta no transformada depende del inhibidor de HPPD utilizado y de la planta sobre la que se aplica dicho inhibidor, así como de la etapa en la que se aplica sobre dicha planta. Sin embargo, un especialista en la materia sabrá determinar dicha dosis sabiendo que el carácter tóxico de dicho inhibidor puede corresponder a un efecto mortal de dicho inhibidor que conduce a la muerte de la planta un cierto número de días después de la aplicación de dicho inhibidor, pudiendo estar precedido dicho efecto mortal por un efecto denominado “blaqueante” de la planta como es generalmente el caso para los inhibidores de HPPD, o bien a un efecto de reducción del crecimiento de la planta. Preferiblemente, las plantas transformadas tolerantes a los inhibidores de HPPD según la invención son tolerantes

frente a una dosis de inhibidor de HPPD normalmente tóxica para plantas idénticas transformadas únicamente con el gen funcional en plantas que permite la sobreexpresión de una enzima HPPD.

Se entiende por inhibidores de HPPD cualquier compuesto, de origen natural o artificial, capaz de ligarse con una enzima HPPD de planta de manera que bloquee, de manera transitoria o permanente, su actividad enzimática natural de transformación de HPP en homogentisato. Por el sesgo de esta propiedad, los inhibidores de HPPD inducen la muerte o la inhibición del crecimiento de plantas sobre las que se aplica, apareciendo dicha muerte generalmente después de un "blaqueamiento" de dichas plantas.

A modo de ejemplos de inhibidores de HPPD, se pueden citar los isoxazoles (documentos EP 418.175, EP 470.856, EP 487.352, EP 527.036, EP 560.482, EP 682.659, US 5.424.276), en particular isoxaflutol, herbicida selectivo de maíz, dicetonitrilos (denominados de aquí en adelante DKN, y descritos en los documentos EP 496.630, EP 496.631), en particular 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃-fenil)propano-1,3-diona y 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3-Cl₂-fenil)propano-1,3-diona, tricetonas (documentos EP 625.505, EP 625.508, US 5.506.195), en particular sulcotriona o mesotriona, o también pirazolinatos.

Se entiende por gen funcional en plantas un gen capaz de funcionar en una planta. Un gen capaz de funcionar en una planta es un gen capaz de expresar la proteína que codifica en al menos un tejido de dicha planta. En particular, los genes funcionales en plantas permiten la sobreexpresión de enzimas PDH y HPPD. La sobreexpresión de una proteína significa la expresión de esta proteína en los tejidos de la planta transformada a un nivel superior al existente en una planta idéntica no transformada, midiéndose dicho nivel en una etapa de desarrollo idéntica de dichas plantas. Preferiblemente, el gen funcional en plantas es un gen quimérico que puede comprender elementos procedentes de organismos distintos de la planta en la que se introducen.

Los genes funcionales en plantas son preferiblemente genes quiméricos que comprenden al menos, ligados entre sí de manera operativa, un promotor funcional en una planta, una secuencia que codifica una enzima PDH y/o HPPD, y un elemento terminador funcional en esta misma planta. Los diferentes elementos que puede contener un gen quimérico son, por una parte, elementos reguladores de la transcripción, de la traducción y de la maduración de proteínas, tales como un promotor, una secuencia que codifica un péptido señal o un péptido de tránsito o un elemento terminador consistente en una señal de poliadenilación, y por otra parte una secuencia que codifica una proteína. La expresión "ligados entre sí de manera operativa" significa que dichos elementos del gen quimérico están ligados entre sí de manera que su funcionamiento sea coordinado y permita la expresión de la secuencia codificante. A modo de ejemplo, un promotor está ligado de manera operativa con una secuencia codificante cuando es capaz de asegurar la expresión de dicha secuencia codificante. La construcción de un gen quimérico y el ensamblaje de sus diferentes elementos es realizable mediante el empleo de técnicas bien conocidas por el especialista en la materia, especialmente las descritas en Sambrook *et al.* (1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Nolan C. ed., Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press). La elección de los elementos reguladores constituyentes del gen quimérico es esencialmente función de la planta en la que deban funcionar, y el especialista en la materia es capaz de seleccionar los elementos reguladores funcionales en una planta dada.

Los promotores que puede contener el gen quimérico según la invención pueden ser constitutivos, inducibles, regulados espacial o temporalmente.

Entre los promotores constitutivos que pueden utilizarse en el gen quimérico de la presente invención, se pueden citar a modo de ejemplo los promotores bacterianos como el del gen de octopina sintasa o el del gen de nopalina sintasa (Sanders *et al.*, 1987, Nucleic Acids Res. 15, 1543-1548), promotores víricos como el del gen que controla la transcripción de ARN de 19S o de 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV; Lawton *et al.*, 1987, Plant Mol. Biol. 9, 315-324; Odell *et al.*, 1985, Nature, 313, 810-812), los promotores del virus del mosaico de las nervaduras de mandioca (CsVMV; tales como se describen en la solicitud de patente WO 97/48819). Entre los promotores de origen vegetal, se citará el promotor del gen de la subunidad pequeña de ribulosa-biscarboxilato/oxigenasa (RuBisCO), el promotor de un gen de histona tal como se describe en la solicitud EP 0.507.698, o el promotor de un gen de actina de arroz (Wang *et al.*, 1992, Mol. Cell. Biol., 12 (8): 3399-3406; US 5.641.876).

Entre los promotores inducibles que pueden utilizarse en el gen quimérico de la presente invención, se pueden citar a modo de ejemplo el promotor del gen que codifica la proteína ligante de auxina (Schwob *et al.*, 1993, Plant J. 4(3): 423-432), el promotor del gen que codifica la UDP-glucosa flavonoide glicosiltransferasa (Ralston *et al.*, 1988, Genet., 119(1), 185-197), el promotor del gen que codifica el inhibidor de MIP proteinasa (Cordero *et al.*, 1994, Plant J., 6(2), 141-150), o el promotor de gen que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Martínez *et al.*, 1989, J. Mol. Biol., 208 (4), 551-565; Quigley *et al.*, 1989, J. Mol. Evol., 29 (5), 412-421; Kohler *et al.*, 1995, Plant Mol. Biol., 29 (6), 1293-1298).

Entre los promotores específicos de tejido que pueden utilizarse en el gen quimérico de la presente invención, se pueden citar a modo de ejemplo los promotores específicos de raíces como, por ejemplo, el descrito en la solicitud de patente WO 00/29594, los promotores específicos de flores tales como los descritos en las solicitudes de patente WO 98/22593, WO 99/15679 o WO 99/43818, o los promotores específicos de frutas, en particular de granos, como los descritos en las solicitudes de patente WO 91/13993, WO 92/17580, WO 98/45460, WO 98/45461 o WO 99/16890.

Entre los elementos terminadores que pueden utilizarse en el gen quimérico de la presente invención, se pueden citar a modo de ejemplo el elemento terminador *nos* del gen que codifica la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan *et al.*, 1983, Nucleic Acids Res. 11(2), 369-385), o el elemento terminador de un gen de histona tal como el descrito en la solicitud EP 0.633.317.

5 El gen quimérico puede comprender igualmente una secuencia de orientación subcelular que codifica un péptido señal o un péptido de tránsito. Dicha secuencia, situada en dirección 5' o 3' de la secuencia que codifica de una enzima HPPD y/o PDH, permite dirigir dicha enzima HPPD o PDH de manera específica a un compartimento celular del organismo hospedador. Por ejemplo, el gen quimérico puede comprender una secuencia que codifica un péptido señal o un péptido de tránsito que permite dirigir la enzima HPPD y/o PDH hacia un compartimento particular del citoplasma como las
10 mitocondrias, plastos, retículo endoplasmático o vacuolas.

Se describe especialmente el papel de dichas secuencias en el número 38 de la revista Plant Molecular Biology (1998), dedicado en gran parte al transporte de proteínas a los diferentes compartimentos de la célula vegetal ("Sorting of proteins to vacuoles in plant cells", pág. 127-144 ; "the nuclear pore complex", pág. 145-162 ; "protein translocation into and across the chloroplastic envelope membranes", pág. 91-207; "multiple pathways for the targeting of thylakoid proteins in chloroplasts", pág. 209-221; "mitochondrial protein import in plants", pág. 311-338).
15

Según un modo de realización, el péptido de tránsito puede ser una señal de orientación cloroplástica o mitocondrial que a continuación se escinde en los cloroplastos o mitocondrias. Preferiblemente, el gen quimérico comprende una secuencia de orientación subcelular que codifica un péptido de tránsito que dirige la enzima HPPD y/o PDH a los cloroplastos.

20 Los péptidos de tránsito pueden ser sencillos o dobles. Los péptidos de tránsito dobles están eventualmente separados por una secuencia intermedia. A modo de ejemplo, un péptido de tránsito preferido según la invención comprende, en el sentido de la transcripción, una secuencia que codifica un péptido de tránsito de un gen vegetal que codifica una enzima de localización plastídica, una parte de la secuencia de la parte madura N-terminal de un gen vegetal que codifica una enzima de localización plastídica y, además, una secuencia que codifica un segundo péptido de tránsito de un gen
25 vegetal que codifica una enzima de localización plastídica. Dichos péptidos de tránsito dobles se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente EP 0.508.909.

El gen quimérico puede comprender igualmente otras secuencias de regulación que están situadas entre el promotor y la secuencia codificante, tales como los activadores de la transcripción (potenciadores) como, por ejemplo, el activador de la transcripción del virus del mosaico del tabaco (VMT) descrito en la solicitud WO 87/07644, del virus del grabado del tabaco (TEV) descrito por Carrington y Freed (1990, J. Virol. 64(4): 1590-7), o del virus del mosaico de la escrofularia ("Figwort Mosaic Virus", documento US 5.994.521). El gen quimérico puede contener también intrones, en particular intrones que favorezcan la expresión de genes en las plantas monocotiledóneas tales como el intrón 1 del gen de actina de arroz descrito en la solicitud de patente WO 99/34005, o el intrón *adh1* de maíz.
30

Las plantas y células vegetales son plantas y células vegetales transformadas. Para obtener las plantas y células vegetales transformadas, el especialista en la materia puede utilizar uno de los numerosos procedimientos de transformación de plantas conocidos.
35

Preferiblemente, las plantas y las células vegetales se transforman con un vector de clonación, de expresión y/o de transformación que comprende un gen funcional en plantas según la invención que permite la sobreexpresión de HPPD o PDH.

40 Los vectores que pueden ser útiles son, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, bacteriófagos o virus. Preferiblemente, los vectores de transformación de células vegetales o de plantas son plásmidos. De manera general, la principal cualidad de un vector debe ser la capacidad de mantenerse y autorreplicarse en células de plantas, especialmente gracias a la presencia de un origen de replicación. Con el objetivo de la transformación estable de un organismo hospedador, el vector puede integrarse también en el genoma. La elección de dicho vector así como las técnicas de inserción en el mismo del gen según la invención se han descrito en gran medida en Sambrook *et al.* (1989, "Molecular Cloning: A
45 Laboratory Manual", Nolan C. ed., Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) y forman parte de los conocimientos generales del especialista en la materia. Ventajosamente, el vector utilizado contiene igualmente, además del gen, otro gen que codifica un marcador de selección. El marcador de selección permite seleccionar los organismos hospedadores eficazmente transformados, es decir, aquellos que hayan incorporado el vector. Entre los marcadores de selección utilizables, se pueden citar el marcador que contiene los genes de resistencia a antibióticos tales como, por ejemplo, el del gen de higromicina fosfotransferasa (Gritz *et al.*, 1983, Gene 25: 179-188), pero igualmente los marcadores que contienen los genes de tolerancia a herbicidas tales como el gen *bar* (White *et al.*, 1990, Nucleic Acid Res. 18(4): 1062) de tolerancia a bialafos, el gen EPSPS (documento US 5.188.642) de tolerancia a glifosato o también el gen HPPD (documento WO 96/38567) de tolerancia a isoxazoles. Se pueden citar igualmente los genes que codifican enzimas fácilmente identificables como la enzima GUS, y genes que codifican pigmentos o enzimas que regulan la producción de pigmentos en células transformadas. Dichos genes marcadores de selección se describen especialmente en las solicitudes de patente WO 91/02071, WO 95/06128, WO 96/38567 y WO 97/04103.
50
55

Entre los procedimientos de transformación utilizables para obtener plantas transformadas, uno de ellos consiste en poner las células o tejidos de las plantas a transformar en presencia de polietilenglicol (PEG) y los vectores descritos anteriormente (Chang y Cohen, 1979, Mol. Gen. Genet. 168(1), 111-115; Mercenier y Chassy, 1988, Biochimie 70(4), 503-517). La electroporación es otro procedimiento que consiste en someter a las células o tejidos a transformar y los vectores a un campo eléctrico (Andreason y Evans, 1988, Biotechniques 6(7), 650-660; Shigekawa y Dower, 1989, Aust. J. Biotechnol. 3(1), 56-62). Otro procedimiento consiste en inyectar directamente los vectores en las células o tejidos mediante microinyección (Gordon y Ruddle, 1985, Gene 33(2), 121-136). Ventajosamente, podrá utilizarse el procedimiento llamado "biolístico". Consiste en bombardear las células o tejidos con partículas sobre las que se han adsorbido los vectores (Bruce *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(24), 9692-9696; Klein *et al.*, 1992, Biotechnology 10(3), 286-291; patente de EE.UU. nº 4.945.050). Preferiblemente, la transformación de células o tejidos vegetales puede hacerse con la ayuda de bacterias del género *Agrobacterium*, preferiblemente por infección de células o tejidos de dichas plantas por *A. tumefaciens* (Knopf, 1979, Subcell. Biochem. 6, 143-173; Shaw *et al.*, 1983, Gene 23(3):315-330) o *A. rhizogenes* (Bevan y Chilton, 1982, Annu. Rev. Genet. 16:357-384; Tepfer y Casse-Delbart, 1987, Microbiol. Sci. 4(1), 24-28). Preferiblemente, la transformación de células o tejidos vegetales por *Agrobacterium tumefaciens* se realiza según el protocolo descrito por Ishida *et al.* (1996, Nat. Biotechnol. 14(6), 745-750). El especialista en la materia hará la elección del procedimiento apropiado en función de la naturaleza de la planta a transformar.

Se entiende por "parte de estas plantas" cualquier órgano de estas plantas, tanto aéreo como subterráneo. Los órganos aéreos son los tallos, hojas y flores que comprenden los órganos reproductores masculinos y femeninos. Los órganos subterráneos son principalmente las raíces, pero pueden ser igualmente tubérculos. Se entiende por "descendencia" principalmente los granos que contienen los embriones resultantes de la reproducción de estas plantas entre ellas. Por extensión, el término "descendencia" se aplica a todos los granos formados en cada nueva generación resultante de cruzamientos en que al menos uno de los progenitores es una planta transformada. Puede obtenerse igualmente una descendencia mediante la multiplicación vegetativa de dichas plantas transformadas. Los granos pueden estar recubiertos por una composición agroquímica que comprende al menos un producto activo que posee una actividad seleccionada entre las actividades fungicida, herbicida, insecticida, nematocida, bactericida o viricida.

Las plantas transformadas pueden comprender al menos otro gen que codifica una proteína de interés, estando dicho otro gen igualmente introducido artificialmente en el genoma de la planta simultánea, anterior o posteriormente al gen funcional en plantas que permite la sobreexpresión de PDH y/o HPPD. Entre los genes que codifican una proteína de interés, se pueden citar los genes que codifican otra enzima de resistencia a un herbicida, por ejemplo, en gel que codifica la enzima *bar* (White *et al.*, NAR 18: 1062, 1990) de tolerancia a bialafos o el gen que codifica la enzima EPSPS (documentos US 5.188.642; WO 97/04103) de tolerancia a glifosato. Se puede citar igualmente un gen que codifica una toxina insecticida, por ejemplo un gen que codifica una δ -endotoxina de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (por ejemplo, véase la solicitud de patente internacional WO 98/40490). Pueden estar contenidos igualmente en estas plantas otros genes de resistencia a enfermedades, por ejemplo, un gen que codifica la enzima oxalato oxidasa tal como se describe en la solicitud de patente EP 0.531.498 o la patente US 5.866.778, o un gen que codifica otro péptido antibacteriano y/o antifúngico tales como los descritos en las solicitudes de patentes WO 97/30082, WO 99/24594, WO 99/02717, WO 99/53053 y WO99/91089. Se pueden citar igualmente los genes que codifican caracteres agronómicos de la planta, en particular un gen que codifica una enzima delta-6-desaturasa tal como se describe en las patentes US 5.552.306, US 5.614.313 y las solicitudes de patente WO 98/46763 y WO 98/46764, o un gen que codifica una enzima serina acetiltransferasa (SAT) tal como se describe en las solicitudes de patente WO 00/01833 y WO 00/36127.

Los genes suplementarios que codifican una proteína de interés pueden integrarse mediante un vector. En este caso, el vector comprende el gen según la invención que codifica una enzima PDH y/o HPPD y al menos un gen que codifica otro péptido o proteína de interés.

Pueden integrarse igualmente mediante al menos otro vector que comprende dicho gen suplementario, según las técnicas habituales definidas anteriormente.

Las plantas pueden obtenerse también mediante cruzamiento de plantas, portando una el gen que codifica una enzima PDH y/o HPPD según la invención, y portando la otra otro gen que codifica al menos otro péptido o proteína de interés.

Las plantas transformadas pueden ser monocotiledóneas o dicotiledóneas. Preferiblemente, estas plantas son plantas de interés agronómico. Ventajosamente, las plantas monocotiledóneas son trigo, maíz y arroz. Ventajosamente, las plantas dicotiledóneas son colza, soja, tabaco y algodón.

La presente invención se refiere igualmente a un procedimiento de cultivo de plantas transformadas según la invención, caracterizado porque consiste en plantar granos de dichas plantas transformadas sobre una superficie de un campo apropiado para el cultivo de dichas plantas, en aplicar sobre dicha superficie de dicho campo al menos una composición herbicida que comprende un inhibidor de HPPD y de recoger después las plantas cultivadas cuando llegan a la madurez deseada y, eventualmente, en separar los granos de las plantas recogidas.

La presente invención se refiere igualmente a un procedimiento para conferir a plantas tolerancia a inhibidores de HPPD, caracterizado porque se transforman dichas plantas, simultánea o sucesivamente, con:

(1) un gen quimérico que comprende un promotor funcional en plantas y una secuencia que codifica una enzima prefenato deshidrogenasa (PDH), con la excepción de la secuencia que codifica el gen TyrA de *Erwinia herbicola*,

(2) un gen quimérico que comprende un promotor funcional en plantas y una secuencia que codifica una enzima piruvato de p-hidroxifenilo dioxigenasa (HPPD).

5 La presente invención se refiere igualmente a una utilización de las plantas o células vegetales según la invención para producir prenilquinonas, en particular, tocoferoles, tocotrienoles y/o plastoquinonas.

La presente invención se refiere igualmente a un procedimiento para aumentar la cantidad de prenilquinonas en plantas, caracterizado porque se transforman dichas plantas, simultánea o sucesivamente, con:

10 (1) un gen quimérico que comprende un promotor funcional en plantas y una secuencia que codifica una enzima prefenato deshidrogenasa (PDH), con la excepción de la secuencia que codifica el gen TyrA de *Erwinia herbicola*,

(2) un gen quimérico que comprende un promotor funcional en plantas y una secuencia que codifica una enzima piruvato de p-hidroxifenilo dioxigenasa (HPPD).

15 La presente invención se refiere igualmente a un procedimiento de inducción de prenilquinonas, caracterizado porque comprende una etapa de puesta en cultivo de una célula vegetal o una planta transformada según la invención en un medio de cultivo adaptado al crecimiento y la multiplicación de dicha célula vegetal o dicha planta.

Según un modo particular de realización de dicho procedimiento, las prenilquinonas producidas son preferiblemente tocoferoles representados por la vitamina E.

Según un modo particular de realización de dicho procedimiento, las prenilquinonas producidas son preferiblemente tocotrienoles.

20 Según un modo de realización particular, dicho procedimiento de producción de prenilquinonas comprende una etapa posterior de extracción de dichas prenilquinonas producidas por dicha célula vegetal o por dicha planta transformada cultivada en la primera etapa.

25 Cuando se pone en aplicación dicho procedimiento de producción de prenilquinonas con las células vegetales transformadas según la invención, se cultivan dichas células vegetales en un medio de cultivo favorable a su supervivencia y su crecimiento. El especialista en la materia sabrá determinar la composición de dicho medio de cultivo de manera que permita un crecimiento óptimo de dichas células vegetales. A modo de ejemplo, se describen procedimientos y medios de cultivo de células vegetales en Murashige y Skoog (1962, Physiol. Plant. 15: 473-497) y en Gamborg *et al.* (1968, Exptl. Cell Research, 50: 151-159).

30 Además, cuando dicho procedimiento se pone en aplicación con células vegetales transformadas según la invención, dichas prenilquinonas producidas pueden secretarse en el medio de cultivo o no. Cuando dichas prenilquinonas se secretan en el medio de cultivo, la etapa de extracción de dicho procedimiento puede estar precedida por una etapa de recuperación del medio de cultivo mediante la eliminación de dichas células vegetales. Puede hacerse dicha etapa de recuperación del medio de cultivo mediante la eliminación de dichas células vegetales mediante cualquier medio de separación de fracciones sólidas comprendidas en una fracción líquida. En particular, la filtración y la centrifugación son los medios adaptados a la puesta en aplicación de esta etapa.

35 Cuando las prenilquinonas no se secretan en el medio de cultivo, la etapa de extracción puede realizarse mediante la sucesión de etapas de concentración de células vegetales cultivadas, de ruptura celular de las células vegetales aisladas, de centrifugación del extracto celular fragmentado y después de recuperación del sobrenadante que comprende dichas prenilquinonas. La etapa de ruptura celular puede realizarse mediante la puesta en aplicación de técnicas conocidas por el especialista en la materia tales como la molienda mecánica (por diferencia de presión, por la acción de ultrasonidos, por trituración), la lisis enzimática o el choque osmótico, pudiendo emplearse dichas técnicas individualmente o en combinación.

40 Cuando dicho procedimiento de producción de prenilquinonas se pone en aplicación con plantas transformadas según la invención, dichas plantas se cultivan sobre un sustrato apropiado para su supervivencia y su crecimiento, pudiendo ser dicho sustrato natural o artificial. Un sustrato natural puede ser, por ejemplo, tierra o una mezcla de tierras, y dichas plantas podrán cultivarse en condiciones controladas como, por ejemplo, en cámara de cultivo, en condiciones semicontroladas como, por ejemplo, en invernadero, o en condiciones naturales como, por ejemplo, en pleno campo. Un sustrato artificial puede ser, por ejemplo, un sustrato líquido o gelificado cuya composición es favorable a la supervivencia y crecimiento de plantas según la invención. El especialista en la materia sabrá determinar la composición de dicho sustrato artificial de manera que permita un crecimiento óptimo de dichas plantas. A modo de ejemplo de sustratos de cultivo de plantas, se pueden citar los medios de tipo lana de roca o vermiculita irrigados con una solución nutritiva que contiene los elementos nutritivos N (nitrógeno), P (fósforo), K (potasio) o cualquier otra solución nutritiva, comercial o adaptada, que permita a las plantas crecer sobre estos medios. Cuando las plantas según la invención se cultivan sobre un sustrato artificial, se cultivan generalmente en condiciones controladas en cámara de cultivo.

Además, cuando dicho procedimiento se pone en aplicación con plantas transformadas, dichas prenilquinonas producidas están generalmente inmovilizadas en dichas plantas transformadas.

5 Las plantas transformadas, o una parte de dichas plantas, pueden utilizarse directamente e incorporarse a composiciones alimentarias destinadas a la alimentación humana o animal, o bien experimentar una extracción de las prenilquinonas que contienen. Como se indica anteriormente, se entiende por "parte de plantas" cualquier órgano de estas plantas, sea aéreo o subterráneo. Los órganos aéreos son los tallos, hojas y flores que comprenden los órganos reproductores masculinos y femeninos, así como los granos. Los órganos subterráneos son principalmente las raíces, pero pueden ser igualmente tubérculos. Según un modo preferido de realización de la invención, los granos son las partes de las plantas transformadas destinadas a la alimentación.

10 La descripción comprende igualmente los granos de las plantas transformadas, siendo dichos granos ricos en prenilquinonas en comparación con los granos de plantas no transformadas. Además, la descripción comprende igualmente composiciones alimentarias que comprenden granos o cualquier otra parte de las plantas transformadas según la invención. Se describe igualmente el aceite producido a partir de estas partes de plantas, en particular los granos.

15 Con el fin de recuperar las prenilquinonas producidas en la planta transformada, puede realizarse una etapa de extracción mediante la sucesión de etapas de molienda de las plantas cultivadas, filtración y/o centrifugación del molido de plantas, y después recuperación del sobrenadante que comprende dichas prenilquinonas, pudiendo consistir dicha recuperación en una extracción de los compuestos lipídicos. Preferiblemente, la etapa de molienda consiste en una molienda mecánica (por diferencia de presión, por acción de ultrasonidos, por trituración) que puede estar seguida por
20 una lisis enzimática o un choque osmótico.

El presente procedimiento puede poner en aplicación igualmente una etapa final de purificación de las prenilquinonas contenidas en el extracto de célula vegetal o de planta obtenido. La purificación de dichas prenilquinonas puede hacerse mediante cualquier técnica de concentración o de separación de compuestos, en particular las técnicas de
25 microfiltración, ultrafiltración, electroforesis o cromatografía bien conocidas por el especialista en la materia. Con el fin de llegar a las prenilquinonas purificadas, el especialista en la materia sabrá emplear un procedimiento de medida de dichas prenilquinonas para identificar la o las fracciones de purificación que contienen dichas prenilquinonas. Según este procedimiento, dichas prenilquinonas producidas pueden tener una pureza preferiblemente de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o ventajosamente de 100%.

30 Según un modo particular de realización de la invención, las plantas transformadas según la invención comprenden, además de un gen quimérico que comprende un promotor funcional en plantas y una secuencia que codifica una enzima prefenato deshidrogenasa (PDH), con la excepción de una secuencia que codifica el gen *TyrA* de *Erwinia herbicola*, y un gen quimérico que comprende un promotor funcional en plantas y una secuencia que codifica una enzima piruvato de p-hidroxifenilo dioxigenasa (HPPD), un gen quimérico que comprende un promotor funcional en plantas y una secuencia que codifica una enzima geranilgeranil reductasa (GGR). Entre las prenilquinonas producidas, dichas plantas producen
35 preferiblemente tocoferoles, en particular vitamina E, en comparación con tocotrienoles y plastoquinonas.

La enzima GGR es una enzima que cataliza la transformación de pirofosfato de geranilgeranilo en pirofosfato de fitilo. Según un modo particular de realización, el gen funcional en plantas que permite la sobreexpresión de GGR comprende la secuencia que codifica un gen que codifica una GGR de planta. A modo de ejemplo, se puede utilizar la secuencia que codifica la GGR de *Arabidopsis* tal como se publica en Keller *et al.*, (1998, Eur. J. Biochem. 251(1-2): 413-417), o
40 aquellas descritas por los números de acceso AJ 007789 (tabaco), AF 069318 (*Mesembryanthemum crystallinum*), Y14044 (*Arabidopsis*), Q55087 (*Synechocystis* sp PCC 6803).

Referencias bibliográficas

- Abou-Zeid *et al.*, 1995, Applied Env. Microb. 41: 1298-1302
- Andreason y Evans, 1988, Biotechniques 6(7): 650-660
- 45 Ausubel *et al.*, 1994, "Current Protocols in Molecular Biology, Current protocols", EE.UU., vol.1-2
- Bevan *et al.*, 1983, Nucleic Acids Res. 11 (2): 369-385
- Bevan y Chilton, 1982, Annu. Rev. Genet. 16: 357-384
- Bonner *et al.*, 1995, Plant Cells Physiol. 36: 1013-1022
- Brown, 1998, "Molecular Biology LabFax", 2ª edición, Academic Press, RU
- 50 Bruce *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(24): 9692-9696
- Byng *et al.*, 1981 Phytochemistry 6: 1289-1292
- Carrington y Freed, 1990, J. Virol. 64(4): 1590-1597

- Chang y Cohen, 1979, Mol. Gen. Genet. 168(1): 111-115
- Connely y Conn, 1986, Z. Naturforsch 41c: 69-78
- Cordero *et al.*, 1994, Plant J., 6 (2): 141-150
- 5 Croy R.D.D., 1993, "Plant Molecular Biology LabFax", BIOS Scientific Publications Ltd (RU) y Blackwell Scientific Publications (RU)
- Dieffenbach y Dveksler, 1995, "PCR Primer: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
- Ellis *et al.*, 1996, Chem. Res. Toxicol. 9: 24-27
- Epstein *et al.*, 1966, Radical Research 28: 322-335
- Folch *et al.*, 1957, J. Biol. Chem. 226-497
- 10 Frazer *et al.*, 2000, Plant J. 24: 551-558
- Gaines *et al.*, 1982, Planta 156: 233-240
- Gamborg *et al.*, 1968, Exptl. Cell Research, 50: 151-159
- García *et al.*, 1997, Biochem. J. 325: 761-769
- García *et al.*, 1999, Plant Physiol. 119: 1507-1516
- 15 Goodwin, 1972, en "Tyrosine Metabolism: The biochemical, physiological, and clinical significance of p-hydroxyphenylpyruvate oxygenase", Goodwin B.L., ed., Oxford University press: 1-94
- Gordon y Ruddle, 1985, Gene 33(2): 121-136
- Gritz *et al.*, 1983, Gene 25: 179-188
- Grumbach, 1984, "Structure Function and Metabolism of plant lipids", Siegenthaler and Eichenberger eds
- 20 Guthrie *et al.*, 1997, J. Nutr. 127: 544-548
- Henner *et al.*, 1986, Gene 49 (1): 147-152
- Horsch *et al.*, 1985, Science 227: 1229-1231).
- Hudson *et al.*, 1984, J. Mol. Biol. 180(4): 1023-1051
- Ishida *et al.*, 1996, Nat. Biotechnol. 14(6): 745-750
- 25 Kamat *et al.*, 1997, Mol. Cell. Biochem. 170: 131-137
- Kamel-Eldin y Appelqvist, 1996, Lipids 31: 671-701
- Keller *et al.*, 1998, Eur. J. Biochem. 251(1-2): 413-417
- Klein *et al.*, 1992, Biotechnology 10(3): 286-291
- Knopf, 1979, Subcell. Biochem. 6: 143-173
- 30 Kohler *et al.*, 1995, Plant Mol. Biol., 29 (6): 1293-1298
- Lawton *et al.*, 1987, Plant Mol. Biol. 9, 315-324
- Lingens *et al.*, 1967, European J. Biochem. 1: 363-374
- Mannhaupt *et al.*, 1989, Gene 85: 303-311
- Martínez *et al.*, 1989, J. Mol. Biol., 208 (4): 551-565
- 35 McPherson *et al.*, 2000, "PCR - Basics: From background to bench", 1ª edición, Springer Verlag, Alemania
- Mercenier y Chassy, 1988, Biochimie 70(4): 503-517
- Murashige y Skoog, 1962, Physiol. Plant. 15: 473-497

- Odell *et al.*, 1985, Nature, 313: 810-812
- Packer *et al.*, 2001, J. Nutr. 131(2): 369S-373S
- Padgett *et al.*, 1991, J. Biol. Chem. 266: 33
- Pearce *et al.*, 1992, J. Med. Chem. 35: 3595-3606
- 5 Quigley *et al.*, 1989, J. Mol. Evol., 29 (5): 412-421
- Qureshi *et al.*, 2001, J. Nutr. 131: 2606-2618
- Ralston *et al.*, 1988, Genet., 119 (1): 185-197
- Rüetschi *et al.*, 1992, Eur. J. Biochem., 205: 459-466
- 10 Sambrook *et al.*, 1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª edición, Nolan C. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
- Sambrook y Russel, 2001, "Molecular cloning: A laboratory manual", 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
- Sampathkumar y Morrisson, 1982, Bioch. Biophys. Acta 702: 204-211
- Sanders *et al.*, 1987, Nucleic Acids Res. 15: 1543-1548
- 15 Schwob *et al.*, 1993, Plant J. 4 (3): 423-432
- Shaw *et al.*, 1983, Gene 23(3): 315-330
- Shigekawa y Dower, 1989, Aust. J. Biotechnol. 3(1), 56-62
- Tepfer y Casse-Delbart, 1987, Microbiol. Sci. 4(1), 24-28
- Viviani *et al.*, 1998, Pestic. Biochem. Physiol. 62: 125-134
- 20 Wang *et al.*, 1992, Mol. Cell. Biol., 12 (8): 3399-3406
- White *et al.*, 1990, Nucleic Acid Res. 18(4):1062
- Xia *et al.*, 1992, J. Gen. Microbiol. 138(7): 1309-1316
- WO 87/07644 US 4.945.050 EP 0.507.698
- WO 91/02071 US 5.424.276 EP 0.508.909
- 25 WO 91/13993 US 5.994.521 EP 0.531.498
- WO 92/17580 US 5.188.642 EP 0.633.317
- WO 95/06128 US 5.506.195 EP 0.242.236
- WO 96/38567 US 5.552.306 EP 0.293.356
- WO 97/04103 US 5.614.313 EP 0.337.899
- 30 WO 97/30082 US 5.866.778 EP 0.418.175
- WO 97/48819 US 5.641.876 EP 0.470.856
- WO 98/22593 EP 0.487.352
- WO 98/40490 EP 0.496.630
- WO 98/45460 EP 0.496.631
- 35 WO 98/45461 EP 0.527.036
- WO 98/46763 EP 0.560.482
- WO 98/46764 EP 0.625.505

WO 99/02717 EP 0.625.508

WO 99/15679 EP 0.682.659

WO 99/16890

WO 99/24585

5 WO 99/24586

WO 99/24594

WO 99/34005

WO 99/43818

WO 99/53053

10 WO 99/91089

WO 00/01833

WO 00/29594

WO 00/36127

Los ejemplos siguientes permiten ilustrar la presente invención sin limitar sin embargo su alcance.

15 Todos los procedimientos u operaciones descritos a continuación en estos ejemplos se dan a modo de ejemplos y corresponden a una elección efectuada entre los diferentes procedimientos disponibles para llegar al mismo resultado. Esta elección no tiene ninguna incidencia sobre la calidad del resultado y, en consecuencia, puede utilizarse cualquier procedimiento adaptado por el especialista en la materia para llegar al mismo resultado. En particular, y al menos que se precise otra cosa en los ejemplos, todas las técnicas de ADN recombinante empleadas se ponen en aplicación según los protocolos estándares descritos en Sambrook *et al.* (1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª edición, Nolan C. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY), en Sambrook y Russel (2001, "Molecular cloning: A laboratory manual", 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY), en Ausubel *et al.* (1994, "Current Protocols in Molecular Biology, Current protocols", EE.UU., volúmenes 1 y 2) y en Brown (1998, "Molecular Biology LabFax", 2ª edición, Academic Press, RU). Se describen los materiales y procedimientos estándares para la biología molecular de las plantas en Croy R.D.D. (1993, "Plant Molecular Biology LabFax", BIOS Scientific Publications Ltd (RU) y Blackwell Scientific Publications (RU). Se describen igualmente los materiales y procedimientos estándares para la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en Dieffenbach y Dveksler (1995, "PCR Primer: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY) y en McPherson *et al.* (2000, "PCR - Basics: From background to bench", 1ª edición, Springer Verlag, Alemania).

30 **Ejemplo 1: Medida de la actividad HPPD**

La actividad HPPD Puede medirse mediante el procedimiento descrito en García *et al.* (1997, Biochem. J. 325, 761-769) o García *et al.* (1999, Plant Physiol. 119, 1507-1516).

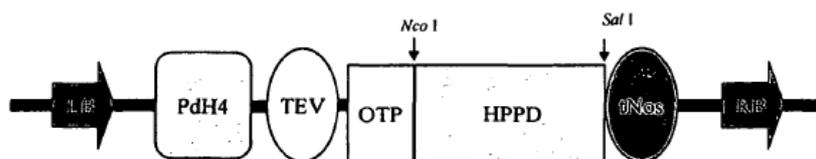
Ejemplo 2: Medida de la actividad prefenato deshidrogenasa

35 La actividad prefenato deshidrogenasa se mide a 25°C por seguimiento espectrofotométrico a 340 nm de la formación de NADH o NADPH en una solución que contiene Tris-HCl 50 mM, pH 8,6, prefenato 300 µM y NAD o NADP 1 mM en un volumen total de 200 µl.

Ejemplo 3: Construcción de un gen quimérico que sobreexpresa HPPD

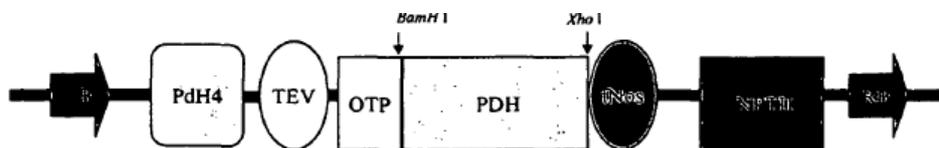
Se ha construido un gen quimérico que permite la sobreexpresión de HPPD para conferir resistencia a plantas frente a herbicidas que inhiben HPPD.

40 Consiste en ensamblar, en el sentido de la transcripción, un promotor denominado "de doble histona" (PdH4) tal como se describe en la solicitud de patente EP 0.507.698, la secuencia del potenciador de la traducción del virus del grabado de tabaco (TEV) descrito en Carrington y Freed (1990; J. Virol. 64: 1590-1597), una secuencia que codifica un péptido de tránsito optimizado (OTP) tal como se describe en la solicitud de patente EP 0.508.909, la parte que codifica del gen de HPPD de *Arabidopsis thaliana* descrita en la solicitud de patente WO 96/38567, y después el terminador *nos* del gen de nopalina sintasa descrito en Bevan *et al.* (1983, Nucleic Acids Res. 11(2), 369-385). Se clona a continuación el conjunto en un vector binario que tiene como estructura:



Ejemplo 4: Construcción de un gen quimérico que sobreexpresa PDH

La construcción de un gen quimérico que sobreexpresa PDH consiste en ensamblar, en el sentido de la transcripción, un promotor denominado "de doble histona" (PdH4) tal como se describe en la solicitud de patente EP 0.507.698, la secuencia del potenciador de la traducción del virus del grabado de tabaco (TEV) descrito en Carrington y Freed (1990; *J. Virol.* 64: 1590-1597), una secuencia que codifica un péptido de tránsito optimizado (OTP) tal como se describe en la solicitud de patente EP 0.508.909, la parte que codifica del gen PDH de levadura descrita en Mannhaupt *et al.* (1989, *Gene* 85, 303-311), y después el terminador *nos* del gen de nopalina sintasa descrito en Bevan *et al.* (1983, *Nucleic Acids Res.* 11(2), 369-385). Se clona a continuación el conjunto en el vector binario pRD224 que contiene un gen de resistencia a kanamicina (NPTII) para dar el vector pRD224-PDH. Este vector tiene como estructura:



Se ha utilizado a continuación este vector binario para transformar la cepa EHA 105 de *Agrobacterium* y dar la cepa EHA 105-pRD224-PDH de *Agrobacterium*. Esta cepa de *Agrobacterium* se ha utilizado para transformar tabaco PBD6 y tabaco PBD6-ARA9 (tabaco transformado con el gen quimérico que permite la sobreexpresión de HPPD de *Arabidopsis thaliana*).

Las plantas transformadas se seleccionan con kanamicina.

Ejemplo 5: Transformación del tabaco PBD6-ARA9 con un módulo de expresión que sobreexpresa PDH

Los tabacos PBD6-ARA9 son tabacos transformados con un gen quimérico tal como se describe en el ejemplo 3, y que sobreexpresan HPPD de *A. thaliana* descrita en la solicitud de patente WO96/38567. Se describe el procedimiento de obtención de tabacos PBD6-ARA9 en García *et al.* (1999, *Plant Physiol.* 119, 1507-1516). Las líneas PBD6-ARA9 transformadas con el gen quimérico que sobreexpresa PDH tal como se describe en el ejemplo 4 se denominan líneas ARA9-PDH.

5.1: Transformación

Se realiza la transformación con la cepa no oncogénica EHA 105-pRD224-PDH de *Agrobacterium tumefaciens* según la técnica de los discos foliares (Horsch *et al.*, 1985, *Science* 227: 1229-1231).

5.2: Regeneración

Se realiza la regeneración del tabaco ARA9-PDH a partir de explantes foliares sobre medio básico de Murashig y Skoog (MS) que comprende sacarosa 30 g/l así como cefotaxima 350 mg/l y kanamicina 200 mg/ml. Se extraen los explantes foliares de plantas en invernadero y se regeneran según las técnicas de discos foliares (Horsch *et al.*, 1985, *Science* 227: 1229-1231) en tres etapas sucesivas:

- La primera comprende la inducción de brotes en un medio MS con adición de sacarosa 30 g/l que contiene ácido naftilacético (ANA) 0,05 mg/l y bencilaminopurina (BAP) 2 mg/l durante 15 días y kanamicina 200 mg/ml.
- Se desarrollan a continuación los brotes verdes formados en el transcurso de esta etapa mediante cultivo en medio MS con adición de de sacarosa 30 g/l y kanamicina 200 mg/ml, pero que no contiene hormona, durante 10 días.
- Se extraen a continuación los brotes desarrollados y se cultivan después en medio de enraizamiento MS de contenido medio en sales, vitaminas y azúcares, kanamicina 200 mg/ml y que no contiene hormona. Al cabo de aproximadamente 15 días, se pasan a tierra los brotes enraizados.

Se estudia la tolerancia de las plantas transformadas mediante semillas en un suelo tratado con dicetonitrilo (DKN).

Ejemplo 6: Tolerancia de los tabacos PBD6-ARA9 y ARA9-PDH a los inhibidores de HPPD

6.1. Tolerancia a dicetonitrilo (DKN)

Se sembraron 13 líneas ARA9-PDH y la línea PBD6-ARA9, que han servido como material de partida para la transformación, sobre concentraciones crecientes de DKN: 5, 10 y 32 ppm.

A 5 ppm de DKN, todas las líneas PBD6-ARA9 y ARA9-PDH resisten, especialmente puesto que todas sobreexpresan HPPD de *A. thaliana*. A 10 ppm de DKN, la línea progenitora PBD6-ARA9 se inhibe completamente. Por el contrario, todas las líneas ARA9-PDH resisten bien, con la excepción de solo una (ARA9-PDH4) que se inhibe. A 32 ppm de DKN, todas las líneas ARA9-PDH que resistían a 10 ppm de DKN, tienen plantas que resisten y brotan normalmente, mientras que la línea progenitora PBD6-ARA9 que solo expresa HPPD recombinante está completamente inhibida. Las líneas que muestran la mejor tolerancia son las líneas ARA9-PDH 14, ARA9-PDH 18 y ARA9-PDH24.

6.2. Tolerancia a sulcotriona y mesotriona

Se realizó la misma experiencia con los inhibidores de HPPD sulcotriona y mesotriona. La línea ARA9-PDH18 se prueba tolerante a mesotriona 3 μM y a sulcotriona 6 μM , mientras que una línea de tabaco silvestre de tipo Petit Havana es sensible a 0,37 μM de estos dos compuestos.

Ejemplo 7: Medida de los índices de tocoferoles y tocotrienoles en tabacos PBD6-ARA9 y ARA9-PDH

Se obtiene un extracto lipídico mediante el procedimiento de Folch (Folch *et al.*, 1957, *J. Biol. Chem.*, 226-497) en muestras de hojas medias y hojas muy jóvenes de cada una de las plantas analizadas. Se realiza a continuación un análisis de sus contenidos de tocoferoles y tocotrienoles mediante HPLC según el procedimiento de Frazer *et al.* (2000, *Plant J.* 24: 551-558). Se cuantifican a continuación estos contenidos con relación a los productos de referencia, y después se expresan en μg por g de masa seca. Se presentan los resultados en la Tabla 1.

Tabla 1: Índices de tocoferoles y tocotrienoles en muestras de las plantas PBD6, PBD6-ARA9 (ARA9) y ARA9-PDH (PDH4, PDH 14, PDH 18, PDH 24).

Hojas medias		PBD6	ARA9	PDH4	PDH14	PDH18	PDH24
		(μg por g de peso seco)					
α	Tocoferol	62,2	64,73	66,9	89,7	91,03	83,4
β/γ	Tocoferol	1,73	1,93	2,16	4,56	4,28	4,01
δ	Tocoferol	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
α	Tocotrienol	Nd	Nd	Nd	64,58	66,99	55,35
β/γ	Tocotrienol	Nd	Nd	Nd	2,04	2,23	1,98
δ	Tocotrienol	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Hojas muy jóvenes		PBD6	ARA9	PDH4	PDH14	PDH18	PDH24
		(μg por g de peso seco)					
α	Tocoferol	73,5	64,73	68 ,7	76,2	75 ,4	83,4
β/γ	Tocoferol	1,83	2,37	1,86	3,32	3	3,5
δ	Tocoferol	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
α	Tocotrienol	Nd	Nd	Nd	275,26	224,5	242,4
β/γ	Tocotrienol	Nd	Nd	Nd	17,45	15,3	17,14
δ	Tocotrienol	Nd	Nd	Nd	6,2	4,3	5,4

Estos resultados muestran claramente que los tabacos ARA9-PDH doblemente transformados con genes quiméricos que permiten la sobreexpresión de las enzimas PDH y HPPD poseen cantidades superiores de prenilquinonas, en particular tocoferoles y tocotrienoles, con relación a los tabacos PBD6-ARA9 transformados sencillamente con un gen que codifica una enzima HPPD. El efecto mayor se refiere a los tocotrienoles. Este efecto mucho más marcado en las hojas muy jóvenes en tejidos meristemáticos. El origen de esta especificidad de tejido está ligado al promotor utilizado para crear los tabacos ARA9-PDH, que es un promotor que se expresa preferiblemente en los tejidos en crecimiento rápido de las plantas, en particular los meristemas (PdH4). La utilización de otros tipos de promotores debería permitir obtener un efecto similar en otros tejidos de la planta.

Por otra parte, las diferencias observadas entre las diferentes líneas ARA9-PDH proceden del hecho de que se trata de eventos de transformación diferentes. Los cruzamientos entre las mejores líneas que aspiran a elaborar líneas homocigóticas deberían permitir obtener líneas homogéneas en cuanto a la producción de prenilquinonas y a la tolerancia a los inhibidores de HPPD.

REIVINDICACIONES

1. Plantas transformadas **caracterizadas porque** comprenden:
 - (1) un gen quimérico que comprende un promotor funcional en plantas y una secuencia que codifica una enzima pfeferato deshidrogenasa (PDH), con la excepción de la secuencia que codifica del gen TyrA de *Erwinia herbicola*,
 - 5 (2) un gen quimérico que comprende un promotor funcional en plantas y una secuencia que codifica una enzima piruvato de p-hidroxifenilo dioxigenasa (HPPD).
2. Células vegetales transformadas, **caracterizadas porque** comprenden:
 - (1) un gen quimérico que comprende un promotor funcional en plantas y una secuencia que codifica una enzima PDH, con la excepción de la secuencia que codifica del gen TyrA de *Erwinia herbicola*,
 - 10 (2) un gen quimérico que comprende un promotor funcional en plantas y una secuencia que codifica una enzima HPPD.
3. Plantas según la reivindicación 1, o células vegetales según la reivindicación 2, **caracterizadas porque** la secuencia que codifica una enzima PDH es la secuencia que codifica un gen que codifica una PDH de levadura.
4. Plantas o células vegetales según la reivindicación 3, **caracterizadas porque** la secuencia que codifica un gen que codifica una PDH de levadura es la secuencia que codifica un gen de *Saccharomyces cerevisiae*.
5. Plantas o células vegetales según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizadas porque** la secuencia que codifica una enzima HPPD es la secuencia que codifica un gen que codifica una HPPD de planta.
6. Plantas o células vegetales según la reivindicación 5, **caracterizadas porque** la secuencia que codifica un gen que codifica una HPPD de planta es la secuencia que codifica un gen de *Arabidopsis thaliana*.
7. Procedimiento de cultivo de plantas transformadas según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** consiste en plantar los granos de dichas plantas transformadas en una superficie de un campo apropiado para el cultivo de dichas plantas, en aplicar sobre dicha superficie de dicho campo al menos una composición herbicida que comprende un inhibidor de HPPD y después en recoger las plantas cultivadas cuando llegan a la madurez deseada, y eventualmente en separar los granos de las plantas recogidas.
8. Procedimiento para conferir a plantas tolerancia a inhibidores de HPPD, **caracterizado porque** se transforman dichas plantas, simultánea o sucesivamente, con:
 - (1) un gen quimérico que comprende un promotor funcional en plantas y una secuencia que codifica una enzima PDH,
 - (2) un gen quimérico que comprende un promotor funcional en plantas y una secuencia que codifica una enzima HPPD.
9. Procedimiento para aumentar la cantidad de prenilquinonas en plantas, caracterizado porque se transforman dichas plantas, simultánea o sucesivamente, con:
 - (1) un gen quimérico que comprende un promotor funcional en plantas y una secuencia que codifica una enzima PDH, con la excepción de la secuencia que codifica el gen TyrA de *Erwinia herbicola*,
 - (2) un gen quimérico que comprende un promotor funcional en plantas y una secuencia que codifica una enzima HPPD.
10. Procedimiento de producción de prenilquinonas, **caracterizado porque** comprende una etapa de puesta en cultivo de una célula vegetal o de una planta transformada según una de las reivindicaciones 1 a 6 en un medio de cultivo adaptado al crecimiento y la multiplicación de dicha célula vegetal o de dicha planta.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 o 10, **caracterizado porque** las prenilquinonas son tocotrienoles.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 o 10, **caracterizado porque** las prenilquinonas se representan por la vitamina E.
13. Plantas o células vegetales según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizadas porque** comprenden, además, un gen quimérico que comprende un promotor funcional en plantas y una secuencia que codifica una enzima geraniilgeranilo reductasa (GGR).

14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 8 o 9, **caracterizado porque** se transforman dichas plantas, simultánea o sucesivamente, con un gen quimérico además que comprende un promotor funcional en plantas y una secuencia que codifica una enzima GGR.