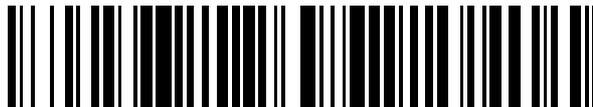


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 868**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03790354 .9**
- 96 Fecha de presentación: **05.12.2003**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1589807**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.11.2005**

54 Título: **Plantas de piña transgénicas que presentan concentraciones modificadas de carotenoides y procedimiento de fabricación**

30 Prioridad:
06.12.2002 US 431323 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.03.2012

73 Titular/es:
**DEL MONTE FRESH PRODUCE COMPANY
241 SEVILLA AVENUE
CORAL GABLES, FL 33134, US**

72 Inventor/es:
**YOUNG, Thomas, R. y
FIROOZABADY, Ebrahim**

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

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).

ES 2 376 868 T3

DESCRIPCIÓN

Plantas de piña transgénicas que presentan concentraciones modificadas de carotenoides y procedimiento de fabricación

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 [0001] Varias frutas y verduras contienen una serie de fitoquímicos que contribuyen a la buena salud. Algunos estudios epidemiológicos, clínicos, y de laboratorio sugieren que varios carotenoides reducen la ocurrencia de enfermedades crónicas, incluyendo las enfermedades coronarias del corazón (Barton-Duell (1995) Endocrinologist, 5:347-356), algunos cánceres (Giovannucci (1999) J. Natl. cancer Inst., 91:317-331), y la degeneración macular debida a la edad (Seddon et al. (1994) J. Am. J. Med. Assoc., 272:1413-1420). Así, la
10 modulación de biosíntesis de carotenoides en plantas por manipulación genética debería afectar a la calidad nutricional de la cosecha.

[0002] Las plantas de piña (*Ananas comosus* de la familia Bromeliaceae) son plantas tropicales monocotiledóneas que tienen espinas rígidas con bordes curvados y hojas y tallos cortos con cabezas alargadas densas de pequeñas flores abortadas. El fruto de muchas variedades de plantas de piña se utiliza para el
15 consumo humano. Algunas de estas variedades incluyen la Cayena Lisa, Roja Española, Perolera, Pernambuco, y Primavera. La planta es auto-incompatible, con largos períodos de tiempo entre las generaciones sucesivas de frutas. Como consecuencia, la cría convencional para mejorar la calidad de la fruta y otras características agronómicas ha resultado difícil.

[0003] De la discusión anterior, es evidente que las plantas transgénicas de piña con niveles de carotenoides modificados son deseables. En particular, las plantas de piña con niveles elevados de carotenoides en los tejidos de la fruta mejorarían la calidad nutricional de este importante cultivo. Además, las plantas de piña transformadas genéticamente con coloración alterada son deseables, entre otros, para la diferenciación del producto. Estas y una variedad de otras características de la presente invención se harán evidentes después del examen completo de la siguiente descripción.

25 RESUMEN DE LA INVENCION

[0004] La presente invención se refiere a la carotenogénesis en las plantas de piña. Más específicamente, esta invención proporciona procedimientos para la transformación genética de células y plantas de piña con reguladores de expresión que modulan la biosíntesis de carotenoides en células o plantas; en particular, la invención proporciona procedimientos para controlar la acumulación de carotenoides en las células de piña, además de procedimientos para alterar la coloración de la planta de piña, especialmente de coloración de tejidos de frutas tal como se define en las reivindicaciones. Por otra parte, la invención proporciona células de piña, que incluyen reguladores de expresión de polipéptidos de biosíntesis de carotenoides introducidos para el control de la acumulación de carotenoides en las células, y también plantas de piña que se regeneran a partir de las piñas tal como se define en las reivindicaciones.

[0005] En un aspecto, la invención se refiere a procedimientos para controlar la acumulación de carotenoides en por lo menos una célula de piña (por ejemplo, una célula embriogénica, una célula organogénica, una célula de callos embriogénicos, una célula de callo organogénica, o similares) tal como se define en las reivindicaciones. Los procedimientos incluyen la introducción de al menos un regulador de la expresión de polipéptidos de biosíntesis de carotenoides en la célula de la piña. El regulador de expresión de polipéptidos de la biosíntesis de carotenoides controla la acumulación de carotenoides en la célula de piña, aumentando o disminuyendo la acumulación de carotenoides en la célula de piña con respecto a la acumulación de carotenoides en una célula de piña que carece de reguladores de la expresión de polipéptidos de biosíntesis de carotenoides. En ciertas realizaciones, la célula de piña es una célula organogénica producida mediante el cultivo de al menos una célula meristémica (por ejemplo, una célula meristémica no apical, etc.) En algunas de estas realizaciones, el cultivo comprende cultivar la célula meristémica para producir al menos un brote, y el cultivo de al menos un explante del brote para producir la célula organogénica.

[0006] Los procedimientos para controlar la acumulación de carotenoides en la célula de al menos una piña incluyen opcionalmente además la regeneración de por lo menos una planta de la piña a partir de la célula de piña (por ejemplo, una célula embriogénica, una célula organogénica, etc.) En ciertas realizaciones, por ejemplo, la célula de piña incluye una población de células de piña y los procedimientos incluyen además: (i) la selección de uno o más miembros de la población de células de piña, que incluyen el regulador expresión de polipéptidos de biosíntesis de carotenoides, (ii) la regeneración de una o más plantas de piña a partir de los miembros, y, (iii) la selección de las plantas de piña con acumulación de carotenoides alterada con respecto a una acumulación de carotenoides en una planta de piña que carece de regulador de la expresión de polipéptidos de la biosíntesis de carotenoides. En algunas realizaciones, la acumulación de carotenoides alterada es sustancialmente específica

de tejidos de la fruta de las plantas de piña. Los procedimientos también incluyen opcionalmente además micropropagar plantas de piña.

5 **[0007]** Según otro aspecto, la presente invención se refiere a procedimientos de alteración de la coloración de piña planta tal como se definen en las reivindicaciones. Los procedimientos incluyen la introducción de al menos un regulador de expresión de polipéptido de biosíntesis de carotenoides en por lo menos una planta de piña en la que el regulador de la expresión de polipéptidos de biosíntesis de carotenoides controla la acumulación de al menos un carotenoide coloreado (licopeno) en la planta de piña para alterar la coloración de la planta de piña. Es decir, el regulador de expresión de polipéptidos de biosíntesis de carotenoides aumenta la acumulación de licopeno de carotenoide coloreado de una planta de piña en relación con la acumulación de carotenoides coloreados en una planta de piña que carece de regulador de la expresión de polipéptidos de biosíntesis de carotenoides. Por lo general, los reguladores de expresión de polipéptidos de biosíntesis de carotenoides se introducen en al menos una célula de una piña a partir de la cual se regenera la planta de piña. En algunas realizaciones, la coloración alterada es sustancialmente específica de los tejidos del fruto de la planta de la piña. Opcionalmente, estos procedimientos incluyen además micropropagar la planta de la piña.

15 **[0008]** Según otro aspecto adicional, la presente invención proporciona una célula de la piña (por ejemplo, una célula embriogénica, una célula organogénica, una célula de callos embriogénicos, una célula de callo organogénica, o similares) que incluyen al menos un regulador de expresión polipéptido de biosíntesis de carotenoides introducido tal como se define en las reivindicaciones. El regulador de expresión de polipéptidos de biosíntesis de carotenoides aumenta o disminuye la acumulación de carotenoides en la célula de la piña en relación con la acumulación de carotenoides en una célula de piña que carece de regulador de expresión de polipéptidos de biosíntesis de carotenoides. La invención también proporciona una planta de piña que se regenera a partir de la célula de piña tal como se define en las reivindicaciones.

20 **[0009]** Los reguladores de la expresión de un polipéptido de biosíntesis de carotenoide de la invención son moléculas orgánicas (por ejemplo, ADN, ARN, etc).

25 **[0010]** Los reguladores de expresión de polipéptidos de biosíntesis de carotenoides incluyen diferentes formas de realización que realizan de diversas maneras la acumulación de carotenoides en células y plantas de piña transgénicas de la presente invención. En particular, los reguladores de expresión de polipéptidos de biosíntesis de carotenoides incluyen al menos un segmento de ácido nucleico sentido o antisentido que corresponde a por lo menos una porción de al menos un gen del polipéptido de biosíntesis de carotenoides endógenos. Los segmentos de ácido nucleico de sentido y antisentido pueden utilizarse, por ejemplo, para suprimir la expresión de una enzima de biosíntesis de carotenoides seleccionada de la vía de biosíntesis de carotenoides para realizar la acumulación de carotenoides que son sustratos de la enzima suprimida.

30 **[0011]** Los reguladores de la expresión de un polipéptido de biosíntesis de carotenoide se introducen en las células de plantas de piña mediante la utilización de prácticamente cualquier técnica de liberación. En algunas realizaciones, por ejemplo, los reguladores de expresión de polipéptidos de biosíntesis de carotenoides incluyen al menos un segmento de ácido nucleico que se introduce en células o tejidos de piña mediante liberación mediada por *Agrobacterium*. En otras realizaciones, los reguladores de expresión de polipéptidos de biosíntesis de carotenoides incluyen al menos un segmento de ácido nucleico que se introduce en células o plantas de piña empleando al menos una de las técnicas de liberación de ácidos nucleicos seleccionadas, por ejemplo, liberación mediada por polen, transferencia directa de ácido nucleico a por lo menos un protoplasto de la célula de piña, el bombardeo con microproyectiles, la microinyección, macroinyección de inflorescencia, impregnación mediada por whiskers, perforación por láser, ultrasonidos, etc En ciertas realizaciones, los reguladores de la expresión de un polipéptido de biosíntesis de carotenoide se inyectan en las plantas de piña.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

45 **[0012]** Las figuras 1A-C muestran esquemáticamente algunos aspectos de una vía de biosíntesis de carotenoide.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. DEFINICIONES

50 **[0013]** Antes de describir la invención en detalle, se debe entender que esta invención no se limita a las realizaciones particulares. También se debe entender que la terminología empleada aquí tiene como propósito describir solamente las realizaciones particulares, y no pretende ser limitante. Las unidades, prefijos y símbolos se representan en la forma sugerida por el Sistema Internacional de Unidades (SI), a menos que se especifique lo contrario. Los rangos numéricos incluyen los números que definen la gama. Tal como se usa en esta descripción y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "a", "un/ una" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula", también incluye dos

- o más células (por ejemplo, en la forma de un tejido, etc), y similares. Además, a menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado entendido comúnmente por un experto en la materia a la que se refiere la invención. Los términos definidos a continuación, y variantes gramaticales de los mismos, están más plenamente definidos por referencia a la especificación en su totalidad.
- 5
- [0014]** El término "ácido nucleico" abarca cualquier cadena física de unidades de monómero que puedan corresponder a una cadena de nucleótidos, incluyendo un polímero de nucleótidos (por ejemplo, un típico ADN o ARN de polímero), PNA, oligonucleótidos modificados (por ejemplo, los oligonucleótidos que comprenden nucleótidos que no son típicos de ARN o ADN biológicos en solución, tales como oligonucleótidos metilados 2'-O-), y / o similares. Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, de hebra simple o doble. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular de esta invención incluye secuencias complementarias, además de la secuencia indicada expresamente. El término ácido nucleico se utiliza indistintamente para, por ejemplo, oligonucleótido, polinucleótido, gen, ADNc, RNAi, y mRNA codificado por un gen.
- 10
- [0015]** Una "secuencia de ácido nucleico" se refiere al orden y a la identidad de los nucleótidos en un segmento de ácido nucleico.
- 15
- [0016]** Un "polinucleótido" es un polímero de nucleótidos (A, C, T, U, G, etc, o de origen natural o análogos artificiales de nucleótidos) o una cadena de caracteres que representa un polímero de nucleótidos, dependiendo del contexto. Tanto el ácido nucleico dado como el ácido nucleico complementario se pueden determinar a partir de cualquier secuencia de polinucleótidos especificados.
- 20
- [0017]** Dos ácidos nucleicos "se corresponden" cuando tienen la misma secuencia, o cuando un ácido nucleico es complementario del otro, o cuando un ácido nucleico es una subsecuencia del otro, o cuando una secuencia se deriva de otra, por manipulación natural o artificial.
- 25
- [0018]** El término "gen" se utiliza ampliamente para referirse a cualquier segmento de un ácido nucleico asociado con una función biológica. Así, los genes son secuencias de codificación y, opcionalmente, secuencias reguladoras necesarias para su expresión. Los genes también incluyen opcionalmente ADN no expresado o segmentos de ARN que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento para otras proteínas. Los genes pueden ser obtenidos a partir de una variedad de fuentes, incluyendo la clonación de una fuente de interés o la síntesis de la información de la secuencia conocida o prevista, y puede incluir secuencias diseñadas para tener los parámetros deseados.
- 30
- [0019]** El término "segmento de ácido nucleico" se refiere a un polinucleótido o a un análogo transcribible de este, de al menos 25 nucleótidos de longitud, usualmente de al menos 100 nucleótidos de longitud, generalmente de al menos 200 nucleótidos de longitud, típicamente de al menos 300 nucleótidos de longitud, más típicamente de al menos 400 nucleótidos de longitud, y lo más típicamente de al menos 500 nucleótidos de longitud. Para ilustrarlo, un segmento de ácido nucleico puede incluir un gen de larga duración (por ejemplo, un gen que codifica a un polipéptido de biosíntesis de carotenoides, como la fitoeno sintasa o similares), o una subsecuencia del dicho gen.
- 35
- [0020]** El término "ADN-T" se refiere a un segmento de ácido nucleico que se puede movilizar y transferir de un Agrobacterium a una célula vegetal para introducir de este modo el segmento de ácido nucleico en la célula vegetal.
- 40
- [0021]** El término "vinculado" se refiere generalmente a los segmentos de ácido nucleico que son contiguos entre sí y, cuando sea necesario para unir dos regiones de aminoácidos de codificación, contiguas y en el mismo marco de lectura. El término "vinculado" también incluye ácidos nucleicos que de co-segregan entre sí. Además, el término "unido operativamente" o "ligado operativamente" se refiere a un vínculo funcional entre dos o más segmentos de ácidos nucleicos. Por ejemplo un promotor y un segmento de ácido nucleico que codifica un polipéptido están operativamente unidos cuando la secuencia del promotor se inicia y sirve de mediador en la transcripción de los segmentos de ácido nucleico.
- 45
- [0022]** El término "regulador de expresión de la biosíntesis de carotenoides polipéptidos" se refiere a una molécula orgánica o inorgánica que afecta directa o indirectamente la biosíntesis de carotenoides en las células en las que se introduce. Por ejemplo, un regulador de expresión de polipéptidos de biosíntesis de carotenoides puede ser un segmento de ácido nucleico que codifica un polipéptido de biosíntesis de carotenoides que aumenta la acumulación de carotenoides en las células en las que se introduce y se expresa.
- 50
- [0023]** El término "expresión" se refiere a la transcripción y a la acumulación de segmentos de ácido nucleico sentido (ARNm) o antisentido ARN derivados de la invención. La expresión puede referirse también a la traducción del ARNm en un polipéptido, por ejemplo, un polipéptido de biosíntesis de carotenoides. En algunas realizaciones de la invención, por ejemplo, los polipéptidos de biosíntesis de carotenoides se expresan en

- 5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
- órganos de almacenamiento de la planta preseleccionada, tales como raíces, semillas, frutas, etc, dando lugar a una mayor acumulación de uno o más carotenoides (por ejemplo, los carotenoides producidos naturalmente) en este órgano de almacenamiento de la planta. En consecuencia, el término "fruto específicos de la expresión" se refiere a la expresión de, por ejemplo, polipéptidos de biosíntesis de carotenoides introducidos que se limitan sustancialmente a los tejidos de la fruta de las plantas de piña de la invención, por ejemplo, para provocar una acumulación alterada de carotenoides que es "sustancialmente específica de los tejidos del fruto" de las plantas de piña transformada.
- [0024]** El término "promotor" se refiere a un sitio de reconocimiento de una secuencia de ADN o de un grupo de secuencias de ADN que proporciona un elemento de control de la expresión de un gen al cual la ARN polimerasa se une específicamente e inicia la síntesis de ARN (transcripción) de ese gen. El término "promotor constitutivo" se refiere a un promotor no regulado que permite la transcripción continua de un gen asociado. El término "promotor inducible" se refiere a un promotor regulado que permite la transcripción de un gen asociado en presencia de otra sustancia o inductor, como por ejemplo una molécula extracelular (por ejemplo, un sustrato de una enzima que es codificada por el gen).
- [0025]** El término "marcador genético" incluye la referencia a un gen cuya expresión permite identificar las células que comprenden al gen marcador, tal como un segmento de ácido nucleico (por ejemplo, un T-DNA) que incluye el gen marcador, además de un polipéptido codificado. Para ilustrar esto, un producto del gen marcador seleccionable puede conferir resistencia a los herbicidas en las células transformadas de manera que, tras la exposición de una población de células a una cantidad efectiva del herbicida, sólo aquellas células que han sido transformadas sigan siendo viables.
- [0026]** El término "segmento de ácido nucleico sentido" se refiere generalmente a un segmento de ácido nucleico que codifica. En contraste, el término "segmento de ácido nucleico antisentido" se refiere normalmente a un complemento de un segmento de ácido nucleico sentido.
- [0027]** El término "factor de transcripción" se refiere a cualquier otro factor que controla el proceso de transcripción (es decir, la realización de una copia de ARN de un segmento de ADN). Habitualmente, se trata de una proteína enzimática o de otro tipo, una coenzima, la vitamina A, u otra molécula orgánica.
- [0028]** El término "potenciador" se refiere a una secuencia de ADN que influye positivamente en la expresión de un gen, incluso si el potenciador se coloca a cierta distancia de ese gen.
- [0029]** Dos ácidos nucleicos están "recombinados" cuando las secuencias de cada uno de los dos ácidos nucleicos se combinan en un ácido nucleico de progenie.
- [0030]** Un segmento de ácido nucleico "se integra establemente" en el genoma de una planta o célula de piña cuando no se introduce transitoriamente en ese genoma. Por ejemplo, un segmento de ácido nucleico heterólogo que se incorpora de forma permanente en un cromosoma de la piña está integrado de forma estable en el genoma de la célula o planta de piña correspondiente.
- [0031]** El término "transformación" se refiere a la transferencia o introducción de un segmento de ácido nucleico en una planta o en una célula vegetal, que la introducción tenga como resultado la herencia genética estable del segmento de ácido nucleico o solamente una presencia transitoria del segmento de ácido nucleico en el genoma de la planta o de la célula vegetal. A las células o plantas de piña que incluyen los segmentos de ácidos nucleicos transformados se las conoce como células o plantas de piña "transgénicas", "recombinantes" o "transformadas".
- [0032]** Una secuencia de polinucleótidos, tal como un segmento de ácido nucleico, es "heteróloga" a un organismo o a una segunda secuencia de polinucleótidos, si proviene de otra especie, o si, proviniendo de la misma especie, se ha modificado desde su forma original o nativa. Por ejemplo, un promotor unido operativamente a una secuencia de codificación heteróloga se refiere a una secuencia codificante de una especie diferente de la cual deriva el promotor, o, si es de la misma especie, se refiere a una secuencia de codificación diferente de variantes alélicas de origen natural.
- [0033]** Los ácidos nucleicos son "homólogos" cuando se derivan, naturalmente o artificialmente, de una secuencia ancestral común. La homología se infiere a menudo a partir de la similitud de secuencia entre dos o más ácidos nucleicos. Esto se produce naturalmente cuando dos o más secuencias descendientes se desvían con el tiempo de una secuencia ancestral común como resultado de la mutación y de la selección natural. Las secuencias artificialmente homólogas se pueden generar de varias maneras. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico se puede sintetizar *de novo* para producir un ácido nucleico que difiere en la secuencia de una secuencia padre seleccionada de ácidos nucleicos. La homología artificial también se puede crear recombinando artificialmente una secuencia de ácido nucleico con otra, como ocurre, por ejemplo, durante la clonación o la mutagénesis química, para producir un ácido nucleico descendiente homólogo. La homología artificial se puede crear también

usando la redundancia del código genético para ajustar de forma sintética algunas o todas las secuencias codificantes entre ácidos nucleicos diferentes de manera diferente, con el fin de aumentar la frecuencia y la longitud de tramos altamente similares de ácidos nucleicos y al mismo tiempo reducir al mínimo los cambios resultantes en secuencias de aminoácidos de los productos génicos codificados. Preferiblemente, esta homología tan artificial se propone aumentar la frecuencia de tramos idénticos de secuencia de al menos tres pares de bases en longitud. Más preferiblemente, se propone aumentar la frecuencia de tramos idénticos de secuencia de al menos cuatro pares de bases en longitud. Generalmente, se supone que dos ácidos nucleicos tienen una ascendencia común cuando demuestran una similitud de secuencias. Sin embargo, el nivel exacto de la similitud de secuencias necesaria para establecer una homología varía en el estado de la técnica. En general, para los fines de esta descripción, dos secuencias de ácidos nucleicos se consideran homólogas cuando comparten una identidad de secuencia suficiente para permitir que se produzca una recombinación directa entre las dos secuencias, es decir, en cualquier lugar a lo largo de las dos secuencias.

[0034] El término "codificación" se refiere a una secuencia de polinucleótidos que codifica a uno o más aminoácidos. El término no requiere un codón de inicio o de parada. Una secuencia de aminoácidos se puede codificar en un marco de lectura proporcionado por una secuencia de polinucleótidos.

[0035] El término "vector" se refiere a un elemento extra-cromosómico capaz de replicarse en una célula y / o para el cual otros segmentos de ácido nucleico pueden ser operativamente enlazados con el fin de lograr la reproducción de esos segmentos. Estos elementos pueden ser secuencias de replicación autónoma, secuencias integrando el genoma, secuencias de fago o nucleótidos, lineales o circulares, de ADN o ANN de una sola o de doble hebra, que deriven de cualquier fuente, en la que una serie de secuencias de nucleótidos se han unido o recombinado en una construcción capaz de introducir segmentos de ácido nucleico (por ejemplo, que incluyen uno o más promotores y uno o más genes que codifican a las enzimas carotenoides biosintéticas) junto con las correspondientes secuencias 3' sin traducir dentro de una célula. Un plásmido es un ejemplo de vector. Los vectores o sistemas de vectores (por ejemplo, los sistemas de vectores binarios, sistemas de vectores trinaros, o similares) pueden incluir elementos además de, por ejemplo, un gen que codifican una enzima de biosíntesis de carotenoides, como las que facilitan la transformación de una célula o una planta de piña, aquellas que permiten una mayor expresión de los genes incluidos (por ejemplo, los promotores) en las células transformadas de piña, los que facilitan la selección de células transformadas de piña (por ejemplo, marcadores de selección, genes informantes, etc), o similares. El término "vector de expresión" se refiere a un elemento extra-cromosómico capaz de regular la expresión de un gen (por ejemplo, un gen que codifica un polipéptido de biosíntesis de carotenoides), cuando está operativamente vinculado con el gen dentro del vector.

[0036] Los términos "polipéptido" se refieren a un polímero que comprende dos o más residuos de aminoácidos (por ejemplo, un péptido o una proteína). El polímero puede contener, además, elementos no-aminoácidos tales como etiquetas, extintores, grupos de bloqueo, o similares, y puede incluir opcionalmente modificaciones tales como glicosilación o similares. Los residuos aminoácidos del polipéptido pueden ser naturales o no naturales y pueden estar no-sustituídos, no-modificados, sustituidos o modificados.

[0037] El término " polipéptido de biosíntesis de carotenoides " se refiere a un biocatalizador o enzima que cataliza al menos un paso en la vía de biosíntesis de carotenoides. Los polipéptidos de biosíntesis de carotenoides incluyen, por ejemplo, geranilgeranil pirofosfato sintasas, isopentenil difosfato isomerasas, fitoeno sintasas, fitoeno desaturasas, ξ -caroteno desaturasas, licopeno β ciclasas, ϵ - licopeno ciclasas, β caroteno hidroxilasas, ϵ - hidroxilasas, y similares.

[0038] Una "secuencia de polipéptido" se refiere al orden y a la identidad de los aminoácidos en un polipéptido.

[0039] El término "polipéptido de biosíntesis de carotenoides artificialmente evolucionado" se refiere a un catalizador de proteína o enzima (por ejemplo, una fitoeno-sintasa o similares) creados con una o más técnicas de generación de diversidad. Por ejemplo, los polipéptidos de biosíntesis de carotenoides artificialmente evolucionados empleados en la práctica de la presente invención se producen opcionalmente por recombinación (por ejemplo, a través de la recombinación recursiva o similares) de dos o más ácidos nucleicos que codifican a uno o más polipéptidos de biosíntesis de carotenoides padres, o mediante la mutación de uno o más ácidos nucleicos que codifican a polipéptidos de biosíntesis de carotenoides (por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis de casete, mutagénesis aleatoria, mutagénesis de conjunto recursiva, o similares). Un ácido nucleico que codifica un polipéptido de biosíntesis de carotenoides padre incluye un polinucleótido o un gen que, a través de los mecanismos de transcripción y de traducción, produce una secuencia de aminoácidos correspondiente a un polipéptido de biosíntesis de carotenoides, por ejemplo, una sintasa no artificialmente evolucionada o una fitoeno sintasa producida naturalmente. El término, "polipéptido de biosíntesis de carotenoide artificialmente evolucionado" abarca también las enzimas químicas que incluyen secuencias de componentes identificables (por ejemplo, los dominios funcionales, etc) derivados de dos o más padres. Los polipéptidos de biosíntesis de carotenoides artificialmente evolucionados empleados en la práctica de la presente invención son

típicamente evolucionados, por ejemplo, para conseguir productos de una mayor eficacia que los polipéptidos de biosíntesis de carotenoides producidos naturalmente.

5 [0040] El término "endógeno" se refiere a una sustancia producida de forma nativa o sintetizada dentro de un organismo o sistema. En una planta o célula de piña, por ejemplo, un gen endógeno de polipéptido de biosíntesis de carotenoides se produce de forma nativa (por ejemplo, se expresa) dentro de la planta o célula.

10 [0041] Los términos "idénticos" o " identidad" de porcentaje, en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico o polipéptido, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o que tienen un porcentaje específico de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son los mismos, cuando se comparan y se alinean para una correspondencia máxima, que se mide utilizando algoritmos de comparación de secuencias o por inspección visual.

15 [0042] Una región de "alta similitud de secuencia" se refiere a una región que es de 90% o más idéntica a una segunda región seleccionada cuando se alinean para una correspondencia máxima (por ejemplo, de forma manual o utilizando el programa común BLAST para establecer los parámetros por defecto). Una región de " baja similitud de secuencias" es idéntica en 30% o menos, con mayor preferencia idéntica en 40% o menos con respecto a la segunda región seleccionada, cuando se alinean para una correspondencia máxima (por ejemplo, manualmente o utilizando el conjunto BLAST con parámetros por defecto).

20 [0043] La frase "sustancialmente idénticas", en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos el 60%, preferiblemente el 80%, más preferentemente el 90-95% de identidad de residuo de nucleótidos o de aminoácido, cuando se comparan y se alinean para una correspondencia máxima, y se mide mediante, por ejemplo, un algoritmo de comparación de secuencias o por inspección visual. Preferiblemente, la identidad sustancial existe en una región de las secuencias que tenga al menos acerca de 50 residuos de longitud, con mayor preferencia en una región de por lo menos acerca de 100 residuos, y con la mayor preferencia las secuencias son sustancialmente idénticas en una región de al menos acerca de 150 residuos. En algunas realizaciones, las secuencias son sustancialmente idénticas en toda la longitud de las regiones codificantes.

25 [0044] Un "subsecuencia" o "fragmento" es cualquier parte de toda una secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos.

[0045] El término "genoma" se refiere a los ácidos nucleicos de los cromosomas de un organismo. Como se usa aquí, el genoma incluye también el genoma de plástidos (por ejemplo, el genoma del cloroplasto, etc.)

30 [0046] El término "Agrobacterium" se refiere a las especies, subespecies o variedades de la bacteria Agrobacterium que son capaces de movilizar y de transferir de forma selectiva y el T-ADN en una célula vegetal, tal como una célula de piña. Por ejemplo, el Agrobacterium es opcionalmente un *Agrobacterium rhizogenes*, pero más comúnmente es un *Agrobacterium tumefaciens*.

35 [0047] El término "células embriogénicas" se refiere a una célula de tejido embriogénico o de callos embriogénicos.

[0048] El término "callos embriogénicos" se refiere a un tejido o a células que no se diferencian y que no tienen una estructura significativa, pero que tienen el potencial para formar un tejido más diferenciado (por ejemplo, tejido embriogénico) que puede producir embriones y germinar en las plantas.

40 [0049] El término "tejido embriogénico" se refiere a los tejidos con estructuras organizadas que incluyen embriones somáticos inmaduros. Los embriones somáticos inmaduros se pueden madurar mediante su cultivo en un medio de maduración. Los embriones somáticos maduros se pueden desarrollar en las plantas mediante su traslado en un medio de germinación. Un embrión somático maduro es una estructura derivada en última instancia de células somáticas que se asemeja a un embrión cigótico en cuanto a su morfología y a su desarrollo, y que es capaz de germinar en una plántula con los dos polos raíces y brotes, cuando se transfiere en un medio de crecimiento adecuado. Una "célula somática", es una célula de un organismo multicelular que no sea los gametos.

[0050] El término "célula organogénica" se refiere a una célula de un tejido organogénico.

[0051] El término "callo organogénico" se refiere a un tejido con una masa irregular de células relativamente indiferenciadas, que puede provenir de, por ejemplo, una célula organogénica simple en un cultivo de tejido.

50 [0052] El término "tejido organogénico" se refiere a un tejido que es capaz de ser inducido a someterse a la organogénesis, es decir, para formar un órgano de planta, tal como un brote, que se podrá inducir luego a desarrollar raíces para producir una planta completa.

[0053] El término "meristema" se refiere a un tejido formativo de una planta que comprende células capaces de dividirse y de dar lugar a células similares o a células que se diferencian para producir tejidos y órganos.

[0054] El término "célula meristémica" se refiere a una célula de un meristema de planta.

5 [0055] El término "célula meristémica no-apical" se refiere a una célula meristémica que no proviene de un meristema apical, pero que puede provenir de meristemas laterales o axilares y de células que mediante el cultivo de un explante de meristema no-apical se han convertido en meristémicas.

[0056] El término "planta de piña" se refiere a una planta de la familia Bromeliaceae, por ejemplo, Ananas comosus. El término "célula de piña" se refiere a una célula de una planta de piña.

10 [0057] El término "regeneración" de una planta de piña se refiere a la formación de una planta de piña que incluye un brote provisto de raíces.

[0058] El término "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad suficiente para conseguir el resultado deseado, como puede ser la producción de un callo o de un tejido embriogénico o organogénico.

[0059] El término "carotenoides" se refiere a la clase caroteno de los hidrocarburos y a sus derivados oxigenados (es decir, las xantofilas).

15 [0060] El término "vía de biosíntesis de carotenoides" o "carotenogénesis" se refiere a la combinación de actividades catalizadoras, por lo general mediante enzima, que tienen como resultado la producción de uno o más carotenoides.

20 [0061] El término "selección" se refiere a un proceso en el cual una o más plantas o células se identifican por una o más propiedades de interés, por ejemplo, un marcador genético, niveles de carotenoides aumentados o disminuidos, color alterado, etc. Por ejemplo, un proceso de selección puede incluir la colocación de organismos en condiciones en las cuales su crecimiento con un genotipo particular estará favorecido. Para ilustrar, se puede cribar una población para determinar una o más propiedades de uno o más miembros de la población. Si a uno o a más miembros de la población son identificados como poseedores de una propiedad de interés, se seleccionan. La selección puede incluir el aislamiento de un miembro de una población, pero esto no es necesario. Además, la selección y la criba pueden ser simultáneas, lo que ocurre a menudo.

25 [0062] El término "cribado" (*screening*) se refiere a un proceso de separación de una población en diferentes grupos. Los procesos de cribado suelen incluir la determinación de una o más propiedades de una o de más plantas o células. Por ejemplo, los procesos típicos de cribado incluyen aquellos en los que se determinan una o más propiedades de uno o más miembros de una o más poblaciones.

30 [0063] Una "población" se refiere a una colección de al menos dos células o plantas diferentes.

II. RESUMEN GENERAL

35 [0064] La presente invención se refiere a procedimientos para transformar genéticamente células y plantas de piña. La piña transgénica de la invención presenta, entre otras cosas, la mejora de las cualidades nutricionales con respecto a las variedades ya existentes. Más específicamente, la invención proporciona células y plantas de piña transformadas genéticamente obtenidas mediante la introducción selectiva de reguladores expresión de polipéptidos de biosíntesis de carotenoides exógenos en las células o plantas. Los reguladores de expresión de polipéptidos de biosíntesis de carotenoides controlan la acumulación de carotenoides en las células de piña y en algunas realizaciones, también la coloración de las células. Además de modificar los niveles de carotenoides, también se pueden modificar otros rasgos de interés para los consumidores, como la dulzura de fruta, acidez, textura y características de maduración de acuerdo con los procedimientos aquí descritos. También se pueden modificar en las células y las plantas de la invención otras características agronómicas tales como una mayor resistencia a las enfermedades bacterianas, una mejor resistencia a enfermedades virales, y / o una mayor resistencia a insectos y nematodos.

45 [0065] En algunas modalidades, los procedimientos de la invención incluyen el uso de material de explante de piña adecuado, que es transformado genéticamente poniendo en contacto el material de explante con células de *Agrobacterium*. Las células de *Agrobacterium* median la transferencia de segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, que codifican polipéptidos de biosíntesis de carotenoides, en las células de piña. también se utilizan opcionalmente Otras técnicas para suministrar reguladores de la expresión de un polipéptido de biosíntesis de carotenoide a las células o plantas. La presente invención también proporciona medios de cultivo adecuados para las etapas de inducir la formación de células embriogénicas u organogénicas para el co-cultivo con células de *Agrobacterium*. En ciertas realizaciones, por ejemplo, se seleccionan células embriogénicas transformadas y los

embriones se forman a partir de estas. Los embriones se pueden germinar para formar brotes y raíces para producir plantas completas.

5 [0066] También se utilizan de forma opcional varios enfoques organogénicos para la transformación y regeneración de plantas de piña. Por ejemplo, la invención se refiere a procedimientos para producir células transformadas de la piña, que incluyen el cultivo de células meristémicas de piña (por ejemplo, células meristémicas no apicales, etc) para producir células de piña organogénicas. Estos procedimientos también incluyen la introducción de reguladores de la expresión de un polipéptido de biosíntesis de carotenoide en las células de piña organogénica para producir células de piña organogénicas transformadas. Para ilustrarlo mejor, la invención se refiere también a procedimientos de producción de las células de piña transformadas, que incluyen el cultivo de células de piña meristémicas para producir brotes. Estos procedimientos incluyen el cultivo de explantes de brotes para producir células de piña organogénicas. Estos explantes pueden comprender células de piña meristémicas no apicales. Además, estos procedimientos también incluyen la introducción de reguladores de la expresión de un polipéptido de biosíntesis de carotenoides en las células de piña organogénica para producir células de piña organogénicas transformadas. Estos procedimientos organogénicos incluyen además típicamente la regeneración de plantas a partir de células de piña organogénicas transformadas. Todos estos y otros aspectos de la presente invención se describen a continuación.

III. CAROTENOIDES

20 [0067] La Coloración, y / o acumulación de carotenoides en las células de piña se controla mediante el control de la expresión de carotenoides en las células. Los carotenoides son una clase de hidrocarburos (carotenos) y sus derivados oxigenados (xantofilos). Cada uno de estos terpenoides de 40 átomos de carbono (C40) incluye ocho unidades isopreno (C5) unidas en las que se invierte la disposición de las unidades de isoprenoides en el centro de la molécula de modo que los dos grupos metilo centrales están en una relación de posición 1,6 y el resto de los grupos metilo no terminales se encuentran en una relación de posición 1,5. Los carotenoides, tales como α caroteno, β caroteno, apocarotenal (β apo-8'-carotenal), licopeno (ψ , ψ -caroteno) y cantaxantina (4,4'-diceto- β caroteno) se utilizan ampliamente como agentes colorantes de alimentos, y muchos carotenoides presentan actividad pro-vitamina A. Se utilizarán nombres triviales y abreviaturas a lo largo de esta descripción, dando típicamente nombres semi-sistemáticos recomendados por la IUPAC entre paréntesis después de mencionar primero un nombre común.

30 [0068] Los carotenoides en plantas son isoprenoides formados por la vía independiente de mevalonato, que es responsable de la síntesis de difosfato isopentenil en plastidios (Fraser et al. (2002) " Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:1092-1097). El difosfato geranylgeranil, derivado de la vía isoprenoide ubicua, es el precursor de los carotenoides, además de los tocoferoles y la filoquinona. En particular, el difosfato de geranylgeranil se puede producir en las distintas reacciones que involucran difosfato isopentenil y, opcionalmente, el difosfato dimetilalil, el difosfato de geranilo, o el difosfato de farnesil. Las figuras 1A-C ilustran esquemáticamente los aspectos de la biosíntesis de carotenoides. Tal como se muestra, la dimerización del precursor con 20 átomos de carbono, geranylgeranil difosfato (I) a fitoeno (7,8,11,12,7',8',11',12'-octahidro- ψ , ψ -caroteno)(II) es la primera etapa omitida en la biosíntesis de carotenoides, catalizada por la enzima fitoeno sintasa (A). El fitoeno (II) es él mismo incoloro, pero es un precursor de carotenoides coloreados. Las próximas dos enzimas (fitoeno desaturasa (B) χ -caroteno desaturasa (C)) desaturasa fitoeno (II) a través de de la fitoflueno intermedia (7,7',8,8',11,12-hexahidro- ψ , ψ -carotene)(III), y ξ -caroteno (7,8,7',8'-tetrahidro- ξ , ξ -caroteno)(IV) a través de la neurosporene intermedia (7,8-dihidro- ξ , ξ -caroteno)(V), respectivamente.

45 [0069] El producto de la ξ -caroteno desaturasa (C) es licopeno (ψ , ψ -caroteno)(VI), puede ser a continuación sometido a ciclización a β caroteno (β , β caroteno)(IX) o α -caroteno (XII). El licopeno imparte el color rojo característico a varias frutas, tales como los tomates maduros. Tal como se muestra en la figura 1B, la ciclización de licopeno (VII) para obtener β caroteno (IX) ocurre a través de del γ -caroteno intermedio (VIII) en una reacción catalizada por licopeno β ciclasa (D). El β -caroteno se utiliza frecuentemente como colorante de productos, tales como la margarina y la mantequilla, como precursor para la producción de vitamina A, y se ha descubierto recientemente que tiene efectos preventivos determinados tipos de cánceres. La hidroxilación del β -caroteno catalizada por β caroteno hidroxilasa (E) produce zeaxantina (β , β caroteno-3,3'-diol)(X). La zeaxantina es un pigmento amarillo que se usa a menudo como colorante en la industria avícola. La figura 1C ilustra esquemáticamente la ciclización de licopeno (VII) para producir β -caroteno (XII) a través del δ -caroteno (ϵ , ψ -caroteno)(XI), que es catalizado por licopeno ϵ -ciclasa (F) y licopeno β ciclasa (D). La hidroxilación del β -caroteno (XII) para producir luteína (3,3'-dihidroxi- α -caroteno) (XIII) está catalizada por β -caroteno hidroxilasa (E) y ϵ -hidroxilasa (G). También se pueden incorporar diferentes ciclasas en la vía biosintética, lo cual lleva a diferentes patrones de ciclización y otras derivaciones de la estructura carotenoide se pueden lograr mediante otras enzimas aguas abajo.

[0070] En general, la vía para la biosíntesis de los carotenoides se ha estudiado en una variedad de organismos y la ruta de biosíntesis se ha dilucidado en organismos que van desde las bacterias hasta las plantas superiores. En las hojas, por ejemplo, los carotenoides están por lo general presentes en la grana de los cloroplastos donde proporcionan una función fotoprotectora. El beta-caroteno y la luteína son los carotenoides predominantes, estando presentes la violaxantina y la neoxantina en cantidades más pequeñas. Los carotenoides se acumulan en cromoplastos de pétalos de flores en desarrollo, por lo general con la desaparición de las clorofilas. Tal como ocurre en pétalos de flores, los carotenoides aparecen en los cromoplastos de frutas, ya que se desarrollan a partir de cloroplastos. Los carotenoides también se encuentran en cromoplastos de las raíces de la zanahoria y los tubérculos de patata. El β caroteno es el pigmento principal presente en la actualidad tanto en las zanahorias y las patatas dulces comerciales, con sólo pequeñas cantidades de xantofilas por lo general presentes. Ver, por ejemplo, Britton, "Biosynthesis of carotenoids," p. 133-182, in T. W. Goodwin (Ed.), Plant Pigments, academic Press, Inc. (1988).

[0071] Las investigaciones también han demostrado que la sobreexpresión o la inhibición de la expresión del gen de la sintasa de fitoeno de planta (Psy1) en plantas transgénicas pueden alterar los niveles de carotenoides en las frutas. Ve, por ejemplo, Bird et al. (1991) biotechnology 9:635-639; Bramley et al. (1992) Plant J. 2:343-349; y Fray et al. (1993) Plant Mol. Biol. 22:589-602. También se han clonado genes de carotenoides de biosíntesis a partir de una variedad de organismos incluidos el *Erwinia uredovora* (Misawa et al. (1990) J. Bacteriol. 172:6704-6712; *Erwinia herbicola* (Solicitud WO 91/13078, Armstrong et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 87: 9975-9979); *R. capsulatus* (Armstrong et al. (1989) Mol. Gen. Genet 216:254-268, Romer et al. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 196:1414-1421); y *Thermus thermophilus* (Hoshino et al. (1993) Appl. Environ. Microbiol. 59: 3150-3153).

[0072] También se describen carotenoides y carotenogénesis en, por ejemplo, Britton et al. (Eds.) Carotenoids: Spectroscopy, Vol. 1, Springer-Verlag (1995), Britton et al. (Eds.) Carotenoids: synthesis, Birkhäuser Verlag (1996), Britton et al. (Eds.) Carotenoids, Vol. 1a: isolation and analysis, Springer-Verlag (1995), Pfander et al. (Eds.) Key to Carotenoids, 2nd ed., Springer-Verlag (1987), Passwater et al. (Eds.) Beta-Carotene and other Carotenoids: The Antioxidant Family That Protects against Cancer and Heart Disease and Strengthens the Immune System, Keats Publishing, Inc. (1999), Bauerfeind (Ed.) Carotenoid as Colorants and Vitamin a precursors: Technological and Nutritional Applications, academic Press, Inc. (1981), Abelson et al. (Eds.) Carotenoids: Chemistry, Separation, Quantitation, and Antioxidation, Vol. 213, academic Press, Inc. (1992), y Abelson et al. (Eds.) Carotenoids: metabolism, Genetics, and Biosynthesis, Vol. 214, academic Press, Inc. (1993). Detalles adicionales relativos a los carotenoides se proporcionan en, por ejemplo, Bendich (1989) "Carotenoids and the immune response," J. Nutr., 119:112-115, Britton (1995) " Structure and properties of carotenoids in relation to function," FASEB J., 9:1551-1558, Di Mascio et al. (1989) " Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher," Arch. Biochem. Biophys., 274:532-538, Di Mascio et al. (1991) "Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, y tioles," Am. J. Clin. Nutr., 53:194S-200S, Mangels et al. (1993) " Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data," J. Am. Diet. Assoc., 93:284-296, Nishino (1998) "Cancer prevention by carotenoide," Mutat. Res., 402:159-163, Ong et al. (1992) " Natural sources of carotenoids from plants and oils," Meth. Enzymol., 213:142-167, Pfander (1992) "Carotenoids: an overview," Meth. Enzymol., 213:3-13, y Snodderly (1995) " Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins," Am. J. Clin. Nutr., 62(suppl):1448S-1461S.

IV. SECUENCIAS DIANA QUE CODIFICAN A POLIPÉPTIDOS DE BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES

[0073] Los reguladores de expresión de polipéptidos de biosíntesis de carotenoides incluyen una variedad de moléculas orgánicas o inorgánicas. Los reguladores de expresión de polipéptidos de biosíntesis de carotenoides pueden ser segmentos de ácidos nucleicos que codifican a polipéptidos de biosíntesis carotenoides. Esencialmente, se utiliza cualquier segmento de ácido nucleico opcionalmente para transformar las células o plantas de piña de acuerdo con los procedimientos aquí descritos. Por consiguiente, no se pretende identificar a todos los ácidos nucleicos conocidos que pueden ser utilizados. Los segmentos de ácido nucleico relacionados con la Carotenogénesis que se introducen opcionalmente en las células o plantas de piña generalmente codifican a, por ejemplo, difosfato isopentenil isomerasas, geranilgeranil pirofosfato sintasas, fitoeno sintasas, fitoeno desaturasas, ξ -caroteno desaturasas, licopeno β ciclasa, licopeno ϵ - ciclasa, hidroxilasas β - caroteno, ϵ hidroxilasas, o similares. A continuación, se proporciona información de referencia relacionada con ejemplos de genes de biosíntesis de carotenoides y secuencias relacionadas que se utilizan opcionalmente para llevar a cabo procedimientos descritos en este documento.

[0074] Un organismo capaz de síntesis de carotenoides y una fuente de genes para este objetivo de biosíntesis es el *Erwinia herbicola*. El *Erwinia herbicola* es miembro de un género de bacterias negativas-Gram de la familia Enterobacteriaceae que son anaeróbicas facultativas. El género *Erwinia* se divide comúnmente en tres grupos. De los tres, el grupo herbicola incluye especies (por ejemplo, *Erwinia herbicola*), que forma típicamente pigmentos amarillos que se han encontrado que los carotenoides. Estas bacterias existen como saprotrofos en la superficie

de plantas y como organismos secundarios en lesiones causadas por varios patógenos de plantas. También se pueden encontrar en el suelo, el agua y como patógenos oportunistas en los animales, incluyendo seres humanos.

5 **[0075]** La solicitud internacional publicada N ° WO 91/13078 (publicada el 5 de septiembre de 1991) describe el uso de genes de *Erwinia herbicola* para la preparación de varias moléculas de carotenoides en varios organismos mono y pluricelulares. Más concretamente, la solicitud internacional publicada N ° WO 91/13078 describe la producción mejorada de fitoeno en las plantas superiores mediante un vector que incluye el virus del mosaico de la coliflor constitutivo CaMV 35S y la transferencia del ADN mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. La transferencia del gen que codifica a la fitoeno sintasa unida en su terminal N al péptido de señal de carboxilasa - oxigenasa bisfosfato ribulosa del tabaco (RUBISCO o RBCS) también se identificó como un procedimiento de transporte de la enzima en los cloroplastos de plantas donde en general se sintetizan los carotenoides. La solicitud internacional publicada N ° WO 91/13078 describe además, la utilización de *Agrobacterium tumefaciens* para la transferencia de un gen que incluye el gen del péptido de tránsito mencionado y el gen para la licopeno ciclasa, que convierte el licopeno en β caroteno en plantas para obtener mejores niveles de cloroplastos de β - caroteno. Además, la solicitud de patente europea No. 0 393 690 A1 (publicada el 24 de octubre 1990) informa sobre el uso de ADN de otra especie *Erwinia*, *Erwinia uredovora* 20D3 (ATCC 19 321), para la preparación de moléculas de carotenoides. Para ilustrarlo aún más, la presente invención también utiliza opcionalmente el ADN de *Erwinia herbicola* EHO-10 (ATCC 39368 y también conocida como *Escherichia vulneris*), que codifica para la enzima fitoeno sintasa para la acumulación de moléculas de carotenoides en órganos de almacenamiento superiores de plantas, tales como los tejidos de fruta de las plantas de piña.

[0076] A continuación se proporciona información adicional acerca de secuencias relacionadas con carotenoides opcionalmente utilizadas en los procedimientos descritos en este documento:

Isopentenil Difosfato Isomerasas

25 **[0077]** Algunas secuencias que codifican a la isopentenil difosfato isomerasa que se utilizan opcionalmente para transformar células o plantas de piña se han aislado, por ejemplo, en *R. Capsulatus* (Hahn et al. (1996) *J. Bacteriol.* 178:619-624 y las referencias ahí citadas), Número de acceso. U48963 y X82627, *Clarkia xantiana* Número de acceso U48962, *Arabidopsis thaliana* Número de acceso U48961, *Schizosaccharomyces pombe* Número de acceso U21154, *Homo sapiens* Número de acceso X17025, y *Kluyveromyces lactis* Número de acceso X14230.

Geranilgeranil pirofosfato Sintetas

30 **[0078]** Algunas secuencias que codifican a la Geranilgeranil pirofosfato sintasa que se utilizan opcionalmente en las transformaciones aquí descritas incluyen aquellas de, por ejemplo, *E. Uredovora* Misawa et al. (1990) *J. Bacteriol.* 172:6704-6712 y solicitus WO 91/13078; y de fuentes de plantas, incluyendo lupin blanca (Aitken et al. (1995) *Plant Phys.* 108:837-838), bell pepper (Badillo et al. (1995) *Plant Mol. Biol.* 27:425-428) y *Arabidopsis* (Scolnik y Bartely (1994) *Plant Physiol* 104: 1469-1470; Zhu et al. (1997) *Plant cell Physiol.* 38:357-361).

Fitoeno sintetas

40 **[0079]** Algunas secuencias que codifican a la Fitoeno sintasa que se utilizan opcionalmente en las transformaciones aquí descritas incluyen aquellas de, por ejemplo, Número de acceso AF220218 que corresponde a la fitoeno sintasa ARNm Citrus unshiu (Kim et al. " Isolation of a cDNA encoding phytoene synthase from Citrus," no publicada), Número de acceso AB037975 correspondiente a Citrus unshiu ARNm para la fitoeno sintasa (Ikoma et al. (2001) " Expression of a phytoene synthase gene and characteristic carotenoid accumulation during citrus fruit development," *Physiol. Plantarum.* 111:232-238), Número de acceso AF152892 correspondiente a Citrus x paradisi fitoeno sintasa ARNm (Costa et al. " Developmental expression of carotenoid genes in Citrus," no publicada), Número de acceso X68017 correspondiente a *C. annum* psy1 ARNm para la fitoeno sintasa (Romer et al. (1993) " Expression of the genes encoding the early carotenoid biosynthetic enzymes in *Capsicum annum*," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196 (3):1414-1421), Número de acceso L23424 correspondiente a *Lycopersicon esculentum* fitoeno sintasa (PSY2) ARNm (Bartley et al. (1993) " cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of PSY2, a second tomato gene encoding phytoene synthase," *J. Biol. Chem.* 268 (34):25718-25721), Número de acceso Z37543 correspondiente a *C. melo* PSY1 ARNm para fitoeno sintasa (Karvouni et al. (1995) " "Isolation

and characterisation of a melon cDNA clone encoding phytoene synthase," *Plant Mol. Biol.* 27(6):1153-1162), y Número de acceso M84744 correspondiente a fitoeno sintasa del tomate ARNm (Bartley et al. (1992) " A tomato gene expressed during fruit ripening encodes an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway," *J. Biol. Chem.* 267(8): 5036-5039).

5 **[0080]** Otras fuentes ilustrativas de secuencias de fitoeno sintasa incluyen, por ejemplo, E. Uredovora, Rhodobacter capsulatus, y otras plantas (Misawa et al. (1990) J. Bacteriol. 172:6704-6712, Número de acceso D90087, Solicitud WO 91/13078, Armstrong et al. (1989) Mol. Gen. Genet. 216:254-268, Armstrong " Genetic Analysis and regulation of carotenoidbiosynthesis," in Blankenship et al. (Eds.), Anoxygenic photosynthetic bacteria; advances in photosynthesis, Kluwer Academic Publishers, Armstrong et al. (1990) Proc. Natl. Acad Sci USA 87:9975-9979, Armstrong et al. (1993) Methods Enzymol. 214:297-311, Bartley et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:27518-27521, Bartley et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:5036-5039, Bramley et al. (1992) Plant J. 2:291-343, Ray et al. (1992) Plant Mol. Biol. 19:401-404, Ray et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15:10587, Romer et al. (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun. 196:1414-1421, Karvouni et al. (1995) Plant Molecular Biology 27:1153-1162, 10 Números de Acceso. U32636, Z37543, L37405, X95596, D58420, U32636, Z37543, X78814, X82458, S71770, L27652, L23424, X68017, L25812, M87280, M38424, X69172, X63873, X60441, y Armstrong (1994) J. Bacteriol. 176:4795-4802 y the references cited therein).

Fitoeno Desaturasas

15 **[0081]** Algunos ejemplos de secuencias que codifican a la fitoeno desaturasa que se utilizan opcionalmente para transformar células o plantas de piña según los procedimientos de la invención incluyen aquellos correspondientes, por ejemplo, Número de acceso X68058 correspondiente a C.annuum pds1 ARNm para la fitoeno desaturasa (Huguene y et al. (1992) " Characterization and molecular cloning of a flavoprotein catalyzing the synthesis of phytofluene and zeta-carotene in Capsicum chromoplasts," Eur. J. Biochem. 209(1):399-407), 20 Número de acceso X59948 correspondiente a L. esculentum ARNm para la fitoeno desaturasa (Pecker et al. (1992) " A single polypeptide catalyzing the conversion of phytoene to zeta-carotene is tran transcriptionally regulated during tomato fruit ripening," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89(11):4962-4966), Número de acceso L39266 correspondiente a Zea mays fitoeno desaturasa ARNm (Hable et al. (1995) "Maize phytoene desaturase maps near the viviparous5 locus," Plant Physiol. 108(3):1329-1330), Número de acceso M88683 correspondiente a Lycopersicon esculentum fitoeno desaturasa ARNm (Giuliano et al. (1993) " Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development," Plant célula 5(4):379-387), y Número de acceso M64704 correspondiente a fitoeno desaturasa ARNm de la soja (Bartley et al. (1991) "Molecular cloning y expression in photosynthetic bacteria of a soybean cDNA coding for phytoene desaturase, an enzyme of the biosíntesis of carotenoids pathway," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88(15):6532-6536).

30 **[0082]** Otras fuentes ilustrativas de secuencias de fitoeno desaturasa incluyen, por ejemplo, aquellas de fuentes bacterianas que incluyen E. uredovora Misawa et al. (1990) J. Bacteriol. 172:6704-6712, y solicitud WO 91/13078 (Números de Acceso. L37405, X95596, D58420, X82458, S71770, y M87280); y de fuentes de plantas, incluyendo maiz (Li et al. (1996) Plant Mol. Biol. 30:269-279), tomate (Aracri et al. (1994) Plant Physiol. 106:789), y Capisum annum (bell beppers) (Huguene y et al. (1992) J. Biochem. 209: 399-407), Números de Acceso. U37285, X59948, X78271, y X68058).

35 ξ-Caroteno Desaturasos

[0083] Algunas secuencias que codifican a la la ξ -caroteno desaturasa que se utilizan opcionalmente en las transformaciones aquí descritas incluyen aquellas de, por ejemplo, Número de acceso AJ319762 correspondiente a Citrus sinensis ARNm for ξ -caroteno desaturasa (gen zds) (Marcos et al. "Caracterización de Pinalate, a novel Citrus sinensis variety con a fruit-specific alteration which results in yellow pigmentation and decreased ABA content," no publicada), Número de acceso AB072343 correspondiente a Citrus unshiu Cit-ZCD ARNm for ξ -caroteno desaturasa (Kasai et al. "Citrus unshiu ξ -caroteno desaturasa," no publicada), Número de acceso AF195507 correspondiente a Lycopersicon esculentum ξ -caroteno desaturasa ARNm (Bartley et al. (1999) " ξ -carotene desaturase (Número de acceso AF195507) from tomato," Plant Physiol. 121(4):1383), Número de acceso X89897 correspondiente a C. annum ARNm for ξ -caroteno / neurosporene deshidrogenasa (Breitenbach et al. (1999) " Catalytic properties of an expressed and purified higher plant type zeta-carotene desaturase from Capsicum

annuum," Eur. J. Biochem. 265(1):376-383), y Número de acceso AF047490 correspondiente a Zea mays ξ -carotene desaturase precursor ARNm (Luo et al. (1999) "A Maize cDNA Encoding ξ -caroteno desaturasa (Número de acceso AF047490)," Plant Physiol. 120(4):1206).

50 Licopeno β Ciclasas

[0084] Algunas secuencias que codifican a la licopeno β ciclasa que se utilizan opcionalmente para transformar células o plantas de piña según los procedimientos de la invención incluyen aquellos correspondientes, por ejemplo, Número de acceso AY094582 correspondiente a gen Citrus sinenses licopeno β -ciclasa gene (Xu et al. " Molecular cloning of lycopene beta-cyclase gene from Red flesh navel orange by using Tail-PCR," no publicada), 55 Número de acceso AF240787 correspondiente a Citrus sinenses licopeno β -ciclasa gene (Xu et al. " Molecular cloning of lycopene β -cyclase gene from orange (Citrus sinensis)," no publicado), Número de acceso AF254793

correspondiente a *Lycopersicon esculentum* chromoplastspecific licopeno β -ciclase ARNm (Ronen et al. (2000) " An alternative pathway to β -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97(20):11102-11107), Número de acceso X86452 correspondiente a *L. esculentum* ARNm for licopeno β ciclase (Cunningham et al. (1996) " Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of Arabidopsis reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation," Plant célula 8(9):1613-1626).

Licopeno ϵ - ciclasas

[0085] Algunas secuencias que codifican a la licopeno ϵ - ciclase que se utilizan opcionalmente, incluyen aquí aquellas correspondientes, por ejemplo, al número de acceso AF486650 correspondiente a *Citrus x paradisi* licopeno ϵ -ciclase ARNm (Costa et al. (2002) direct submission to Horticultural Sciences, University of Florida, Gainesville, FL, USA), Número de acceso AF463497 correspondiente a *Spinacia oleracea* licopeno ϵ -ciclase (lec) ARNm. DeSouza et al. "Production of Lutein in microorganisms," no publicada), Número de acceso AF321538 correspondiente a *Lactuca sativuna* licopeno ϵ - ciclase ARNm (Cunningham et al. (2001) " One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene varepsilon-cyclases," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98(5):2905-2910), y Número de acceso Y14387 correspondiente a *Lycopersicon esculentum* ARNm para licopeno ϵ -ciclase (Ronen et al. " Regulation of expression of the gene for lycopene epsilon cyclase during fruit ripening of tomato," no publicada).

β caroteno Hidroxilasas

[0086] Algunos ejemplos secuencias que codifican a la β caroteno hidroxilasas que se utilizan opcionalmente para transformar células o plantas de piña según los procedimientos de la invención incluyen aquellos correspondientes a, por ejemplo, Número de acceso AC092389 correspondiente a la secuencia genómica *Oryza sativa* cromosoma 10 BAC OSJNBa0053C23 (Buell et al. " *Oryza sativa* chromosome 10 BAC OSJNBa0053C23 genomic sequence," no publicada), Número de acceso AF499108 correspondiente al gen *Vitis vinifera* beta-carotene hydroxylase (bch1) (Young et al. " Isolation, characterization and heterologous expression of a beta-carotene hydroxylase from grapevine (*Vitis vinifera*)," no publicada), Número de acceso AF315289 correspondiente a *Citrus unshiu* β caroteno hidroxilasa (CHX2) ARNm (Kim et al. (2001) " Isolation and characterization of cDNAs encoding beta-carotene hydroxylase in Citrus," Plant Sci. 161(5):1005-1010), y Número de acceso AF296158 correspondiente a *Citrus unshiu* β caroteno hidroxilasa (CHX1) ARNm (Kim et al. (2001) " Isolation and characterization of cDNAs encoding beta-carotene hydroxylase in Citrus," Plant Sci. 161(5):1005-1010).

ϵ - hidroxilasas

[0087] Algunas secuencias que codifican a la ϵ -hydroxylase hidroxilasas que se utilizan opcionalmente aquí incluyen aquellas correspondientes a, por ejemplo, Número de acceso AE005173 correspondiente al cromosoma 1 de *Arabidopsis thaliana*, secuencia completa del fondo del brazo (Theologis et al. (2000) " Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant Arabidopsis thaliana," Nature 408(6814):816-820) y Número de acceso AE005172 correspondiente al cromosoma 1 de *Arabidopsis thaliana*, secuencia completa del fondo del brazo. Theologis et al. (2000) " Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant Arabidopsis thaliana," Nature 408(6814):816-820.

[0088] Además, las secuencias de ácidos nucleicos para los grupos de enzimas de biosíntesis de carotenoides procedentes de microorganismos carotenogénicos se pueden obtener de GenBank®, tal como el Número de acceso M87280 (*Erwinia herbicola* Eho10), D90087 (*Erwinia uredovora*), U62808 (*Flavobacterium*), D58420 (*Agrobacterium aurantiacum*) y M90698 (*Erwinia herbicola* Eho13).

V. POLIPÉPTIDOS DE BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDE EVOLUCIONADOS ARTIFICIALMENTE

[0089] Se pueden utilizar polipéptidos de biosíntesis de carotenoides evolucionados artificialmente para modular la acumulación de carotenoides en las células y plantas de piña transgénicas. Por ejemplo, cualquiera de los ejemplos de secuencias diana de biosíntesis de carotenoides descritos anteriormente pueden ser artificialmente evolucionadas hasta adquirir los rasgos deseados o propiedades, tales como el aumento de la eficiencia catalítica, una mayor especificidad de sustrato, y / o similares. Se puede utilizar una variedad de procedimientos de generación de diversidad artificial están disponibles y están descritos en la técnica, para producir polipéptidos de biosíntesis de carotenoides artificialmente evolucionados. Estos procedimientos se pueden utilizar por separado o en combinación para producir variantes de un ácido nucleico, así como las variantes de las proteínas de biosíntesis de carotenoides codificada por las variantes de ácido nucleico. Individual y colectivamente, estos procedimientos proporcionan vías de diseño robustas y ampliamente aplicables o de ácidos nucleicos y proteínas de biosíntesis de carotenoides de evolución rápida, o incluso toda la vía carotenoide o partes seleccionadas de la vía. Los productos de estos procedimientos se pueden utilizar en los procedimientos de transformación aquí.

5 **[0090]** En particular, el resultado de cualquiera de los procedimientos de generación de diversidad descritos en este documento o conocido de otra manera en el estado de la técnica puede ser la generación de uno o más ácidos nucleicos que son normalmente seleccionadas o seleccionados para ácidos nucleicos que codifican enzimas de la biosíntesis de carotenoides con o que confieren las propiedades deseadas, tales como aumento de la eficiencia catalítica, etc. Esto puede incluir la identificación de cualquier actividad que se pueda detectar, como por ejemplo, en un formato automatizado o automatizable, mediante cualquiera de los ensayos conocidos en la técnica. Una variedad propiedades relacionadas (o incluso no relacionados) se pueden evaluar, en serie o en paralelo, según el criterio del médico.

10 **[0091]** Los polipéptidos de biosíntesis de carotenoides evolucionados artificialmente que se utilizan opcionalmente en los procedimientos de transformación aquí descritos se pueden crear usando muchas técnicas diferentes. A modo de ilustración, se pueden utilizar las enzimas quiméricas que incluyen componentes de identificación (por ejemplo, dominios de las proteínas) derivados de dos o más secuencias de los padres. Por ejemplo, se pueden identificar y seleccionar dominios en diferentes sintasas fitoeno para su inclusión en una progenie quimérica de fitoeno sintasa. Varios algoritmos de comparación de secuencias y otras herramientas que son útiles para el diseño de enzimas quiméricas se describen más adelante.

15 **[0092]** Además, las enzimas desarrolladas artificialmente se pueden desarrollar utilizando diversos procedimientos mutagénicos, tales como la mutagénesis de casete, dirigida a un sitio de mutagénesis (ver, por ejemplo, Botstein & Shortle (1985) "Strategies and applications of in vitro mutagenesis" Science 229:1193-1201; Carter (1986) "Site-directed mutagenesis" Biochem. J. 237:1-7; y Kunkel (1987) "The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis" Nucleic Acids & Molecular Biology (Eckstein, F. y Lilley, D.M.J. eds., Springer Verlag, Berlin)), mutagénesis química, PCR propensa a errores, mutagénesis de saturación de sitio, mutagénesis de conjunto recursivo, y similares. Para ilustrar estos, se pueden utilizar PCR propensas a error para generar variantes de ácido nucleico. Utilizando PCR propensa a errores, por ejemplo, la PCR se realiza en condiciones en que la fidelidad de copia de la ADN polimerasa es baja, de tal manera que se obtiene una alta tasa de mutaciones puntuales a lo largo de toda la longitud del producto de PCR. Ejemplos de estas técnicas se describen más detalladamente en, por ejemplo, Leung et al. (1989) 1:11-15 Technique and Caldwell et al. (1992) Methods of PCR Aplic. 2:28-33. Para ilustrar un ejemplo de técnica mutagénica, se utiliza opcionalmente mutagénesis de cassette en un proceso que sustituye a una pequeña región de una molécula de ADN de doble cadena con, por ejemplo, un casete de oligonucleótidos sintéticos que difieren de la secuencia de origen. El oligonucleótido sintético puede contener, por ejemplo, secuencia(s) nativa(s) completas y / o parcialmente aleatorizada (s). Los detalles adicionales relacionados con la mutagénesis de casete se describen, por ejemplo, Wells et al. (1985) "la mutagénesis de casete: un método eficiente para la generación de múltiples mutaciones en los sitios definidos" Gene 34:315-323. Otro procedimiento ejemplar de creación de diversidad molecular mutagenicamente es un proceso de mutagénesis de conjunto recursivo en el que se utiliza un algoritmo para la mutagénesis de proteínas para producir diversas poblaciones de mutantes fenotípicamente relacionados, cuyos miembros difieren en la secuencia de aminoácidos. Este procedimiento utiliza un mecanismo de retroalimentación para monitorizar las sucesivas rondas de mutagénesis de casete combinatorias. Algunos ejemplos de este enfoque se encuentran en Arkin et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Ciencia. EE.UU. 89:7811-7815. Las técnicas mutagénicas antes mencionadas se ofrecen simplemente para ilustrar ciertos procedimientos que se utilizan opcionalmente para producir diversidad en ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de biosíntesis de carotenoides. Son bien conocidos muchos otros enfoques para la creación de diversidad a través de mutagénesis que también son adecuados para los procedimientos aquí descritos.

45 **[0093]** Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de biosíntesis de carotenoides, tales como los descritos anteriormente, también se utilizan opcionalmente como sustratos para una gran variedad de reacciones de recombinación, tal como un protocolo de recombinación de secuencia recursiva. Muchas de estas técnicas se describen en varias publicaciones incluyendo, por ejemplo, Chang et al. (1999) "Evolution of a cytokine using DNA family shuffling" Nature biotechnology 17:793-797, Crameri et al. (1998) "DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution" Nature 391:288-291, Crameri et al. (1997) "Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling," Nature biotechnology 15:436-438, Crameri et al. (1996) "Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling" Nature biotechnology 14: 315-319, Stemmer (1995) "Searching Sequence Space" Bio/Technology 13:549-553, y Stemmer (1994) "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling" Nature 370:389-391.

55 **[0094]** Muchos de los procedimientos de generación de diversidad descritos anteriormente (por ejemplo, el diseño y la síntesis de la enzima quimérica, la recombinación de secuencias recursivas, etc), incluyen la determinación de los niveles de homología entre las secuencias de partida. Por ejemplo, en los procesos de comparación de secuencias y de determinación de homología, se puede utilizar una secuencia, por ejemplo, un fragmento o subsecuencia de una secuencia de genes a recombinar, como una referencia con la cual se comparan otras secuencias de ácido nucleico de prueba. Esta comparación se puede lograr con la ayuda de un algoritmo de comparación de secuencias o por inspección visual. Cuando se emplea un algoritmo, las secuencias de ensayo y

de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencias, según sea necesario, y se especifican los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. El algoritmo calcula el tanto por ciento de identidad de la secuencia de prueba de ácido nucleico (s) en relación con la secuencia de referencia, a partir de los parámetros del programa especificados.

5 **[0095]** A los efectos de la presente invención, se pueden ejecutar comparaciones de la secuencia adecuada, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482, mediante el algoritmo de alineación por homología de Needleman & Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, mediante el procedimiento de búsqueda de semejanza de Pearson & Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, mediante implementaciones en ordenadores de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer grupo, 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección visual. Ver en general, los protocolos actuales en biología molecular, F.M. Ausubel et al., eds., *Current protocols*, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (divulgado en 2001). Otro ejemplo de algoritmo de búsqueda que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia es el algoritmo de Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), que se describe en, por ejemplo, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410. Algunos Software para llevar a cabo análisis BLAST están a disposición del público a través de The National Center for Biotechnology Information en la web ncbi.nlm.nih.gov.

20 **[0096]** Kits para mutagénesis, construcción de bibliotecas y otros procedimientos de generación de diversidad están disponibles en el mercado. Por ejemplo, algunos kits están disponibles en, por ejemplo, Stratagene (por ejemplo, QuickChange™ dirigida a un sitio mutagénesis kit, y Chameleon™ de doble cadena, dirigido a un sitio mutagénesis kit), Bio/Can Scientific, Bio-Rad (por ejemplo, empleando el procedimiento de Kunkel mencionado más arriba), Boehringer Mannheim Corp., Clontech Laboratories, DNA Technologies, Epicentre Technologies (por ejemplo, 5 prime 3 prime kit), Genpak Inc., Lemarg Inc., Life Technologies (Gibco BRL), New England Biolabs, Pharmacia biotechnology, Promega Corp., Quantum Biotechnologies, Amersham international plc, y Anglian biotechnology Ltd.

VI. PREPARACIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO

30 **[0097]** Algunos segmentos de ácido nucleico que codifican polipéptidos de biosíntesis de carotenoides, tales como los descritos anteriormente, se pueden preparar utilizando diversos procedimientos o combinaciones de ellos, incluidas ciertas técnicas de ADN de síntesis, la amplificación de ADN, la digestión por nucleasa, etc. Hay información de secuencias que se pueden buscar en bases de datos de ácidos nucleicos durante procesos de selección y / o de diseño de segmentos de ácido nucleico y de vectores. GenBank®, Entrez®, EMBL, DDBJ, GSDB, NDB y NCBI son ejemplos de bases de datos públicas / servicios de búsqueda disponibles. Estas bases de datos suelen estar disponibles a través de Internet o mediante un contrato en una variedad de empresas especializadas en la generación y / o almacenamiento de información genómica. Estos y otros recursos útiles están disponibles y son conocidos por los expertos.

40 **[0098]** La secuencia de un polinucleótido a utilizar en cualquiera de los procedimientos de la presente invención también se puede determinar fácilmente utilizando técnicas bien conocidas por los expertos, incluyendo Maxam-Gilbert, Sanger Dideoxy, y secuenciación por procedimientos de hibridación. Para descripciones generales de estos procesos consultar, por ejemplo, Stryer, *Biochemistry*, 4th Ed., W.H. Freeman y Company (1995) y Lewin, *Gens VI*, Oxford University Press (1997). Ver también, Maxam y Gilbert (1977) " A New Method for Sequencing DNA," *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:560-564, Sanger et al. (1977) " DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors," *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:5463-5467, Hunkapiller et al. (1991) " Large-Scale and Automated DNA Sequence Determination," *Science* 254:59-67, y Pease et al. (1994) " Light-Generated Oligonucleotide Arrays for Rapid DNA Sequence Analysis," *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:5022-5026.

45 **[0099]** Los segmentos de ácido nucleico que codifican las enzimas de biosíntesis de carotenoides que se han descrito anteriormente se pueden sintetizar mediante técnicas químicas, por ejemplo, utilizando el procedimiento de fosfotriéster de Matteucci et al. (1981) *J. Am. Chem. Soc.*, 103:3185. Por supuesto, mediante la síntesis química de la secuencia de codificación, las modificaciones deseadas pueden hacerse simplemente mediante la sustitución de las bases apropiadas para aquellas que codifican a la secuencia residuo del aminoácido nativo. Sin embargo, suelen preferirse los segmentos de ácidos nucleicos que incluyen a las secuencias discutidas anteriormente. Además, los segmentos de ácido nucleico que codifican las enzimas de biosíntesis de carotenoides se pueden obtener opcionalmente a partir de moléculas de ADN recombinante existentes (vectores del plásmido) que contienen a aquellos genes. Algunos de estos plásmidos están disponibles en el American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852.

55 **[0100]** Los segmentos de ácido nucleico y las construcciones o vectores para su uso con la presente invención se pueden preparar mediante una serie de procedimientos conocidos en la técnica, tales como las técnicas de clonación molecular. Una amplia variedad de procedimientos de clonación y de amplificación in vitro adecuados

para la construcción de los ácidos nucleicos recombinantes, como los vectores de expresión, son bien conocidos de los expertos. Más adelante se describen algunos vectores adecuados para su uso en la presente invención. Algunos textos de carácter general que describen en este documento las técnicas moleculares biológicas, incluyendo la mutagénesis, incluyen Berger y Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology*, Vol. 152, Academic Press, Inc. (1999) ("Berger"); Sambrook et al., *Molecular Cloning--A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (2000) ("Sambrook"); and *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al. (Eds.), Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (supplemented through 2000) ("Ausubel"). Algunos ejemplos de técnicas suficientes para guiar a expertos en la materia en procedimientos de amplificación *in vitro*, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación Qb y otras técnicas mediadas por polimerasa ARN (por ejemplo, NASBA) se encuentran en Berger, Sambrook, y Ausubel, as well as Mullis et al. (1987) U.S. Pat. No. 4,683,202; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis et al., eds.), Academic Press Inc. (1990) ("Innis"); Arnheim & Levinson (1990) *Chemical and Engineering News* 36-47; Kwoh et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173; Guatelli et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874; Lomell et al. (1989) *J. Clin. Chem.* 35:1826; Landegren et al., (1988) *Science* 241:1077-1080; Van Brunt (1990) *Biotechnology* 8:291-294; Wu and Wallace, (1989) *Gene* 4:560; Barringer et al. (1990) *Gene* 89:117, and Sookninan and Malek (1995) *Biotechnology* 13:563-564. Otros procedimientos para la clonación *in vitro* de ácidos nucleicos amplificados se describen en la U.S. Pat. No. 5,426,039 de Wallace et al. Procedimientos para amplificar ácidos nucleicos de gran tamaño mediante PCR se resumen en Cheng et al. (1994) *Nature* 369:684-685 y las referencias ahí citadas, donde se generan amplicones PCR de hasta 40 kb. Un experto en la materia también apreciará que esencialmente cualquier ARN puede ser convertido en un AND de doble hebra para la digestión, restricción, expansión PCR y secuenciación empleando transcriptasa inversa y una polimerasa. Ver, Ausubel, Sambrook y Berger, ya mencionados.

[0101] El aislamiento de una secuencia de ácido nucleico para su inclusión en una construcción de vectores para su uso en la invención se puede realizar por cualquier número de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, las sondas de oligonucleótidos basadas en secuencias conocidas se pueden utilizar para identificar el gen deseado en una biblioteca de ADNc o de ADN genómico. Las sondas se pueden utilizar para hibridar con secuencias de ADN genómico o ADNc a fin de aislar los genes homólogos en la misma o en diferentes especies. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos dirigidos contra una enzima para detectar una biblioteca de expresión de ARNm para la correspondiente secuencia de codificación.

[0102] Por otra parte, los ácidos nucleicos de interés (por ejemplo, genes que codifican los polipéptidos de biosíntesis de carotenoides) se pueden amplificar a partir de muestras de ácido nucleico mediante técnicas de amplificación. Por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se puede usar para amplificar las secuencias de los genes deseados directamente a partir del ADN genómico, del ADNc, a partir de bibliotecas genómicas o de bibliotecas de ADNc. La PCR y otros procedimientos de amplificación *in vitro* pueden también ser útiles, por ejemplo, para clonar secuencias de ácido nucleico que codifican para proteínas a expresar, para producir ácidos nucleicos con el fin de usarlos como sondas para detectar la presencia del ARNm deseado en las muestras, para la secuenciación de ácido nucleico, o para otros fines. Para una visión general de la PCR, ver Innis, (arriba).

[0103] Los polinucleótidos se pueden sintetizar también mediante técnicas bien conocidas como se describe en la literatura técnica. Ver, por ejemplo, Carruthers et al. (1982) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47:411-418, y Adams et al. (1983) *J. Am. Chem. Soc.* 105:661. Se pueden obtener dobles segmentos de ADN de cadena ya sea mediante la síntesis de la cadena complementaria e hibridando los hilos juntos en las condiciones adecuadas, o mediante la adición de la cadena complementaria utilizando la polimerasa de ADN con una secuencia de cebador adecuada.

[0104] Los oligonucleótidos para su uso como sondas, por ejemplo, en los procedimientos de amplificación *in vitro*, para su uso como sondas genéticas suelen ser sintetizados químicamente según el procedimiento triéster de fosforamidita de base sólida descrito por Beaucage y Caruthers (1981) *Tetrahedron Letts.* 22(20): 1859-1862, por ejemplo, mediante un sintetizador automatizado, tal como se describe en Needham-VanDevanter et al. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12:6159-6168. Los oligonucleótidos utilizados en las construcciones o vectores nucleoácidos de la presente invención también pueden ser hechos a medida y encargados a partir de una variedad de fuentes comerciales conocidas de las personas competentes en la materia.

VII. VECTORES

[0105] Esencialmente, cualquier vector o sistema de vectores se puede utilizar para crear las células y las plantas transformadas de piña de la invención. Los segmentos de ácido nucleico que codifican los polipéptidos de biosíntesis de carotenoides se pueden unir operativamente a los vectores en forma de plásmidos o de sistemas de plásmido (por ejemplo, un sistema binario, un sistema ternario, un sistema de transporte de vectores, etc.) Ciertos sistemas ejemplares de plásmido opcionalmente adaptados para su uso en la presente invención se

describen, por ejemplo en U.S. Pat. Nos. 5,977,439 de Hamilton (publicada en el 2 de Noviembre del 1999), 5,929,306 de Toriski et al. (publicada el 27 de JULIO del 1999), 5,149,645 de OHoekema et al. (publicada en el 22 de Septiembre del 1992), 6,165,780 de Kawasaki (publicada el 9 de Agosto del 1988), y 5,068, 193 de Comai (concedida el 26 de Noviembre del 1991).

5 **[0106]** Los segmentos de ácido nucleico que aquí se describen, por ejemplo en forma de casetes de expresión, suelen incluir la dirección de la transcripción en la posición 5'-3', una región de iniciación de transcripción y de traducción, una secuencia de ADN de interés (por ejemplo, un gen que codifica un polipéptido de biosíntesis de carotenoides), y una región de terminación de transcripción y de traducción funcional en las plantas de piña. La
10 región de terminación puede ser nativa con la región de iniciación de la transcripción, puede ser nativa con la secuencia de ADN de interés, o puede derivar de otra fuente. Las regiones de terminación convenientes están disponibles en el plásmido Ti de *A. tumefaciens*, tales como las regiones de terminación de sintasa octopina y de sintasa nopalina.

15 **[0107]** Los genes de biosíntesis de carotenoides pueden ser objeto de plástidos, tales como los cloroplastos, para su expresión. De esta manera, cuando el gen de biosíntesis de carotenoides no se inserta directamente en el plástido, el casete de expresión contendrá además un gen que codifica un péptido de tránsito para dirigir el gen de interés en el plástido. Estos péptidos de tránsito son conocidos en la técnica. Algunos genes carotenoides de planta útiles en la invención pueden utilizar péptidos de tránsito nativos o heterólogos.

20 **[0108]** Las construcciones para su uso en la invención también pueden incluir otros reguladores necesarios, tales como secuencias de plantas de consenso de traslación (Joshi, C. P., (1987), *Nucleic Acids Research*, 15:6643-6653), introns (Luehrsen and Walbot, (1991), *Mol. Gen. Genet.*, 225:81-93) y similares, unidos operativamente con la secuencia de nucleótidos de interés.

25 **[0109]** En algunas realizaciones, las secuencias 5' líder se incluyen en la construcción de casete de expresión. Tales secuencias líder pueden actuar para mejorar la traducción. Los líderes de traducción son conocidos en la técnica e incluyen: los líderes de los picornavirus, por ejemplo, líder de EMCV (Encephalomyocarditis 5' región no codificante) (Elroy-Stein et al. (1989) *PNAS USA* 86: 6126-6130); potyvirus leaders, por ejemplo, TEV leader (Tobacco Etch Virus) (Allison et al., (1986); MDMV leader (Maize Dwarf Mosaic Virus); *Virology*, 154:9-20), y la proteína de unión de cadena pesada de la inmunoglobulina humana (BiP), (Macejak, D. G., y Sarnow, P., (1991), *Nature*, 353:90-94; líder no traducido de mRNA de la proteína del virus del mosaico de la alfalfa (AMV RNA 4), (Jobling, S. A., and Gehrke, L., (1987), *Nature*, 325:622-625; líder del virus de mosaico del tabaco (TMV), (Gallie, D. R. et al., (1989), *Biología Molecular Biology de RNA*, páginas 237-256; y maize chlorotic mottle virus leader líder del virus del moteado clorótico del maíz (MCMV) (Lommel, S. A. et al., (1991), *Virology*, 81:382-385. Ver también, Della-Cioppa et al., (1987), *Plant Physiology*, 84:965-968.

35 **[0110]** Dependiendo del lugar donde la secuencia de ADN de interés se va a expresar, puede ser conveniente sintetizar la secuencia con codones preferidos de planta de piña, o, alternativamente, con codones preferidos de cloroplasto. Los codones preferidos de planta de piña se pueden determinar a partir de los codones de mayor frecuencia en las proteínas que se expresan en la mayor cantidad en las especies vegetales de interés. ver, Solicitudes de patente europea números 0359472 y 0385962; Solicitud Internacional No. WO 91/16432; Perlak et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3324-3328; y Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 477-498. De esta manera, las secuencias de nucleótidos pueden ser optimizadas para la expresión en plantas de piña. Se reconoce que la totalidad o parte de la secuencia genética puede ser optimizada o sintética. Es decir, también se pueden utilizar secuencias sintéticas o parcialmente optimizadas. Para la construcción de los genes preferidos de cloroplasto, véase, por ejemplo, Patente americana 5,545,817.

45 **[0111]** En la preparación de casetes de expresión, se pueden manipular los diferentes fragmentos de ADN, con el fin de prever las secuencias de ADN en la orientación adecuada y, en su caso, en el marco de lectura apropiado. Con este fin, se pueden emplear adaptadores o conectores para unir los fragmentos de ADN o se pueden emplear otras manipulaciones para proporcionar sitios de restricción convenientes, eliminación de ADN superfluo, eliminación de sitios de restricción, o similares. Para ello, la mutagénesis in vitro, la reparación mediante cebador, la restricción, el hibridación, la resección, la ligadura, o similares, se pueden emplear, donde pueden estar involucradas las inserciones, las supresiones o las sustituciones, por ejemplo, las transiciones y transversiones.

50 **[0112]** Los vectores para su uso en la invención también suelen incluir elementos de expresión de control, tales como promotores. Los genes de codificación del polipéptido de biosíntesis de carotenoides se unen operativamente a la expresión del vector para permitir que la secuencia del promotor para dirigir la unión de polimerasa ARN y la expresión del gen de codificación de polipéptido. Útiles para expresar el gen de codificación de polipéptido lo son los promotores que son inducibles, víricos, sintéticos, constituyentes como se describe, por
55 ejemplo, Poszkowski et al. (1989) *EMBO J.* 3:2719 and Odell et al. (1985) *Nature* 313:810 (1985), y ajustados temporalmente y espacialmente tal como se describe en, por ejemplo, Chua et al. (1989) *Science* 244:174-181.

- 5 **[0113]** La elección del vector de expresión y, por ejemplo, el órgano mayor promotor preseleccionadas al cual un gen de codificación de polipéptido está vinculado operativamente depende de las propiedades funcionales deseadas, por ejemplo, la ubicación y el tiempo de expresión de la proteína. Un vector que es útil en la práctica de la presente invención se integra en el genoma de las plantas de piña, es capaz de dirigir la replicación, y también la expresión del gen de codificación del polipéptido de biosíntesis de carotenoides incluido en el segmento de ácido nucleico al cual está operativamente unido. Es bien sabido en la técnica que el vector de expresión no se integra entero en el genoma de la planta huésped, sino que se integra sólo una parte. Sin embargo, se dice que el vector se integra por comodidad de expresión.
- 10 **[0114]** En algunas realizaciones de la presente invención, las construcciones incluyen elementos además de las secuencias de ácidos nucleicos unidos, tales como promotores, elementos potenciadores, y secuencias de señalización. Los promotores ejemplares incluyen el promotor CaMV, un promotor del gen de la subunidad pequeña ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa-oxigenasa, un promotor de la ubiquitina, y un promotor rolD. Algunos elementos potenciadores ejemplares se describen, por ejemplo, en EE.UU. Pat. N ° 6.271.444, que se publicó el 7 de agosto del 2001 a McBride et al. Algunos secuencias ejemplares de señalización incluyen, pero no se limitan a, las secuencias de ácido nucleico que codifican a péptidos de tránsito de tejido específicos, como los péptidos de tránsito al cloroplasto (see, por ejemplo, Zhang et al. (2002) Trends Plant Sci 7(1):14-21).
- 15 **[0115]** En ciertas realizaciones, se puede emplear un promotor fuerte o débilmente constitutivo de una planta que vaya a dirigir la expresión de las secuencias codificadas en todos los tejidos de una planta de la piña. Estos promotores están activos en la mayoría de las condiciones ambientales y estados de desarrollo o diferenciación celular. Algunos ejemplos de promotores constitutivos incluyen el promotor 1'- o 2'- derivado de T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens*, y otras regiones de iniciación de la transcripción a partir de genes de varias plantas conocidos por los expertos. En situaciones en las que la sobreexpresión de un gen no es deseable, se pueden utilizar promotores débilmente constitutivos para reducir los niveles de expresión. En los casos que requieren altos niveles de expresión, se puede utilizar un promotor fuerte, por ejemplo, un t-RNA u otro promotor de pol III, o un fuerte promotor de pol II, tal como el promotor del virus del mosaico de la coliflor.
- 20 **[0116]** Por otra parte, un promotor de planta puede estar bajo el control del medio ambiente. A tales promotores se les conoce aquí como promotores "inducibles". Ejemplos de condiciones ambientales que puedan afectar la transcripción por los promotores inducibles incluyen el ataque de patógenos, las condiciones anaeróbicas, o la presencia de la luz.
- 25 **[0117]** En algunas realizaciones, los promotores incorporados a las construcciones de la presente invención son "tejidos específicos" y, como tal, bajo el control de desarrollo en el cual el gen deseado se expresa sólo en ciertos tejidos, tales como los tejidos de fruta. En realizaciones en las que se incorporan una o más secuencias de ácidos nucleicos endógenos de la planta de la piña en la construcción, los promotores endógenos (o sus variantes) de estos genes se pueden utilizar para dirigir la expresión de los genes en la planta transflectada. También se pueden utilizar promotores de tejidos específicos para dirigir la expresión de genes estructurales heterólogos, incluyendo los ácidos nucleicos artificialmente evolucionados aquí descritos.
- 30 **[0118]** Además de los promotores señalados anteriormente, los promotores de origen bacteriano que operan en las plantas incluyen el promotor de la octopina sintasa, el promotor de la nopalina sintasa y otros promotores derivados de plásmidos Ti nativos. (ver, Herrera-Estrella et al. (1983) Nature 303:209-213). Los promotores víricos incluyen los promotores 35S y 19S RNA del virus del mosaico de la coliflor (Odell et al. (1985) Nature 313:810-812). Otros promotores de planta incluyen la ribulosa-1, el promotor de la pequeña subunidad 3-bifosfato carboxilasa y el promotor de faseolina. También se pueden utilizar la secuencia del promotor del gen E8 y de otros genes. El aislamiento y la secuencia del promotor E8 se describen en detalle en Deikman y Fischer (1988) EMBO J. 7:3315-3327.
- 35 **[0119]** En la preparación de las construcciones para su uso en la invención, también se pueden emplear las secuencias que no sean el promotor y el segmento de ácido nucleico unido. Si se desea la expresión de polipéptidos normales, se puede incluir una región de poliadenilación en el extremo 3' de la región de codificación. La región de poliadenilación puede derivar del gen natural, a partir de una variedad de genes de otras plantas, o de T-ADN.
- 40 **[0120]** Los vectores típicos útiles para la expresión de genes en las plantas de piña son bien conocidos en la técnica e incluyen vectores derivados del plásmido de *Agrobacterium tumefaciens* inductor de tumores (Ti) descrito por Rogers et al. (1987) Meth. en Enzymol., 153:253-277 (1987). Estos vectores son vectores de integración de la planta en los cuales, bajo transformación, los vectores integran una parte del vector de ADN en el genoma de la planta de piña. Para la integración de vectores basados en el plásmido Ti, la región integrada en los cromosomas de la planta huésped es la región situada entre los bordes derecho e izquierdo del plásmido Ti.
- 45
- 50
- 55

5 **[0121]** Algunos ejemplos de vectores *A. tumefaciens* útiles aquí son los plásmidos pKYLX6 y pKYLX7 de Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11 y Berger et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86:8402-8406. El plásmido PKYLX6 es un vector de *E. coli* diseñado para las construcciones intermedias, mientras que el plásmido pKYLX7 es un vector de *A. tumefaciens* diseñado para la integración de los genes clonados. Los vectores modificados pKYLX61 y pKYLX71 contienen HindIII, XhoI, BamHI, PstI y sitios SstI en lugar de la región de sitios de clonación de múltiples fragmentos original HindIII. Otro vector útil es el vector plásmido pBI101.2 que está disponible en Clontech Laboratories, Inc., de Palo Alto, California. Los plásmidos pKYLX7, pKYLX71 y pB7101.2 son vectores binarios que se utilizan en *A. tumefaciens* con un vector con un gen vir. Los sistemas de otros vectores también utilizan opcionalmente este vector, incluyendo, por ejemplo, sistemas de vectores trinarios. Otro sistema de transformación de la planta se basa en *Agrobacterium rhizogenes* que induce raíces peludas en lugar de un tumor en la transformación. Véase, por ejemplo, la publicación internacional N^o WO 88/02405 (publicada 07 de abril 1988) que describe el uso de la cepa A4 *A. rhizogenes* y su Tri plásmido junto con vectores *A. tumefaciens* pARC8 o pARC16 para transformar plantas. La transformación mediada por *Agrobacterium* se describe más adelante.

15 **[0122]** También se contempla el uso de vectores de expresión retroviral. Tal como se usa aquí, el término "vector de expresión retroviral" se refiere a una molécula de ADN que incluye una secuencia de promotor derivada de la región terminal de repetición larga (LTR) de un genoma de retrovirus. Debido a que algunos de los productos de los carotenoides de la invención se asocian a la producción y a la coloración de alimentos, el vector de expresión retroviral es preferentemente incompetente para replicarse en las células eucariotas. La construcción y el uso de vectores retrovirales ha sido descrito por, por ejemplo, Verma en Publicación internacional No. WO 87/00551, y en Cocking et al. (1987) Science 236:1259-62.

25 **[0123]** El vector utilizado para expresar el gen de codificación de polipéptido de biosíntesis de carotenoides puede incluir un marcador vegetal seleccionable que confiere un fenotipo seleccionable en la célula de piña transformada de. El gen marcador vegetal seleccionable en el segmento de ADN que se insertara codificará generalmente una función que permite la supervivencia y la aparición de tejido o callo transformado embriogénico o organogénico en un medio selectivo. Habitualmente, el gen marcador seleccionable codificará la resistencia a los antibióticos, con los genes apropiados, incluidos los que codifican la resistencia a los antibióticos de espectinomicina (por ejemplo, el gen aadA), el gen de la fosfotransferasa de la estreptomycin (SPT) que codifica la resistencia a la estreptomycin, el gen de la fosfotransferasa de la neomicina (NPTII) que codifica la resistencia a la kanamicina o a la geneticina, el gen de la fosfotransferasa de la higromicina (HPT) que codifica la resistencia a la higromicina, los genes que codifican la resistencia a los herbicidas que actúan para inhibir la acción de la sintasa de acetolactato (ALS), en particular los herbicidas de tipo sulfonilurea (por ejemplo, el gen de la sintasa de acetolactato (ALS) que contiene mutaciones que conducen a esa resistencia, en particular, el S4 y / o mutaciones HRA), genes que codifican la resistencia a los herbicidas que actúan para inhibir la acción de la sintasa de glutamina, tales como la fosfinotricina o basta (por ejemplo, el gen bar), o otros genes de este tipo, conocidos en la técnica. El gen bar codifica la resistencia al herbicida Basta, el gen nptII codifica la resistencia a los antibióticos kanamicina y geneticina, y el gen ALS codifica la resistencia a los herbicidas clorsulfurón. Se prefiere una selección basada en la resistencia a los herbicidas de tipo sulfonilurea. Algunos marcadores de selección basados en la proteína verde fluorescente (GFP) o en la β glucuronidasa (GUS) también se utilizan opcionalmente y se describen con más detalle en, por ejemplo, Mantis et al. (2000) "Comparing the utility of β glucuronidase and green fluorescent protein for detection of weak promoter activity in *Arabidopsis thaliana*," Plant Molecular Biology Reporter 18:319-330.

45 **[0124]** Los procedimientos para seleccionar las células vegetales transformadas que incorporan un gen de la resistencia deseada son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, si el marcador es resistente a la sulfonilurea, el medio de selección contiene generalmente un herbicida de tipo sulfonilurea en una concentración adecuada (por ejemplo, clorsulfurón en el rango de 1,000-1,000 pg / l, preferiblemente alrededor de 500-100 pg / L). Para la selección de células o tejido de piña resistentes a la geneticina que contienen el gen nptII, la geneticina se incluye normalmente en el medio en la cantidad de 10-50 mg / l. Las células o tejido resistentes a la espectinomicina que contienen el gen aadA se suelen seleccionar en un medio que contiene 200-1000 mg / l de espectinomicina.

50 **[0125]** Dado que muchos carotenoides son colorados, estos productos de carotenoides se pueden visualizar y determinar por su espectro característico y mediante otros procedimientos analíticos. Por lo tanto, se pueden utilizar los genes que codifican enzimas de biosíntesis de carotenoides como marcadores genéticos para permitir la selección visual de los transformantes. En particular, estas células transformadas muestran generalmente una gama de colores que van del amarillo al naranja y al rojo como consecuencia de los niveles crecientes de carotenoides. En algunas realizaciones, otras técnicas analíticas se pueden utilizar para seleccionar las células de piña transformadas, incluyendo, por ejemplo, la espectrometría de masas, la cromatografía en capa fina (TLC), la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), la electroforesis capilar (CE), la espectroscopia RMN, y las técnicas tradicionales de hibridación.

[0126] Una variedad de procedimientos han sido desarrollados para conectar operativamente el ADN a los vectores a través de terminales complementarios de cohesión o extremos romos. Por ejemplo, las zonas complementarias de homopolímero se pueden agregar a los segmentos de ácido nucleico donde hay que insertarlos y en el vector. El vector y el segmento de ácido nucleico se unen entonces por enlaces de hidrógeno entre las colas homopoliméricas complementarias para formar moléculas de ADN recombinante.

[0127] Por otra parte, enlazadores sintéticos que incluyen uno o más sitios de endonucleasa de restricción se pueden utilizar para unir los segmentos de ácido nucleico al vector de expresión integrante. Los enlazadores sintéticos se unen a segmentos de ácidos nucleicos de extremos romos mediante la incubación de los segmentos de ácido nucleico de extremos romos con un gran exceso de moléculas sintéticas enlazadoras en presencia de una enzima capaz de catalizar la ligadura de las moléculas de ácido nucleico de extremos romos, tales como la ligasa bacteriófaga de ADN T4. Así, los productos de la reacción son segmentos de ácido nucleico que llevan secuencias sintéticas enlazadoras en sus extremos. Estos segmentos de ácidos nucleicos se escinden luego mediante la endonucleasa de restricción apropiada y se liga con un vector de expresión integrante que se ha escindido mediante una enzima que produce terminales compatibles con los del enlazador sintético. Algunos enlazadores sintéticos que contienen una variedad de sitios de endonucleasa de restricción están disponibles comercialmente a partir de una serie de fuentes, incluyendo New England BioLabs (Beverly, MA).

[0128] Los segmentos de ADN introducidos pueden contener además uno o más genes que se escogen para proporcionar nuevas características de la planta de piña, para mejorar un rasgo existente de la planta de piña, o para modificar de otra manera la expresión de los fenotipos exhibidos por la planta de la piña, es decir, además de modificar los niveles de carotenoides en las plantas de piña. Tales características adicionales incluyen la resistencia a herbicidas, la resistencia a pesticidas, la resistencia a enfermedades, la tolerancia al medio ambiente (por ejemplo, calor, frío, sequía, salinidad), la morfología, las características de crecimiento, el contenido nutricional, el sabor, el rendimiento, las características hortícolas, las características relativas al consumidor (calidad), y otras similares. Ejemplos de genes que se pueden introducir incluyen los que confieren resistencia o que reducen la sensibilidad a ciertas enfermedades o plagas de la piña. Los ejemplos incluyen los que reducen la sensibilidad a la fusariosis, al marchitamiento por cochinilla, a la enfermedad del veteado, y a los nematodos.

VIII. CAROTENOID BIOSYNTHESIS MODULATION STRATEGIES

[0129] Los genes funcionales que se introduzcan pueden ser genes estructurales que codifican polipéptidos que imparten el fenotipo deseado, tales como la coloración modificada de la piña. Por otra parte, los genes funcionales pueden ser genes reguladores que juegan un papel en el control de transcripción y / o de traducción para suprimir, mejorar o modificar la transcripción y / o la expresión de genes endógenos en las plantas de piña. Los reguladores de expresión del polipéptido de biosíntesis de carotenoides introducidos pueden ser segmentos de ácidos nucleicos que codifican los factores de transcripción del polipéptido de biosíntesis de carotenoides, que, cuando se expresa en las células transformadas, para llevar a cabo una expresión elevada de genes de biosíntesis de carotenoides diana. En otros casos, los reguladores de expresión de polipéptido de biosíntesis de carotenoides incluyen segmentos de ácido nucleico que codifican los promotores de polipéptido de biosíntesis de carotenoides y / o los potenciadores de polipéptido de biosíntesis de carotenoides, que los segmentos de ácido nucleico recombinan homologamente con los promotores y / o los potenciadores de genes endógenos de polipéptido biosíntesis de carotenoides para aumentar o disminuir la expresión de los genes como se desee.

[0130] Para ilustrar aún más, diversas construcciones de ADN se pueden utilizar en una serie de técnicas para suprimir la expresión de genes endógenos de plantas, por ejemplo, la supresión de sentido o antisentido o ribozimas. Se ha demostrado la inhibición de ARN anti-sentido de la expresión génica; ver, por ejemplo, Sheehy et al. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:8805-8809, y Hiatt et al. U.S. Pat. No. 4,801,340. Por ejemplos de la utilización de supresión de sentido para modular la expresión de genes endógenos ver, Napoli et al. (1990) The Plant Cell 2:279-289, y U.S. Pat. No. 5,034,323.

[0131] Se pueden utilizar moléculas de ARN catalíticas o ribozimas también para inhibir la expresión de genes, y se utilizan opcionalmente para llevar a cabo la acumulación de carotenoides seleccionados que están río arriba en la vía de biosíntesis de carotenoides a partir del gen que se inhibe. Es posible diseñar ribozomas que se asocien específicamente con prácticamente cualquier ARN diana y unan la columna vertebral fosfodiéster a un lugar específico, inactivando así funcionalmente el ARN diana. Para llevar a cabo esta división, el ribozoma no es en sí alterado, por lo que es capaz de reciclar otras moléculas y de adherirse a ellas, lo que hace de ella una enzima verdadera. La inclusión de secuencias de ribozoma en los ARNs antisentido confiere una actividad de hibridación de RNA sobre ellos, lo que aumenta la actividad de las construcciones.

[0132] Se ha identificado una serie de clases de ribozomas. Una clase de ribozomas deriva de una serie de pequeños ARN circulares capaces de auto-división y replicación en las plantas. Los ARN se replican ya sea solos (ARNs viroides) o con un virus auxiliar (ARN satélites). Algunos ejemplos incluyen los ARN de la mancha del aguacate viroide y los ARN satélites del virus de manchas en anillo del tabaco, el virus pasajero de la alfalfa, el

virus moteado del terciopelo del tabaco, el virus moteado solanum nodiflorum, y el virus moteado del trébol subterráneo. El diseño y el uso de los ribozimas específicos del ARN diana se describen en Haseloff et al. (1988) Nature 334:585-591.

5 **[0133]** Para la supresión antisentido, la secuencia introducida también requiere no ser de larga duración en relación con el producto, que sea de transcripción primaria o de ARNm totalmente procesado. Generalmente, la mayor homología se puede utilizar para compensar el uso de una secuencia más corta. Además, la secuencia introducida no necesita tener el mismo patrón de intrón o de exón, y la homología de los segmentos no codificantes puede ser igualmente eficaz. Normalmente, se debería utilizar una secuencia de entre unos 30 o 40 nucleótidos y unos 2000 nucleótidos, aunque se prefiere una secuencia de al menos aproximadamente 100 nucleótidos, se prefiere más una secuencia de al menos 200 nucleótidos, y se prefiere especialmente una secuencia de al menos 500 nucleótidos.

15 **[0134]** Para ilustrarlo aún más, se utiliza también opcionalmente la interferencia de ARN (RNAi), también conocida como silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) para modular la acumulación de carotenoides en las células y plantas de piña. El ARNi es un mecanismo celular que niega selectivamente el efecto de un gen diana destruyendo el ARN mensajero. Al destruir el ARNm diana, la síntesis de proteínas se interrumpe, lo que "silencia" efectivamente el gen diana. En ciertas realizaciones, este proceso se inicia con un ARN de doble cadena (dsRNA), donde una de las cadenas es sustancialmente idéntica a la secuencia del ARNm diana. En consecuencia, en algunas realizaciones de la invención, los reguladores de expresión de un polipéptido de biosíntesis de carotenoide comprende segmentos de ácido nucleico que se introducen en las células de piña para desencadenar la producción de dsRNA de doble cadena, que luego se escinde en pequeños ARN de interferencia (siRNA), como parte de un proceso de iARN. Esto se traduce en la destrucción de los ARNm diana, lo que silencia efectivamente la expresión de un gen diana, como por ejemplo un gen endógeno que codifica un polipéptido de biosíntesis de carotenoides. Detalles adicionales relacionados con el iARN se describen, por ejemplo, en U.S. Pat. No. 6,573,099, con título "GENETIC CONSTRUCTS FOR DELAYING OR REPRESSING THE EXPRESSION OF A TARGET GENE," concedida el 3 de junio de 2003 a Graham, y en, por ejemplo, Arenz et al. (2003) "RNA interference: from an ancient mechanism to a state of the art therapeutic application?" Naturwissenschaften. 90(8):345-59, Wang et al. (2003) "RNA interference: antiviral weapon and beyond," World J Gastroenterol. 9(8):1657-61, y Lavery et al. (2003) "Antisense and RNAi: powerful tools in drug target discovery and validation" Curr Opin Drug Discov Devel. 6(4):561-9. Segmentos habituales de ácido nucleico que se pueden utilizar a efecto de silenciamiento del gen diana también están disponibles comercialmente en varios proveedores, tales como Ambion, Inc. (Austin, TX, USA), Benitec Australia Limited (St Lucia, AU), y similares.

35 **[0135]** A menudo, los genes funcionales que se introduzcan sufrirán modificaciones a partir de su forma nativa. Por ejemplo, las construcciones de sentido y de anti-sentido antes mencionadas tienen a menudo toda o una parte de la transcripción del gen nativo unido operativamente a una secuencia de promotor en el extremo 5' del segmento transcribible, y unido operativamente a la secuencia 3' de otro gen (incluyendo secuencias de poliadenilación) en el extremo 3' del segmento transcribible. Como es evidente para los expertos en la materia, la secuencia del promotor podría ser una de las secuencias activas de muchas plantas ya descritas. Por otra parte, otras secuencias promotoras activas de plantas podrían derivarse específicamente para vincularse al segmento transcribible. El promotor puede ser endógeno de la piña, o puede provenir de una fuente exógena, tal como un promotor del virus del mosaico de la coliflor 35S (Odell et al. (1985) Nature 313:810-812), el promotor ubicuo 1 (Christensen et al. (1992) Plant Mol. Biol. 18:675-689), o el promotor Smas (Ni et al. (1995) Plant J. 7:661-676). La secuencia en el extremo 3' a añadir puede derivar, preferiblemente, de la sintasa de nopalina o de genes de sintasa octopina, o alternativamente del gen de otra planta, o menos preferiblemente de cualquier otro gen eucariota.

45 **[0136]** Tal como se ha descrito anteriormente, la producción de carotenoides se puede elevar en las células y plantas de piña y transformadas con segmentos de ácido nucleico (por ejemplo, un primer gen de interés) que, por ejemplo, codifican las enzimas de biosíntesis de carotenoides. Opcionalmente, una vez que esta actividad biosintética se ha incrementado mediante la expresión de estos genes de biosíntesis de carotenoides introducidos, la vía puede ser desviada para la producción y la acumulación de carotenoides específicos. El desvío incluye de forma característica el uso de al menos un segundo gen de interés. Para ilustrar, el segundo gen puede codificar una enzima para obligar a la producción de un carotenoide en particular o, alternativamente, puede codificar un gen para detener el camino para la acumulación de un determinado carotenoide. Para forzar la producción de una expresión particular de carotenoides, se utiliza un gen de expresión de una biosíntesis de carotenoides encaminado hacia el carotenoide deseado. Los genes nativos o exógenos a la planta de la piña diana se utilizan opcionalmente en estos procedimientos, incluyendo, por ejemplo, genes de biosíntesis de carotenoides de fuentes que no sean de plantas, tales como bacterias, incluyendo las especies de Erwinia y de Rhodobacter. Genes ejemplares de la biosíntesis de carotenoides que se pueden utilizar para estos fines se describen más arriba. Para cortar la vía con el fin de acumular un compuesto carotenoide particular, el segundo gen proporcionara la inhibición de la transcripción de un gen (por ejemplo, nativos o exógenos) a la planta de

destino en la cual la enzima codificada por el gen inhibido es capaz de modificar el compuesto deseado de carotenoides. La inhibición se puede lograr mediante la transcripción del gen que se debe inhibir, ya sea en el sentido (co-supresión) o en la orientación antisentido del gen. Otras estrategias sentido y antisentido para modular la acumulación de carotenoides en las plantas de piña están referidas más arriba.

5 **[0137]** Para ilustrarlo aún más, para alterar la composición de carotenoides de una planta de piña para acumular niveles mas altos de carotenoides derivados del β caroteno, tales como la zeaxantina, la diglucósido zeaxantina, la cantaxantina y la astaxantina, la inhibición de licopeno ϵ - ciclasa de se puede lograr para evitar la acumulación de α -caroteno y de otros carotenoides que derivan del α -caroteno, tal como la luteína. Además de la inhibición de la licopeno ϵ - ciclasa, se puede utilizar la expresión aumentada de un segundo gen para una mayor acumulación de un determinado β caroteno derivado de un carotenoide. Por ejemplo, la expresión aumentada de caroteno β hidroxilasa es útil para la producción de zeaxantina, mientras que la expresión aumentada de caroteno β hidroxilasa y de enzima de cetoinroducción es útil para la producción de astaxantina. Por otra parte, para acumular licopeno, se puede llevar a cabo la inhibición de licopeno β -ciclasa o de licopeno ϵ - ciclasa y la licopeno β -ciclasa para reducir la conversión de licopeno en un α -caroteno y un β caroteno.

15 **[0138]** Se utiliza opcionalmente una variedad de genes para desviar la biosíntesis de carotenoides en las células y en las plantas de piña como se desee. Estos incluyen, pero no se limitan a, β caroteno hidroxilasa o crtZ (Hundle et al. (1993) FEBS Lett. 315: 329-334, Número de acceso M87280) para la producción de zeaxantina; enzima de cetoinroducción de codificación de genes, tal como ascrtW (Misawa et al. (1995) J. Bacteriol. 177:6575-6584, WO 95/18220, WO 96/06172) o β C-4-oxygenasa (crtO; Harker et al. (1997) FEBS Lett. 404:129-134) para la producción de cantaxantina; crtZ y crtW o crtO para la producción de astaxantina, s-ciclasa y ϵ - hidroxilasa para la producción de luteína, ϵ -hidroxilasa y crtZ para la producción de luteína y zeaxantina; licopeno ϵ -ciclasa antisentido (Número de acceso U50738) para la producción aumentada de β -caroteno; licopeno ϵ - ciclasa and licopeno β -ciclasa antisentido (Huguene y et al. (1995) Plant J. 8:417-424, Cunningham Jr et al. (1996) Plant Cell 8:1613-1626, Scolnik et al. (1995) Plant Physiol. 108:1343, Números de Acceso. X86452, L40176, X81787, U50739 y X74599) para la producción de licopeno; fitoeno desaturasa antisentido de planta para la producción de fitoeno, y similares.

20 **[0139]** De esta manera, el camino puede ser modificado para la alta producción de cualquier compuesto particular de carotenoides de interés. Tales compuestos incluyen, pero no se limitan a, α -criptoxantina, β criptoxantina, ξ -caroteno, fitoflueno, neurosporane, etc. Utilizando los procedimientos de la invención, se puede producir cualquier compuesto de interés en la vía de carotenoides en altos niveles en organos de almacenamiento seleccionados, como la fruta de las plantas de piña.

30 **[0140]** Opcionalmente, también se puede manipular la vía para disminuir los niveles de un carotenoide particular, por ejemplo, transformando la célula de la piña con secuencias de ADN antisentido que impide la conversión del compuesto precursor en el carotenoide particular que se está regulando.

35 **[0141]** Se utiliza opcionalmente cualquier estrategia para producir una planta de piña que incluye, por ejemplo, un primer gen de interés, o los genes primero y segundo de interés en la presente invención. Por ejemplo, un segundo gen de interés se puede utilizar para transformar una planta de piña en el momento mismo que el primer gen de interés se introduce (co-transformación). Opcionalmente, el segundo gen de interés se puede introducir en una planta de piña que ya ha sido transformada con un primer gen de interés, o, alternativamente, plantas transformadas de piña, una primera expresando el primer gen de interés y una segunda expresando el gen de interés, se pueden cruzar para producir una progenie dotada de ambos genes.

IX. FUENTES DE EXPLANTES DE PIÑA

45 **[0142]** Esencialmente, cualquier variedad de piña se puede transformar según los procedimientos descritos aquí. En algunas realizaciones, el material de explante de piña se obtiene de variedades que se utilizan normalmente para el consumo humano, incluyendo las del grupo Smooth Cayenne (Cayena Lisa), el grupo Español (por ejemplo, Española roja), el grupo Perolera, el grupo Pernambuco, y el grupo Primavera. La variedad más importante para su uso en la producción de piña en conserva, de otros productos a base de piña procesada y de piña fresca es la Cayena Lisa. En muchas de estas variedades hay un gran número de clones que se han establecido en diferentes zonas geográficas, y que se han adaptado a la producción en esos lugares. Entre los clones de la Cayena Lisa estan los clones Champaka que se han utilizado ampliamente para la producción de piña en conserva y fresca.

50 **[0143]** El explante inicial puede ser cualquier región meristémica de una planta, incluyendo el meristema (vértice) principal o axilar de la planta antes de la formación de las flores, y el meristemo principal o axilar de la corona de la fruta. Estas regiones se pueden extirpar de la planta y esterilizar mediante procedimientos estándar tal como se describe en este documento y bien conocidos por los expertos para establecer cultivos estériles en un medio artificial. Estos cultivos se pueden mantener durante un período prolongado de tiempo (por ejemplo, semanas,

55

meses o años) mediante una serie de etapas de propagación. Algunos medios adecuados para establecer y mantener cultivos de brotes in vitro se describen, por ejemplo, en DeWald et al. (1988) *Plant Cell Reports*, 7:535-537; Wakasa et al. (1978) *Japan J Breed* 28: 113-121; Mathews and Rangan (1981) *Scientia Hort* 14: 227-234; Srinivasa et al. (1981) *Scientia Hort* 15: 23S-238; Fitchet (1990) *Acta Hort* 275: 267-274; Bordoloi and Sarma (1993) *J Assam Science Society* 35: 41-45; y Firoozabady and Moy (2003) "Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis," *In Vitro*, en prensa.

[0144] En ciertas realizaciones de la presente invención, las células de piña que son el blanco para la liberación del ADN se obtienen por primera vez a partir de la parte basal de las hojas (es decir, la base de la hoja) o de las secciones de tallo de los brotes de piña cultivados in vitro, y que han proliferado en cultivo antes de a la etapa de entrega de ADN. Como se usa aquí, el término "base de la hoja" se refiere a la parte de la hoja que está conectada a la madre de un brote de piña.

[0145] Para la inducción de callo o tejido embriogénico, o de un callo o tejido organogénico, se transfieren explantes estériles tales como hojas o bases de hojas en medios artificiales específicos que incluyen combinaciones seleccionadas de hormonas vegetales sintéticas, que pueden incluir, por ejemplo, auxinas, citoquininas, giberelinas, y ácido abscísico. Para ilustrar, se suelen seleccionar auxinas sintéticas de entre, por ejemplo, depicloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico), dicamba (ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico), 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), ácido indole-3-acético (IAA), acético indole butírico (IBA), NAA (ácido 2-naftaleno acético), NOA (ácido naftoxiacético), o similares. Ejemplos de citoquininas que se pueden utilizar incluyen, aunque no se limitan a, BA (benzil adenina), BAP (benzal aminopurina), TDZ (tidiazuron), zeatina, kinetina, o similares. Cultivos celulares embriogénicos y organogénicos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, detalles adicionales relativos a cultivos celulares embriogénicos somáticos y otros aspectos adaptados para su uso en procedimientos en la presente invención se proporcionan, por ejemplo, picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico), dicamba (3,6-dicloro-2-metoxibenzoico), 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), ácido indol- 3-acético (IAA), ácido indolbutírico (IBA), ANA (2-naftaleno ácido acético), NOA (ácido naftoxiacético), o similares. Algunos ejemplos de citoquininas que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, BA (bencil adenina), BAP (aminopurina bencilo), TDZ (tidiazurón), zeatina, kinetina, o similares. Los cultivos celulares embriogénicos y organogénicos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los detalles adicionales relacionados con la cultura somática de células embriogénicas y otros aspectos que se han adaptado para su uso en los procedimientos de la presente invención se proporcionan en, por ejemplo, U.S. Pat. No. 5,952,543, titulada "GENETICALLY TRANSFORMED PINEAPPLE PLANTS AND METHODS FOR THEIR PRODUCTION," concedida el 14 de septiembre de 1999 a Firoozabady et al. y en las referencias ahí citadas y Firoozabady et al. (2002) *Molecular Breeding*. Detalles adicionales relativos a cultivos de células organogénicas se describen por ejemplo en la solicitud internacional publicada No. WO 01/33943, titulada "A METHOD OF PLANT TRANSFORMATION," por Graham et al., publicada el 17 de mayo de 2001, U.S. Pat. No. 5,908,771, titulada "METHOD FOR REGENERATION OF SALVIA SPECIES," concedida el 1 de junio de 1999 a Liu et al., U.S. Pat. No. 6,242,257, titulada "TISSUE CULTURE PROCESS FOR PRODUCING A LARGE NUMBER OF VIABLE COTTON PLANTS IN VITRO," concedida el 5 de junio de 2001 a Tuli et al., Croy (Ed.) *Plant Molecular Biology Labfax*, Bios Scientific Publishers Ltd. (1993), Jones (Ed.) *Plant Transfer and Expression Protocols*, Humana Press (1995), y en las referencias ahí citadas.

[0146] Un experto en la materia reconocerá que muchos tipos diferentes de células embriogénicas y organogénicas se pueden utilizar como células diana para la entrega de los segmentos de ácidos nucleicos descritos en este documento y para la selección de eventos de transformación. Por ejemplo, los segmentos de ácido nucleico de la invención se pueden entregar a las células de las secciones de la hoja, de la base de la hoja, o del tallo cuando se someten a la embriogénesis o a la organogénesis. Además, los segmentos de ácido nucleico se entregan opcionalmente a las células inmediatamente después de haber dado lugar a un callo o tejido embriogénico o a un callo o tejido organogénico. Como opción adicional, segmentos de ácidos nucleicos se pueden entregar a las células embriogénicas o organogénicas después de que el material embriogénico o organogénico se ha mantenido y multiplicado in vitro por un periodo de tiempo seleccionado.

X. SUMINISTRO DE SEGMENTOS DE ÁCIDO NUCLEICO DE ADN

[0147] Las células de piña transgénica de la presente invención se transforman en diferentes etapas de desarrollo, por ejemplo, en las distintas etapas de la organogénesis o de la embriogénesis. Además, los segmentos de ácido nucleico de la invención se pueden introducir en las células de piña en una serie de técnicas reconocidas. En general, los procedimientos apropiados de transformación de células vegetales incluyen la microinyección (Crossway et al. (1986) *BioTechniques* 4:320-334), electroporación (Riggs et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5602-5606, transformación mediada por *Agrobacterium*- (Hinchee et al. (1988) *Biotechnology* 6: 915-921), aceleración de partículas balísticas o bombardeo con microproyectiles (Sanford et al. U.S. Pat. No. 4,945,050; y McCabe et al. (1988) *Biotechnology* 6:923-926), suministro mediado por polen (Zhou et al. (1983) *Methods Enzymol.* 101: 433, De Wet et al. (1985) en manipulación experimental de tejidos de óvulos,

Chapman et al. (Eds.), Longman, p. 197; Hess (1987) Intern. Rev. Cytol. 107:367; y Luo et al. (1989) Plant Mol. Biol. Rep. 7:69), transferencia directa de ácido nucleico a protoplastos de células de piña (Caboche et al. (1984) Comptes Rendus Acad. Sci. 299, series 3:663), microinyección (Crossway et al. (1986) Mol. Gen. Genet. 202:179 and Reich et al. (1986) Bio/technol. 4:1001), macroinyección de inflorescencia (De la Pena et al. (1987) Nature 325:274), impregnación mediada por whiskers (Dunahay (1993) Biotécnicas 15:452-460 y Frame et al. (1994) The Plant Journal 6:941-948), perforación láser (Weber (1988) Naturwissenschaften 75:35), and ultrasonification (Zhang et al. (1991) Bio/technol. 9:994).

[0148] Para ilustrarlo aún más, la transferencia mediada por *Agrobacterium* es un sistema ampliamente aplicable para la introducción de genes en las células vegetales, porque los segmentos de ácido nucleico se pueden introducir en los tejidos de toda la planta, evitando así la necesidad de regeneración de una planta intacta a partir de un protoplasma. El uso de vectores de expresión mediada por *Agrobacterium* para introducir ADN en células de planta se conoce mucho en la técnica. Ver, por ejemplo, los procedimientos descritos por Fraley et al. (1985) Biotechnology, 3: 629 y Rogers et al. (1987) Methods in Enzymology, 153:253-277. Además, la integración de T-ADN es un proceso relativamente preciso que resulta en una serie de reordenamientos. La region de ADN a transferir se define mediante las secuencias de borde, y el ADN que interviene o el segmento de ácido nucleico suele ser insertado en el genoma de la planta tal como se describe en Spielmann et al. (1986) Mol. Gen. Genet., 205:34 y Jorgensen et al. (1987) Mol. Gen. Genet. 207:471.

[0149] Los vectores modernos de transformación con *Agrobacterium* como los anteriormente mencionados son capaces de replicarse en *E. coli*, así como el *Agrobacterium*, lo que permite manipulaciones convenientes como se describe en Klee et al., in Plant DNA Infectious Agents, Hohn and Schell, (Eds.), Springer-Verlag (1985) pp. 179-203.

[0150] Por otra parte, los recientes avances tecnológicos en los vectores de transferencia génica mediada por *Agrobacterium* han mejorado la disposición de los genes y los sitios de restricción en los vectores para facilitar la construcción de vectores capaces de expresar diversos genes de codificación de polipéptido. Por ejemplo, los vectores descritos por Rogers et al. (1987) Methods in Enzymology, 153:253, Tienen regiones multi-enlazadoras adecuadas, flanqueadas por un promotor y un sitio de poliadenilación para la expresión directa de genes de codificación de polipéptido insertados y son adecuados para los presentes propósitos. Los vectores adecuados se describen en mayor detalle anteriormente.

[0151] En una realización determinada de la invención, los segmentos heterólogos de ácido nucleico se introducen utilizando cepas de *Agrobacterium* provistas del ADN exógeno en un elemento de T-ADN. El elemento recombinante de T-ADN puede ser parte de un plásmido Ti que contiene las funciones de virulencia necesarias para la entrega de ADN de las células de *Agrobacterium* a células de la planta, o el elemento de T-ADN puede estar presente en un plásmido distinto de otro plásmido provisto de funciones de virulencia (se denominan vectores binarios). Una variedad de estos vectores binarios, capaces de reproducirse tanto en *E. coli* como en *Agrobacterium*, se describen en las referencias citadas anteriormente. En un procedimiento de co-cultivo, el *Agrobacterium* se cultiva a una concentración de $2-7 \times 10^8$ células/ ml y se diluye a $1-6 \times 10^8$ células/ ml, preferentemente $2-5 \times 10^8$ células/ ml antes del co-cultivo. El *Agrobacterium* se suele cultivar durante 1-5 días, preferentemente de 2-3 días con tejidos de piña.

[0152] Algunas cepas de *Agrobacterium* adecuadas incluyen el *Agrobacterium tumefaciens* y el *Agrobacterium rhizogenes*. Mientras que las cepas de tipo salvaje se pueden utilizar, derivados "desarmados" de ambas especies, en los cuales las secuencias de inducción de tumores del plásmido Ti se han retirado, son los preferidos. Las cepas deseables de *Agrobacterium tumefaciens* incluyen, por ejemplo EHA101, tal como se describe en Hood et al. ((1986) J. Bacteriol., 168:1291-1301), LBA4404, tal como se describe en Hoekema et al. ((1983) Nature, 303:179-80), y C58(pMP90), tal como se describe en Koncz and Schell ((1986) Mol. Gen. Genet., 204:383-96). Una cepa preferida de *Agrobacterium rhizogenes* es la 15834, tal como se describe Birot et al. (Biochem, 25: 323-35).

[0153] Los tejidos o callos embriogénicos o organogénicos de piña y las células de *Agrobacterium* que llevan el segmento de ADN se co-cultivan en un medio adecuado de co-cultivo para permitir la transferencia del T-ADN a las células vegetales. Cuando la cepa de *Agrobacterium* que lleva el segmento de ácido nucleico se ha preparado, se cultiva generalmente antes de la incubación con el callo o el tejido. El *Agrobacterium* se puede cultivar en medios sólidos o líquidos de acuerdo con procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia. Ver, por ejemplo, U.S. Pat. No. 5,262,316.

[0154] Como opciones adicionales, la transformación de protoplastos de la planta se puede lograr utilizando procedimientos basados en la precipitación de fosfato de calcio, el tratamiento de glicol de polietileno, electroporación, y combinaciones de estos tratamientos. Ver, por ejemplo, Potrykus et al. (1985) Mol. Gen. Genet., 199:183; Lorz et al. (1985) Mol. Gen. Genet., 199:178; Fromm et al. (1986) Nature, 319:791; Uchimiya et al. (1986) Mol. Gen. Genet., 204:204; Callis et al. (1987) Genes y desarrollo, 1: 1183; Marcotte et al. (1988)

Nature, 335:454; Wang et al. (1992) Bio/Technology, 10:691-696; y Fennell et al. (1992) Plant cell Reports, 11:567-570.

[0155] Para transformar las especies de plantas que no pueden regenerarse con éxito a partir de protoplastos, se pueden utilizar otras maneras de introducir segmentos de ácidos nucleicos en células o tejidos intactos. Por ejemplo, se pueden utilizar "cañón de partículas" o tecnología de microproyectiles de alta velocidad. Empleando esta tecnología, los segmentos de ácidos nucleicos son llevados a través de la pared celular y en el citoplasma sobre la superficie de pequeñas partículas de metal tal como se describe en Klein et al. (1987) Nature, 327:70; Klein et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85:8502; y McCabe et al. (1988) biotechnology, 6:923; y Vasil et al. (1992) Bio/ tecnología, 9:667-674. Las partículas de metal penetran a través de varias capas de células y por lo tanto permiten la transformación de las células en explantes de tejidos. La transformación de explantes de tejido elimina la necesidad de pasar por una etapa de protoplastos y por lo tanto acelera la producción de plantas transgénicas.

[0156] La expresión de los genes que codifican polipéptidos se pueden obtener mediante la inyección de los segmentos de ácido nucleico en los órganos reproductivos de una planta según como se describe en Pena et al. (1987) Nature, 325:274. Los segmentos de ácido nucleico también pueden ser directamente inyectados en las células embriones inmaduros y la rehidratación de embriones desecados tal como se describe en Neuhaus et al. (1987) Theor. Apl. Genet., 75:30; y Benbrook et al., in Proceedings Bio Expo 1986, Butterworth, Stoneham, masa., pp. 27-54 (1986).

[0157] Como alternativa, puede transformarse directamente una planta de plástidos. Se informa de la transformación estable de cloroplastos en las plantas superiores, véase, por ejemplo, Svab et al. (1990) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 87:8526-8530; Svab et al. (1993) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:913-917; Staub et al. (1993) Embo J. 12:601-606. El procedimiento emplea la liberación por cañón de partículas de segmentos de ácido nucleico que contienen un marcador de selección y la focalización de los ácidos nucleicos en el genoma del plástido mediante la recombinación homóloga. En estos procedimientos, la expresión de genes de plástidos se puede lograr mediante el uso de un promotor del gen de plástidos o trans-activación de un trasngen silencioso proveniente de plástidos posicionado para la expresión de una secuencia promotora selectiva como la reconocida por la polimerasa ARN T7. El gen de plástidos silencioso se activa por la expresión de la polimerasa de ARN específica de una construcción de expresión nuclear y la focalización de la polimerasa hacia los plástidos mediante el uso de un péptido de tránsito. La expresión específica de tejido se puede obtener en este procedimiento mediante el uso de una polimerasa de RNA específica codificada en el núcleo y dirigida al plástido a partir de un promotor específico de tejido de planta adecuado. De este sistema se informa en McBride et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 91:7301-7305.

XI. REGENERACIÓN Y MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS DE PIÑA TRANSGÉNICAS

[0158] Después de la liberación de los segmentos de ácidos nucleicos, las células embriogénicas u organogénica se suelen transferir a los medios que pueden incluir un agente selectivo (por ejemplo, un herbicida o similar) que es capaz de impedir el crecimiento de células de piña que no han recibido un gen (por ejemplo, un marcador de selección), cuyo producto de expresión es capaz de prevenir la acción del agente selectivo. Los marcadores de selección se describen más arriba. Después de un período de cultivo, los callos o tejidos embriogénicos u organogénicos o tejido que siguen creciendo normalmente se separan de los callos o tejidos embriogénicos u organogénicos cuyo crecimiento se ha ralentizado o terminado.

[0159] La regeneración de plantas a partir de cualquier protoplasto de planta individual o varios explantes es bien conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, Weissbach et al. (Eds.), Métodos de Biología Molecular de Plantas, Academic Press, Inc. (1988). En ciertas realizaciones, el proceso de regeneración y el crecimiento incluye las etapas de selección de células y brotes transformados, enraizado de brotes transformados y el crecimiento de plántulas en el suelo. A modo de ilustración, la regeneración de plantas que contienen un gen introducido por Agrobacterium a partir de explantes de hojas se puede lograr según lo descrito por Horsch et al. (1985) Science, 227:1229-1231. En este procedimiento, los transformantes se cultivan en presencia de un agente de selección y en un medio que induce la regeneración de brotes en plantas que se transforman según lo descrito por Fraley et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Ciencia. U.S.A., 80:4803. Este procedimiento produce por lo general brotes en de dos a cuatro semanas y estos brotes transformados se transfieren a un medio inductor de raíces adecuado que contiene a un con agente selectivo y un antibiótico para impedir el crecimiento bacteriano. Para la piña, se pueden utilizar las bases de las hojas para producir materiales organogénicos (Firoozabady y Moy (2003) "La regeneración de plantas de piña a través de embriogénesis somática y organogénesis," In Vitro, en prensa) y a continuación, estos materiales pueden ser expuestos a Agrobacterium para producir, tal vez mediante selección, materiales organogénicos transgénicos. Estos materiales son entonces inducidos a producir brotes y plantas completas. En ciertas realizaciones, se prefiere la transformación de callos embriogénicos para la formación de brotes de plantas transformados. Entonces se trasplantan los brotes transformados enraizados en presencia del agente selectivo para formar plántulas al suelo u otros medios para permitir la producción de raíces.

- 5 **[0160]** Los detalles adicionales relacionados con la regeneración de plantas, la micropropagación, y otros aspectos que se han adaptado para su uso en los procedimientos de la presente invención se proporcionan en, por ejemplo, U.S. Pat. No. 5,952,543 y WO 01/33943 (ya referenciada más arriba), Patentes americanas 5,591,616, 6,037,522, Solicitudes europeas 604662 (A1) y 672752 (A1), y WO 01/12828. Ver también, Kyte et al., *Plants from Test Tubes: An introducción to Micropropagación*, Timber Press, Inc. (1996), Hudson et al., Hartmann y Kester's *Plant propagación: principles and Practices 7th Ed.*, Pearson Educación (2001), Bajaj (Ed.) *High-Tech and Micropropagation I*, Springer-Verlag New York, Inc. (1992), Jain, *In Vitro Haploid production in Higher Plants*, Kluwer academic Publishers (1996), y Debergh et al. (Eds.), *Micropropagation: technology and Application*. Kluwer academic Publishers (1991).
- 10 **[0161]** Opcionalmente, los polipéptidos de biosíntesis de carotenoides de la invención se pueden recuperar y purificar a partir de cultivos de células de piña transformadas o tejidos de planta de la piña transformados (por ejemplo, tejidos de frutas u otros) por cualquiera de una serie de procedimientos bien conocidos en la técnica, incluyendo precipitación de sulfato de amonio o etanol, extracción por ácidos, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxiapatita, y la cromatografía de lectina. En algunos casos la proteína tendrá que volver a plegarse para recuperar un producto funcional. Además de las referencias citadas arriba, son bien conocidos en la técnica una variedad de procedimientos de purificación, incluyendo, por ejemplo, aquellos indicados en Sandana, *Bioseparation of Proteins*, Academic Press, Inc. (1997); and Bollag et al., *Protein Methods*, 2nd Ed., Wiley-Liss, NY (1996); Walker, *The Protein Protocols Handbook*, Humana Press, NJ (1996); Harris and Angal, *Protein Purification Applications: A Practical Approach*, IRL Press (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, 3rd Ed., Springer Verlag (1993); and Janson et al., *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*, 2nd Ed., Wiley-VCH (1998).

XII. EJEMPLOS

- [0162]** Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar la invención, y no constituyen ninguna limitación de esta.
- 25 **[0163]** Los medios se designan con letras y número; las letras se refieren a componentes de medios empleados, seguido por un número que indica la concentración del componente particular. Por ejemplo, B2N2 es un medio MS que contiene 6- benzilamino purina (BA o B) y acético ácido -naftaleno (NAA o N). Los detalles más específicos relativos las composiciones de los medios a los que se hace referencia en estos, incluyendo las concentraciones de componentes se suministran más abajo.

30 **EJEMPLO 1: INTRODUCCIÓN DEL GEN DE LA FITOENO SINTASA (PSY) DE MANDARINA EN PIÑA (LÍNEA TRANSGÉNICA 16.5.9)**

1. AISLAMIENTO DEL GEN PSY A PARTIR DE CÍTRICOS.

i Diseño de cebadores

- 35 **[0164]** Dos primeros diseños se diseñaron a partir de la información de secuencia de PSY-Naval (Número de acceso Gi 5959859):

Cebador directo PSY-F: 5'-aaa ctg cag atg tct gtt aca ttg ctg tgg-3'

Cebador inverso PSY-R: 5'-gat atc tta agc ctt act ggt ata tat tct tg-3'

ii. Aislamiento de ARN

- 40 **[0165]** El ARN total se extrajo de tejido de hoja de mandarina con una solución de Trizol (Invitrogen, Inc., CA, USA). La extracción se realizó según el proceso de fabricación.

iii. Reacción de transcripción inversa

[0166] La transcripción inversa se llevado a cabo con 1 µg de ARN total y 1 µl de 10 µM de primer PSY-R en 20 µl volumen de reacción.

iv. PCR para aislar el gen PSY

- 45 **[0167]** Se realizó PCR con primeros PSY-F y PSY-R en la siguiente reacción:

PSY-F (10 µM): 1 µl

PSY-R (10 µM): 1 µl

Reacción inversa:	1 µl
DNTPs (10 mM):	1 µl
Tampón 10X:	2.5 µl
polimerasa ADN Pfu:	0.2 µl
5 Agua	25 µl

[0168] El programa PCR fue: 92°C durante 2 minutos para desnaturalizar. Entonces 35 ciclos de:

92°C durante 30 segundos

55°C durante 20 segundos

72°C durante 1.5 minutos.

10 v. Clonación del fragmento PCR.

[0169] El producto o fragmento de reacción PCR se realizó en 0.8% de gel Agrose. El fragmento PCR se cortó y purificó empleando el Kit de purificación de Gel Qiagen (Qiagen, Inc., CA, USA). Entonces se clonó el fragmento en un vector pGEM-Teasy (Promega Corp., WI, USA). La secuenciación se realizó empleando primeros T7 y M13-R.

15 2. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE BROTES

[0170] se utilizaron meristemas aislados de coronas de piñas Del Monte Gold MD-2 cultivadas en el campo en Costa Rica para establecer cultivos de brotes. Brevemente, se retiraron manualmente y se desecharon las hojas de las coronas, se lavaron con agua el núcleo o el tallo de la corona (~ 3x5 cm), se esterilizó la superficie con un 33% de Clorox más 0,05% de Tween20 con agitación durante 25 minutos y se enjuagó dos veces con agua esterilizada. Los meristemas laterales y el meristema de la punta de la corona se extirparon de la base mediante la eliminación de las hojas primarias, una por una, quemando frecuentemente las herramientas. Se dispusieron el explante del meristema de la punta de la corona incluyendo la cúpula del meristema, 2 a 3 hojas primarias pequeñas, y 1 cm³ de núcleo del tallo en el medio de cultivo de brote B2N2 CC. Los meristemas laterales también fueron aislados junto con un 1 cm³ de núcleo del tallo y se cultivaron en el mismo medio. Se utilizaron CC (500 mg / l tanto de *carb* como de cefotaxima) para eliminar la contaminación de levadura endógena y de hongos. Los cultivos se incubaron bajo luz continua a 28 ° C. Nueve días después del inicio del cultivo, los tejidos se subcultivaron en B2N2 + N. Se empleó Nistatina (N, 40 mg / l) para eliminar la contaminación de levadura endógena y de hongos. Después de 20 días, las puntas de las hojas de la corona habían crecido mucho, se retiraron para promover el crecimiento del meristema de la punta de la corona y fueron trasferidos a un medio fresco B2N2 + NA. También se empleó Amfocilina B (A, 5 mg / l) se utilizó para eliminar la contaminación de levadura endógena y de hongos. Después de dos semanas adicionales, se formaron brotes (2-3 por explante) y posteriormente se produjeron pequeños brotes nuevos para formar un grupo de brotes. Después de un total de 4 meses a partir del inicio de los cultivos, los grupos de brotes fueron trasferidos y mantenidos en un medio líquido B1.5N.5 con subcultivos mensuales.

35 3. PRETRATAMIENTO DE EXPLANTES PARA COCULTIVO CON AGROBACTERIUM

[0171] Se emplearon como explantes unos brotes de crecimiento rápido. Se cortaron las puntas de las hojas largas (>15 mm) para proporcionar explantes menores. Los brotes se cortaron longitudinalmente en 4-6 secciones y pretrataron (se cultivaron) en P10T1.1B6 (con un contenido de 6% de pulpa de banana) durante 8 días. Las secciones de base y núcleo de las hojas se prepararon y mezclaron con Agrobacterium para su cocultivo.

40 4. CULTIVO DE TUMEFACIENS AGROBACTERIUM Y PREPARACIÓN

[0172] Se utilizó una cepa de Agrobacterium tumefaciens GV3101 que contenía un sistema de vector binario para la transformación. El sistema de vector incluía un vector pDM que comprendía un gen SurB que confería resistencia al clorsulfurón, y el gen PSY para expresar el gen de la fitoeno sintasa. Las bacterias se sacaron de glicerol congelado, se cultivaron y se mantuvieron en un medio LBroth solidificado con un 1,5% de Bactoagar que contenía 10 mg / l de tetraciclina. Un día antes de co-cultivo, las bacterias se desprendieron del medio sólido empleando un bucle y se suspendieron en medio líquido MinAsuc y se cultivaron durante un día en un agitador (120 rpm) a 28 ° C. Se determinó la concentración de bacterias utilizando un espectrofotómetro (Beckman DU-50) antes del co-cultivo, y se demostró que era de 4x10⁸ células / ml.

5. CO-CULTIVO EN MEDIO DE CO-CULTIVO

5 [0173] Las bacterias se mezclaron con una proporción de volumen de 4:1 (tejido de planta: células de Agrobacterium) con 170 secciones y núcleos de hojas, el tejido se secó y la mezcla se colocó en círculos de filtro de 7,0 cm de vidrio estéril Fisherbrand G6 sobre el medio de cocultivo P10T2.2As300. Las placas se dispusieron en un parafilm y se colocaron en una incubadora de ambiente controlado a 24 ° C en oscuridad durante 3 días.

6. RECUPERACIÓN, SELECCIÓN, y REGENERACIÓN DE PLANTA

10 [0174] Después del co-cultivo, los tejidos fueron transferidos (15-20 piezas / placa) a un medio de recuperación P10T1.1Carb500 durante un período de recuperación de 7 días bajo condiciones de baja iluminación (16 horas / día). A continuación los explantes se transfirieron a un medio de selección P10T2.2Carb300CS5 durante 17 días y luego a P10T2.2Carb500CS5 observando el crecimiento bacteriano e incubados con alta intensidad de luz (16 horas / día). Se utilizó carbenicilina para matar a los Agrobacterium residuales y clorsulfurón (CS) para seleccionar las células transformadas. En el medio de selección, la mayoría de los tejidos se volvió marrón dentro de 3-6 semanas, aunque sin embargo, de vez en cuando algunos sectores de los tejidos se mantuvieron saludable y empezó a formarse tejido verde morfogénica saludable. Los tejidos morfogénicos produjeron brotes transgénicos en medio B3N.2Carb100CS10 en 30 días. Entonces estos se transfirieron a B1Carb100CS10 para que se alargasen. Algunos de los brotes fueron vitrificados, los cuales fueron luego transferidos a B1A1%Carb100CS10 durante 14 días para producir brotes alargados normalmente.

7. CONFIRMACIÓN DE TRANSFORMACIÓN

20 [0175] se confirmó que los brotes se transformaron por varios medios: 1. Los brotes resistentes CS y los primordiales se mantuvieron sanos y verdes en niveles letales de CS, 2. Los brotes resistentes CS y los primordiales se muestrearon (2-5 mg/ pieza resistente) para un ensayo GUS. Los tejidos transformados manchados de azul y los no transformados no manchaban de azul. Los tejidos también se pueden probar molecularmente para transformación utilizando, por ejemplo, PCR y análisis de Southern Blot.

8. MICROPROPAGACIÓN Y PRODUCCIÓN DE PLANTS TRANSGÉNICAS

25 [0176] Se transfirieron grupos de brotes individuales o pequeños a 15 ml de medio líquido B1Carb100CS20 en cubos de GA-7 (2-3 grupos/ cubo) para propagación y crecimiento. Opcionalmente, 30 días después, los grupos de brotes se pueden micropropagar y mantener en B1.5N.5CS20 (que no contenía agentes contra selectivos) durante varios meses. Los brotes individuales (de 4-6 cm de longitud) se separaron y cultivaron en un medio líquido de enraizado N.5IBA.5CS10 o N.5IBA.5CS20 (que no contenía agentes contra selectivos) durante 2-4
30 semanas para producir plantas completas. Entonces, se pueden trasplantar las plantas en suelo, endurecidas gradualmente y transferidas a condiciones de invernadero.

EJEMPLO 2: INTRODUCCIÓN DEN DE LA FITOENO SINTASA (PSY) DE LA MANDARINA A LA PIÑA (13.18.2)1. AISLAMIENTO DEL GEN PSY DEL CÍTRICO

35 [0177] Igual que en el ejemplo 1.

2. PREPARACIÓN DE TEJIDOS FUENTEi. Establecimiento de cultivos de brotes.

[0178] Igual que en el ejemplo 1.

ii. Pretratamiento de explantes para su co-cultivo con Agrobacterium.

40 [0179] Los brotes de crecimiento rápido cultivados tal como se expuso anteriormente durante 4 meses se utilizaron como explantes. Las puntas de las hojas largas (> 15 mm) fueron cortadas para proporcionar explantes más pequeños. Los brotes se cortaron longitudinalmente en 3 a 8 secciones y pretratados (cultivados) en medio P2T10A durante 10 días. Las bases de las hojas y las secciones centrales se prepararon y pretataron de nuevo en los mismos medios durante 62 días antes de la transferencia a otro medio de pre tratamiento. Las secciones
45 con tejidos morfogénicos que contenían brotes primordiales se subcultivaron en medio T1.1I.1 durante 24 días. Entonces se subcultivaron los tejidos organogénicos en medio B3N.2 durante 22 días, luego se cortaron en secciones de 5.3 mm y se colocaron en medio B2N2 durante 7 días, y luego se mezclaron con Agrobacterium para su co-cultivo.

3. CULTIVO Y PREPARACIÓN DE AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

5 **[0180]** Se utilizó una cepa de *agrobacterium tumefaciens* GV3101 que contenía a los vectores binarios, a la cual se hacia referencia más arriba, para la transformación. Tal como se ha mencionado, el vector pDM contiene al gen surB, que confiere resistencia a clorsulfurón y el gen PSY expresa el gen de la fitoeno sintasa. Las bacterias se sacaron de glicerol congelado, se cultivaron y mantuvieron en un medio L-Broth solidificado con 1,5% de Bactoagar que contenía 10 mg / l de tetraciclina. Un día antes del co-cultivo, las bacterias se desprendieron del medio sólido empleando un bucle y se suspendieron en medio líquido MinAsuc y se cultivaron durante un día en un agitador (120 rpm) a 28 ° C. Se determinó la concentración de bacterias utilizando un espectrofotómetro (Beckman DU-50) antes del co-cultivo, y se demostró que era de 1.7×10^9 células / ml.

10 4. CO-CULTIVO EN MEDIO DE CO-CULTIVO

[0181] Las bacterias se mezclaron en una proporción de volumen de 4:1 (tejido de planta: células de Agrobacterium), el tejido se secó, y la mezcla se colocó en círculos de filtro de vidrio estéril de 7,0 cm Fisherbrand G6 sobre el medio de cocultivo B3n. 2AS300. Las placas se pusieron en parafilm y colocaron en una incubadora de ambiente controlado a 24 ° C en la oscuridad durante 3 días.

15 5. RECUPERACIÓN, SELECCIÓN Y REGENERACIÓN

20 **[0182]** Después del co-cultivo, los tejidos fueron transferidos (20-25 piezas / placa) a un medio de recuperación B3N.2Carb500 B3n. 2CEF400 durante un período de recuperación de 7 días bajo condiciones de baja iluminación (16 horas / día). Los explantes fueron transferidos a un medio de selección B2N2CEF400CS5 en condiciones de alta intensidad de luz (16 horas / día) durante 25 días y luego en B3N.2CEF400CS5 con subcultivos mensuales a partir de entonces. Se utilizó cefotaxima para matar a los Agrobacterium residuales y clorsulfurón (CS) para seleccionar las células transformadas. En el medio de selección, la mayoría de los tejidos se volvió marrón en 4 a 6 semanas, sin embargo, dos sectores de tejidos se mantuvieron saludables y empezaron a crecer para producir tejido verde morfogénico saludable. Las plantas fueron regeneradas tal como se describe en el ejemplo 1.

6. CONFIRMACIÓN DE TRANSFORMACIÓN

25 **[0183]** Igual que en ejemplo 1.

7. MICROPROPAGACIÓN Y PRODUCCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS

[0184] Igual que en ejemplo 1.

COMPOSICIONES DE LOS MEDIOS

Asuc mínimo = MinAsuc

30 **[0185]**

Rango preferido

fosfato de potasio dibásico	10.5 g/l	5-20 g/l
fosfato de potasio monobásico	4.5 g/l	2-8 g/l
sulfato de amonio	1.0 g/l	0.5-3 g/l
35 dihidrato de citrato de sodio	0.5 g/l	0-2 g/l
heptahidrato de sulfato de magnesio	247 mg/l	0-1000 g/l
glucosa	2.0 g/l	1-30 g/l

MinAsuc

[0186] MinA pero con sacarosa en lugar de glucosa.

40 L-Broth:

[0187]

Tryptone	10 g/l
Extract de levadura	5 g/l
NaCl	5 g/l
glucosa	1 g/l
pH	7.0 - 7.2
Bacto Agar	15 g/l

5 **[0188]** Para medios de cultivo de tejidos, el pH debería estar en el intervalo de aproximadamente 5-7.5, preferiblemente aproximadamente 5.6. El medio se utiliza tras la esterilización por *autoclaving*, excepto para componentes específicos que son filtrados y esterilizados y luego añadidos después del *autoclaving*.

MS

[0189]

	Sales MS	1X
	Vitaminas B5	1X
10	Sacarosa	30 g/l
	MES	600 mg/l
	Gel-rite®	2.5 g/l
	pH	5.7

B1.5N.5

15 **[0190]**

	Medio MS +	
	BA	1.5 mg/l
	NAA	0.5 mg/l

B2N2

20 **[0191]**

	medio MS +	
	BA	2 mg/l
	NAA	2 mg/l

B2N2 + CC

25 **[0192]**

	medio MS +	
	BA	2 mg/l
	NAA	2 mg/l
	Carbenicilina	500 mg/l

- Cefotaxime 500 mg/l
B2N2CEF400CS5
[0193]
 medio MS +
- 5 BA 2 mg/l
 NAA 2mg/l
 Cefotaxime 400 mg/l
 Clorsulfuron 5 µg/l
B2N2 + N
- 10 **[0194]**
 B2N2 +
 Nistatina 40 mg/l
B2N2 + NA
[0195]
 15 medio B2N2 +
 Nistatina 40 mg/l
 Anfotericina B 5 mg/l
B3N.2
[0196]
- 20 MS+
 BA 3 mg/l
 NAA 0.2 mg/l
B3N.2AS300
[0197]
- 25 B3N.2 +
 Acetosiringone 300 µM
B3N.2CARB500
[0198]
 B3N.2 +
- 30 Carbenicilina 500 mg/l
B3N.2CEF400
[0199]
 B3N.2 +
 Cefotaxime 400 mg/l

B3N.2CEF400CS5

[0200]

B3N.2Cef400 +

Clorsulfuron 5 Pg/l

5 P2T10A

[0201]

MS con agar en lugar de Gel-rite +

Picloram 2 mg/l

Tidiazuron 10 mg/l

10 P10T1.1B6

[0202]

MS +

Picloram 10 mg/l

Tidiazuron 1.1 mg/l

15 Pulpa de Banana 6 %

P10T1.1CARB500

[0203]

MS +

Picloram 10 mg/l

20 Tidiazuron 1.1 mg/l

Carbenicilina 500 mg/l

P10T2.2

[0204]

MS +

25 Picloram 10 mg/l

Tidiazuron 2.2 mg/l

P10T2.2A

[0205]

P10T2.2 con agar en lugar de gel-rite

30 P10T2.2AS300

[0206]

MS +

Picloram 10 mg/l

Tidiazuron 2.2 mg/l

35 Acetosiringone 300 µM

P10T2.2CARB300CS5

[0207]

MS+

	Picloram	10 mg/l
5	Tidiazuron	2.2 mg/l
	Carbenicilina	300 mg/l
	Clorsulfuron	5 µg/l

P10T2.2CARB500CS5

[0208]

10 MS+

	Picloram	10 mg/l
	Thidiazuron	2.2 mg/l
	Carbenicilina	500 mg/l
	Clorsulfuron	5 µg/l

15 P10B.5

[0209]

MS +

	Picloram	10 mg/l
	BA	0.5 mg/l

20 LÍQUIDO N.5I.5

[0210]

MS sin Gel-rite +

	NAA	0.5 mg/l
	IBA	0.5 mg/l

25 T1.1I.1

[0211]

MS +

	Tidiazuron	1.1 mg/l
	IBA	0.1 mg/l

30

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Procedimiento para controlar la acumulación de carotenoides en al menos una célula de piña, comprendiendo el procedimiento introducir al menos un regulador de la expresión de un polipéptido de biosíntesis de carotenoide en dicha célula de piña, donde dicho regulador de la expresión de un polipéptido de biosíntesis de carotenoide inhibe la expresión de (i) una licopeno β ciclasa o (ii) una licopeno β ciclasa y una licopeno ϵ - ciclasa en dicha célula de piña, y donde dicho regulador de la expresión de un polipéptido de biosíntesis de carotenoide comprende (i) un segmento de ácido nucleico en una orientación sentido o antisentido con respecto a una porción de un gen endógeno que codifica a dicha licopeno β ciclasa o (ii) un segmento de ácido nucleico en una orientación sentido o antisentido con respecto a una porción de un gen endógeno que codifica a dicha licopeno β ciclasa, y un segmento de ácido nucleico en una orientación sentido o antisentido con respecto a una porción de un gen endógeno que codifica a dicha licopeno ϵ - ciclasa.
- 10 **2.** El procedimiento para controlar la acumulación de carotenoides en al menos una célula de piña según la reivindicación **1**, donde dicho regulador de la expresión de un polipéptido de biosíntesis de carotenoide inhibe la expresión de una licopeno β ciclasa y una licopeno β ciclasa en dicha célula de piña, y donde dicho regulador de la expresión de un polipéptido de biosíntesis de carotenoide comprende un segmento de ácido nucleico en una orientación sentido o antisentido con respecto a una porción de un gen endógeno que codifica a dicha licopeno β ciclasa, y un segmento de ácido nucleico en una orientación sentido o antisentido con respecto a una porción de un gen endógeno que codifica a dicha licopeno ϵ - ciclasa.
- 15 **3.** El procedimiento de la reivindicación **1**, donde dicho regulador de la expresión de un polipéptido de biosíntesis de carotenoide controla la acumulación de licopeno.
- 20 **4.** El procedimiento de la reivindicación **1**, donde dicha célula de piña es una célula organogénica producida por cultivo de al menos una célula meristemática no apicales.
- 25 **5.** Procedimiento para alterar la coloración de una planta de piña, comprendiendo el procedimiento introducir al menos un regulador de la expresión de un polipéptido de biosíntesis de carotenoide en al menos una planta de piña, donde dicho regulador de la expresión de un polipéptido de biosíntesis de carotenoide controla la acumulación de al menos un carotenoide coloreado en dicha planta de piña, alterando de este modo dicha coloración de dicha planta de piña, y donde dicho regulador de la expresión de un polipéptido de biosíntesis de carotenoide inhibe la expresión de (i) una licopeno β ciclasa o (ii) una licopeno β ciclasa y una licopeno ϵ - ciclasa y comprende (i) un segmento de ácido nucleico en una orientación sentido o antisentido con respecto a una porción de un gen endógeno que codifica a dicha licopeno β ciclasa o (ii) un segmento de ácido nucleico en una orientación sentido o antisentido con respecto a al menos una porción de un gen endógeno que codifica a dicha licopeno β ciclasa, y un segmento de ácido nucleico en una orientación sentido o antisentido con respecto a una porción de un gen endógeno que codifica a dicha licopeno ϵ - ciclasa.
- 30 **6.** El procedimiento para alterar la coloración de una planta de piña de la reivindicación **5**, donde dicho regulador de la expresión de un polipéptido de biosíntesis de carotenoide inhibe la expresión de una licopeno β ciclasa y una licopeno ϵ - ciclasa y comprende un segmento de ácido nucleico en una orientación sentido o antisentido con respecto a una porción de un gen endógeno que codifica a dicha licopeno β ciclasa, y un segmento de ácido nucleico en una orientación sentido o antisentido con respecto a una porción de un gen endógeno que codifica a dicha licopeno ϵ - ciclasa.
- 35 **7.** El procedimiento de la reivindicación **1**, **2**, **5** o la **6**, donde dicha inhibición de la expresión se obtiene por interferencia del ARN.
- 40 **8.** El procedimiento de la reivindicación **5**, donde dicho carotenoide coloreado es licopeno.
- 9.** El procedimiento de la reivindicación **5**, donde dicho regulador de la expresión de un polipéptido de biosíntesis de carotenoide se introduce en al menos una célula de piña a partir de la cual dicha planta de piña se regenera.
- 45 **10.** El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones **1 a 9**, donde dicho regulador de la expresión de un polipéptido de biosíntesis de carotenoide controla la acumulación de carotenoide en dicha célula de piña mediante el aumento de la acumulación de licopeno.
- 50 **11.** Célula de piña que comprende al menos un regulador de la expresión de un polipéptido de biosíntesis de carotenoide heterólogo, inhibiendo dicho regulador de la expresión de un polipéptido de biosíntesis de carotenoide la expresión de (i) una licopeno β ciclasa o (ii) una licopeno β ciclasa y una licopeno ϵ - ciclasa en dicha célula de piña, y comprende (i) un segmento de ácido nucleico en una orientación sentido o antisentido con respecto a una porción de un gen endógeno que codifica a dicha licopeno β ciclasa o (ii) un segmento de ácido nucleico en una orientación sentido o antisentido con respecto a una porción de un gen endógeno que codifica a dicha licopeno β

ciclasa, y un segmento de ácido nucleico en una orientación sentido o antisentido con respecto a una porción de un gen endógeno que codifica a dicha licopeno ϵ - ciclasa.

5 **12.** Célula de piña según la reivindicación **11**, donde dicho regulador de la expresión de un polipéptido de biosíntesis de carotenoide inhibe la expresión de una licopeno β ciclasa y una licopeno ϵ - ciclasa en dicha célula de piña, y comprende un segmento de ácido nucleico en una orientación sentido o antisentido con respecto a una porción de un gen endógeno que codifica a dicha licopeno β ciclasa, y un segmento de ácido nucleico en una orientación sentido o antisentido con respecto a una porción de un gen endógeno que codifica a dicha licopeno ϵ - ciclasa.

10 **13.** Célula de piña según la reivindicación **12**, donde dicha inhibición de la expresión se obtiene por interferencia del ARN.

14. Célula de piña según la reivindicación **11**, donde dicho regulador de la expresión de un polipéptido de biosíntesis de carotenoide controla la acumulación de licopeno.

15. Planta de piña regenerada a partir de dicha célula de piña según cualquiera de las reivindicaciones **11 a 14**.

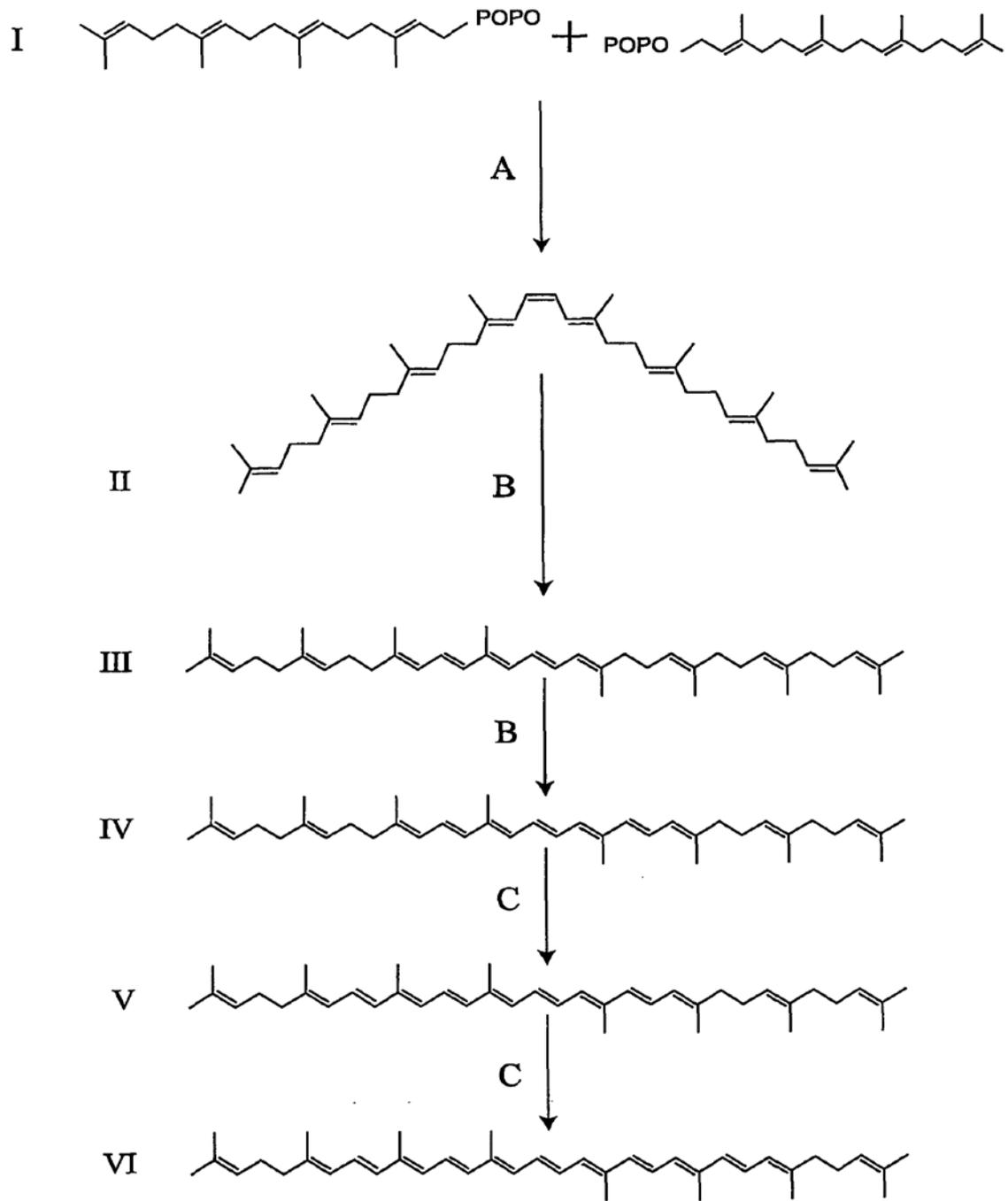


Fig. 1A

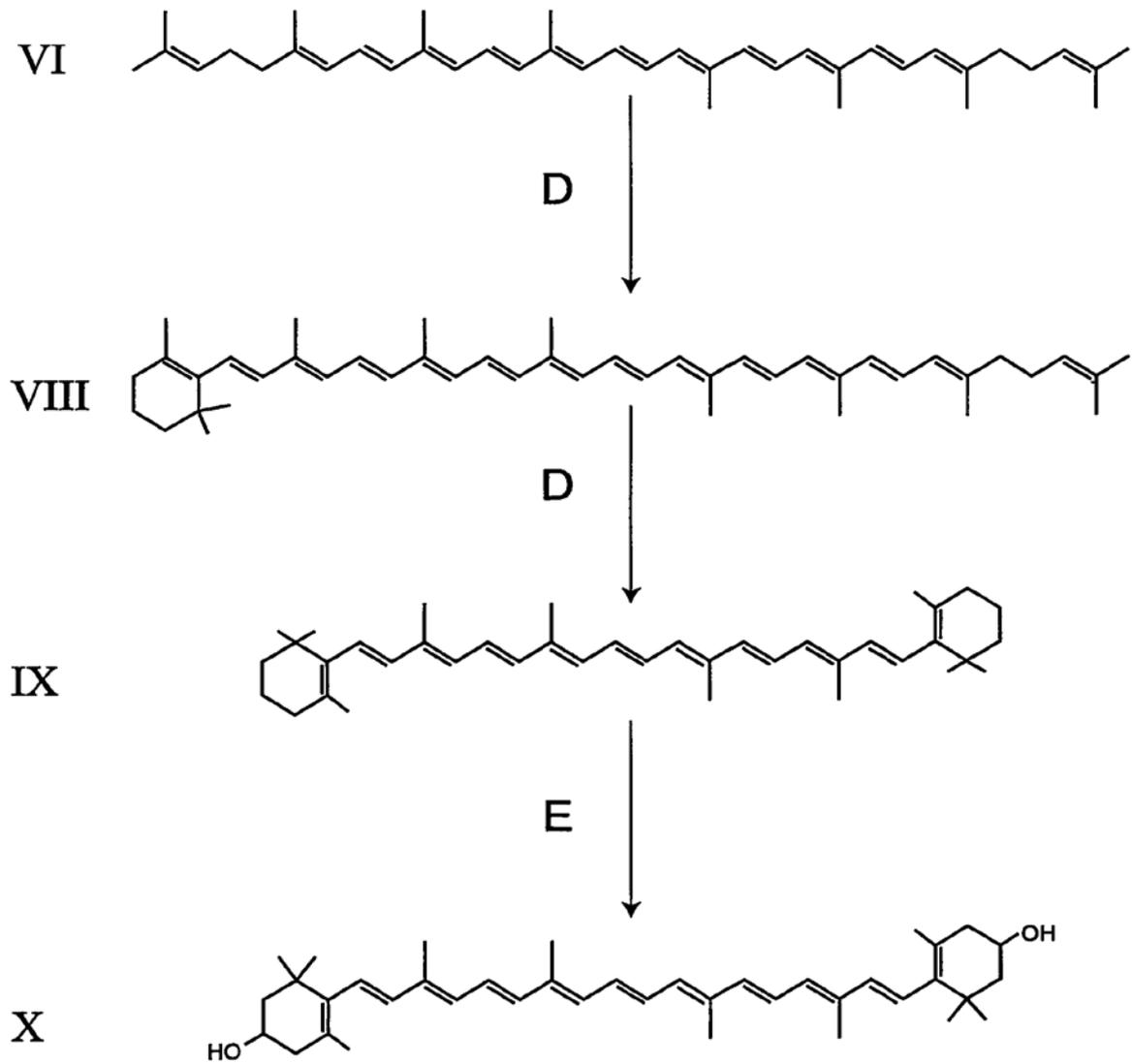


Fig. 1B

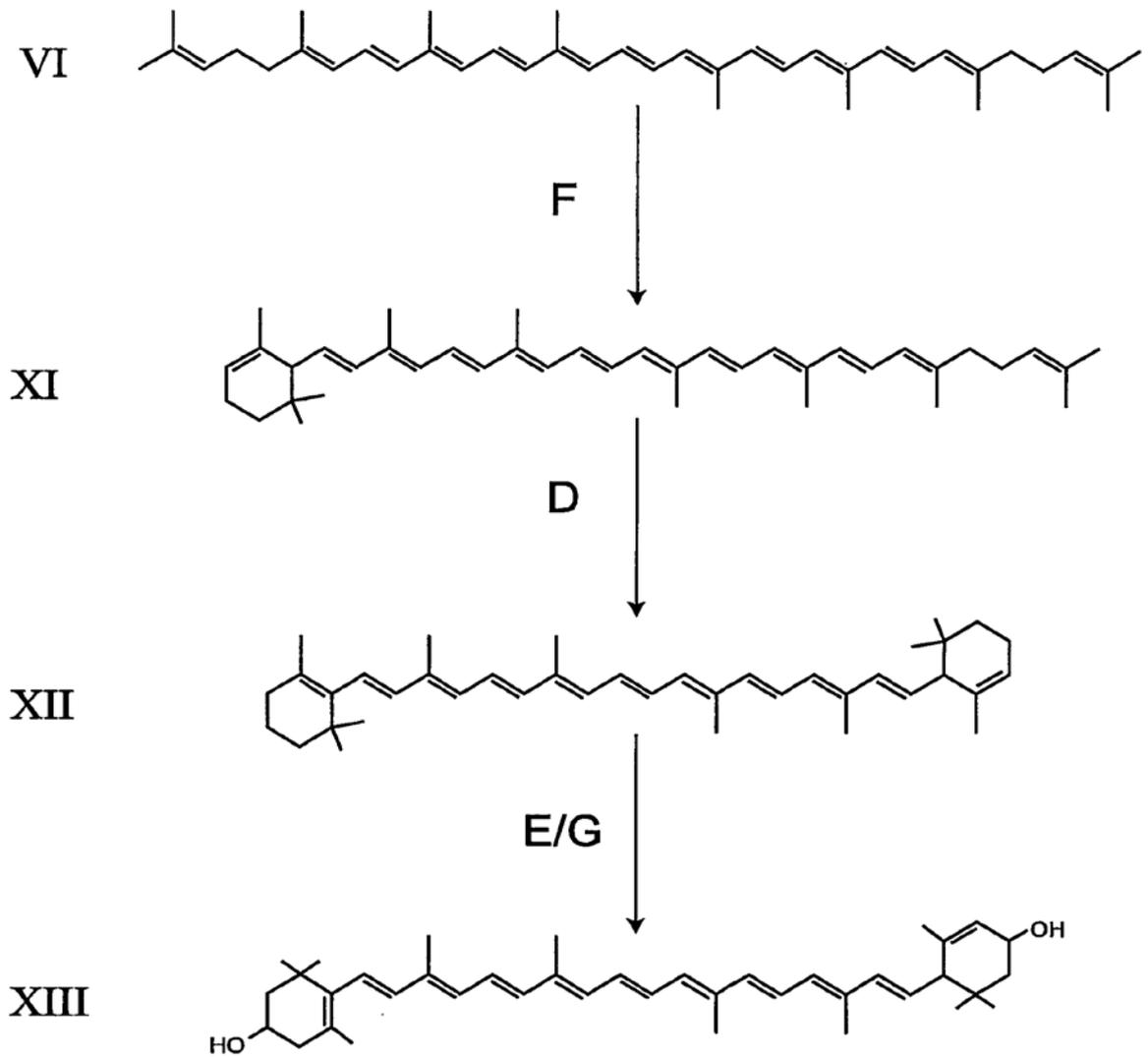


Fig. 1C