

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 722**

51 Int. Cl.:

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 15/60 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12P 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2009 E 09771418 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015 EP 2373790**

54 Título: **Farneseno sintasa**

30 Prioridad:

05.12.2008 US 120179 P

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

14.05.2015

73 Titular/es:

**KEYGENE N.V. (100.0%)
P.O. Box 216
6700 AE Wageningen, NL**

72 Inventor/es:

**DE BOTH, MICHIEL, THEODOOR, JAN;
SCHUURINK, ROBERT, CORNELIS;
AMENT, KAI y
HARING, MICHAEL, ALBERTUS**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 535 722 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Farneseno sintasa

5 **Descripción resumida**

10 [0001] Se aisló una nueva farneseno sintasa a partir de tomate. La farneseno sintasa muestra propiedades sorprendentes con respecto a los productos finales formados y su gen tiene, a nivel de nucleótidos, una identidad de secuencia baja con genes conocidos de farneseno sintasa de otros orígenes. La invención se refiere a polinucleótidos aislados, polipéptidos codificados por dichos polinucleótidos, construcciones genéticas, vectores, huéspedes, en particular plantas, que albergan dichos polinucleótidos, polipéptidos y construcciones genéticas, y semillas derivadas de dichas plantas.

15 **Campo técnico**

20 [0002] La presente invención se refiere a una enzima farneseno sintasa, en particular a una alfa-farneseno sintasa y/o una beta-farneseno sintasa. También se refiere a secuencias de polinucleótidos que codifican dichas enzimas. La invención también se refiere a construcciones de ácido nucleico (o genéticas), vectores y células huésped que incorporan las secuencias de polinucleótidos. Se refiere además a la producción de alfa-farneseno y/o beta-farneseno, y al uso de las mismas.

Antecedentes de la técnica

25 [0003] El término farneseno se refiere a un conjunto de seis compuestos químicos estrechamente relacionados que son todos sesquiterpenos. El alfa-farneseno y el beta-farneseno son isómeros, que se diferencian por la localización de un doble enlace. El alfa-farneseno es 3,7,11-trimetil-1,3,6,10-dodecatetraeno y el beta-farneseno es 7,11-dimetil-3-metilen-1,6,10-dodecatrieno. El alfa-farneseno puede existir como cuatro estereoisómeros que difieren en la geometría de dos de sus tres dobles enlaces internos (los estereoisómeros del tercer doble enlace interno son idénticos). El beta-farneseno existe como dos estereoisómeros en la geometría de su doble enlace central. Sólo hay un entendimiento limitado con respecto a las diferencias entre los diversos isómeros de alfa-farneseno y beta-farneseno, en relación con la función específica de estos isómeros.

35 [0004] El alfa-farneseno está constitutivamente presente o es inducido en una amplia gama de especies (Gapper et al, Postharvest Biology and Technology 42: (2006) 225-233). Se cree que el alfa-farneseno se sintetiza a partir de farnesil difosfato (FDP) en una reacción que procede a través de un intermedio carbocatión, y se describe que es catalizada por la enzima alfa-farneseno sintasa (Rupasinghe, et al., J. Am. Soc. Hortic. Sci. 123,882-886 (1998)). El beta-farneseno se produce en una amplia gama de taxones de plantas y animales. Se han publicado varios artículos sobre la presencia de este producto natural y su utilización como mensajero importante en la comunicación química. El beta-farneseno se encuentra en el aceite esencial de muchas especies de gimnospermas y angiospermas, incluyendo Chamomilla recutita, Vitis vinifera, Zea mays, y Piper nigrum. La (E)-beta-farneseno sintasa es inducida por la herbivoría del gusano de la hoja de algodón egipcio (Spodoptera littoralis) en la vaina de maíz y el tejido de la hoja, pero no en tejidos de la raíz (Schnee et al, Plant Physiol, 2002, 130: 2049 a 2060) Se cree que el beta-farneseno es sintetizado a partir de FDP, en una reacción que implica la ionización asistida por un ion de metal divalente del éster difosfato y la desprotonación de la C-3 de metilo del carbocatión resultante, tal como se describe en WO1999/18118.

45 [0005] Entre sus funciones, el alfa-farneseno se describe como un atrayente de insectos y actúa como una feromona sexual en ratones e insectos. Actúa como una feromona de alarma en Prorethinius canalifrons (Sobotnik et al (2008) J. Chem Ecol 34 (4): 478-86). Otros usos de alfa-farneseno y sus derivados son como potentes agentes de prevención del cáncer, y en la síntesis de películas de plástico (US20060137032). Hernández-ceruelos et al (Toxicol Lett 135: 103-110, 2005) describe los efectos antimutagénicos de β -farneseno, el principal componente del aceite esencial de manzanilla, en células de médula ósea de ratón después de los tratamientos mutagénicos.

50 [0006] El beta-farneseno se ha descrito como un componente principal del olor de polen en Lupinus y estimula el comportamiento de la polinización en abejorros (Dobson et al. (1996) Am. J. Bot. 83, 877-885). Más importante aún, se ha descrito el uso de beta-farneseno por especies de áfidos como una feromona de alarma, por ejemplo, para Aphis gossypii (pulgón del algodón) (Jianwei et al, 2006, J. Econ Entomol 99 (5): 1636-1640 ; Kislow y Edwards, 1972, Nature 235: 108-109; Pickett y Griffiths, 1980, J. Chem Ecol 6: 349-360 y para Myzus persicae (pulgón verde del melocotonero) (Edwards, LJ, 1973, Nature 241: 126-127). Los áfidos expuestos a beta-farneseno se vuelven inquietos y se dispersan de su planta huésped (Wohlens (1981) Z Angew. Entomol. 92, 329-336). El beta-farneseno es muy tóxico para los áfidos en una dosis de 100 ng/áfido (van Oosten et al. (1990) Acta Phytopathol. Entomol. Hung 25, 331-342). También de interés es el conocimiento de que el vapor de beta-farneseno es tóxico para las moscas blancas (Klijnstra et al. (1992) Meded Fac. Landbouwwet. 57, 485-491). Desafortunadamente, los esfuerzos por controlar el comportamiento de áfidos mediante aplicación tópica de beta-farneseno a los cultivos han tenido poco éxito, debido a la volatilidad y la inactivación oxidativa rápida en el aire (Dawson et al. (1988) Pest. Sci. 22, 17-30).

65

[0007] Schnee et al (Plant Physiology Vol. 130, pág. 2049 (2002) describe una terpeno sintasa que cataliza la formación de (E)-beta-farneseno. WO2004/035791 describe una alfa-farneseno sintasa de Malus domestica. WO99/18118 describe una (E)-beta farneseno sintasa de Mentha piperita.

5 [0008] Green et al (2007, Phytochemistry 68; 176-188) describe una farneseno sintasa de manzana que tiene actividad alfa- y beta-farneseno sintasa. WO2004/035791A1 describe una alfa-farneseno sintasa aislada y secuencias de polinucleótidos que codifican la enzima.

Descripción resumida de la invención

10

[0009] La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

15

[0010] En un primer aspecto, se proporciona un polinucleótido según la SEQ ID NO: 1, y homólogos del mismo. El nucleótido puede codificar un polipéptido con actividad de farneseno sintasa, en particular, la actividad de alfa-farneseno sintasa y/o la actividad de la beta-farneseno sintasa.

20

[0011] En un aspecto adicional, la invención proporciona un polipéptido según la SEQ. ID. NO: 2, y homólogos del mismo. El polipéptido puede tener actividad de farneseno sintasa, en particular, actividad de alfa-farneseno sintasa y/o actividad de beta-farneseno sintasa.

[0012] En todavía otro aspecto, la invención proporciona una construcción genética, un vector que comprende dicha construcción genética, y una célula huésped que comprende dicha construcción genética, en la que la construcción genética comprende un polinucleótido según la presente invención.

25

[0013] En todavía otro aspecto, la invención proporciona una planta transgénica o una célula de planta transgénica que comprende dicha construcción genética, y semillas derivadas de dichas plantas o células vegetales.

30

[0014] En todavía un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento para la preparación de alfa-farneseno y/o beta-farneseno que comprende el uso de un polinucleótido según la presente invención.

[0015] En todavía un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento para la modulación de alfa-farneseno y/o la producción de beta-farneseno de una planta, que comprende la regulación del nivel de expresión de polipéptidos codificados por los polinucleótidos según la invención.

35

[0016] Los aspectos anteriores y otras ventajas de la presente invención serán más fácilmente entendidos, ya que los mismos se entienden mejor mediante referencia a la siguiente descripción detallada y ejemplos, cuando se toman en conjunto con los dibujos adjuntos, la descripción de los cuales se proporciona en el descripción y ejemplo.

Definiciones

40

[0017] En la siguiente descripción y ejemplos se utilizan varios términos. Con el fin de proporcionar una comprensión clara y consistente de la memoria y las reivindicaciones, incluyendo el alcance que debe darse a dichos términos, se proporcionan las siguientes definiciones. Salvo que se defina de otra manera en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención.

45

[0018] "Farneseno sintasa" se refiere a una enzima que es capaz de convertir difosfato de farnesilo en alfa-farneseno y/o beta-farneseno.

50

[0019] "Actividad farneseno sintasa" se refiere a la capacidad de la farneseno sintasa de la presente invención para catalizar la formación de alfa-farneseno, beta-farneseno o ambos a partir de difosfato de farnesilo. La actividad se mide en un ensayo de actividad de enzima, tal como el ensayo descrito en el ejemplo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos de las farneseno sintasas de la presente invención pueden tener una actividad biológica alterada deseable incluyendo, por ejemplo, la cinética de reacción alterada, la utilización de sustratos, la distribución del producto u otras características, tales como la estereoquímica.

55

[0020] "Construcción genética" se refiere a una molécula de polinucleótido, habitualmente ADN de doble cadena, que puede haber insertado en ella otra molécula de polinucleótido (la molécula de polinucleótido de inserción), tal como, pero sin limitación, una molécula de ADNc. Una construcción genética puede contener los elementos necesarios que permiten la transcripción de la molécula de polinucleótido de inserción, y, opcionalmente, la traducción de la transcripción en un polipéptido. La molécula de polinucleótido de inserción puede derivarse de la célula huésped, o puede derivarse de una célula u organismo diferente y/o puede ser un polinucleótido recombinante. Una vez dentro de la célula huésped la construcción genética puede llegar a integrarse en el ADN cromosómico del huésped. La construcción genética puede unirse a un vector.

60

65

[0021] El término "gen" significa una secuencia de ADN que comprende una región (región transcrita), que se transcribe en una molécula de ARN (por ejemplo un ARNm) en una célula, unida operativamente a regiones reguladoras adecuadas (por ejemplo, un promotor). Un gen puede comprender por tanto varias secuencias unidas operativamente, tales como un promotor, una secuencia 5' líder que comprende, por ejemplo, secuencias implicadas en el inicio de la traducción, una región codificante (de proteína) (ADNc o ADN genómico) y una secuencia 3' no traducida que comprende, por ejemplo, sitios de terminación de la transcripción.

[0022] "Célula huésped" se refiere a una célula procariota o eucariota. Las células huésped procariotas típicas incluyen varias cepas de *E. coli*. Las células huésped eucariotas típicas son células vegetales, células de levadura, células de insecto o células animales.

[0023] "Porcentaje de identidad de secuencia" significa el porcentaje de aminoácidos o nucleótidos que ocupan la misma posición relativa cuando dos secuencias de aminoácidos, o dos secuencias de ácidos nucleicos, están alineados lado a lado. La longitud de las secuencias a comparar para los ácidos nucleicos es generalmente de al menos 120 nucleótidos, preferiblemente 200 nucleótidos y más preferiblemente 300 nucleótidos y la longitud de las secuencias a comparar para los polipéptidos es generalmente de al menos 40 residuos de aminoácidos, preferiblemente 65 residuos de aminoácidos y más preferiblemente 100 residuos de aminoácidos. Preferiblemente "porcentaje de identidad de secuencia" se determina utilizando alineaciones Clustal W. Las alineaciones de vClustalW se llevaron a cabo utilizando el programa de software "CLC Free Workbench 3" de la empresa CLC Bio, Cambridge, MA, EE.UU. Este programa está disponible gratuitamente desde el sitio web <http://www.clcbio.com>. Los parámetros utilizados para las alineaciones de nucleótidos y aminoácidos son una penalización de hueco abierto de 10 y una penalización de extensión de hueco de 1. Los extremos huecos se consideraron como todos los otros huecos.

[0024] "Polinucleótido o polinucleótidos", tal como se usa en el presente documento, significa un polímero de cadena única o de doble cadena de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos e incluye ADN y las moléculas de ARN correspondientes, orientaciones sentido y anti-sentido, y comprende ADNc, ADN genómico y ADN recombinante, así como polinucleótidos total o parcialmente sintetizados. Un polinucleótido puede consistir en un gen completo, o cualquier porción del mismo. Los polinucleótidos antisentido operables pueden comprender un fragmento del polinucleótido correspondiente y la definición de "polinucleótido", por tanto, incluye todos estos fragmentos antisentido operables.

[0025] "Polinucleótido aislado" es una molécula de nucleótidos que se identifica y separa de al menos un polinucleótido contaminante con el que está asociado normalmente.

[0026] "Polipéptido o polipéptidos", tal como se utiliza en el presente documento, incluye péptidos, polipéptidos y proteínas.

[0027] "Polipéptido aislado" es un polipéptido que se ha identificado y separado o recuperado para estar ampliamente libre de componentes de su entorno natural. Se incluyen polipéptidos in situ dentro de células recombinantes. Sin embargo, los polipéptidos aislados se preparan generalmente mediante al menos una etapa de purificación.

[0028] El término "marcador genético" o "marcador polimórfico" o "marcador molecular" se refiere a una región en el ADN genómico que se puede utilizar para "marcar" una localización particular en el cromosoma. Si un marcador genético está estrechamente ligado a un gen o está "en" un gen "marca" el ADN en el que se encuentra el gen y por lo tanto se puede utilizar en un ensayo de marcadores (moleculares) (ver más abajo) para seleccionar a favor o en contra la presencia del gen, por ejemplo, en métodos de selección/reproducción asistidos por marcadores (MAS). Ejemplos de marcadores genéticos son AFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados), microsatélites, RFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción), STS (sitio etiquetado con secuencia), SNP (polimorfismo de nucleótido único), SFP (Polimorfismo de característica única; véase Borevitz et al 2003, *Genome Research* 13: 513-523), SCAR (región amplificada caracterizada por secuencia), marcadores CAPS (secuencia polimórfica amplificada escindida) y similares. Cuanto más lejos está el marcador del gen, más probable es que la recombinación (cruzamiento) tenga lugar entre el marcador y el gen, con lo cual se pierde el enlace (y la cosegregación del marcador y el gen). La distancia entre los loci genéticos se mide en términos de frecuencias de recombinación y se propociona en cM (centiMorgans; 1 cM es una frecuencia de recombinación meiótica entre dos marcadores de 1%). Como el tamaño del genoma varía ampliamente entre especies, y como la distribución de sucesos de recombinación no es al azar sobre el genoma, la distancia física real representada por 1 cM (es decir, las kilobases, kb, entre dos marcadores) también varía enormemente entre y dentro de las especies. Se entiende que, cuando se hace referencia a los marcadores o marcadores "unidos o ligados" en el presente documento, esto también abarca marcadores "en" el propio gen.

[0029] Un "ensayo de marcadores moleculares" (o prueba) se refiere a un ensayo (basado en ADN) que indica (directa o indirectamente) la presencia o ausencia de un polinucleótido según la invención en una planta o parte de planta.

Descripción detallada

[0030] La invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

[0031] Un objeto de la invención es proporcionar nuevas secuencias de polinucleótidos que codifican farneseno sintasas, enzima o enzimas codificadas por dichos nucleótidos, métodos para la síntesis in vitro de alfa-farneseno y/o beta-farneseno, y/o modifica genéticamente plantas para alterar sus niveles de actividad de alfa-farneseno y/o beta-farneseno, y ofrecen al público una opción útil en enzimas disponibles.

[0032] Se ha encontrado sorprendentemente que el problema anterior se puede resolver proporcionando un polinucleótido aislado según la SEQ ID No: 1, o un polinucleótido que tiene al menos un 50%, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70% , incluso más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, dicho polinucleótido codifica una farneseno sintasa, es decir, una enzima que puede sintetizar una alfa-farneseno y/o una beta-farneseno de un sustrato adecuado. Por lo tanto, en otra realización, se proporciona un polinucleótido según la invención, en el que dicho polinucleótido codifica un polipéptido con actividad de farneseno sintasa.

[0033] El nucleótido de SEQ ID NO: 1, y según la invención, es la secuencia de codificación de un gen de farneseno sintasa que codifica una farneseno sintasa obtenida a partir de una planta de tomate, *Solanum Lycopersicon* variedad Money Maker, tal como se describe en detalle en los métodos. Tal como se explicará en más detalle a continuación, la farneseno sintasa según la invención tiene características sorprendentes en comparación con farneseno sintasas conocidas en la técnica, no sólo con respecto a las diferencias en la identidad de secuencia de los polinucleótidos, sino, sobre todo, con respecto a la actividad de la farneseno sintasa codificada por dichos polinucleótidos.

[0034] Tal como se entenderá por el experto en la materia, también se dan a conocer dichos polinucleótidos que tienen al menos un 50%, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, incluso más preferiblemente al menos 90%, lo más preferiblemente al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.

[0035] En el contexto de la presente invención, la identidad de secuencia puede ser y se determinó mediante el uso de la alineación ClustalW. Las alineaciones de ClustalW se llevaron a cabo utilizando el programa de software "CLC Free Workbench 3" de la empresa CLC Bio, Cambridge, MA, EE.UU. Este programa está disponible gratuitamente desde el sitio web <http://www.clcbio.com>. Los parámetros utilizados para las alineaciones de nucleótidos y aminoácidos son una penalización de hueco abierto de 10 y una penalización de extensión de hueco de 1. Los extremos huecos se consideraron como todos los otros huecos.

[0036] Utilizando dicha alineación de ClustalW se calculó que el polinucleótido según SEQ. ID. N°: 1 muestra (sólo) una identidad del 36% con una E-beta-farneseno sintasa conocida aislada de *Zea mays* (Schee et al.2002), una identidad del 46% con una alfa-farneseno sintasa conocida aislada de *Malus domestica* (WO2004/035791) y un 48% de identidad con una E-beta-farneseno sintasa conocida de *Mentha x piperita* (WO99/18118).

[0037] En otra realización, la presente invención también proporciona polinucleótidos que difieren del polinucleótido según la SEQ. ID. NO: 1 con respecto a los 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ó 1 nucleótido, por la inserción, delección o sustitución en la secuencia de polinucleótidos según la SEQ. ID. NO: 1. Dichas inserciones, delecciones o sustituciones pueden ser con respecto a nucleótidos adyacentes, pero también pueden estar presentes en diferentes posiciones, por ejemplo 2, 3, 4 ó 5, dentro del polinucleótido según SEQ. ID. NO: 1. Por ejemplo, se puede eliminar un nucleótido en una primera posición, se pueden sustituir dos nucleótidos en una segunda posición, mientras que se insertan uno o más nucleótidos en una tercera posición dentro del polinucleótido según SEQ.ID.NO:1.

[0038] El polinucleótido (aislado) según la invención puede estar en forma de un ADNc, o el ARN correspondiente, un polinucleótido sintético, pero también incluye un polinucleótido que comprende intrones y exones. Como se entenderá por un experto en la materia, el polinucleótido según la invención puede comprender además, además de una región que codifica una farneseno sintasa según la invención, secuencias reguladoras, incluyendo, preferiblemente una región promotora, por ejemplo, una región promotora de la farneseno sintasa según la invención.

[0039] También se proporcionan fragmentos de un polinucleótido según la invención, siempre y cuando dichos fragmentos del polinucleótido según la invención codifiquen un polipéptido que tiene actividad de farneseno. La actividad de farneseno se puede determinar mediante varios métodos conocidos en la técnica, pero se determina preferiblemente tal como se describe en detalle en los ejemplos adjuntos.

[0040] Tal como se discutió anteriormente, se ha encontrado que el polinucleótido según la invención, por ejemplo, el polinucleótido según SEQ. ID. NO:1, codifica un polipéptido con actividad de farneseno. En particular, se ha encontrado que el polipéptido según la invención codifica un polipéptido capaz de formar alfa-farneseno y/o beta-farneseno. El polinucleótido, según la invención, puede, en esta realización, por tanto, utilizarse para la formación de alfa-farneseno y/o beta-farneseno.

[0041] Además, los resultados mostraron la presencia de (+)-valenceno, lo que sugiere que los polipéptidos según la invención pueden utilizarse también para la formación de (+)-valenceno. Por lo tanto, en la presente descripción, cuando se hace referencia al polipéptido según la invención, además de la actividad alfa farneseno sintasa y/o actividad de la

beta farneseno sintasa, el polipéptido según la invención también podía mostrar actividad de (+)-valenceno sintasa, es decir, la forma (+)-valenceno.

[0042] El alfa-farneseno puede existir en forma de cuatro estereoisómeros diferentes: (Z,E)-alfa-farneseno, (Z,Z)-alfa-farneseno, (E,Z)-alfa-farneseno y (E,E)-alfa-farneseno. El beta-farneseno puede existir en dos estereoisómeros diferentes: (E)-beta-farneseno y (Z)-beta-farneseno.

[0043] En una realización adicional, se proporciona un polinucleótido según la invención en el que el polinucleótido codifica un polipéptido con actividad de alfa-farneseno sintasa y actividad beta-farneseno sintasa.

[0044] Sorprendentemente, se encontró que el o polinucleótidos según la invención pueden codificar un polinucleótido o polinucleótidos según la invención que son capaces de sintetizar alfa-farneseno y beta-farneseno, tal como se muestra en los ejemplos. En cambio, otras farneseno sintasas conocidas por el solicitante, por ejemplo, las descritos en los documentos WO2004/035791 y WO99/18118, sólo se han descrito como formadoras de alfa-farnesenos o beta-farnesenos. Por ejemplo, y preferiblemente, el polinucleótido o polinucleótidos según la invención pueden codificar un polinucleótido o polinucleótidos según la invención que son capaces de sintetizar (E)-beta-farneseno, (Z,E)-alfa-farneseno, (E,E)-alfa-farneseno y (Z,Z)-alfa-farneseno.

[0045] Se encontró que, por ejemplo, el polipéptido codificado por un polinucleótido según SEQ. ID. NO:1, tiene actividad hacia la síntesis de alfa-farneseno y beta-farneseno (en particular, (E)-beta-farneseno, (Z,E)-alfa-farneseno, (E,E)-alfa-farneseno y (Z,Z)-alfa-farneseno). Ahora por primera vez se encontró que un polinucleótido según la invención, por ejemplo aislado de la planta del tomate (*Solanum Lycopersicon* variedad Money Maker), codifica un polipéptido que tiene la propiedad de sintetizar diferentes estereoisómeros de alfa-farneseno y beta-farneseno. De hecho, la síntesis de alfa-farneseno y beta-farneseno de dicha planta de tomate, por ejemplo *Solanum Lycopersicon* variedad Money Maker, no se ha descrito antes y es sorprendente.

[0046] Esto permite ahora, por primera vez, proporcionar un polinucleótido según la invención que puede ser utilizado para la formación de alfa-farneseno, beta-farneseno, o ambos. Además, esto permite ahora, por primera vez, usar dicho polinucleótido y polipéptido codificado para dilucidar más la relación entre el polinucleótido y polipéptido codificado y su actividad con respecto a la síntesis de los diferentes farnesenos, tanto in vivo como in vitro. Por ejemplo, se puede entender que se pueden obtener mutantes que tienen, por ejemplo, actividad (incrementada) de beta-farneseno sintasa, y no actividad de alfa-farneseno sintasa (o reducida). Las variantes de la secuencia de aminoácidos de las farneseno sintasas de la presente invención también pueden tener actividad biológica alterada deseable incluyendo, por ejemplo, una cinética de reacción alterada, utilización de sustrato, distribución de productos u otras características, tales como la estereoquímica.

[0047] Además, con los polinucleótidos y polipéptidos según la invención, es posible ahora sintetizar mezclas o combinaciones específicas de alfa-farneseno y/o beta-farneseno, tanto in vivo como in vitro, utilizando sólo un polinucleótido o polipéptido. Por ejemplo, el polinucleótido según la invención se puede introducir en una planta o bacteria, o puede utilizarse un polipéptido según la invención en un sistema in vitro para la síntesis de alfa-farneseno y/o beta-farneseno.

[0048] Con el polinucleótido según la invención se tiene un medio eficaz de controlar la síntesis de diferentes farnesenos, tal como se explicará en más detalle a continuación, ya que el gen se puede usar para transformar, por ejemplo, genotipos de plantas susceptibles produciendo de ese modo plantas genéticamente transformadas que tienen una síntesis alterada de diferentes tipos de farnesenos.

[0049] En una realización preferida del polinucleótido según la invención, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido según SEQ ID NO: 2, o un polipéptido que tiene al menos un 70%, preferiblemente al menos un 90%, lo más preferiblemente al menos un 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 2.

[0050] Se ha encontrado que, en particular, un polinucleótido que codifica un polipéptido según SEQ ID NO: 2, o un polipéptido que tiene al menos un 70%, preferiblemente al menos un 90%, lo más preferiblemente al menos un 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2, se puede utilizar ventajosamente dentro del contexto de la presente invención.

[0051] En otra realización, se proporciona un fragmento de un polinucleótido según la invención en el que el fragmento codifica un polipéptido con actividad de alfa-farneseno sintasa y actividad de beta-farneseno sintasa.

[0052] Sin salir del alcance de la presente invención, se entenderá que, además de los polinucleótidos descritos anteriormente, son posibles varias modificaciones en los polinucleótidos según la invención, sin deteriorar dichas modificaciones sustancialmente la actividad del polipéptido codificado por dicho polinucleótido modificado. Por ejemplo, tal como se ha explicado anteriormente, el polinucleótido según la invención puede comprender modificaciones, tales como deleciones, sustituciones e inserciones sin interferir sustancialmente con la actividad del polipéptido codificado. Por lo tanto, también se proporcionan en la presente invención fragmentos de los polinucleótidos según la invención que

codifican polipéptidos que muestran actividad alfa-farneseno y actividad beta-farneseno sintasa. Dicho fragmento no está limitado a un tamaño particular o parte del polinucleótido según la invención, siempre que tenga actividad de alfa-farneseno y actividad de beta-farneseno sintasa. El experto puede establecer fácilmente si dicho fragmento del polinucleótido según la invención tiene la actividad requerida mediante la aplicación de los métodos proporcionados en los ejemplos, o mediante cualquier otro método adecuado conocido en la técnica.

[0053] En otro aspecto, la invención se refiere a los polipéptidos codificados por los polinucleótidos según la invención. En particular, se describe un polipéptido según la SEQ ID NO: 2, o un polipéptido que tiene al menos un 50%, preferiblemente al menos un 60%, más preferiblemente al menos un 70%, incluso más preferiblemente al menos un 90%, lo más preferiblemente al menos un 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2, tal como puede determinarse mediante la alineación de ClustalW tal como se describe anteriormente.

[0054] En otra realización, la presente invención también proporciona dichos polipéptidos que difieren del polipéptido según la SEQ. ID. NO: 2 con respecto a 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ó 1 aminoácido, por inserción, deleción o sustitución en la secuencia de polipéptido según la SEQ. ID. NO: 2. Dichas inserciones, deleciones o sustituciones pueden ser con respecto a aminoácidos adyacentes, pero también pueden estar presentes en diferentes posiciones, por ejemplo, 2, 3, 4 ó 5, dentro del polipéptido según la SEQ. ID. NO: 2. Por ejemplo, se puede eliminar un aminoácido en una primera posición, se puede sustituir un aminoácido en una segunda posición, mientras que se insertan uno o más nucleótidos en una tercera posición dentro del polipéptido según la SEQ.ID.NO:2.

[0055] En una realización preferida, dichos polipéptidos según la invención tienen actividad alfa-farneseno y actividad de beta-farneseno sintasa.

[0056] En otra realización, se proporciona un polipéptido de alfa-farneseno y beta-farneseno sintasa aislados. Dicho polipéptido según la invención es activo hacia la síntesis de alfa-farneseno y beta-farneseno, por ejemplo, tal como se puede determinar tal como se describe en los ejemplos. Tal como se discutió anteriormente, ahora, por primera vez, dicho polipéptido ha sido aislado (de una planta de tomate (*Solanum Lycopersicon* variedad Money Maker)), y cuyo polipéptido puede emplearse ventajosamente tal como se describe aquí.

[0057] En otra realización, se proporciona un fragmento de un polipéptido según la invención, en el que el fragmento tiene actividad alfa-farneseno sintasa y actividad beta-farneseno sintasa.

[0058] Sin salir del alcance de la presente invención, se entenderá que, además de los polipéptidos descritos anteriormente, son posibles varias modificaciones en los polipéptidos, sin deteriorar dichas modificaciones sustancialmente la actividad del polipéptido. Por ejemplo, tal como se ha explicado anteriormente, el polipéptido según la invención puede comprender modificaciones, tales como deleciones, sustituciones e inserciones de aminoácidos sin interferir sustancialmente con la actividad del polipéptido. Por lo tanto, también se proporcionan en la presente invención fragmentos de los polipéptidos según la invención y que tienen actividad alfa-farneseno y actividad beta-farneseno sintasa. Dicho fragmento no está limitado a un tamaño particular o parte del polipéptido según la invención, siempre que tenga actividad de alfa-farneseno y actividad de beta-farneseno sintasa. El experto puede establecer fácilmente si dicho fragmento según la invención tiene la actividad requerida mediante la aplicación de los métodos proporcionados en los ejemplos, o mediante cualquier otro método adecuado conocido en la técnica.

[0059] El polipéptido según la invención, o un fragmento del mismo puede utilizarse, además de su actividad farneseno sintasa, por ejemplo, para producir anticuerpos contra el mismo y cuyos anticuerpos pueden utilizarse para la detección de un polipéptido según la invención, por ejemplo en plantas.

[0060] Los polinucleótidos según la invención se pueden usar para el diseño de oligonucleótidos que son complementarios a una cadena de la secuencia de ADN de un polinucleótido según la invención, preferiblemente una secuencia de polinucleótidos según SEQ. ID. NO: 1, o parte de la misma, y que se pueden utilizar como sondas de hibridación, estando marcadas para permitir la detección, para el cribado de bibliotecas de ADN genómico o de ADNc para genes homólogos. Se describen secuencias homólogas que pueden hibridarse a la sonda bajo condiciones de hibridación muy rigurosas, y que codifican un producto génico que está involucrado en la farneseno sintasa, que tiene preferiblemente actividad de alfa-farneseno sintasa y/o actividad de beta-farneseno sintasa.

[0061] En general, las condiciones muy rigurosas se refieren a las condiciones de hibridación (Southern) que permiten que una secuencia de ácido nucleico de al menos 50 nucleótidos y preferiblemente de aproximadamente 200 o más nucleótidos se hibride con una secuencia particular a aproximadamente 65°C en una solución que comprende aproximadamente 1 M de sal, preferiblemente 6 x SSC o cualquier otra solución con una fuerza iónica comparable, y lavado a 65°C en una solución que comprende aproximadamente 0,1 M de sal, o menos, preferiblemente 0,2 x SSC o cualquier otra solución con una fuerza iónica comparable (Sambrook, Maniatis, Fritsch, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, CSHL Press, EE.UU., 1987)). Estas condiciones permiten la detección de secuencias que tienen aproximadamente un 90% o más de identidad de secuencia.

[0062] Alternativamente, se diseñan oligonucleótidos basándose en el polinucleótido según la invención, de manera que pueden utilizarse como sondas de hibridación en análisis Southern. Estas sondas pueden utilizarse como marcadores

moleculares para distinguir genotipos de plantas que tienen una farneseno sintasa según la invención y genotipos de plantas que carecen de dicha farneseno sintasa. Dicha sonda puede utilizarse como una herramienta adicional en la selección.

5 **[0063]** Por ejemplo, se pueden utilizar en un método de detección de la presencia o ausencia de una secuencia de nucleótidos según la invención, que codifica un polipéptido según la invención en un tejido de planta o muestra de ácido nucleico del mismo, que comprende:

- a. Obtener una muestra de tejido de planta o una muestra de ácido nucleico,
- 10 b. Analizar la muestra usando un ensayo de marcadores moleculares para detectar la presencia o ausencia de uno o más marcadores unidos al polipéptido según la invención, en el que el ensayo de marcadores detecta una secuencia según la SEQ ID No: 1, o una secuencia que tiene al menos un 70%, preferiblemente al menos un 90%, lo más preferiblemente al menos un 95% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.

15 **[0064]** Preferiblemente, los oligonucleótidos se diseñan basándose en el polinucleótido según la invención, de manera que se pueden utilizar como cebadores en una reacción de amplificación, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mediante la cual la formación de un producto de amplificación indica la presencia de una farneseno sintasa, preferiblemente una farneseno sintasa según la invención, en un determinado genotipo de la planta.

20 **[0065]** Preferiblemente, dichos cebadores se utilizan en la amplificación de fragmentos de restricción selectivos para identificar marcadores AFLP, que están estrechamente unidos a un gen de farneseno sintasa según la invención. De hecho, una técnica excepcionalmente útil es la técnica AFLP, tal como se describe por Vos, P. et al., en *Nucleic Acids Research*, 1995, vol. 23, No. 21: 4407-4414.

25 **[0066]** Los marcadores moleculares pueden ahora, de hecho, derivar de los polinucleótidos según la invención. De hecho, las secuencias de nucleótidos proporcionadas pueden aplicarse como marcadores genéticos para usar en los métodos de reproducción molecular y cribado y/o caracterización de germoplasma. Dichos marcadores pueden utilizarse en la selección asistida por marcadores de plantas que tienen o no tienen un polinucleótido o polipéptido según la invención.

30 **[0067]** Para ello se describe el uso de al menos 15 nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1, o una secuencia que comprende al menos un 90% de identidad de nucleótidos con la misma, como marcador molecular, preferiblemente como un marcador molecular para un polinucleótido aislado según la SEQ ID No: 1, o un polinucleótido que tiene al menos un 50%, preferiblemente al menos un 60%, más preferiblemente al menos un 70%, incluso más preferiblemente al menos un 90%, lo más preferiblemente al menos un 95% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, o como marcador molecular para un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 7-10, que tiene preferiblemente la actividad de alfa-farneseno sintasa y/o la actividad de beta-farneseno sintasa.

35 **[0068]** También se describe el uso de un polinucleótido según la SEQ ID No: 1, o un polinucleótido que tiene al menos un 50%, preferiblemente al menos un 60%, más preferiblemente al menos un 70%, incluso más preferiblemente al menos un 90%, lo más preferiblemente al menos un 95% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1. para el mapeo de un marcador molecular (ADN) unido a la secuencia de nucleótidos según la invención.

40 **[0069]** Como es consciente el experto en la materia, un marcador genético (o molecular) es un gen o secuencia de ADN con una ubicación conocida en un cromosoma y asociado con un gen o rasgo particular. Se puede describir como una variación, que puede surgir debido a la mutación o alteración en el loci del genoma, que se puede observar. Un marcador genético puede ser una secuencia corta de ADN, tal como una secuencia que rodea un solo cambio de pares de bases (polimorfismo de un solo nucleótido, SNP), o uno largo, como minisatélites.

45 **[0070]** En la presente descripción, el marcador puede ser (un fragmento de) el polinucleótido según la SEQ ID No: 1, o un polinucleótido que tiene al menos un 50%, preferiblemente al menos un 60%, más preferiblemente al menos un 70%, incluso más preferiblemente al menos un 90%, lo más preferiblemente al menos un 95% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.

50 **[0071]** El mapeo de marcadores genéticos en o en la proximidad de un gen es un procedimiento que se puede realizar muy fácilmente por una persona experta media en biología molecular y que se describe por ejemplo en Lefebvre, V. & AM Chevre. Tools for marking plant disease and pest resistance genes: a review. *Agronomie* 15, 1995 (1): 3-19; Michelmore, RW Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology* 33 (1995): 393-427; Michelmore, RW, RV Kesseli y EJ Ryder. Genetic mapping in lettuce. En: RL Phillips y IK Vasil (eds.) *DNA-based markers in plants*, Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht, 1994, pág. 223-239; Winter, P. y G. Kahl. Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1995, 11 (4): 438-448.

55 **[0072]** También se describen kits de diagnóstico, que comprenden oligonucleótidos según la invención, para la detección de la presencia o ausencia de un gen de farneseno sintasa según la invención en un genotipo en estudio. Dicho kit de diagnóstico evita el uso de ensayos laboriosos para el cribado de genotipos que forman por ejemplo alfa-farneseno y/o beta-farneseno o no.

5 [0073] Además, la invención se refiere a construcciones genéticas que comprenden una secuencia de polinucleótido según la invención, preferiblemente que codifica una farneseno sintasa según la invención que tiene actividad de alfa-farneseno sintasa y actividad de beta-farneseno. Dicha construcción genética comprende preferiblemente además secuencias reguladoras funcionales en células de plantas, siendo dichas secuencias reguladoras, tales como promotores, homólogas o heterólogas a las secuencias codificantes de los polinucleótidos, por ejemplo, un polinucleótido según la SEQ. ID. NO:1, según la invención.

10 [0074] En otra realización, la construcción genética comprende en la dirección 5'-3' un polinucleótido de marco de lectura abierto que codifica un polipéptido según la invención. En una realización adicional, la construcción genética comprende en la dirección 5'-3' un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido que codifica un polipéptido según la invención, preferiblemente en condiciones rigurosas.

15 [0075] La invención se refiere también a un vector de ADN que comprende una construcción de ADN según la invención. Los vectores adecuados pueden ser vectores de clonación, vectores de transformación, vectores de expresión, y así sucesivamente, y que son bien conocidos para los expertos en la materia.

20 [0076] Además, las células que albergan un vector que comprende una construcción genética tal como se describió anteriormente, por ejemplo, que comprende un polinucleótido según SEQ. ID. NO: 1, o parte del mismo, u homólogo al mismo, están dentro del alcance de la invención. Además, las células que llevan una construcción genética según la invención, están dentro del alcance de la presente invención.

25 [0077] En una realización preferida de la invención, se obtiene una planta transformada genéticamente mediante la introducción de un polinucleótido según la invención en el genoma de dicha planta, usando técnicas de transformación estándar. Preferiblemente, dicha planta transformada genéticamente expresa funcionalmente la farneseno sintasa según la invención, por ejemplo, una farneseno sintasa tiene una secuencia de aminoácidos según SEQ.ID.NO:2.

30 [0078] En otra realización de la invención, el polinucleótido según la invención puede transferirse, utilizando técnicas de transformación conocidas en general, a sistemas heterólogos, tales como, pero sin limitación, melón, tabaco, Arabidopsis thaliana, patata, remolacha azucarera, colza, pepino, pimiento, berenjena, algodón, maíz, calabacín, sandía y lechuga. También se incluyen sistemas, tales como bacterias y levaduras. La introducción de un polinucleótido según la invención en dichos sistemas permite la producción de, por ejemplo, polipéptidos según la invención, y la utilización in vivo o in vitro de dichos péptidos para la producción de farneseno, preferiblemente alfa-farnesenos y beta-farnesenos.

35 [0079] En otra realización de la invención, se proporcionan semillas derivadas de una célula vegetal o de planta transgénica según la invención, y, por ejemplo que comprende un polinucleótido según la invención, por ejemplo según la SEQ. ID. NO1.

40 [0080] En otro aspecto, se proporciona un método de preparación de alfa-farneseno y/o beta-farneseno que comprende las etapas de cultivar una célula que ha sido modificado genéticamente con un polinucleótido según la invención para proporcionar una mayor actividad de alfa-farneseno sintasa y/o beta-farneseno sintasa; opcionalmente, proporcionar a la célula con difosfato de farnesilo; y separar el alfa-farneseno y/o beta-farneseno producido. También se incluye en este método cultivar una célula derivada de tomate, en particular, el tomate utilizado en los ejemplos.

45 [0081] En una realización adicional, se proporciona un método para la modulación de la producción de alfa-farneseno y beta-farneseno de una planta, comprendiendo el método aumentar o disminuir la expresión de una farneseno sintasa tiene una secuencia de polipéptido según la invención, en el que dicho aumento o disminución se consigue mediante modificación genética para alterar la expresión de un polinucleótido que codifica dicho polipéptido.

50 [0082] Los polinucleótidos y polipéptidos, y fragmentos de los mismos, y preferiblemente que codifican o que tienen actividad de farneseno sintasa, preferiblemente actividad de alfa-farneseno y/o actividad de beta-farneseno, tal como se describen en el presente documento, tienen diversas aplicaciones de las cuales algunas se describen en el presente documento, pero que no son limitativas del alcance de la invención. Por ejemplo, los polinucleótidos según la invención pueden usarse para la creación de una planta que (sobre)expresa una farneseno sintasa según la invención, y que pueden conferir un mejor control del comportamiento de ácidos y repeler insectos herbívoros, por ejemplo, moscas blancas.

60 [0083] La presente invención se describirá adicionalmente en los ejemplos en vista del aislamiento de un polinucleótido según la invención. Los siguientes ejemplos ilustran meramente el mejor modo ahora contemplado para la práctica de la invención, pero no debe interpretarse que limita la invención.

Ejemplos

Aislamiento de material vegetal y tricoma, ARN y ARNm

65

5 **[0084]** Se cultivó una planta de tomate (*Solanum lycopersicon* variedad Money Maker) en tierra en un invernadero con temperaturas de día/noche de 23°C a 18°C y un régimen de 16/8 h de luz/oscuridad durante 4 semanas. Se realizaron cortes de tallos con tejido meristemático de la misma planta, que se colocaron en el suelo y se cultivaron de nuevo durante otras 3 semanas. Se recogieron los tricomas del tallo y pecíolos en la parte inferior de un tubo de 50 ml mediante agitación de los segmentos de pecíolo y tallo congelados en nitrógeno líquido.

10 **[0085]** Se aisló ARN de tricomas usando el Mini kit de plantas Qiagen RNeasy (Düsseldorf, Alemania) según el protocolo del fabricante para células y tejidos vegetales. La lisis se llevó a cabo utilizando el tampón RLT suministrado. El ARN mensajero se aisló del grupo de ARN total usando el sistema de aislamiento de ARNm PolyAtract de Promega (Madison, Wisconsin, EE.UU.) según el protocolo del fabricante. Se aisló el ARNm del ARN total con una eficacia del 0,71%.

Amplificación de ARNm y la síntesis de ADNc de doble cadena

15 **[0086]** Se utilizó MessageAmp II, un kit de amplificación de ARN de Ambion (Austin, Texas, EE.UU.) para amplificar el ARNm de tricomas. Se utilizaron 100 ng de ARNm como entrada para la amplificación. La amplificación se llevó a cabo según el protocolo del fabricante. El rendimiento de ARN amplificado fue de 171 µg y la distribución de tamaños fue lo esperada, variando desde ~ 400 a 3.000 bases.

20 **[0087]** Se utilizaron cebadores de hexámeros al azar (obtenidos de MWG Operon, Ebersberg, Alemania) para sintetizar una primera cadena de ADNc a partir de este ARN amplificado en lotes utilizando 10 µg de ARN en reacciones de 20 µl. Se combinaron los cebadores aleatorios a una concentración final de 62,5 nM con ARN amplificado y se incubaron a 70°C durante 5 minutos, tras lo cual se almacenó en hielo. Se añadió transcriptasa inversa RevertAid M-MuIV (200 unidades) de Fermentas Life Sciences (St.Leon-Rot, Alemania) en combinación con el tampón suministrado. Los nucleótidos se añadieron hasta una concentración final de 1 mM. La síntesis de ADNc se llevó a cabo a 42°C durante 90 minutos. Directamente después de eso, los tubos se transfirieron a hielo y se realizó la síntesis de una segunda cadena utilizando ARNasa H de Fermentas y ADN polimerasa I de *E. coli*. A cada tubo de reacción de 20 µl se añadieron 8 µl del tampón de reacción de la ADN polimerasa I suministrada junto con 1 unidad de ARNasa H y 30 unidades de ADN polimerasa I. El volumen de reacción se aumentó con agua hasta 100 µl. Todos los componentes se añadieron en frío y la reacción de síntesis de la segunda cadena se llevó a cabo a 15°C durante 2 horas.

Pirosecuenciación paralela masiva y análisis de datos

35 **[0088]** Se realizaron el cizallamiento de ds-ADNc, preparación de bibliotecas, secuenciación de 454 y alineaciones de contigs según los métodos descritos en la técnica y conocidos por el experto en la materia. El procesamiento implicó un adaptador de la secuenciación de 454 con código de barras, portando cada uno de los 5 mutantes un código de barras distinto (véase, por ejemplo WO2007073165, WO2007037678 o WO2007073165, en los que el código de barras distinto se describe como una etiqueta o identificador). La propia pirosecuenciación es conocida en la técnica y se describe, entre otros, en www.biotagebio.com; www.pyrosequencing.com /sección de tecnología. La tecnología se aplica además, por ejemplo, en los documentos WO 03/004690, WO 03/054142, WO 2004/069849, WO 2004/070005, WO 2004/070007 y WO 2005/003375 (todo en nombre de 454 Life Sciences), que se incorporan en este documento por referencia. Los métodos de alineación de secuencias para fines de comparación son bien conocidos en la técnica. Varios programas y algoritmos de alineación se describen en: Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482; Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443; Pearson y Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 2444; Higgins y Sharp (1988) *Gene* 73: 237-244; Higgins y Sharp (1989) *CABIOS* 5: 151-153; Corpet et al. (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 10881-90; Huang et al. (1992) *Computer Appl. In the Biosci.* 8: 155-65; y Pearson et al. (1994) *Meth. Mol. Biol.* 24: 307-31, que se incorpora aquí por referencia. Altschul et al. (1994) *Nature Genet.* 6: 119-29 (incorporado aquí como referencia) presenta una consideración detallada de los métodos de alineación de secuencias y cálculos de homología.

Identificación y clonación de sesquiterpeno sintasa SISTS3 de tomate

50 **[0089]** Uno de los contigs generados a partir de las lecturas de las secuencias de 454 (Icl-CL117Contig1) con una longitud de 793 pb tenía entre los contigs, un mayor grado de identidad con el ARNm de sesquiterpeno sintasa de *Fabiana imbricata* (sin función conocida) (AY860847). Para obtener un clon de longitud completa de este ADNc de tomate, la amplificación PCR se realizó en una biblioteca de ADNc construida con ARNm de tricomas de tomate. Se utilizaron el kit de construcción de bibliotecas HybriZAP -2.1 XR y el kit de síntesis de ADNc HybriZAP - 2.1XR de Stratagene (Cedar Creek, Texas, EE.UU.) según el protocolo del fabricante. El tamaño de la biblioteca de ADNc primario fue de 2,5x10⁶ unidades formadoras de placa (UFP)/µg de brazos de fagos. La biblioteca primaria se amplificó según el protocolo del fabricante. Esta biblioteca de ADNc amplificada se escindió usando el protocolo de escisión de masas tal como se describe por el fabricante. Esta biblioteca escindida se utilizó para amplificar por PCR las partes de 3' y 5' del fragmento de ADNc utilizando los cebadores 1-6 (véase la lista de cebadores en la tabla 1 a continuación).

Tabla 1 Lista de cebadores

	1 GGTATTATGGAAAAGAAAGTACCAAC	6F3_E
	2 TTCCATAAATGAGATGAAAAAGGTC	6F4_E
5	3 TTCCTTCAAATTTCCCTTGGTCATT	6R4_E
	4 CTCAACATTCCCTTCTACATCC	6R5_E
	5 TAATACCACTACAATGGATC	pActF
	6 AATACGACTCACTATAGGGCTCTA	T7long
	7 CACCATGGAGTTGTGCACACAAAC	E6TopoF
10	8 CTATATAATAGGATCAACTAGTATATCAGAGATG	E6TopoR
	9 TTCTTTTTCTTGTGTGCATCGG	E6flR2
	10 CTTGTGAAAATGGAGTTGTGC	E6flF

[0090] Para la parte 5' de este ADNc se realizó una PCR con el cebador 6R5E y pActF (véase la lista de cebadores) y para la parte 3' de este ADNc se utilizaron los cebadores 6F4E y T7long. Se utilizó la biblioteca de ADNc escindida como plantilla con 0,25 unidades de polimerasa de Phusion Hot Start de Finnzymes (Espoo, Finlandia) junto con tampón suministrado, cada cebador en una concentración de 0,4 mM y dNTP en una concentración de 0,2 mM en un volumen de reacción de 25 µl. Se añadió MgCl₂ a la mezcla de PCR en una concentración final de 0,3 mM. El termociclador T1 de Biometra (Göttingen, Alemania) se utilizó con el siguiente programa:

- Etapa 1. 98°C durante 1 minuto
- Etapa 2. 98°C durante 10 segundos
- Etapa 3. 56°C durante 30 segundos
- Etapa 4. 72°C durante 45 segundos
- Etapa 5. Ir a la etapa 2; repetir 34 veces
- Etapa 6. 72°C durante 5 minutos
- Etapa 7. 4°C hasta recoger del termociclador.

[0091] Los productos de reacción se diluyeron 20 veces con agua para usar como plantilla para la reamplificación. La reamplificación de la parte 5' se llevó a cabo usando los cebadores 6R4E y pActF y para la reamplificación de la parte 3' se utilizaron los cebadores 6F3E y T7long. Las condiciones de PCR fueron las mismas que para las PCR primarias.

[0092] Los productos de PCR de las reacciones de reamplificación se cortaron del gel y se aislaron utilizando el Kit de extracción de gel de QIAGEN según el protocolo del fabricante. Se secuenciaron los productos de PCR utilizando el kit de secuenciación por ciclos ABI Prism BigDye Terminator v1.1.

[0093] Junto con los fragmentos de ADNc recién secuenciados, el contig obtenido de las secuencias 454 pudo expandirse a la secuencia de codificación completa ensamblando fragmentos de secuencias superpuestas. Se diseñaron nuevos cebadores (cebador E6flR2 y E6flF, véase la lista de cebadores) que se utilizaron para amplificar por PCR la secuencia de codificación completa de la biblioteca de ADNc escindidos. La amplificación de longitud completa se realizó con la polimerasa de Phusion Hot Start de Finnzymes tal como se ha descrito anteriormente.

[0094] El fragmento de PCR obtenido en esta reacción de PCR se escindió del gel y se aisló utilizando el kit de extracción de gel de QIAGEN según el protocolo del fabricante. Posteriormente, este fragmento purificado se clonó en el vector de clonación pCR2.1 usando el kit de clonación TA de Invitrogen (Carlsbad, California, EE.UU.) según el protocolo del fabricante. El plásmido se transfirió a células E. coli químicamente competentes de One Shot TOP10 (suministradas con el kit). Se inició un cultivo líquido a partir del cual se aisló el plásmido utilizando el kit de minipreparación de plásmidos GeneJET de Fermentas según el protocolo del fabricante y se secuenció el inserto del plásmido. La figura 1 muestra esta secuencia y la posición de todos los cebadores.

[0095] La secuencia de codificación de longitud completa se amplificó a partir del plásmido con los cebadores E6TopoF y E6TopoR usando la Taq polimerasa de Phusion, tal como se describe anteriormente. El fragmento de PCR se aisló del gel tal como se ha descrito anteriormente. Este ADNc de longitud completa se clonó en el vector pET TOPO usando el kit de expresión Champion pET200 Directional TOPO de Invitrogen tal como se describe en el protocolo del fabricante. En la figura 2 se representa un mapa del vector de expresión.

[0096] Posteriormente, el plásmido se transfirió a células E. coli químicamente competentes de One Shot Top10, suministradas con el kit. Se aislaron y se secuenciaron los plásmidos. La secuencia era idéntica al primer ADNc de longitud completa tal como se ha secuenciado a partir del vector de clonación pCR2.1. La secuencia de codificación de SISST3 se muestra en SEQ. ID. No: 1. La SEQ. ID. No: 2 muestra la secuencia de aminoácidos deducida.

60 *Expresión de la proteína SISST3 en E. coli*

[0097] El plásmido pET200 que contiene SISST3 se transformó en células de E. coli químicamente competentes BL21 Star (DE3) One Shot. Los cultivos líquidos se cultivaron durante la noche a 37°C. El día después se inoculó un cultivo de 50 ml con 2,5 ml del cultivo de la noche y se hizo crecer hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,5. El cultivo se transfirió hasta temperatura ambiente y se indujo con isopropil beta-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) de Roche (Basilea, Suiza) a una concentración final de 1 mM. Como control negativo se utilizó un cultivo con un inserto falso en el vector

pET200 (un factor de transcripción MYB de tipo R2R3 (número de acceso Genbank AY705977) sin actividad terpeno sintasa). Los controles no inducidos de ambos cultivos se tomaron conjuntamente. Después de 3 horas de inducción, se tomaron dos alícuotas de 1 ml de cada cultivo, después de lo cual que se recogieron el resto de las células por centrifugación a 4°C a 2.000 g durante 15 minutos y la posterior aspiración del medio. Los sedimentos celulares se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta que se realizaron los ensayos enzimáticos.

[0098] Se determinó la densidad óptica de las alícuotas de 1 ml a 600 nm. Las células se recogieron mediante centrifugación a 2.000 g a 4°C durante 10 minutos y aspiración del medio. Las células de una de las alícuotas inducidas y una de las alícuotas no inducidas se resuspendieron en 50 µl por unidad de DO de tampón de terpeno sintasa (tal como se describe por Van Schie et al Plant Mol Biol 2007 Jun; 64 (3): 251-63). Después de la alteración de las células mediante incubación con 1 µg de lisozima en hielo durante 30 minutos y sonicación, se recogió la fracción de proteína soluble mediante centrifugación a 12.000 g durante 30 minutos a 4°C. Los otros sedimentos celulares inducidos y no inducidos se resuspendieron en 50 µl por unidad de DO de PBST (NaCl al 0,8% (p/v), KCl al 0,02% (p/v), Na₂HPO₄ al 0,144% (p/v), KH₂PO₄ al 0,02% (p/v) y Tween-20 al 0,02% (v/v)). Para las fracciones de proteínas totales y solubles, se añadió un tercio del volumen de 4X tampón de muestra (SDS al 8% (p/v), glicerol al 40% (p/v), beta-mercaptoetanol al 20% (v/v), Tris-HCl 240 mM, pH 6,8 y azul de bromo-fenol al 0,08% (p/v)) y las muestras se colocaron en agua hirviendo durante 5 minutos. Se sometió a electroforesis una muestra de 15 µl de proteína en un gel de acrilamida al 10%. Se tiñó un gel de acrilamida de las proteínas totales de células inducidas y no inducidas con plásmido que contiene SISST3 y el factor de transcripción MYB con azul brillante de Coomassie (CBB al 0,25% (p/v), metanol al 30% (v/v) y ácido acético al 10%). Un rastreo de este gel teñido se muestra en la figura 3.

[0099] Las fracciones de proteínas totales y solubles de células inducidas y no inducidas con plásmido que contiene SISST3 se desarrollaron en un gel de acril amida al 10%. Después de la electroforesis de las muestras, las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa. La transferencia se bloqueó con una solución de leche en polvo al 5% en PBST durante una hora. Durante la noche la transferencia se incubó en 10 ml de PBST con 5% de leche en polvo con anticuerpo penta His (catálogo n°. 34660, lote n°. 130167450) de QIAGEN. La transferencia se lavó 3 veces con PBST y posteriormente se incubó durante una hora en PBST con 5% (p/v) de leche en polvo y anticuerpo IGG anti-ratón de cabra acoplado a peroxidasa de rábano picante de Pierce, Rockford, IL, EE.UU., después de lo cual se lavó 3 veces en PBST. La actividad de la peroxidasa se detectó mediante un aumento de la quimioluminiscencia (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido). Una imagen de la quimioluminiscencia se puede ver en la figura 4.

Análisis funcional de la proteína SISST3

[0100] Los sedimentos celulares del resto de los cultivos se analizaron para determinar la actividad de sesquiterpeno sintasa. Los ensayos sesquiterpeno sintasa se realizaron como se describe por Van Schie et al. Plant Mol Biol. 2007 Jun; 64 (3): 251-63, y se incorporan en la presente por referencia.

[0101] El análisis de los productos de reacción se llevó a cabo con la proteína purificada con Ni en un GC-MS TOF con una columna DB-5 tal como se describe por Van Schie et al. Plant Mol Biol. 2007 Jun; 64 (3): 251-63, o tal como se describe por Ament et al (2004) Plant Physiol. 135: 2025-2037, que se incorporan en la presente por referencia.

[0102] La figura 5 muestra espectros GC-MS de ion 69 para SISST3 purificada con Ni y la proteína del factor de transcripción Myb analizada con FPP con aumentos sobre un tiempo de retención de 402 segundos a 436 segundos. Los productos de los máximos 1, 2, 3 y 4 se identificaron como (E) beta-farneseno (máximo 1), (Z,E) alfa-farneseno (máximo 2), (E,E) alfa-farneseno y (Z,Z) alfa-farneseno (ambos en el máximo 3) y (E)-nerolidol (máximo 4), utilizando patrones auténticos y la comparación de los espectros de iones y tiempos de retención.

[0103] La figura 7 muestra otra cromatograma GC-MC de extractos de proteínas de células de E. coli que expresan la farneseno sintasa de tomate analizadas con FPP. Máximo 1 beta-elemento (*). 2. (E) beta-farneseno. 3. sesquiterpeno desconocido (*). 4. (Z, E) alfa-farneseno. 5. (+)-valenceno (*). 6. (E, E) alfa-farneseno. 7. sesquiterpene desconocido (*). (*) Los máximos indicados con (*) se identifican en base a los espectros de masa, todos los demás se basan en los espectros de masas y la comparación del tiempo de retención de los patrones puros.

[0104] El (E) beta-farneseno puro fue proporcionado amablemente por el profesor Dr. W. Boland. Los espectros de masas de este sesquiterpeno y el máximo 1 del espectro de masas se muestran en la figura 6a. Se obtuvo una mezcla de (Z, E) alfa-farneseno y (E, E) alfa-farneseno de Sigma. Los espectros de masas de (Z, E) alfa-farneseno y el máximo 2 se muestran en la figura 6b y la figura 6c muestra los espectros de masas de (E, E) alfa-farneseno y el máximo 3. (E) nerolidol se obtuvo de Sigma. Los espectros de masas de este sesquiterpeno y el máximo 4 se muestran en la figura 6d.

[0105] Estos resultados muestran que la SISST3, clonada a partir de ADNc de tricomas de tomate, codifica una farneseno sintasa, que tiene (predominantemente) actividad beta-farneseno sintasa y, además, actividad alfa-farneseno.

Niveles de expresión relativa de farneseno sintasa de tomate en diversos tejidos y órganos

[0106] En la figura 8, se muestra la expresión espacial de la farneseno sintasa (según la invención) en *Solanum lycopersicum* tal como se determina mediante RT-PCR cuantitativa y corregida para la expresión de *RCE1* constitutiva

en ADNc de diferentes tejidos de *Solanum lycopersicum*. Los gráficos de barras representan el promedio de dos predicados independientes. El máximo está indicada por barras de error. El ADNc se sintetiza a partir de ARN aislado de 1. Raíz 2. Capullos de flores 3. Estambres 4. Pétalos 5. Sépalos 6. Frutos verdes inmaduros 7. Frutos con formación incipiente de color rojo 8. Frutos que cambian de color 9. Fruto rojo 10. Pecíolos 11. Tallos 12. Parte superior de la planta 13. Hojas jóvenes 14. Hojas maduras 15. Hojas senescentes.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0107]

- 10 <110> Keygene
- <120> Farneseno sintasa
- <130> P29486PC00
- <150> US61 / 120.179
- <151> 2008-12-05
- 15 <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 1665
- <212 > ADN
- 20 <213> Solanum lycopersicon
- <400> 1

5	atggagttgt gcacacaaac cgttgcagcg gatcatgaag ttataattac acgtcgctct	60
25	ggtagtcatc atcctacttt atggggtgac cattttcttg cctatgctga tcttcgggga	120
30	gccaatgaag ggaagagaa gcaaatgaa gacctaaaag aagaagtgag aaagatgcta	180
35	gtgatggctc cttcaaagtc ttggaaaaa ctggaactca tcaacacaat ccaatgtctt	240
40	ggtttaggtt atcattttca aagtgagatt gatgaatcat tgagttacat gtacactcat	300
45	tatgaagaat attcgattgg tgatcttcat gctattgctc tatgctttcg attacttagg	360
50	caacaagggtt attatgtctc atgtgatgca ttaagaagt tcactaatga ccaaggaaat	420
55	ttcaaggaag aattggtaa ggatgtagaa ggaatggtga gcttatatga ggcagcacia	480
60	ttcagagtac atggagaaca aattcttgat gaagcactaa atttcacat tgctcaattg	540
65	aaacaaattt tgcctaaatt gagcaactcc caacttgcac aacaaatcac aaatgcactc	600
70	aagtatcaa ttaaagatgg cattgtgagg gtagaaaca gaaatacat atcattttac	660
75	caacaaaatc aaaatcacia tgaagtctta ctaaactttg ccaattaga cttcaacatc	720
80	ttgcaaacat tgcataaaaa ggagctatct gatatgacaa ggtggtggaa aaagatggaa	780

5 ctagtgaaca cttacctta tgcaagagac agattggtag agtggttactt ttggtgttta 840
 ggcacctatt ttgagcctca gtatagcgtc gcaaggaaaa tgttgacaaa aatttcattc 900
 10 tatatttcaa ttattgatga cacatatgat atttatggga aactagatga acttactcta 960
 15 ttcactcagg caattgaaag gtggaatatt gatgcttcag aacagttacc attatatatg 1020
 aagattatth accgtgatct tttagatggt tatgatgaaa ttgagaaaga gttggcaaat 1080
 20 gaaaacaagt ctttttagt caattattcc ataatgaga tgaaaaagggt cgtaaggggt 1140
 tactttcaag aggcaaatg gtattatgga aagaaagtac caacaatgga gcaatatatg 1200
 25 aagaatggaa tttcaacaag tgcttacata ttgctaacaa ctacttcttg gttagcaatg 1260
 30 ggaaatgtag caactaaaga tgcatttgat tgggtagcaa ctgaaccacc aatagttggt 1320
 gcttcttggt acattataag attactcaat gatcttgtat cacatgagga agaacaaaaa 1380
 35 cgaggaaatg cggcttctgc tgttgaatgt tatatgaatg aatatagcgt taciaaggaa 1440
 40 gaagcacaca taaaaataag agatataata gaaaattatt ggaaggattt gaatgaagaa 1500
 tactttaaag tagatatgat tattatacca agagttttgc tcatgtgtat aattaatctt 1560
 45 acaagagtgg ctgagttcat atataaagat gaagatgctt atactttctc caaaaataac 1620
 ttgaaagatg tcatctctga tatactagtt gatcctatta tatag 1665

50
 <210> 2
 <211> 554
 <212> PRT
 <213> solanum lycopersicon
 55 <400> 2

Met Glu Leu Cys Thr Gln Thr val Ala Ala Asp His Glu val Ile Ile
1 5 10 15

60
Thr Arg Arg Ser Gly Ser His His Pro Thr Leu Trp Gly Asp His Phe
20 25 30
 65

Leu Ala Tyr Ala Asp Leu Arg Gly Ala Asn Glu Gly Glu Glu Lys Gln
 35 40 45
 5
 Asn Glu Asp Leu Lys Glu Glu Val Arg Lys Met Leu Val Met Ala Pro
 50 55 60
 10
 Ser Lys Ser Leu Glu Lys Leu Glu Leu Ile Asn Thr Ile Gln Cys Leu
 65 70 75 80
 15
 Gly Leu Gly Tyr His Phe Gln Ser Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ser Tyr
 85 90 95
 20
 Met Tyr Thr His Tyr Glu Glu Tyr Ser Ile Gly Asp Leu His Ala Ile
 100 105 110
 25
 Ala Leu Cys Phe Arg Leu Leu Arg Gln Gln Gly Tyr Tyr Val Ser Cys
 115 120 125
 30
 Asp Ala Phe Lys Lys Phe Thr Asn Asp Gln Gly Asn Phe Lys Glu Glu
 130 135 140
 35
 Leu Val Lys Asp Val Glu Gly Met Leu Ser Leu Tyr Glu Ala Ala Gln
 145 150 155 160
 40
 Phe Arg Val His Gly Glu Gln Ile Leu Asp Glu Ala Leu Asn Phe Thr
 165 170 175
 45
 Ile Ala Gln Leu Lys Gln Ile Leu Pro Lys Leu Ser Asn Ser Gln Leu
 180 185 190
 50
 Ala Gln Gln Ile Thr Asn Ala Leu Lys Tyr Pro Ile Lys Asp Gly Ile
 195 200 205
 55
 Val Arg Val Glu Thr Arg Lys Tyr Ile Ser Phe Tyr Gln Gln Asn Gln
 210 215 220
 60
 65

ES 2 535 722 T3

Asn His Asn Glu Val Leu Leu Asn Phe Ala Lys Leu Asp Phe Asn Ile
 225 230 235 240
 5
 Leu Gln Thr Leu His Lys Lys Glu Leu Ser Asp Met Thr Arg Trp Trp
 245 250 255
 10
 Lys Lys Met Glu Leu Val Asn Thr Leu Pro Tyr Ala Arg Asp Arg Leu
 260 265 270
 15
 Val Glu Cys Tyr Phe Trp Cys Leu Gly Thr Tyr Phe Glu Pro Gln Tyr
 275 280 285
 20
 Ser Val Ala Arg Lys Met Leu Thr Lys Ile Ser Phe Tyr Ile Ser Ile
 290 295 300
 25
 Ile Asp Asp Thr Tyr Asp Ile Tyr Gly Lys Leu Asp Glu Leu Thr Leu
 305 310 315 320
 30
 Phe Thr Gln Ala Ile Glu Arg Trp Asn Ile Asp Ala Ser Glu Gln Leu
 325 330 335
 35
 Pro Leu Tyr Met Lys Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Leu Asp Val Tyr Asp
 340 345 350
 40
 Glu Ile Glu Lys Glu Leu Ala Asn Glu Asn Lys Ser Phe Leu Val Asn
 355 360 365
 45
 Tyr Ser Ile Asn Glu Met Lys Lys Val Val Arg Gly Tyr Phe Gln Glu
 370 375 380
 50
 Ala Lys Trp Tyr Tyr Gly Lys Lys Val Pro Thr Met Glu Gln Tyr Met
 385 390 395 400
 55
 Lys Asn Gly Ile Ser Thr Ser Ala Tyr Ile Leu Leu Thr Thr Thr Ser
 405 410 415
 60
 65

5 Trp Leu Ala Met Gly Asn Val Ala Thr Lys Asp Ala Phe Asp Trp Val
 420 425 430

10 Ala Thr Glu Pro Pro Ile Val Val Ala Ser Cys Tyr Ile Ile Arg Leu
 435 440 445

15

20 Leu Asn Asp Leu Val Ser His Glu Glu Glu Gln Lys Arg Gly Asn Ala
 450 455 460

25 Ala Ser Ala Val Glu Cys Tyr Met Asn Glu Tyr Ser Val Thr Lys Glu
 465 470 475 480

30 Glu Ala His Ile Lys Ile Arg Asp Ile Ile Glu Asn Tyr Trp Lys Asp
 485 490 495

35

40 Leu Asn Glu Glu Tyr Phe Lys Val Asp Met Ile Ile Ile Pro Arg Val
 500 505 510

45 Leu Leu Met Cys Ile Ile Asn Leu Thr Arg Val Ala Glu Phe Ile Tyr
 515 520 525

50

55 Lys Asp Glu Asp Ala Tyr Thr Phe Ser Lys Asn Asn Leu Lys Asp Val
 530 535 540

60 Ile Ser Asp Ile Leu Val Asp Pro Ile Ile
 545 550

65

5

REIVINDICACIONES

10

1. Polinucleótido aislado según la SEQ ID NO: 1, o un polinucleótido que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, en el que dicho polinucleótido codifica un polipéptido con actividad de alfa-farneseno sintasa y actividad de beta-farneseno sintasa.

15

2. Fragmento de un polinucleótido, según la reivindicación 1, en el que el fragmento codifica un polipéptido con actividad de alfa-farneseno sintasa y actividad de beta-farneseno sintasa.

20

3. Polipéptido según la SEQ ID NO: 2, o un polipéptido que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2, en el que dicho polipéptido tiene actividad de alfa-farneseno sintasa y actividad de beta-farneseno sintasa.

25

4. Fragmento de un polipéptido, según la reivindicación 3, en el que el fragmento tiene actividad de alfa-farneseno y actividad de beta-farneseno sintasa.

30

5. Construcción genética que comprende un polinucleótido, según cualquiera de las reivindicaciones 1-2.

6. Construcción genética que comprende en la dirección 5'-3' un polinucleótido que en su marco de lectura abierto codifica un polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 3-4.

35

7. Construcción genética que comprende en la dirección 5'-3' un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que codifica un polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 3-4.

8. Vector que comprende una construcción genética, según cualquiera de las reivindicaciones 5-7.

9. Célula huésped que comprende una construcción genética, según cualquiera de las reivindicaciones 5-7.

10. Planta o célula vegetal transgénicas que comprende una construcción genética, según cualquiera de las reivindicaciones 5-7.

40

11. Semillas derivadas de una planta o célula vegetal transgénica, según la reivindicación 10, que comprende una construcción genética, según cualquiera de las reivindicaciones 5-7.

12. Procedimiento de preparación de alfa-farneseno y beta-farneseno, que comprende las etapas de cultivar una célula que se ha modificado genéticamente con un polinucleótido, según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, para proporcionar una mayor actividad de alfa-farneseno sintasa y actividad de beta-farneseno sintasa; y, opcionalmente, proporcionar farnesil difosfato a la célula; y separar la alfa-farneseno y beta-farneseno producidas.

45

13. Procedimiento de modulación de la producción de alfa-farneseno y beta-farneseno de una planta, comprendiendo el procedimiento incrementar o disminuir la expresión de una alfa-farneseno sintasa y una beta-farneseno sintasa que tienen una secuencia de polipéptido, tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 3-4, en el que dicho incremento o disminución se consigue mediante la modificación genética para alterar la expresión de un polinucleótido que codifica dicho polipéptido.

50

14. Procedimiento de detección de la presencia o ausencia de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, en un tejido vegetal o muestra de ácido nucleico del mismo, que comprende:

a. Obtener una muestra de tejido vegetal o una muestra de ácido nucleico.

55

b. Analizar la muestra utilizando un ensayo de marcadores moleculares para la presencia o ausencia de uno o más marcadores unidos al polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, en el que el ensayo de marcadores detecta una secuencia según la SEQ ID NO: 1, o una secuencia que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1.

60

15. Utilización de un polinucleótido según la SEQ ID NO: 1, o un polinucleótido que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 para mapear un marcador molecular (ADN) unido a la secuencia de nucleótidos según la SEQ ID NO: 1 o a una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, en la que dicha secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido con actividad de alfa-farneseno sintasa y actividad de beta-farneseno sintasa.

65

16. Utilización de al menos 15 nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1, o una secuencia que comprende al menos un 90% de identidad de nucleótidos con los mismos, como marcador molecular para un polinucleótido aislado según la

SEQ ID NO: 1, o para un polinucleótido que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, en la que dicho polinucleótido codifica un polipéptido con actividad de alfa-farneseno sintasa y actividad de beta-farneseno sintasa o; como marcador para un polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, en la que dicho polipéptido tiene actividad de alfa-farneseno sintasa y actividad de beta-farneseno sintasa.

5

Figura 2

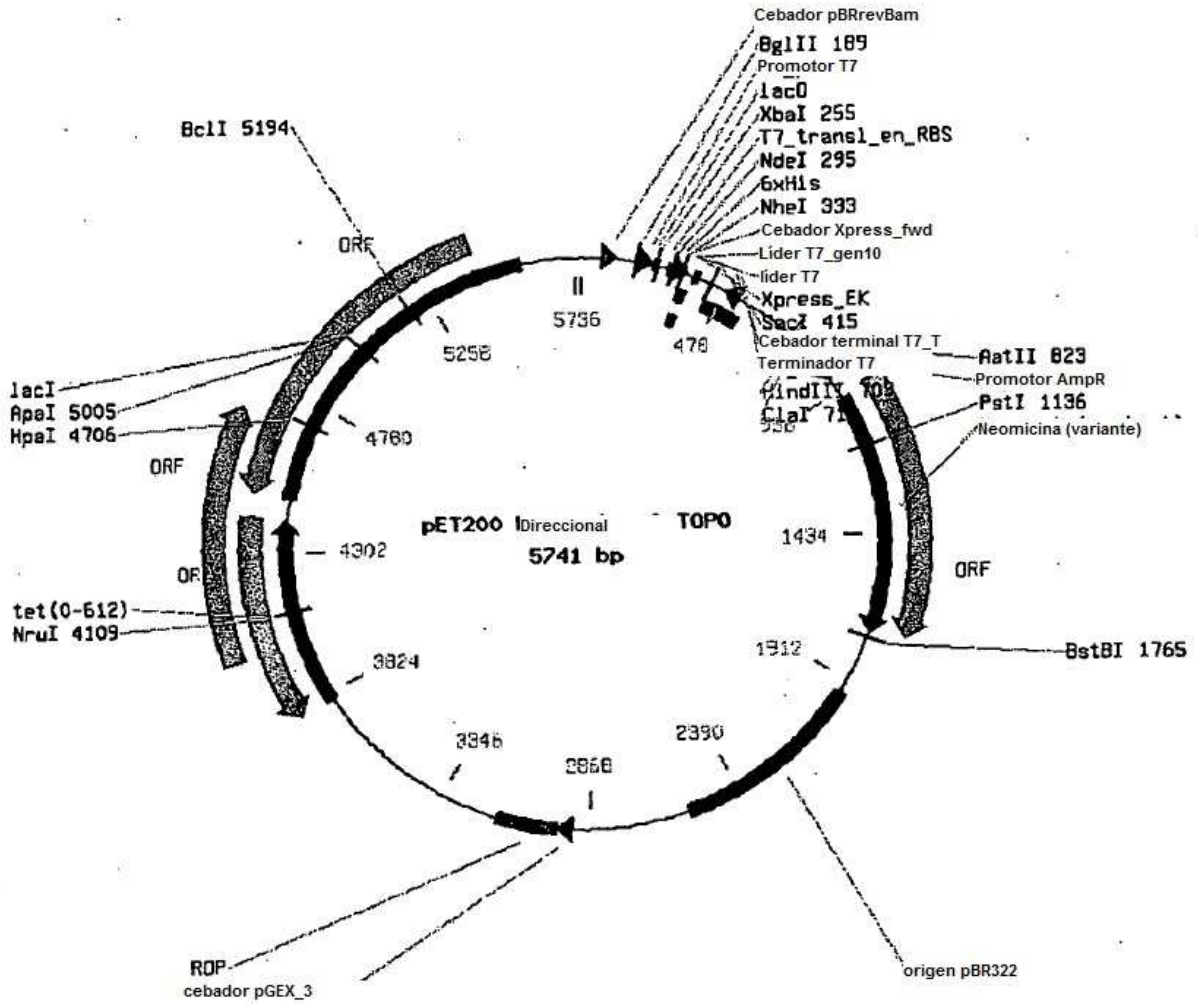


Figura 3

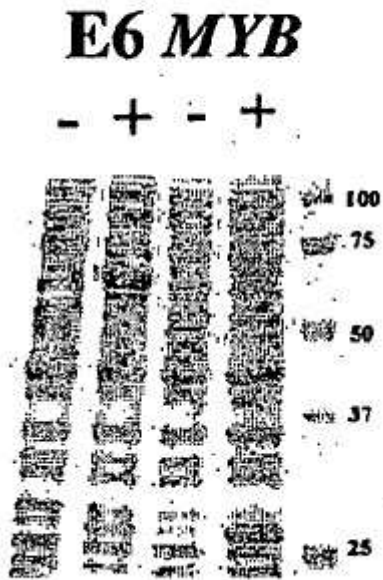


Figura 4

Sol. total

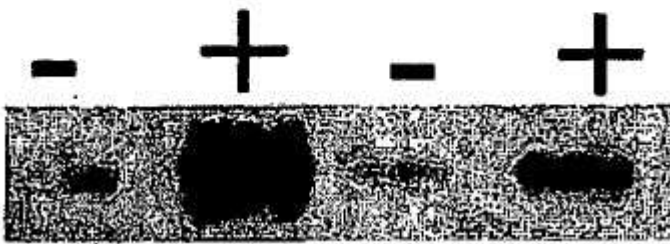


Figura 5

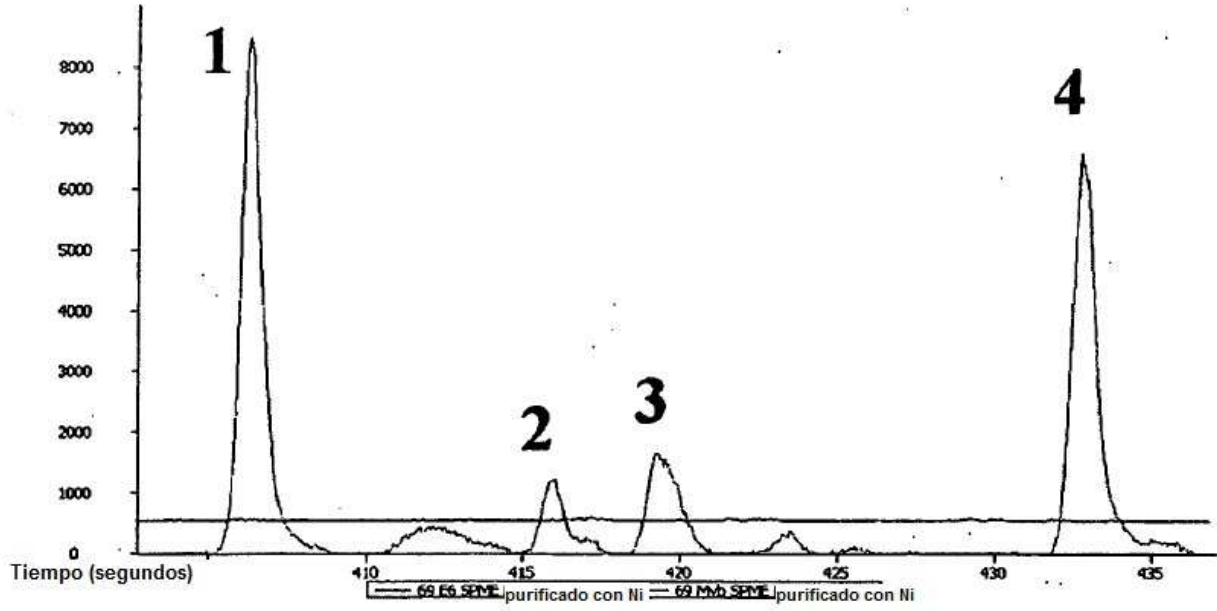


Figura 6

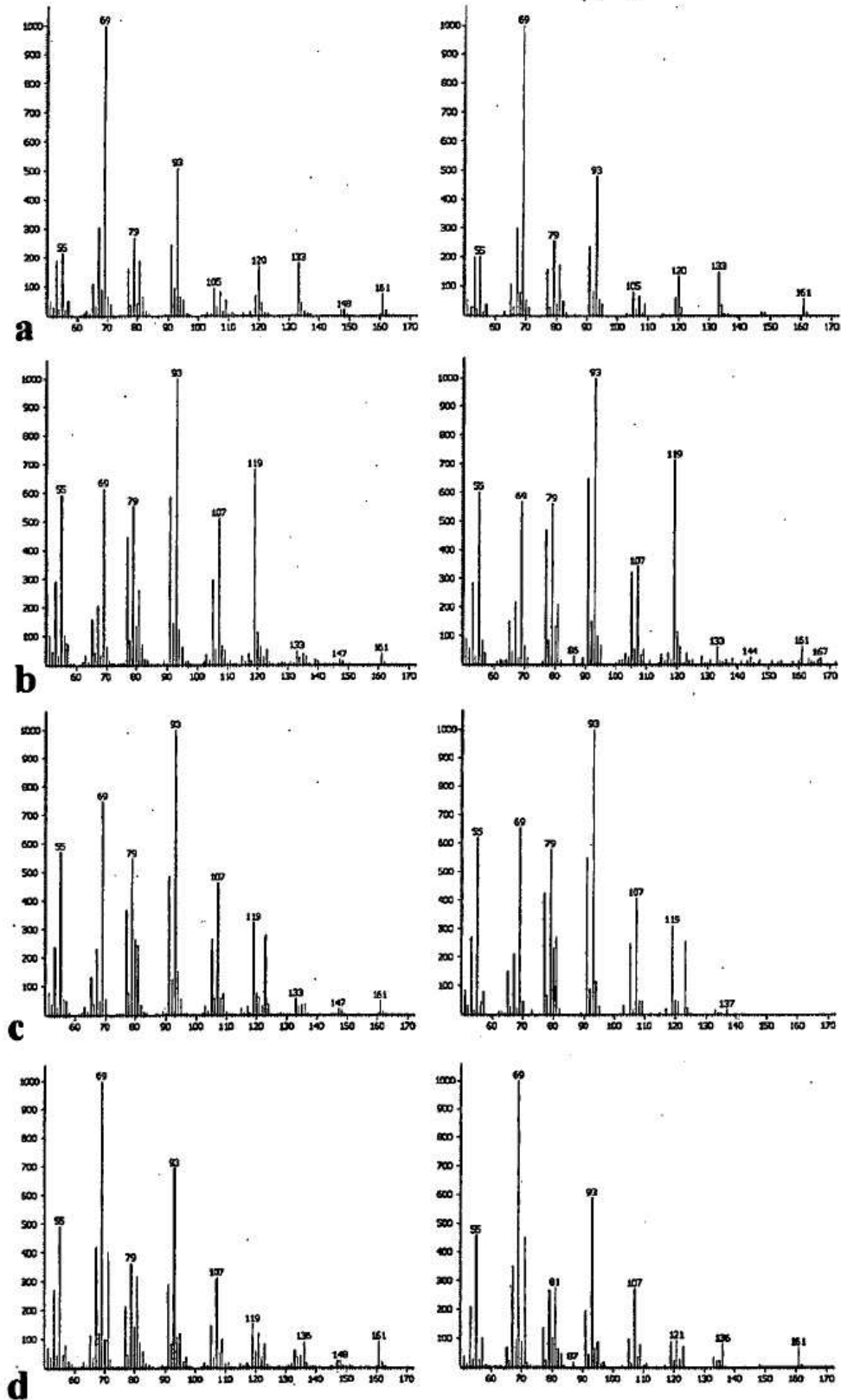


Figura 7

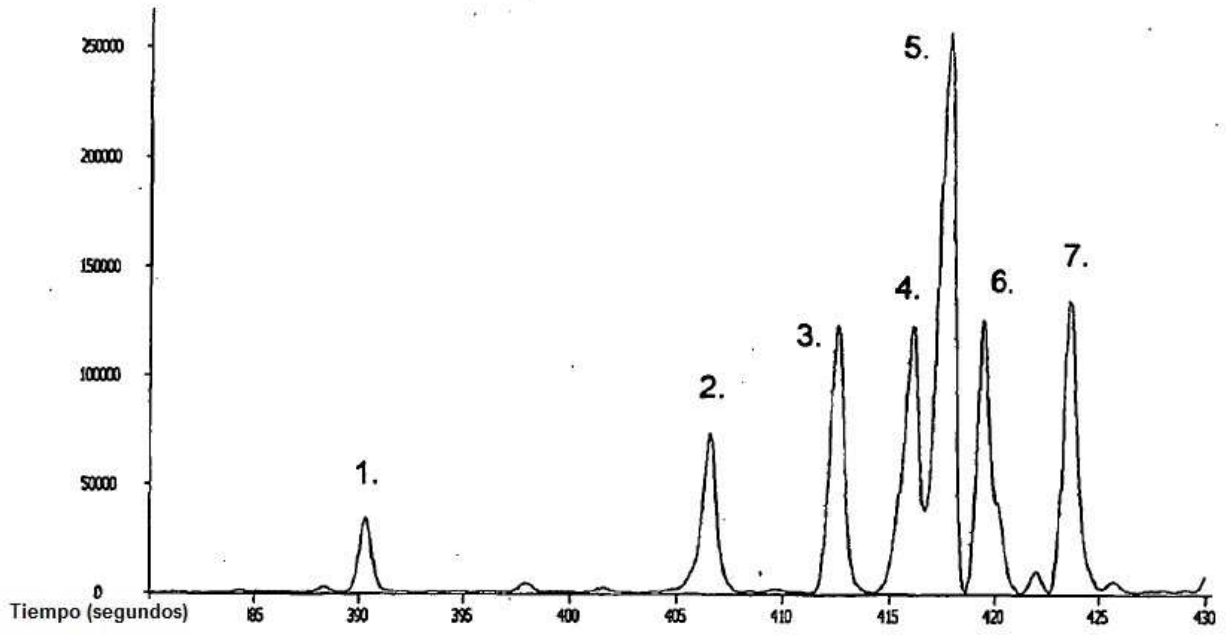


Figura 8

