

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 658**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2011 PCT/IL2011/000225**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2011 WO11111041**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2011 E 11714114 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2545177**

54 Título: **Organismo con contenido de carotenoides alterados y procedimiento para producirlo**

30 Prioridad:

09.03.2010 US 312082 P

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

20.07.2017

73 Titular/es:

**YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY
OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM,
LTD. (100.0%)
Hi-Tech Park Edmond J. Safra Campus Givat
Ram P.O.B 39135
91390 Jerusalem, IL**

72 Inventor/es:

**HIRSCHBERG, JOSEPH y
ZAMIR, DANI**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 625 658 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).

Organismo con contenido de carotenoides alterados y procedimiento para producirlo**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere a organismos alterados genéticamente que producen contenido elevado de los carotenoides fitoeno, fitoflueno, caroteno zeta o combinaciones de los mismos y a los medios y métodos para producir los mismos.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Los carotenoides son pigmentos isoprenoides 40-carbono sintetizados por todas las plantas, algas y cianobacterias, así como por varias bacterias no fotosintéticas y hongos. En las plantas, los carotenoides se sintetizan dentro de plastidios. La vía central de biosíntesis de isoprenoides en plastidios comienza con la producción de difosfato de isopentilo (IPP), una molécula de C₅, que es el bloque de construcción de todos los isoprenoides de cadena larga, a partir de piruvato y gliceraldehído 3-fosfato en la 2-C-metilo-d-eritritol 4-fosfato (MEP). Después de la isomerización de IPP a pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), se combinan tres moléculas adicionales de IPP para producir la molécula de C₂₀, pirofosfato de geranylgeranilo (GGPP). Estas reacciones de condensación 1'-4 se catalizan mediante enzimas de sintasas GGPP del tipo transferasa de prenilo. Hay pruebas en las plantas de que la misma enzima, sintasa de GGPP, lleva a cabo todas las reacciones de DMAPP a GGPP.

[0003] La cadena de polieno de carotenoides puede extenderse desde 3 a 15 dobles enlaces conjugados, que son responsables de los espectros de absorción característica de carotenoides y conferir propiedades fotoquímicas específicas. Debido a estas propiedades los carotenoides son componentes esenciales en todos los organismos fotosintéticos, donde cumplen funciones indispensables en la fotosíntesis. Los carotenoides también juegan un papel en la reproducción de plantas mediante el suministro de flores y frutas con pigmentación distinta diseñada para atraer animales y mejorar la polinización y la dispersión de semillas. Muchos de los colores naranja, amarillo o rojo que se encuentran en estos órganos se generan por la acumulación de alta concentración de carotenoides en los cromoplastos. Además, los productos de degradación de los carotenoides comprenden compuestos aromáticos y aromatizantes, y su presencia en la fruta atrae a los animales.

[0004] En la última década, la biosíntesis de carotenoides en plantas se ha descrito en el nivel molecular (revisado en, por ejemplo, Lu, S. y Li, L. 2008. J. Integr Plant Biol. 50: 778-785). El primer paso comprometido en la vía carotenoides es la condensación cabeza a cabeza de dos moléculas GGDP para producir fitoeno, el primer carotenoide C₄₀, catalizado por la enzima sintasa de fitoeno (PSY).

[0005] La inserción de dobles enlaces conjugados (caroteno de desaturación) en la cadena de C₄₀ de fitoeno conduce a la formación de cromóforo de polieno visible. La desaturación de la planta caroteno es una secuencia de reacción compleja unida a la membrana. Cuatro dobles enlaces son introducidos a fitoeno por dos enzimas, la desaturasa de fitoeno (PDS) y ζ desaturasa de caroteno (ZDS), cada uno que catalizan dos pasos de saturación simétricos para producir ζ-caroteno y licopeno, respectivamente (Figura 1). Se estableció recientemente que todos los intermedios en esta parte de la vía son *cis*-configurados y que una isomerasa específica, CRTISO, opera en conjunción con ZDS para producir todo-*trans* licopeno (Isaacson, T. et al 2002. Plant Cell 14: 333 - 342, Isaacson, T. et al., 2004. Plant Physiol., 136: 4246 - 4255, Park, H. et al., 2002. Plant Cell 14: 321 - 332). Además, se ha predicho que otras enzimas y cofactores son esenciales para este proceso, incluyendo un factor designado Z-ISO que está implicado en isomerización de 15-*cis*-ζ-caroteno (Li F. et al. 2007. Plant Physiol. 144 : 1181 - 1189). La desaturación de caroteno es una reacción redox, unida a una cadena redox extendida, empleando quinonas como oxígeno intermedio y molecular como aceptor terminal de electrones. El gen Oxi Molecular se reduce por medio de una oxidasa plastídica "terminal" ("alternativo"). Debido a esta complejidad y la topología unida a la membrana de las enzimas implicadas, un sistema de desaturación PDS-ZDS nunca ha sido reconstruido *in vitro* con proteínas purificadas. Un documento de Chen Y. et al., publicado después de la prioridad de la presente invención describe el aislamiento y caracterización del gen Z-ISO, y propone que la proteína codificada tiene un papel en la isomerización de 15-*cis*-enlace presente en el producto PDS, 9,15,9'-tri-*cis*-ζ-caroteno para formar el sustrato ZDS 9,9'-di-*cis*-ζ-caroteno.

[0006] La ciclación de licopeno por cualquiera de β-ciclasa de licopeno (Lcy-b) o licopeno epsilon-ciclasa (Lcy-e), llevan a β-caroteno y α-caroteno, respectivamente. Oxigenaciones de carotenos cíclicos producen xantofilas. En las bacterias, una sola enzima de desaturasa de fitoeno, CrtI, lleva a cabo el fitoeno a la conversión *trans*-licopeno. Sorprendentemente, una desaturasa de CrtI transgénica es activa en plantas.

[0007] En las plantas, los carotenoides son también precursores para reguladores de crecimiento y señales de desarrollo. La hormona ácido abscísico (ABA) se produce a partir de xantofilas violaxantina y neoxantina. Se ha descubierto recientemente que un derivado de la escisión de caroteno β, posiblemente 13-*apo*-β-carotenono, sirve como un injerto-transmisible inhibidor de ramificación lateral en *arabidopsis*.

[0008] Existe un interés creciente en todo el mundo para aumentar el contenido de vitaminas y otros nutrientes funcionales en plantas de cultivo (DellaPenna, D. 1999. Science 285: 375-379; Lindsay, DG 2000. Trends in Food Sci. Technol 11: 145-151). Los carotenoides juegan un papel crucial en la determinación de los parámetros de calidad de las frutas y hortalizas (revisados en van den Berg, H. et al., 2000, J. Sci. Food Agric. 80: 880-912). Todas las especies de carotenoides que contienen β -anillo pueden ser convertidas en retinol y por lo tanto son precursores de la vitamina A (provitamina A). Si bien esta es la mayor importancia de los carotenoides en la nutrición humana, beneficios de salud adicionales se atribuyen a su actividad antioxidante *in vivo* (Stahl, W. y Sies, H. 2003. Mol Aspects Med. 24: 345-351). El consumo de xantofilas (especialmente la luteína) se ha asociado con la prevención de la degeneración macular relacionada con la edad.

[0009] Los estudios epidemiológicos han asociado carotenoides con riesgo reducido de cáncer y otras enfermedades en los seres humanos (Cooper, D.A. 2004. J Nutr 134: 221S-224s). Se han atribuido beneficios específicos para la salud a los carotenoides fitoeno y fitoflueno (Shaish, A. et al., 2008. Plant Foods Hum Nutr. 63: 83-86). Se observó una absorción significativa de fitoeno y fitoflueno a partir de productos a base de tomate en seres humanos (Aust, O. et al., 2005), y se encontró que se absorben fácilmente por células tumorales normales y de próstata (Campbell, JK et al., 2007). Nutr Res. 27: 794 - 801). Fitoeno se demostró en modelos animales como un protector solar eficaz (Mathews-Roth, MM y Pathak, MA 1975. Photochem., Photobiol., 21: 261-263).

[0010] Fitoeno y fitoflueno absorben luz en el intervalo de longitud de onda ultravioleta. El espectro de absorción de fitoeno es 276-297 nm (pico principal 285-287 nm) y de fitoflueno 331-367 nm (pico principal 348 nm). El espectro de absorción de ζ -caroteno es 374-425 nm (pico principal 395-400 nm). Por lo tanto, estos carotenoides se pueden utilizar como protección solar para proteger la piel de los daños infligidos por la luz ultravioleta (UV). De hecho, se demostró la protección de la piel frente a la luz UV en seres humanos alimentados con alimentos o extractos a base de tomate (Stahl, W. et al., 2001. J. Nutr. 131: 1449-1451), y este efecto se atribuyó a fitoeno y fitoflueno (Aust, O. et al., 2005. Int. J. Vitam, Nutr Res. 75: 54 - 60). Basándose en estos estudios, se ha sugerido que los carotenoides dietéticos pueden contribuir a la protección a lo largo de la vida contra la radiación UV perjudicial (Stahl, W. et al., 2006. Photochem., Photobiol Sci., 5: 238-242). El potencial del uso de fitoeno y fitoflueno como protector solar está respaldado por estudios previos que demostraron beneficios al combinar el tratamiento tópico con carotenoides además de la suplementación oral (Palombo, P. y otros, 2007. Skin Pharmacol., Physiol., 20: 199-210). Se ha informado de la acumulación de fitoeno y hasta cierto punto de fitoflueno mediante la adición del herbicida norflurazon (4-cloro-5(metilamino)-2-(3-(trifluorometilo)fenilo)-3(2H)-piridazinona) al medio de crecimiento de las algas *Dunaliella* (Ben Amotz, A. et al., 1987 J. Phycol., 23: 176-181). Sin embargo, el uso de tales productos químicos sólo es posible en organismos cultivados.

[0011] Li et al. (Plant Physiology 2007, 144: 1181-1189) es un artículo de revisión en maíz $\zeta 9$ que codifica un producto esencial para la isomerización de 15-cis- ζ -caroteno, sin embargo, los componentes estructurales de la actividad descrita no se revelan.

[0012] La cantidad de fitoeno y fitoflueno, siendo los primeros ingredientes en la vía de carotenoides, se relativamente baja en los organismos que contienen carotenoides. En vista de los efectos beneficiosos notificados para fitoeno y fitoflueno, existe una necesidad reconocida de, y sería altamente ventajoso tener, organismos productores de carotenoides que tienen altas cantidades de fitoeno y fitoflueno.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0013] La presente invención se refiere a organismos alterados genéticamente que tienen un contenido elevado de estos carotenoides y a métodos para producir los mismos.

[0014] La presente invención se basa en parte en el descubrimiento inesperado de que las plantas de tomate comprenden mutaciones Z producen frutos con cantidades elevadas de los carotenoides fitoeno, fitoflueno y ζ -caroteno en comparación con el tomate de tipo salvaje correspondiente. El contenido elevado de estos carotenoides también se midió en flores, raíces y hojas etioladas de las plantas de tomate Z. Las mutaciones Z y las proteínas codificadas se caracterizan por primera vez en la presente invención, así como la secuencia del gen y la proteína de tomate de tipo salvaje.

[0015] Sin desear estar ligado por ninguna teoría particular o mecanismo de acción, una proteína, designada Ziso, se requiere para la isomerización adecuada de ζ -caroteno. Como se ha demostrado en las plantas de tomate, su ausencia o falta de actividad en los mutantes Z, en particular en las células que contienen cromoplasto, detiene la ruta biosintética del carotenoide después de la producción de caroteno ζ , llevando a la acumulación de los componentes previos, principalmente fitoeno y fitoflueno.

[0016] La presente invención proporciona por lo tanto medios y métodos para la inhibición de la expresión y/o función de la proteína Ziso. Como resultado, la vía de biosíntesis de carotenoides distal a la isomerización ζ -caroteno se bloquea o se atenúa, conduciendo de este modo a la acumulación de fitoeno y fitoflueno. En algunas realizaciones, el fitoeno y el fitoflueno se acumulan hasta cantidades no detectadas hasta ahora de al menos 15% de fitoflueno y 25% de fitoeno fuera del contenido total de carotenoides. La presente invención proporciona además

organismos genéticamente alterados, particularmente plantas superiores, con una expresión o actividad reducida de Ziso y un contenido elevado de al menos uno de fitoeno, fitoflueno y opcionalmente caroteno de ζ adicional en comparación con organismos no alterados.

5 **[0017]** De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona un organismo que produce carotenoides alterados genéticamente que comprende al menos una célula que contiene cromoplasto que tiene expresión reducida o actividad de la proteína Ziso que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 70%, 75%, 80%, 85% o 95% homólogo a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 en comparación con un organismo no alterado correspondiente que tiene expresión no alterada de la proteína Ziso, en la que el organismo genéticamente alterado tiene un contenido elevado de al menos un carotenoide seleccionado del grupo que consiste en fitoeno, fitoflueno, caroteno ζ y combinaciones de los mismos en comparación con un organismo no alterado correspondiente, seleccionándose dicho organismo genéticamente modificado del grupo que consiste en una planta, una alga y una cianobacteria.

15 **[0018]** Otros aspectos y realizaciones de la presente invención se especifican en las reivindicaciones pendientes.

[0019] La inhibición de la expresión o actividad de la proteína Ziso puede conseguirse por diversos medios. De acuerdo con ciertas realizaciones, la inhibición de la expresión Ziso puede verse afectada en la genómica y/o el nivel de transcripción usando una variedad de moléculas que interfieren con la transcripción y/o traducción (por ejemplo, antisentido, siARN, ribozima, o ADNzima) del gen *Ziso*. La inserción de una mutación al gen *Ziso*, incluyendo delecciones, inserciones, mutaciones específicas de sitio, mutaciones mediadas por las nucleasas de dedos de zinc y similares también se pueden utilizar, siempre y cuando los resultados de mutación en la baja regulación de la expresión génica o en la no función de la proteína. Alternativamente, la expresión puede ser inhibida a nivel de proteína utilizando, por ejemplo, antagonistas, enzimas que escinden el polipéptido, y similares.

25 **[0020]** De acuerdo con ciertas realizaciones, el organismo alterado genéticamente comprende un gen Ziso mutado. Las mutaciones pueden aplicarse sobre una pluralidad de organismos por cualquier método como se conoce en la técnica, incluyendo la aplicación de productos químicos mutagénicos o radiación. La pluralidad de organismos se examina entonces para el fenotipo específico de detención en la biosíntesis de carotenoides en la etapa de ζ -caroteno, específicamente la acumulación de 9,15,9'-tri-cis- ζ -caroteno. La pluralidad de organismos se puede tamizar también para mutaciones específicas en el gen Ziso por métodos de cultivo molecular (McCallum, CM et al., 2000. Nat Biotechnol., 18: 455 - 457). Los organismos que tienen el fenotipo deseado se someten luego a cribado para tener un contenido elevado de fitoeno y/o fitoflueno en comparación con un organismo no alterado correspondiente. Según algunas realizaciones, el gen mutado codifica una proteína Ziso no funcional. De acuerdo con ciertas realizaciones típicas, el gen mutado comprende la secuencia de ácidos nucleicos expuesta en la SEQ ID NO: 4 (Z designado *0089*), que codifica una proteína Ziso no funcional que tiene la SEQ ID NO: 5. De acuerdo con realizaciones típicas adicionales del gen mutado comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 6 (Z⁰⁰⁸⁹ designado) que codifica una proteína Ziso no funcional que tiene la SEQ ID NO: 7.

40 **[0021]** De acuerdo con realizaciones adicionales, el organismo genéticamente alterado es un organismo transgénico que comprende al menos una célula que comprende una molécula de silenciamiento *Ziso* seleccionado del grupo que consiste en molécula de interferencia de ARN, una molécula antisentido y una molécula de codificación de ribozima.

45 **[0022]** La molécula que silencia *Ziso* puede ser diseñada como se conoce por una persona experta en la técnica. De acuerdo con ciertas realizaciones, la molécula de silenciamiento comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico complementario sustancialmente una región del gen Ziso expresado. De acuerdo con ciertas realizaciones, el gen Ziso comprende una secuencia de ácido nucleico a al menos 55%, típicamente al menos 60%, 70%, 75%, más típicamente al menos 80%, 85%, 95% y más homólogos a la nucleico Secuencia de ácido establecido en la SEQ ID NO: 2. Según otras realizaciones, el gen Ziso comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 2.

55 **[0023]** De acuerdo con ciertas realizaciones, la molécula de silenciamiento es un ARN antisentido. Según otras realizaciones, la molécula silenciadora es una molécula de interferencia de ARN (ARNi).

[0024] Las moléculas de silenciamiento se pueden incorporar en un constructo de ADN que permite su expresión en las células del organismo. Las construcciones de ADN adecuadas para un organismo particular, incluyendo plantas, algas y cianobacterias son conocidas por una persona experta en la técnica. Una construcción de ADN puede comprender al menos un elemento regulador de la expresión seleccionado del grupo que consiste en un promotor, un potenciador, un origen de replicación, una secuencia de terminación de la transcripción, una señal de polianilación y similares. Típicamente, el promotor es un promotor específico de tejido. El tejido puede ser un tejido que contiene cromoplasto o un tejido no fotosintético. Cuando el organismo es una planta, el promotor es típicamente específico de un tejido seleccionado del grupo que consiste en raíces, tubérculos, frutos, flores y semillas. De acuerdo con ciertas realizaciones, el organismo genéticamente alterado de la presente invención tiene un contenido de fitoeno de al menos el 25% (p/p) del contenido de carotenoides totales de las células genéticamente alteradas.

[0025] Según otras realizaciones, el organismo alterado genéticamente de la presente invención tiene un contenido de fitoflueno de al menos 15% (en peso) del contenido total de carotenoides de las células alteradas genéticamente. Según otras realizaciones adicionales, el organismo genéticamente alterado de la presente invención tiene un nivel combinado de fitoeno y fitoflueno de al menos 30% (p/p) del contenido total de carotenoides.

[0026] Se ha de entender expresamente que cuando el organismo es una planta, el porcentaje de fitoeno, fitoflueno o su combinación se refiere a su porcentaje en al menos uno de los órganos de la planta. De acuerdo con realizaciones típicas, el órgano de la planta se selecciona de una raíz, un tubérculo, un fruto, una flor y una semilla.

[0027] También se dan a conocer suspensiones de células alteradas genéticamente y cultivos de tejidos derivados de las células alteradas genéticamente, o de organismos. La suspensión celular y los cultivos de tejidos se pueden usar para la producción de al menos uno de fitoeno, fitoflueno, caroteno ζ o combinaciones de los mismos, que luego se extraen de las células o del medio de crecimiento. Alternativamente, las células alteradas genéticamente y/o el cultivo de tejidos se usan para regenerar un organismo que tiene una expresión reducida de la proteína Ziso, teniendo por lo tanto un contenido elevado de al menos uno de fitoeno, fitoflueno, caroteno ζ o combinaciones de los mismos como se describe aquí.

[0028] En las realizaciones en las que el organismo es una planta, la presente invención también abarca semillas de la planta alterada genéticamente, en el que las plantas cultivadas a partir de dichas semillas han reducido la expresión de Ziso en comparación con plantas cultivadas a partir de semillas no alteradas correspondientes, con lo que tienen un contenido elevado de al menos uno de fitoeno, fitoflueno, ζ caroteno o combinaciones de los mismos como se describe en la presente memoria.

[0029] Según un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para elevar el contenido de al menos uno de fitoeno, fitoflueno, caroteno ζ o combinaciones de los mismos en al menos un cromoplasto que comprenden una secuencia de aminoácidos al menos 70%, 75%, 80%, 85% o 95% homóloga a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3 en al menos una célula, produciendo de este modo un organismo que tiene una cantidad elevada de al menos uno de fitoeno, fitoflueno, caroteno ζ o combinaciones de los mismos en dicha al menos una célula en comparación con una célula que tiene expresión no inhibida de la proteína Ziso, en la que el organismo se selecciona del grupo que consiste en una planta, una alga y una cianobacteria.

[0030] De acuerdo con ciertas realizaciones, la inhibición de la expresión Ziso comprende introducir una mutación en el gen que codifica Ziso, en el que la mutación resulta en la expresión reducida del gen Ziso o en la producción de proteína Ziso no funcional. Cualquier método para introducir una mutación en el gen Ziso como se describe en este documento y como se conoce en la técnica se puede utilizar de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención.

[0031] De acuerdo con algunas formas de realización, la inhibición de la expresión Ziso comprende transformar al menos una célula del organismo con una molécula diseñada para silenciar la expresión del gen Ziso. De acuerdo con ciertas realizaciones, el gen Ziso comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 70%, 75%, más típicamente al menos 80%, 85%, 95% y más homóloga a la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 2.

[0032] De acuerdo con ciertas realizaciones, el organismo producido por el método de la presente invención tiene un contenido fitoeno de al menos 25% (en peso) de carotenoides totales, o un contenido de fitoflueno de al menos 15% (en peso) del contenido total de carotenoides, o un nivel combinado de fitoeno y fitoflueno de al menos 30% (p/p) del contenido total de carotenoides.

[0033] De acuerdo con un aspecto todavía adicional, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica la proteína no funcional Ziso que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7. De acuerdo con algunas realizaciones, el polinucleótido aislado comprende una secuencia de ácido nucleico expuesta en las SEQ ID NO: 4 y 6, respectivamente.

[0034] Otros objetos, características y ventajas de la presente invención quedarán claras a partir de la siguiente descripción y los dibujos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 muestra la presentación esquemática de la ruta de biosíntesis de carotenoides en las plantas de difosfato de geranilgeranilo a β -caroteno. CRTISO, isotrasa de caroteno; CYC-B, β -ciclase de licopeno de cromoplastos específicos; GGPP, difosfato de geranilgeranilo; LCY-B, β -ciclase de licopeno; LCY-E, ϵ -ciclase de licopeno; PDS, desaturasa de fitoeno; PSY, sintasa de fitoeno; ZDS, desaturasa ζ -caroteno; Ziso, isomerasa ζ -caroteno.

FIG. 2 es una representación esquemática del mapa genético en el cromosoma # 12 de tomate en la región cerca del locus ZETA. ZETA se localizó entre los marcadores CT80B y Atlg48300. Se indican los clones BAC con secuencias genómicas tomate que cubren estos marcadores.

FIG. 3 muestra la secuencia genómica del gen Ziso del tomate (secuencias de exones predichos se indican en negrita).

FIG. 4 muestra la secuencia de ADNc del gen Ziso de tomate (cv M82). El codón de iniciación (ATG) y el codón de terminación están marcados.

FIG. 5 muestra la secuencia de ADNc del gen Ziso del alelo mutante de tomate *ZETA z⁰⁰⁸⁹*, con la mutación crea un nuevo codón de parada indicado (Figura 5A); la secuencia de ADNc del gen Ziso del alelo mutante tomate *ZETA z²⁰⁸³*, con la mutación crea un nuevo codón de parada indicado (Figura 5B); y la alineación de secuencias de aminoácidos del polipéptido ZISO del tipo salvaje de tomate (CV M82) y mutantes *ZETA* (alelos *z²⁰⁸³* y *z⁰⁰⁸⁹*) como se infiere a partir de secuencias de ADNc (Figura 5C).

FIG. 6 muestra la composición de carotenoides en fruto de seis líneas de mejoramiento F2 que lleva la mutación *ZETA* [$\mu\text{g}/\text{gr}$ FW].

FIG. 7 presenta la alineación de secuencias de aminoácidos del polipéptido ZISO a partir del tomate de tipo salvaje (CV M82) y Z-como producto génico de *Synpcc7942_1979* (ziso 7942) a partir de *Synechococcus elongatus* PCC7942. Las identidades están marcadas en fuentes blancas sobre fondo negro; similitudes como fuentes negras sobre fondo gris.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

[0036] La presente invención se refiere a medios y métodos para la producción de al menos uno de fitoeno, fitoflueno, zeta caroteno o combinaciones de los mismos en organismos que sintetizan carotenoides. En particular, la presente invención se refiere a organismos genéticamente alterados por medios biotecnológicos, en los que se inhibe la expresión o actividad de la proteína Ziso, de tal manera que la vía de biosíntesis de carotenoides se detiene después de la producción de 9,15,9'-tri-cis- ζ -caroteno y fitoeno y/o fitoflueno se acumulan a niveles de al menos 25% y 15% (p/p) del nivel total de carotenoides, respectivamente, en las células genéticamente alteradas. De acuerdo con ciertas realizaciones típicas, el organismo es una planta, típicamente planta de tomate.

Definiciones

[0037] El término "organismo productor de carotenoide" se refiere a un organismo natural capaz de producir carotenoides, en el que la ruta de biosíntesis de carotenoides comprende la etapa de isomerización ζ -caroteno. El organismo se selecciona del grupo que consiste en plantas, algas y cianobacterias.

[0038] El término "organismo genéticamente alterado" se refiere a un organismo que comprende al menos una célula alterada genéticamente por el hombre. La modificación genética incluye la modificación de un gen o genes, por ejemplo introduciendo deleciones de mutación, inserciones, elemento(s) transponibl(es) y endógenos similares en un polinucleótido endógeno o un gen de interés. Adicionalmente o alternativamente, la modificación genética incluye transformar la célula del organismo con polinucleótido heterólogo para producir un organismo transgénico.

[0039] El término "fitoeno" se refiere a 15Z-7,8,11,12,7',8',11',12'-octahidro- ψ,ψ -caroteno.

[0040] El término "fitoflueno" se refiere a 15Z-7,8,11,12,7',8'-hexahidro- ψ,ψ -caroteno.

[0041] El término " ζ -caroteno" se refiere a 7,8,7',8'-tetrahidro- ψ,ψ -caroteno

[0042] El término "tri-cis- ζ -caroteno" se refiere a 9Z, 15Z, 9'Z-7,8,7',8'-tetrahidro- ψ,ψ -caroteno.

[0043] Los términos "Ziso" y "proteína Ziso" se usan aquí indistintamente y se refieren a una proteína cuya presencia o actividad es necesaria para la isomerización del ζ -caroteno. Según la presente invención, la proteína ZISO nativa, no modificada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3 o una secuencia homóloga a la misma.

[0044] Tal como se utiliza aquí, el término "cis-carotenoide" se refiere a un carotenoide que tiene al menos un doble enlace que conecta dos átomos de carbono en una orientación cis.

[0045] Tal como se uso en este documento, el término "isomerización caroteno ζ " se refiere a la conversión de 9,9'-15-cis- ζ -caroteno a 9,9'-cis- ζ caroteno.

[0046] El término "gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) que comprende las secuencias necesarias para la producción de ARN o un polipéptido. Un polipéptido puede estar codificado por una secuencia de codificación de longitud completa o por cualquier parte de la misma. El término "partes de los mismos" cuando se usa en referencia a un gen se refiere a fragmentos de ese gen. Los fragmentos pueden variar en tamaño desde unos cuantos nucleótidos hasta la secuencia génica completa menos un nucleótido. De este modo, "una

secuencia de ácido nucleico que comprende al menos una parte de un gen" puede comprender fragmentos del gen o del gen completo.

5 **[0047]** El término "gen" también abarca las regiones codificantes de un gen estructural e incluye secuencias localizadas adyacentes a la región codificante en ambos extremos 5' y 3' para una distancia de aproximadamente 1 kb en cada extremo de tal manera que el gen corresponde a la longitud del ARNm de longitud completa. Las secuencias que están localizadas en 5' de la región codificante y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias 5' no traducidas. Las secuencias que están situadas 3' o aguas abajo de la región codificante y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias 3' no traducidas.

10 **[0048]** Los términos "Ziso" y "gen Ziso" se usan aquí de forma intercambiable y se refieren a un polinucleótido que codifica la proteína Ziso. De acuerdo con ciertas realizaciones típicas de la presente invención, el gen Ziso está codificado por la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2.

15 **[0049]** Los términos "homólogo" o "homólogos" se refieren a polipéptidos o proteínas que se usan aquí para significar polipéptidos con cualesquiera inserciones, deleciones y sustituciones que no afectan la actividad biológica del polipéptido como se describe aquí. Los polipéptidos homólogos a la proteína ZISO se pueden determinar usando el software BlastP o TblastN del National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parámetros por defecto, opcionalmente y preferiblemente incluyendo lo siguiente: filtrar "on" (esta opción filtra secuencias repetitivas o de baja complejidad de la búsqueda mediante el uso del programa Seg (proteína), matriz de puntuación es BLOSUM62 para las proteínas, el tamaño de la palabra es 3, el valor E es 10 y los costos del hueco son 11, 1 (inicialización y extensión).

20 **[0050]** Cuando se hace referencia a polinucleótidos los términos "homólogo" o "homólogos" significan polinucleótido que codifica un polipéptido o proteína que tiene la actividad biológica de ZISO como se describe en el presente documento. La homología/identidad de la secuencia de ácidos nucleicos puede determinarse usando el software BlastN del National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parámetros por defecto, que preferiblemente incluyen el uso del programa de filtro DUST, y también preferiblemente incluyen tener un valor E de 10, filtrando secuencias de baja complejidad y un tamaño de la palabra de 11.

25 **[0051]** Los términos "polinucleótido", "secuencia de polinucleótido", "secuencia de ácido nucleico" y "polinucleótido aislado" se usan indistintamente en este documento. Estos términos abarcan secuencias de nucleótidos y similares. Un polinucleótido puede ser un polímero de ARN o ADN o híbrido de los mismos, que es monocatenario o bicatenario, lineal o ramificado, y que opcionalmente contiene bases de nucleótidos sintéticas, no naturales o alteradas. Los términos también abarcan híbridos de ARN/ADN.

30 **[0052]** Los términos "complementario" o "complemento del mismo" se utilizan aquí para referirse a las secuencias de polinucleótidos que es capaz de formar apareamiento de bases Watson & Crick con otro polinucleótido especificado a lo largo de la totalidad de la región complementaria. Este término se aplica a pares de polinucleótidos basándose únicamente en sus secuencias y no un conjunto particular de condiciones bajo las cuales los dos polinucleótidos se unirían realmente.

35 **[0053]** El término "constructo", como se usa aquí se refiere a una molécula de ácido nucleico ensamblado artificialmente o aislado que incluye el polinucleótido de interés. En general, un constructo puede incluir el polinucleótido o polinucleótidos de interés, un gen marcador que en algunos casos puede ser también un gen de interés y secuencias reguladoras apropiadas. Debe apreciarse que la inclusión de secuencias reguladoras en una construcción es opcional, por ejemplo, tales secuencias pueden no ser necesarias en situaciones en las que se van a usar las secuencias reguladoras de una célula huésped. El término constructo incluye vectores, pero no debe considerarse limitado a ellos.

40 **[0054]** El término "expresión", como se usa en el presente documento, se refiere a la producción de un ejemplo del producto final funcional, un ARNm o una proteína.

45 **[0055]** El término "transgénico" cuando se usa en referencia a un organismo de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención (es decir, un "organismo transgénico") se refiere a un organismo que contiene al menos un polinucleótido transcribible heterólogo en una o más de sus Células. El término "material transgénico" se refiere ampliamente a una planta, algas, una cianobacteria o parte de la misma, incluyendo células o tejidos que contienen al menos un polinucleótido heterólogo en al menos una célula.

50 **[0056]** Los términos "transformantes" o "células transformadas" incluyen la célula transformada primaria y los cultivos derivados de esa célula sin tener en cuenta el número de transferencias. Todas las progenies pueden no ser exactamente idénticas en el contenido de ADN; sin embargo, todas las progenies que tienen la misma funcionalidad que en la célula originalmente transformada se incluyen en la definición de transformantes.

55 **[0057]** La transformación de una célula puede ser estable o transitoria. El término transformación transitoria o transitoriamente transformado se refiere a la introducción de uno o más polinucleótidos exógenos en una célula en

ausencia de integración del polinucleótido exógeno en el genoma de la célula huésped. Por el contrario, el término transformación estable o transformado establemente se refiere a la introducción e integración de uno o más polinucleótidos exógenos en el genoma de una célula. El término "transformante estable" se refiere a una célula que ha integrado de forma estable uno o más polinucleótidos exógenos en el ADN genómico o organelar. Debe entenderse que un organismo o su célula transformada con los ácidos nucleicos, constructos y/o vectores descritos en la presente memoria pueden ser transitorios así como transformados de forma estable.

Modos preferidos para ejecutar la invención

[0058] En el curso de la investigación de la ruta de biosíntesis de carotenoides, en particular los pasos de desaturación e isomerizaciones que convierten fitoeno a trans-licopeno, los inventores de la presente invención han utilizado una "biblioteca de mutación" de tomate isogénico generada en el fondo genético de la variedad congénita M82 de tomate procesado, por uno de los inventores de la presente invención y sus compañeros (Menda, N. et al. 2004. Plant J. 38:861-872). Para la generación de la biblioteca, un total de 13.000 familias de M2, derivado de metanosulfonato de etilo (EMS) de tratamiento químico y la mutagénesis de neutrones rápidas de las semillas, se determinó su fenotipo en condiciones de campo. Con base en los fenotipos, las familias se clasificaron en un catálogo morfológico que incluía 15 categorías primarias y 48 categorías secundarias. Más de 3000 mutaciones se han identificado, algunas de las cuales representan nuevos alelos de fenotipos descritos anteriormente de la colección mutante monogénica del Centro de Recursos de Genética de Tomates (TGRC: <http://tgrc.ucdavis.edu>). Muchas mutaciones se clasifican en más de una sola categoría, y por lo tanto tienen efectos pleiotrópicos sobre el crecimiento vegetal. Los mutantes se pueden buscar y acceder a la red en el genoma de las solanáceas (SGN) en un sitio llamado "los genes que hacen tomates" (<http://zamir.sgn.cornell.edu/mutantes/>). Se han identificado numerosas mutaciones con colores alterados de frutos o flores (véase, por ejemplo, Galpaz, N. et al 2008. Plant J. 53: 717-730).

El mutante de tomate ZETA

[0059] La exploración de plantas mutagenizadas de metanosulfonato de etilo (EMS) de la biblioteca descrita anteriormente con colores alterados de frutos o flores revelaron una mutación recesiva en el tomate hasta ahora no caracterizada (*Solanum lycopersicum* cv M82), que se denominó ZETA. El fruto de ZETA que lleva plantas son de color amarillo-anaranjado en lugar del color rojo típico. La presente invención ahora da a conocer que en lugar del pigmento rojo licopeno, fruto de fitoeno acumulado ZETA, fitoflueno y 9,15,9'-tri-cis- ζ -caroteno. Fitoeno, fitoflueno y 9,15,9'-tri-cis- ζ -caroteno también se acumularon en cotiledones etiolados y flores de las plantas que llevan la mutación ZETA. La exposición de los cotiledones y otras licencias en desarrollo a la luz invierte el fenotipo a la normalidad. Las hojas jóvenes de ZETA son virescentes pero se vuelven verdes a medida que desarrollan. Sin desear estar ligado a ninguna teoría o mecanismo de acción específico, la actividad fotosintética puede estar implicada en la corrección de las lesiones en los cloroplastos.

[0060] La acumulación de fitoeno, fitoflueno y 9,15,9'-tri-cis-zeta-caroteno indican que en los organismos que llevan ZETA la biosíntesis de carotenoides se altera en el metabolismo de caroteno zeta hacia carotenoides aguas abajo en la ruta de biosíntesis de carotenoides. La presente invención muestra ahora que ZETA no es alélica a ZDS o CRTISO. Por lo tanto, esta mutación revela una nueva función (enzima) que es esencial para metabolismo ζ -caroteno en plantas y otros organismos que producen carotenoides. Al encontrarse que la mutación está involucrada en la isomerización de caroteno zeta, el gen fue designado Ziso.

[0061] La mutación ZETA en el M82 de tomate cultivar se mapeó genéticamente en el cromosoma 12 que solapa el segmento cromosómico *S. pennellii* en la línea de introgresión IL12-4. El mapeo genético fino hecho por la proyección de aproximadamente 3.000 plantas F2 de un cruce entre ZETA e IL12-4. Los resultados indicaron que el locus ZETA se mapea muy cerca (<0,8 cM) del marcador genético Atlg48300 (Figura 2).

[0062] Así, según un aspecto, la presente invención proporciona un organismo que produce carotenoides alterados genéticamente que comprende al menos uno, al menos, 70% de células que tiene una expresión reducida o actividad de proteína Ziso que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 70%, 75%, 80%, 85% o 95% homóloga a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3 en comparación con un organismo no alterado correspondiente que tiene la expresión no alterada de la proteína Ziso, en la que el organismo alterado genéticamente tiene un contenido elevado de al menos un carotenoide seleccionado de entre el grupo que consiste en fitoeno, fitoflueno, caroteno zeta y combinaciones de los mismos en comparación con el correspondiente organismo no alterado, seleccionándose dicho organismo modificado genéticamente del grupo que consiste en una planta, un alga y una cianobacteria.

[0063] El organismo genéticamente alterado comprende un contenido elevado de fitoeno en comparación con un organismo correspondiente no alterado, el contenido elevado de fitoflueno en comparación con un organismo no alterado correspondiente, o el contenido elevado de una combinación de fitoeno y fitoflueno en comparación con un organismo no alterado correspondiente.

[0064] Cualquier método conocido para una persona experta en el arte para la regulación negativa de la expresión

y/o actividad Ziso puede ser utilizado para producir el organismo genéticamente alterado de la presente invención. La inhibición de la expresión Ziso puede verse afectada en el nivel genómico y/o de transcripción. Alternativamente, la expresión puede ser inhibida en el nivel de proteína utilizando, por ejemplo, antagonistas, enzimas que escinden el polipéptido, y similares.

5 **[0065]** De acuerdo con ciertas realizaciones, el organismo alterado genéticamente comprende un gen mutado Ziso.

Mutagénesis

10 **[0066]** Las mutaciones se pueden introducir en el gen Ziso utilizando, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio (véase, por ejemplo Zhengm L. et al 2004 Nucleic Acid Res 10:32 (14): e115. Tal mutagénesis puede ser usada para introducir una inserción de aminoácidos deseada, delección o sustitución específica. Mutagénesis química usando un agente tal como sulfonato de metilo de etilo (EMS) se puede emplear para obtener una población de mutaciones puntuales y de pantalla para mutantes del gen Ziso que pueden convertirse en silencio o regularse hacia abajo. En 15 las plantas, los métodos de reinstalación en la introgresión de los genes de poblaciones naturales o mutados se pueden utilizar. Tipos cultivados y especies salvajes se cruzan repetidamente de manera que se aísla una planta que comprende un segmento dado del genoma salvaje o mutado. Ciertas especies de plantas, por ejemplo, maíz (maíz) o boca de dragón tienen transposones naturales. Estos transposones son autónomos, es decir, las transposas se encuentran dentro de la secuencia de transposón o no autónomos, sin transposas. Una persona 20 experta puede causar que transposones "salten" y creen mutaciones. Alternativamente, una secuencia de ácido nucleico se puede sintetizar con nucleótidos aleatorios en una o más posiciones predeterminadas para generar sustitución aleatoria de aminoácidos.

25 **[0067]** El gen mutado puede codificar una proteína Ziso no funcional. De acuerdo con ciertas realizaciones típicas, el gen mutado comprende la secuencia de ácidos nucleicos expuestos en la SEQ ID NO: 4 (Z^{0089} designado), que codifica una proteína Ziso funcional no tiene la SEQ ID NO: 5. De acuerdo con realizaciones típicas adicionales del gen mutado comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 6 (Z^{2803} designado) que codifica una proteína Ziso no funcional que tiene la SEQ ID NO: 7.

30 **[0068]** De acuerdo con realizaciones adicionales, el organismo genéticamente alterado es un organismo transgénico que comprende al menos una célula que comprende una molécula de silenciamiento Ziso seleccionada del grupo que consiste en molécula de interferencia de ARN, una molécula antisentido y una molécula de codificación de ribozima.

35 Moléculas de interferencia de ARN (ARNi)

[0069] ARNi se refiere a la introducción de ARN de doble hebra homólogo (ARNds) para llegar a un producto génico específico, lo que resulta en el silenciamiento post transcripcional de ese gen. Este fenómeno se informó por primera vez en *Caenorhabditis elegans* por Guo y Kemphues (1995. Cell, 81 (4): 611-620) y, posteriormente, Fire et al. 40 (1998. Nature 391: 806-811) descubrió que es la presencia de ARNds, formado a partir de la hibridación de cadenas de sentido y antisentido presentes en las preparaciones de ARN *in vitro*, que es responsable de producir la actividad de interferencia.

45 **[0070]** La presente invención contempla el uso de ARN de interferencia (ARNi) para regular hacia abajo la expresión de Ziso para aumentar el nivel de fitoeno, fitoflueno y ζ -caroteno en los organismos productores de carotenoides. En las plantas y los animales, ARNi está mediado por complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), una nucleasa de multicomponente de secuencia específica que destruye ARN mensajeros homólogos al gatillo de silenciamiento. Se sabe que RISC contiene ARN cortos (aproximadamente 22 nucleótidos) derivados del gatillo de 50 doble cadena de ARN. Las secuencias de ARN corto de nucleótidos son homólogas al gen diana que se está suprimiendo. Por lo tanto, las secuencias de nucleótidos cortos parecen servir como secuencias de guía para instruir a una nucleasa multicomponente, RISC, para destruir los ARNm específicos.

55 **[0071]** Los ARNds utilizados para iniciar ARNi, pueden aislarse de la fuente nativa o producidos por medios conocidos, por ejemplo, transcritos a partir de ADN. Los plásmidos y vectores para la generación de moléculas de ARNi contra secuencia diana son ahora fácilmente disponibles.

60 **[0072]** Los ARNds pueden ser transcritos a partir de los vectores como dos hebras separadas. Alternativamente, las dos hebras de ADN usadas para formar los ARNds pueden pertenecer al mismo o dos dúplex diferentes en los que cada uno de ellos forma con una cadena de ADN de una secuencia menos parcialmente complementaria. Cuando se produce de este modo los ARNds, la secuencia de ADN a transcribirse está flanqueada por dos promotores, uno que controla la transcripción de una de las hebras, y el otro el de la cadena complementaria. Estos dos promotores pueden ser iguales o diferentes. Alternativamente, un único promotor puede derivar la transcripción de polinucleótido de hebra única de la horquilla que tiene regiones con sentido y antisentido autocomplementarias que recocen para producir los ARNds. 65

[0073] La inhibición es específica de la secuencia en que las secuencias de nucleótidos correspondientes a la región

dúplex del ARN están dirigidas para la inhibición genética. Moléculas de ARN que contienen una secuencia de nucleótidos idéntica a una porción del gen diana son preferidas para la inhibición. Las secuencias de ARN con inserciones, deleciones y mutaciones puntuales individuales en relación con la secuencia diana también se han manifestado eficaces para la inhibición. Por lo tanto, la identidad de secuencia puede ser optimizada por la secuencia de comparación y algoritmos de alineación conocidos en la técnica (véase, por ejemplo Gribskov y Devereux, Sequence Analysis Primer, Stockton Press, 1991, y las referencias citadas en el mismo) y calculando la diferencia porcentual entre las secuencias de nucleótidos por, por ejemplo, el algoritmo de Smith-Waterman como se implementa en el programa de software BESTFIT usando parámetros por defecto (por ejemplo, University of Wisconsin Genetic Computing Group). Se prefiere la identidad de secuencia de más de 90%, o incluso una identidad de secuencia del 100%, entre el inhibidor ARN y la parte del gen diana. Alternativamente, la región dúplex del ARN puede ser definida funcionalmente como una secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridarse con una porción del transcrito del gen diana. La longitud de las secuencias de nucleótidos idénticas pueden ser al menos 20, 25, 50, 100, 200, 300 o 400 bases. No hay límite superior a la longitud del ARNs que se puede utilizar. Por ejemplo, los ARNs pueden variar de aproximadamente 21 pares de bases (pb) del gen a la longitud completa del gen o más.

[0074] De acuerdo con la molécula de ARN de doble cadena, que comprende un primer polinucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 90% de identidad de secuencia a una parte del gen Ziso y un segundo polinucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico complementario al primer ácido nucleico. De acuerdo con ciertas realizaciones, el gen Ziso es un gen de tomate que comprende la secuencia de polinucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 2. Según otras realizaciones, el gen Ziso es un ortólogo del gen de tomate.

Moléculas antisentido

[0075] La tecnología antisentido es el proceso en el que una molécula de ARN o ADN antisentido interactúa con una cadena de ADN o ARN de sentido diana. Una cadena de sentido es una molécula de ARNm o molécula de ADN 5' a 3'. La cadena complementaria, o cadena espejo, al sentido se llama un antisentido. Cuando una cadena antisentido interactúa con una cadena de ARNm sentido, la doble hélice se reconoce como extraña a la célula y se degrada, lo que resulta en la producción de proteína reducida o ausente. Aunque el ADN ya es una molécula de doble cadena, la tecnología antisentido puede ser aplicada a la misma, la construcción de una formación de triplex.

[0076] Hebras de ARN antisentido pueden ser catalíticas o no catalíticas. Las hebras catalíticas antisentido, también llamados ribozimas, escinden la molécula de ARN en secuencias específicas. Una hebra antisentido de ARN no catalítica bloquea procesamiento de ARN adicional.

[0077] Modulación antisentido de niveles de Ziso en células y tejidos pueden efectuarse mediante la transformación de las células del organismo o tejidos con al menos un compuesto antisentido, incluyendo ADN antisentido, ARN antisentido, una ribozima, ADNzima, un ácido nucleico bloqueado (LNA) y un aptámero. Las moléculas pueden ser alteradas químicamente. La molécula antisentido puede ser ADN antisentido o un análogo de ADN antisentido. De acuerdo con ciertas realizaciones, el gen Ziso es un gen de tomate que comprende la secuencia de polinucleótidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 1 y SEQ NO: 2. Según otras realizaciones, el gen Ziso es un ortólogo del gen de tomate.

Moléculas ADNzima

[0078] Otro agente capaz de la regulación negativa de la expresión de Ziso es una molécula ADNzima, que es capaz de escindir específicamente un transcrito de ARNm o una secuencia de ADN de la Ziso. ADNzimas son polinucleótidos de cadena simple que son capaces de escindir secuencias diana de cadena tanto única como doble. Se ha propuesto un modelo general (el modelo de "10-23") para la ADNzima. ADNzimas "10-23" tienen un dominio catalítico de 15 desoxirribonucleótidos, flanqueados por dos dominios de reconocimiento de sustrato de siete a nueve desoxirribonucleótidos cada uno. Este tipo de ADNzima puede escindir eficazmente su ARN sustrato en uniones purina:pirimidina (para una revisión de ADNzimas, véase: Khachigian, L.M. 2002. Curr Opin Mol Ther 4: 119-121).

[0079] Ejemplos de la construcción y la amplificación de ADNzimas sintéticas diseñadas que reconocen sitios de escisión diana de cadena única y doble, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.326.174.

Oligonucleótido enzimático

[0080] Los términos "molécula enzimática de ácido nucleico" o "oligonucleótido enzimático" se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene la complementariedad en una región de unión de sustrato a un objetivo gen especificado, y también tiene una actividad enzimática que es activa para escindir específicamente Ziso ARN, silenciando de este modo Ziso. Las regiones complementarias permiten la hibridación suficiente de la molécula de ácido nucleico enzimático con el ARN diana y posterior escisión. El término ácido nucleico enzimático se utiliza indistintamente con por ejemplo, ribozimas, ARN catalítico, ARN enzimático, ADN catalítico, aptacima o ribozima de unión a aptámero, oligonucleótido catalítico, nucleozima, ADNzima y ARNzima. Cualesquiera moléculas de ácido nucleico enzimático como se conoce en la técnica se pueden usar de acuerdo con las enseñanzas de la presente

invención, con tal de que tiene un sitio de unión a sustrato específico que es complementario a una o más de las regiones de ácido nucleico diana, y que tiene secuencias de nucleótidos dentro o alrededor de ese sitio de unión al sustrato que imparten una actividad de escisión de ácido nucleico y/o de ligación a la molécula. La patente de EE.UU. n° 4.987.071 da a conocer ejemplos de tales moléculas.

Organismos transgénicos

[0081] La clonación de un polinucleótido que codifica una molécula de silenciamiento *Ziso* puede realizarse por cualquier método tal como es conocido para una persona experta en la técnica. Diversas construcciones de ADN se pueden utilizar para expresar la molécula de silenciamiento de *Ziso* en un organismo deseado.

[0082] También se describe, pero no forma parte de la presente invención un vector de expresión que comprende todos los elementos necesarios para la expresión de la molécula de silenciamiento. La expresión de la molécula de silenciamiento puede ser controlada por un promotor constitutivo. El organismo puede ser una planta, y el promotor constitutivo puede ser específico al tejido. En consecuencia, el promotor específico se puede seleccionar del grupo que consiste de raíz promotor específico y promotor específico de fruta. Promotores específicos de raíz se describen, por ejemplo, en Martínez, E. et al. 2003. Curr. Biol. 13: 1435-1441. Promotores específicos de la fruta se describen entre otros en Estornell L.H. et al. 2009. Plant Biotechnol. J. 7: 298-309 y Fernández A.I. Et al. 2009 Plant Physiol. 151: 1729-1740.

[0083] El vector de expresión puede comprender además elementos reguladores en la secuencia no codificante 3'. Tal como se usa en este documento, "secuencias no codificantes 3'" se refieren a las secuencias de ADN localizadas aguas abajo de una secuencia codificadora e incluyen secuencias de reconocimiento de poliadenilación y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar el procesamiento del ARNm o la expresión génica. La señal de poliadenilación se caracteriza normalmente por afectar a la adición de tramos de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor de ARNm. El uso de diferentes secuencias no codificantes 3' es ejemplificado por Ingelbrecht I L et al. (1989. Plant Cell 1: 671-680).

[0084] Los expertos en la técnica apreciarán que los diversos componentes de las secuencias de ácidos nucleicos y los vectores de transformación descritos en la presente invención están ligados operativamente, con el fin de resultar en la expresión de dicho ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico. Las técnicas para unir operativamente los componentes de los constructos y vectores descritos en la presente invención son bien conocidos para los expertos en la técnica. Tales técnicas incluyen el uso de ligadores, tales como ligadores sintéticos, por ejemplo incluyendo uno o más sitios de enzimas de restricción.

[0085] Los métodos para transformar un organismo que produce carotenoides seleccionados del grupo que consiste en una planta, un alga y una cianobacteria son conocidos por los expertos en la técnica. Tal como se utiliza aquí, el término "transformación" o "transformar", describe un proceso por el cual un ADN extraño, tal como una construcción de ADN, incluyendo vector de expresión, entra y cambia una célula receptora en una célula transformada, genéticamente alterada o transgénica. La transformación puede ser estable, en la que la secuencia de ácido nucleico se integra en el genoma de organismo y como tal, representa un rasgo estable y heredado, o transitorio, en el que la secuencia de ácido nucleico se expresa por la célula transformada, pero no se integra en el genoma, y como tal, representa un rasgo transitorio. La secuencia de ácido nucleico utilizado en la presente invención puede de forma estable se transformarse en la célula de organismo.

[0086] Según un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para elevar el contenido de al menos uno de fitoeno, fitoflueno, caroteno zeta o combinaciones de los mismos en al menos una célula que contiene cromoplasto de un organismo, que comprende la inhibición de la expresión de la proteína *Ziso* que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 70%, 75%, 80%, 85% o 95% homóloga a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3 en al menos una célula, produciendo de ese modo un organismo que tiene una cantidad elevada de fitoeno, fitoflueno, caroteno zeta o combinaciones de los mismos en dicha al menos una célula en comparación con una célula que tiene expresión desinhibida de la proteína *Ziso*, en la que el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en una planta, un alga y una cianobacteria .

[0087] De acuerdo con ciertas realizaciones, la inhibición de la expresión *Ziso* comprende la introducción de una mutación en el gen que codifica *Ziso*, en el que los resultados de mutación en la expresión reducida del gen *Ziso* o en la producción de proteína *Ziso* no funcional. Cualquier método para introducir una mutación en el gen *Ziso* como se describe en este documento y como se conoce en la técnica se puede utilizar de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención.

[0088] De acuerdo con algunas formas de realización, la inhibición de la expresión *Ziso* comprende transformar al menos una célula del organismo con una molécula diseñada para silenciar la expresión del gen *Ziso*, exponiendo el gen la secuencia de ácido nucleico en cualquiera de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2. De acuerdo con ciertas realizaciones, se selecciona la molécula de silenciamiento del grupo que consiste de una molécula antisentido, una molécula de ARNi, un polinucleótido que codifica el ribozima y similares.

[0089] Los organismos alterados genéticamente que tienen un contenido elevado del carotenoide deseado de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención se seleccionan típicamente primero basado en la expresión del gen *Ziso* o proteína. Organismos que tienen la expresión aberrante de *Ziso* se analizan a continuación por el contenido de fitoeno, fitoflueno, zeta o combinaciones de los mismos.

[0090] La detección de *Ziso* mutado y/o la presencia de *Ziso* que silencia la molécula y/o la presencia de proteína *Ziso* no funcional se lleva a cabo empleando métodos estándar de genética molecular, conocidos para una persona de experiencia ordinaria en la técnica.

[0091] Para la medición del gen *Ziso* o silenciamiento de la expresión molécula, ADNc o ARNm se debe obtener de un órgano en el que se expresa el ácido nucleico. La muestra puede ser procesada adicionalmente antes de la etapa de detección. Por ejemplo, los polinucleótidos en la muestra de células o tejido pueden ser separados de otros componentes de la muestra, puede ser amplificados, etc. se consideran. Todas las muestras obtenidas de un organismo, incluyendo las sometidas a ningún tipo de procesamiento adicional para obtenerse a partir del organismo.

[0092] La detección del gen *Ziso* o la molécula de silenciamiento requiere típicamente la amplificación de los polinucleótidos tomados del organismo de candidato alterado. Los métodos para la amplificación de ADN son conocidos para una persona experta en la técnica. El método más comúnmente utilizado para la amplificación de ADN es la PCR (reacción en cadena de la polimerasa; véase, por ejemplo, PCR básico: de fondo a Bench, Springer Verlag, 2000; Eckert et al, 1991. PCR Methods and Applications 1:17.). Métodos de amplificación adecuados adicionales incluyen la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación de la transcripción y replicación de secuencia autosostenida y amplificación de ácido nucleico basada en la secuencia (NASBA).

[0093] La secuencia de ácido nucleico que comprende la molécula de silenciamiento *Ziso* puede comprender además una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable. El marcador seleccionable puede conferir resistencia a antibióticos o, en el caso de las plantas y algas, a herbicida; en estos casos los organismos transgénicos se seleccionan según su resistencia al antibiótico o herbicida.

[0094] El contenido total de carotenoides, así como de cada uno de fitoeno, fitoflueno y zeta-caroteno se mide por métodos estándar conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Schiedt K y Liaaen-Jensen S. 1995. Carotenoids: Isolation and analysis. In Carotenoids Volumen 1A: Isolation and Analysis, G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander, Eds (Basel: Birkhauser), pp 81-108).

[0095] De acuerdo con ciertas realizaciones, el organismo alterado genéticamente de la presente invención tiene un contenido de fitoeno de al menos 25% (en peso) del contenido total de carotenoides de la célula genéticamente alterada.

[0096] Según otras realizaciones, el organismo alterado genéticamente de la presente invención tiene un contenido de fitoflueno de al menos 15% (en peso) del contenido total de carotenoides. De acuerdo con realizaciones todavía adicionales, el organismo alterado genéticamente de la presente invención tiene un nivel combinado de fitoeno y fitoflueno de al menos 30% (en peso) del contenido total de carotenoides.

[0097] Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar más completamente algunas realizaciones de la invención. No deben, de ninguna manera interpretarse, sin embargo, como limitantes del amplio alcance de la invención.

EJEMPLOS

Materiales y Métodos

Aislamiento y análisis de ácido nucleico

Extracción de ADN de plantas

[0098] ADN genómico fue extraído de las hojas como se describe (Bernatzky R. y Tanksley S. 1986. Plant Mol Biol Reporter 4: 37-41). Para la secuenciación de alelos *ZETA*, el ADN genómico se preparó a partir 0,1-0,2 g de tejido de hoja por el reactivo DNAzol®ES de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, Ohio, EE.UU.).

Extracción de ARN de las plantas y la producción de ADNc

[0099] El ARN total se extrajo de 0,1 g de tejidos de las hojas o 1,0 g de tejido de la fruta mediante el uso de TRI-REAGENT de acuerdo con el protocolo del fabricante recomendado (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, Ohio, EE.UU.; adquirido de Sigma). La transcripción inversa del ARN total se llevó a cabo mediante el uso de oligo-dT como cebador y Transcriptasa Inversa de ARNasa⁺ SUPERSCRIPT™ II (GibcoBRL) o kit de Sistema de

Transcripción Inversa ImProm-II™ (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis de mutaciones

5 **[0100]** Para plantillas de ADNc se utilizó la polimerasa de ADN de Taq polimerasa DynaZyme™ II (recombinante, FinnZymes Oy, Espo, Finlandia). Para el ADN genómico también se utilizó polimerasa de Taq HotStarTaq® (Grupo QIAGEN). El uso estaba de acuerdo con el protocolo recomendado del fabricante.

10 **[0101]** Los siguientes pares de cebadores se utilizaron para amplificar la secuencia de ADNc de Ziso para cada uno de los alelos ZETA:

1) 5'-ACTTAGAGCT CACATAACCTTGTA-3' (Z1-delantero, SEQ ID NO: 9)).

2) 5'-TGTATGGAAACGAGTTATGTAACA-3' (Z1-inverso, SEQ ID NO: 10)

15 **[0102]** Los productos de PCR se secuenciaron y se resolvieron las diferencias de la secuencia de tipo salvaje.

Análisis de secuencia de ADN

20 **[0103]** La secuencia de ADN se determinó con el ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer) y se procesa con el software de análisis de secuencias ABI. Software Vector NTI Suit (InforMax, North Bethesda, MD EE.UU.) se utilizó para el análisis de secuencia.

Análisis de carotenoides

25 **[0104]** Para minimizar la degradación de los carotenoides y la isomerización, todas las manipulaciones se llevaron a cabo bajo luz muy tenue y, cuando sea posible, las muestras de carotenoides se mantuvieron en condiciones anaeróbicas, en hielo o a -20°C.

Extracción de carotenoides a partir de frutas

30 **[0105]** Los pigmentos de la fruta se extrajeron de 0,2-0,6 g de tejido fresco. El tejido se molió en 1 ml de acetona y se recogió y se filtró el disolvente. Los restos de tejido resto se molió de nuevo en 1 ml de diclorometano, el disolvente se filtró y se combinó con el filtrado de acetona. La molienda y la recogida de disolventes se repitieron hasta que el tejido perdió todo su color. Pigmentos se extrajeron mediante la partición de la mezcla de disolventes contra un volumen igual de éter dietílico y 0,2 volumen de 12% p/v de NaCl/H₂O. Se recogió fracción de éter coloreado (fase superior), se secó bajo una corriente de N₂ y el extracto de lípido seco se volvió a disolver en 70 µl de acetona para su posterior análisis.

Extracción de carotenoides de flores

40 **[0106]** Los pigmentos de la flor se extrajeron de pétalos o anteras de las flores individuales frescas. Los tejidos se molieron en 1 ml de acetona y se recogió y se filtró a la acetona. Este proceso se repitió hasta que todos los pigmentos se extrajeron del tejido. La acetona se secó bajo una corriente de N₂ y la fracción seca se disolvió en 450 µl de etanol. 50 µl 60% de KOH (p/v) se añadió y las muestras se incubaron durante 16 horas a 4°C durante la saponificación. Los carotenoides se extrajeron mediante la partición de las mezclas contra un volumen igual de éter dietílico y 0,2 volumen de 12% p/v de NaCl/H₂O. Se recogió la fase superior (éter), se secó bajo una corriente de N₂ y los carotenoides secos se disolvieron en acetona para su posterior análisis.

Extracción de carotenoides a partir de cotiledones

50 **[0107]** Pigmentos de las hojas se extrajeron de 30-100 mg de cotiledones frescos (de 5-12 plántulas) de plántulas crecidas oscuras o ligeras. Tejido fresco se desmenuzó en acetona y se filtró. El disolvente se secó bajo una corriente de nitrógeno y se disolvió en 70 µl de acetona para su posterior análisis por HPLC.

Análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

60 **[0108]** Los carotenoides se separaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando un sistema Waters que consiste en la bomba de Waters 600, detector de matriz de fotodiodos Waters 996 y Waters 717 más inyector automático (Waters, Milford, MA). Se utilizaron dos columnas de fase inversa ODS2C18: uno de Phenomenex (silice 5 µm, 3,2 mm X 250 mm) (Phenomenex®, Torrance, CA, EE.UU.) y uno de Waters (5 µm, 4,6 x250 mm) (Waters, Milford, MA). Ambas columnas se acoplaron a un sistema de cartucho protector SecurityGuard™ (Phenomenex®, Torrance, CA, EE.UU.).

65 **[0109]** En el sistema de HPLC 1, que se usó para fines preparativos, acetonitrilo se usó como eluyente a un caudal constante de 1,6 ml/min (con la columna de Waters).

[0110] El sistema de HPLC 2, el cual se utilizó para fines analíticos, se basó en un gradiente de disolventes. Usando acetonitrilo: agua (9: 1; A) y acetato de etilo (B), a un caudal constante de 1 ml/min o 1,6 ml/min para la columna Phenomenex o la columna de Waters, respectivamente. El gradiente era: 100% a 80% A durante 8 min; 80% a 65% A durante 4 min, seguido de 65% a 45% A durante 14 min y un segmento final a 100% B. Se registró el espectro en rango de longitud de onda de 250-600 nm de disolvente de elución de HPLC y se detectaron picos de absorción. Los carotenos se identificaron por sus espectros de absorción y retención de tiempo, y en algunos casos por comparación con las sustancias de referencia auténticas. Normas de licopeno *todo-trans*, caroteno β *todo-trans* y neurosporeno *todo-trans* se obtuvieron por extracción de carotenoides de células de *E. coli* que llevan plásmidos pACCRT-EIB (Cunningham, FX Jr. et al., 1993.. FEBS Lett 328: 130-138), pBCAR (Lotán, T. y Hirschberg, J. 1995. FEBS Lett 364: 125-128) y pAC-NEUR (Cunningham FX Jr. et al 1994. Plant Cell 6: 1107-1121). Una norma de *trans*- ζ -caroteno fue adquirida de CaroteNature GmbH (Lupsingen, Suiza). La cuantificación se realizó mediante la integración de las áreas de pico utilizando el software de cromatografía Millennium (Waters).

Cuantificación de carotenoides

[0111] El contenido total de carotenoides se determinó espectroscópicamente. Para tejidos verdes, la cuantificación se realizó de acuerdo con (Lichtenthaler, H.K. 1987. Methods Enzymol 148: 350-382). Los extractos de pigmentos se diluyeron 10 veces en acetona y se midió la absorbancia de las muestras a 661,6 nm, 644,8 nm y 470 nm. El contenido de clorofilas y carotenoides totales se calcula del siguiente modo:

$$\text{Chl}_b \text{ (}\mu\text{g/mL acetona)} = 11,24 \times A_{661,6} - 2,04 \times A_{644,8}$$

$$\text{Chl}_b \text{ (}\mu\text{g/mL acetona)} = 20,13 \times A_{644,8} - 4,19 \times A_{661,6}$$

$$\text{Carotenoide (}\mu\text{g/mL acetona)} = (1.000 \times A_{470} - 1,9 \times \text{Chl}_a - 63,14 \times \text{Chl}_b) / 214$$

[0112] Donde A_x representa la absorbancia de la muestra de 1 ml en una cubeta de 1 cm de longitud de vía en la longitud de onda dada (x).

[0113] Para los tejidos coloreados, la cuantificación de carotenoides siguió Schiedt y Liaaen-Jensen. (Schiedt K. and Liaaen-Jensen S. 1995. Carotenoids: Isolation and analysis. In Carotenoids Volume 1A: Isolation and Analysis, G. Britton, S. Liaaen-Jensen, and H. Pfander, Eds (Basel: Birkhauser), pp. 81-108.)

$$\text{Carotenoides (mg/mL)} = (A \times 1000) / (A_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100)$$

[0114] Donde A representa la absorbancia de la muestra de 1 ml en un 1 cm de longitud de vía cubeta a una longitud de onda específica (470 nm para xantofilas o *trans*-licopeno, y 440 nm para prolicopeno) y $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ es el coeficiente de absorción específica (2400, 3400 o 1920 para xantofilas, *trans*-licopeno o prolicopeno, respectivamente) que se define como la absorbancia teórica de una solución de concentración 1% en un 1 cm de longitud de vía cubeta.

[0115] El contenido del ζ -caroteno, fitoflueno y fitoeno se calculó de acuerdo con su proporción relativa a xantofilas, *trans*-licopeno o prolicopeno en el tejido.

Ejemplo 1: Caracterización de la mutación ZETA

[0116] La mutación ZETA en el tomate cultivar M82 se mapeó genéticamente en el cromosoma 12 que solapa el segmento cromosómico *S. pennellii* en la línea de introgresión IL12-4. Mapeo genético fino hecho por la proyección de aproximadamente plantas 3.000 F2 de un cruce entre ZETA e IL12-4. Los resultados indicaron que el locus ZETA se mapea muy cerca (<0,8 cm) al marcador genético Atlg48300 (Figura 2).

[0117] El gen que codifica ZETA, llamado *Ziso*, se clonó basándose en la homología con el gen Arabidopsis At1G10830, que había sido identificado por el Dr. Elli Wurtzel (CUNY, Lehman College, comunicación personal). Co-segregación completa del ortólogo de tomate de la secuencia At1G10830 y la mutación ZETA se estableció en la población F2 de un cruce ZETA x *S. Pimpinellifolium*.

[0118] La secuencia de ADN del gen de tomate de tipo silvestre *Ziso* comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 1 (Figura 3), y se transcribe a *Ziso* ADNc que tiene la secuencia de ácido nucleico expuesto en SEQ ID NO: 2 (Figura 4).

[0119] El gen *Ziso* en tomate codifica un polipéptido de 369 aminoácidos con un peso molecular calculado de 41,5 kDa. Una secuencia de péptido de tránsito de 80 aminoácidos para la orientación del plástido se predice por el programa ChloroP en el extremo amino. Se prevé que el tamaño del polipéptido maduro sea 32,4 kDa y contiene cinco hélices de *trans*-membrana. El análisis bioinformático reveló que *Ziso* se produce en todas las cianobacterias,

algas y plantas. Su función ha sido anotada como "desconocida", aunque existe un motivo relacionado en un gen bacteriano *Nrru*.

[0120] Análisis de secuencias de dos alelos *Zeta*: z^{0089} , que tiene la secuencia de ácidos nucleicos expuesta en la SEQ ID NO: 4 (Figura 5A); y z^{2083} , teniendo la secuencia de ácidos nucleicos expuesta en la SEQ ID NO: 6 (Figura 5B), reveló que cada alelo *Zeta* lleva una mutación sin sentido único. Las proteínas codificadas de los dos alelos no son funcionales, y tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7, respectivamente. La alineación de las secuencias de aminoácidos de polipéptidos *Ziso* de tipo salvaje, z^{2083} y z^{0089} se presenta en la Figura 5C.

[0121] La composición de carotenoides en frutas y flores de la planta de tomate que llevan la mutación *Zeta* (z^{2083}) en comparación con la composición de carotenoides de una planta de tomate de tipo salvaje (M82) se presenta en la Tabla 1 a continuación. La concentración de carotenoides se presenta en μg por gramo de peso fresco (FW). Los resultados muestran claramente que el contenido de fitoeno, fitoflueno y caroteno zeta es significativamente elevado en planta de tomate que lleva la mutación *ZETA* en comparación con una planta de tipo salvaje.

Tabla 1: Composición de carotenoides en frutas y flores de tipo salvaje y plantas de tomate *ZETA*

Carotenoides ($\mu\text{g}/\text{GFW}$)	Fruta		Flores	
	Tipo Wilt	<i>ZETA</i> (Z^{2083})	Tipo Wilt	<i>ZETA</i> (Z^{2083})
fitoeno	7,6	28,5	0,1	44,3
fitoflueno	3,9	16,5	No detectable	15,5
ζ -caroteno	0,7	38,0	No detectable	29,5
β -caroteno	3,2	4,1	<0,1	<0,1
Licopeno	81,2	10,1	<0,1	<0,1
Luteína	3,0	2,8	<0,1	<0,1
Violaxantina			30,5	5,7
Beoxantina			65,9	3,2

Ejemplo 2: Cultivo de líneas de tomate con alto fitoeno y fitoflueno

[0122] Para aumentar la concentración del fitoeno deseado y fitoflueno (P & P) en frutos de tomate, planta que lleva el mutante z^{0089} *ZETA*, se originó en el M82 cultivar, se cruzaron con varias líneas de cultivo. Las plantas en la generación F2 fueron cultivadas en el campo y se analizaron los carotenoides de frutas. La composición de carotenoides fue esencialmente similar a la *ZETA* original, a saber, que contenían altas concentraciones de fitoeno, fitoflueno y ζ -caroteno, y cantidades muy bajas de licopeno (0,5 a 6 por ciento del total de carotenoides) (Figura 6). La concentración media de fitoeno y fitoflueno (P & P) en las frutas en estas líneas era 70,8 $\mu\text{g}/\text{g}$ de peso fresco (FW), que corresponde a aprox. 76 por ciento de los carotenoides de frutas totales (Tabla 2). Las plantas que llevan la mutación *ZETA* se designan "Z"; líneas de cultivo están representadas por números.

Tabla 2: Concentraciones de carotenoides totales y ración de fitoeno más fitoflueno en frutos de seis líneas de cultivo F2 que llevan la mutación *ZETA*

	Zx64	Zx65	Zx66	Zx67	Zx68	Zx69	Zx69-2	ZX70
Los carotenoides totales ($\mu\text{g}/\text{GFW}$)	128 \pm 25	115 \pm 34	86 \pm 24	84 \pm 28	67 \pm 15	103 \pm 23	81 \pm 17	82 \pm 27
P & P (%)	78 \pm 4	76 \pm 3,2	69 \pm 5,6	78 \pm 4,3	76 \pm 15	77 \pm 1,3	79 \pm 2,7	74 \pm 5

Ejemplo 3: Producción de algas con el aumento de P&P y zeta-caroteno

[0123] Búsqueda bioinformática en bases de datos de secuencias reveló que los genomas de algas y cianobacterias (algas azul-verde) comprenden genes que son similares a *Ziso*. Por ejemplo, *Synechococcus elungatus* PCC7942 contiene un gen, *Synpcc7942_1979* anotado como "función desconocida", con la secuencia de nucleótidos de 55,8% de similitud con la del tomate *Ziso* ADNc (SEQ ID NO: 2). La secuencia de aminoácidos del producto génico *Synpcc7942_1979* (proteína AAG59994.1 ID, SEQ ID NO: 8) es 54% idéntica y el 65,5% similar a la secuencia de la proteína de tomate *Ziso* (SEQ ID NO: 3).

[0124] Hemos suprimido el gen *Synpcc7942_1979* en una cepa de tipo salvaje de *Synechococcus elungatus* PCC7942 por medio de mutagénesis de transposón (Holtman, C.K. et al 2005. DNA Res. 12: 103-115). La cepa mutada de *S. elungatus* PCC7942 se denominó Δ Ziso. Las células de este mutante crecieron lentamente en

condiciones de baja intensidad de luz de 5-10 fotones micromoles por metro cuadrado por segundo. Análisis de los carotenoides totales en el mutante reveló que acumuló tri-cis- ζ -caroteno a un nivel de 6,5%, que es >500 veces más alto que en el tipo salvaje (Tabla 3). Este resultado indica que *Synpcc7942_1979* es un ortólogo Ziso auténtico. Los resultados confirman además que, de manera similar a las plantas, las mutaciones en Ziso causan acumulación de ζ -caroteno en las algas. Algas con el gen Ziso mutado o silenciado de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención son por lo tanto fuente potencial para ζ -caroteno y posiblemente también fitoeno y fitoflueno.

Tabla 3: Composición de carotenoides (por ciento de carotenoides totales) en *Synechococcus elongatus* PCC7942 de tipo salvaje y cepas Δ Ziso

	β -caroteno	zeta-caroteno	zeaxantina	Otros
Tipo salvaje	57,5	<0,01	36,5	6
Δ ziso	32,5	6,5	54,9	6,1

LISTADO DE SECUENCIAS
[0125]

<110> YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM LTD.,

<120> ORGANISM WITH ALTERED CAROTENOID CONTENT AND METHOD OF PRODUCING SAME

<130> YISSUM/082 PCT

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8071

<212> DNA

<213> Solanum lycopersicum

<220>

<221> misc_feature

<222> (1752)..(1753)

<223> n e s a, c, g, o t

<400> 1

ES 2 625 658 T3

5	ccccaccgag caatctgtca agagagcaaa agcagagtta aaacgtgtac tggaggacat	60
	taccatgcaa gcatcatcac ttcctgggtc ggctcaacca ggcagatact cagttgtata	120
10	agaatgaaca ccgttgtcat tatgatgtta ctttttatct attatctttt ccgagcaaat	180
	tatttcctaa attttgttac tcaatttggga gatgacttac tttgtaatga tataaacagg	240
	tttaactaga tacatgattc tcagtgatca tcggccatgg ttagttcctc tcctatatta	300
15	tctcatacct gttatctgta ttacttgatt cctttactga tagtatcatc aaagctgcta	360
	tttgaattga aactgccaca gggagattac atagagttgc ccaggaagaa gcatggtatt	420
20	cagtcacccc gactaataatc ttgtaggaa agaaacctg tggtaaactt tgtaacacaa	480
	ttacttgaat ttctattta ctcatgttat agagtagcag aattgcttga attctatgca	540
	tgaggaatca tcatatgcac aaggttgatg acgattttca tgatggcatt gatccatata	600
25	cctaattgat cgtgagacga ctactagagc aaaggatat tgactagatt cagtgttgtc	660
	tttccatctt ctttgtggat ttggtagtaa atgaaaacag gtactgactt gactttttat	720
30	atcttctaaa tgttaaaaac tttaacaagt taaaatgtta aaccttctgc ttgtagattc	780
	tcaagcaaca ctaacaaaaa aaaaaaaaaa aaaggaaaga aaatgtgaaa tgcctttggc	840
	tctgtcttgt ccaatggatt ataagctttg gtttacttgc tataaagaga ctggaagcta	900
35	tctcaatgca tcgatacgtt gttttttggt aagagtacc actcctgaag actatataca	960
	tcttccccct acaggttagg cctgttgccg agaacgtggt aagaagttgt aaaagaaaa	1020
40	gcatgtactg ttcagagtca tctagtgtca tttggttagt tggttaaact gaatttcat	1080
	gctcaactcc cttgttttag attctactat ttatgtacta tttttctttg aggttgaacg	1140

45

50

55

60

65

70

75

80

ES 2 625 658 T3

gtatgtgtcg ttctgacttg ttctgctggt ctcatattca tatccaagca atggaagaga 1200
 5 atggtcacaa gaacaacctc ccaagttatg cttcacaaaa gccctgtga aaacaacctt 1260
 ccttttcaat ggtgtacatc ctagtgtata aatttgatgt taggtgtggt attattctct 1320
 10 tgctgtgaat ccaggtaaaa gtcattgtaa tttggtcagt cctcctctgc tggaaaagcc 1380
 ttgtgctttc aatgcttggg agaatataga atcaagtga tagtgtatct tttcgatcaa 1440
 tgttttgtgc ttgtaagttg aaaaaaaaaatg tacaatgagg ttttatattg tatccattta 1500
 15 tgggattgta cttactattc acaacttagt tgatttgact cgactttcaa atcacttgta 1560
 tcgtattcac gcggtttagt gattaatgaa atgaaaatag gttgataacg ataaatgta 1620
 gtattcacgc ggtttagtga ttaatgaaat gaaaataggt tgataacgat aaatgtagt 1680
 20 gacgaataat tctaaaattg ctggcataca gtatcaccca aacaaatgga tatttacgac 1740
 aatcaatatt tnnacttgat acaagtaaat ttttatcatt actttaaag tgtatatata 1800
 25 tatatatgat taggtaaaaca ttattttgcc gacccaaacc aagaaaaaac aataaaatta 1860
 gctacaagta gtgtatcatt tgcccacttt cctccactag ttatccaaaa tgcccaccaa 1920
 agagcacaac tcctttaaga tacctttttc cccttgcccta ataaacttgt tttggtcaca 1980
 30 gtttgtaaaa aaaaaaatta aatgtttttg aataataaca taaaaaatta ttttttgaa 2040
 aagatgaaaa aaataatttc cttttaaaaa tacttgcaac aaataagatt tctcaaaata 2100
 atttttttta tgtcgtgtaa tttgattttc cacctcggaa tcctcttttc tagttactct 2160
 35 accccaatt tttatttatt tgttgaaaa aactaagaac ttggccaaga caggtttata 2220
 tatttaccaa aactacacac ttagagctca cataatcttg taaaaatggc aacttcaatt 2280
 tttctctcac accctttttc tcatttalla tcaaacacc ataaaaltcc aagtcctaaa 2340
 40 caaacatag ccatagcata tcactccacc aacaaacca ccaccaagac tccattttta 2400
 ccattaccca cttctttttt tccatttccc tcaaacccea gaaaggaatt ttggccaatt 2460
 tcagtgggaa gaacacaaac agatgaaaaa gatgaaatct tgggtggtggg tgaagattct 2520
 45 gctgaatttg agttatccaa acaaaagatt tcactttggg tttattttgc tggggttctt 2580
 ggtgttgtgc tttatgttct taatgttggt tggattgaca attctactgg atttgaaaaa 2640
 tcattcattg attctgtttc tagtatttca gatagccctg aagtgagtat ttttgcttaa 2700
 ttactttttc tgttctgttt ttatttactt ttgctgaatt gagttttgag gtattgcttt 2760
 50 tgattatggt ctttacttgg taataatagt tgtataaatt gttagaacag taaaaaatg 2820
 atatcttttg tgaagggtat aacgcataaa tatgtccttt aacttggcat atctgtgcct 2880
 caaactttgg gcgtgcacac gttgatgctt aaacttgtat agagttaaaa catatgcatt 2940
 55 ctatgtgtat gtaataata gaagagaatt attactcact ttggtgttcc attattctat 3000

60

65

70

ES 2 625 658 T3

5 tttatgtttc ttaactttat tgtatagtga ttataaaatt tttgtagttt tctggaacgg 3060
 gacggagttc ccacttcttc ctagcacatt tgctctcctt gtagcacttc tgacaaagat 3120
 ttagttattt ttcatatgca tattttctta ttgtagtgtt ccagcacacc tttactattt 3180
 taccggtttt acttattttc tcttaccgat ataggtttta ggtaactcta tccactaagc 3240
 10 gttaggcaaa taggaagaga ttattaaacg cttctttggt tttggccgct gtcgggattt 3300
 aaaccttggc cttcattcta gtctaagtga acgctaactc acacccttgt gcgacatcac 3360
 ccaactgattg ttgtcttatg aatttgttta caatgaaata tggcttaaga cttttaagtt 3420
 15 ctgctatcta ggctttagca tataattgag ccgaggttct attgggaaca acctccctat 3480
 cctgcaaagg ttggggtaag gtgtgcatac atcgtaccct ctccagaatc cagaccctat 3540
 gttgttggtg tagattagca tataaattaa aggtggcaac atcagtcatc ccgggcctct 3600
 20 gtatattaaa aatcagggac tagtttaatc aatcagcact tggggattga gctttagtagga 3660
 tcaagctttt aagcgttacg gagatgagaa aaagatagat aaaatctttt atctgcaaac 3720
 tcccattcac aataattttg ttaattattt ttattgattt caatgttggt attttcttct 3780
 25 ttgtttggtt gtcacttggg gttagtcttg tgtagtact ttggttaatt caaacgaaat 3840
 tatggaattg gtttacgttc aagactttta caaggggaag cttttgtag catagtttta 3900
 tcaaagaact ctatgagata ccaactaata gtcaaacaag aaccaacgaa ggagggtcga 3960
 30 tttgaagttg ttaaccaaca aggttactta tgtttgggca actgtagaat aacattatgt 4020
 cttcgccttg caatgaagac tatatagcct tgataatgct cggaaagtat ttatttgttc 4080
 tggttcattc tgtcactctt cttggcttga taataggcaa gagatgcatt agattctcga 4140
 35 tgaatatgca agagatgcat tagattctcg atgaatcata ttggccaaca taaaattgtc 4200
 ttgatttctt tcctgttggt tctttctttg tacacttagt tatttcacgt ccacttttgc 4260
 catcttggtg accagcatac actatataaa ttttctattt cgcgtaccaa aatttctgct 4320
 40 ttctgagagt ttatccaat gtttctatgc agattgtaat gctttccctt accttgattt 4380
 tcgctatagt ccacagtggc cttgctagtc ttagagacia aggtgaggaa ctcatggag 4440
 agcgtgcttt tcgtgtattg tttgctgggg tatctctgcc attggcagtc agcacaattg 4500
 45 tgagttttct agtctgccat gcagaaacta agaattttgt ttattttttt gggtaacttt 4560
 tctgatttta cggtgcgatg cttgatagat ggaaatttaa cataacggaa ggttcttatg 4620
 50 atgatttaca ggtgtatttc attaaccacc gatacgatgg agtgcagtta tggcaattaa 4680
 acagtgttgc tgggattcac gaactagttt ggatttctaa ctttgtttcc ttcttcttcc 4740
 tatacccgtc gacattcaat ttactagagg tagcggctgt tgacaagccc aagatgcac 4800
 55 tttgggaaac tgggattatg aggattacca ggcattcaca ggtaaagtct caattatcac 4860
 ttaaagttaa cctaccgttg tagaagatac agtctgaatg attttataat gtgccttgtc 4920

60

65

ES 2 625 658 T3

ccgaaacacc aatgcgtacc ttactttca aatctctttc caaattaaat ttcaacgttt 4980
 5 gattcaaadc acttcgcttt gtacctcgta ttacatttta attccaggat atgacacttg 5040
 ggagggtagg atgtacgtac gctgacctta ctcctacctt tgtgggtag agaggttgtc 5100
 tccgatagac tctcagggtca aaagaagtgt aatcaaagca gataagatag gaagaaaaat 5160
 10 aatgacaaca aaatactgag atatacagag caaatgaggc aacagggtgtt agaaaaagtt 5220
 gaagaataag tactattaaa ggagaagatg agaagaggag actagcccc ttcctttccc 5280
 acataaaaga acgacgacac tcgggtatct cataccttc taccctaac tgaccatata 5340
 15 ccctcctacc taggattatg tcttcagcaa gctgaagatt agacccccgg ttcttctatt 5400
 ttccaggata tgacgcaagt actatgacag aggaggttta gagtcatgat ttctaatacat 5460
 tatttctgta gggttcagga attcttcttt tttaggtttt tcgtgtattt cagtcagata 5520
 20 ctcaaaatta taaatcactt ttgattctta gaaccaagaa gtggatttat cgggtcaatgg 5580
 ttttctctga aggagttgaa taaggcatgt cacaaagaat gatattctca gaaatgacgg 5640
 gcagaggttg atgcagaacg agtctgtaca tgaatgagg tgaaggttat tgtaatccca 5700
 25 gttctgctaa taatacataa aagggaaagaa acctaccaa ttgataaagc tgttccataa 5760
 ttgaggattt tagtaaagag aatcatctc aagtcctgaa aatcgagaaa ataagtgtct 5820
 ttgtgcatat atgttacacg acagtccagt attcttgctt ctatttgctg tctcatttct 5880
 30 tagtataagt tattccgtct ttgatagcta attgaagcct ccattcccta tattagctgg 5940
 tcgggcaggt tatatggtgc ttagctcaca cgctgtggat tgggaattca gttgcagtgg 6000
 cagcttcagt aggtttgata ggacatcatc tgtttggtgc ctggaatggg gaccggaggt 6060
 35 tagccatacg atatggtgag gcttttgaag tcgtgaagaa cagaacgagt atcattccat 6120
 ttgcagccat tcttgatggt cgtcaaaagt tgctgaaga ttattacaag gaatttatca 6180
 gattgccata tttatcgata acaacattga cattaggtgc ttacttcctc cacccatta 6240
 40 tgcaagctgc cagttatcgg ctacactggt agtagtactg atgttacata actcgtttcc 6300
 atacaagata tcgcgattac gagttgtata tttttcctca atatataatag gttactgatg 6360
 45 tctatttaac tactgttgga taacaaagaa agaaagaaga ggaatagaga gaattcagtt 6420
 taatgtgttt gaaagtaaag ttccaacttg tatttccctt caatttctat atagtgtata 6480
 tcatgacata tatgtccttg ttattccaat atatataat atatggtacc aaagtttctg 6540
 50 agtttgagtt atgttaatga attattattt tttataaaac gcgatttatc tctttagatg 6600
 aacctcatgg tgtaaatttt gtttatttca ttttagcggct tcaagtacca aataattaac 6660
 taacggcatt atgtctgaat aatgattca tcaaaataac gagttatcat taacattgag 6720
 55 acatttgaaa tcgccaataa cgtaaaagtt tctcaaattt gattcatcta atgaacttca 6780
 60
 65

ES 2 625 658 T3

	aatatcaagt aatttaaaaa atgatgcaaa tatcaataat tttatgggtca gacaaggcct	6840
5	acctaaaagg agcaagtcag cttggaccaa atccaaaaat gaaaaaaaa acagatTTTT	6900
	TTTTTTTTT ttataaatta aacactatTC cacttctggt gttgaggaat tatcaaataa	6960
	aagtacacca aattcTTTTg actTTTTTTTT actTTTTgtg ataatgaaga aatacatgtg	7020
10	gccaatttga atgatTTTT atatttaaat tcccttTgga tttactctTC ctcatgcaat	7080
	gtgattggaa gagtagggaa tgagtaggtt cacttaagaa tgctacactt aaaccaatct	7140
	gaataaattt ttcactcgat atttaatact aatcttaaag tcttattaaa tttaaattcg	7200
15	tatcgaaaaa tttcacatta aataataaga catttcccaa taagataact tcatgtccac	7260
	gattcgaact caaaatccta attattatcc acatacatat acttctagga acctTTTTaa	7320
	cgtggcatac atacatcact cacttaaaaa gaacatacaa gttatatgtc actataaata	7380
20	aattattaca taacgataac tatttcatca ttcttaarca gaaaaaatta tattcacgct	7440
	tttggtataa aatcggtttt gataagtaac gctttacccc taciaagtga aactgtatat	7500
	tgatcgaagt ccaaaataaa tatcgaaaaa taatacaacc gtgtataaaa ctatgtaaac	7560
25	ccccaccctt ccacatacac acaaacactt catgggggtg gaggatttgg ttagtgtgct	7620
	tttgTTTTta tttcataaaa attggactaa cattgggttg agttgcacag tttaaccaac	7680
	tatattatat ccactttatt aagtttctaa cccactccat catttttaat atttctaatt	7740
30	taatgccaca ttgccaccaa cctactttaa tattgggtat gtcttacatt ttctataact	7800
	aaaatcatac taactttcta ttttaagccaa ttgcttaaca catctcatta ttattattat	7860
	aactcttctt tctatttata taaatctttg tgattttatat gctattataa ttcactattg	7920
35	atttcatatt tcatatgcta attggaagaa atatgaagga aaaatcagta gagaaatttt	7980
	tcatgttgcc attctattta ggggtgtaatt ctgagtcaag tgttggagtg acaaaccaac	8040
	ttgtggaaac aaagaattca tcacaaataa c	8071
40	<p><210> 2 <211> 1599 <212> DNA <213> Solanum lycopersicum</p>	
45	<p><400> 2</p>	
50	tgaataataa cataaaaaat tattTTTTtg aaaagatgaa aaaaataatt tcTTTTtaa	60
	aatacttgca acaataaaaa tttctcaaaa taattTTTTt tatgtcgggt aatttgattt	120
55	tccacctcgg aatcctcttt tctagttact ctacccccaa tttttattta ttgttgaaa	180
	aaaactaaaa acttggccaa gacaggttta tatatttacc aaaactacac acttagagct	240
60	cacataacct tgtaaaaaatg gcaacttcaa tttttctctc acaccctttt tctcatttat	300
	tatcaaaaaca ccataaaatt ccaagtcccta aacaaacat agccatagca tatcactcca	360
65		
70		

ES 2 625 658 T3

5 ccaacaaacc caccaccaag actccatttt taccattacc cacttccttt tttccatttc 420
 cctcaaacc cagaaaggaa ttttggccaa tttcagtggg aagaacacaa acagatgaaa 480
 aagatgaaat cttggtggtg ggtgaagatt ctgctgaatt tgagttatcc aaacaaaaga 540
 10 tttcatcttg ggtttatfff gctggggttc ttgggtgtgt gctttatggt cttaatggtg 600
 tttggattga caattctact ggatttggaa aatcattcat tgattctggt tctagtatff 660
 15 cagatagccc tgaatttga atgctttccc ttacctgat tttcgctata gtccacagtg 720
 gtcttgctag tcttagagac aaaggtgagg aactcattgg agagcgtgct tttcgtgat 780
 20 tgtttgctgg ggtatctctg ccattggcag tcagcacaat tgtgtatttc attaaccacc 840
 gatacgatgg agtgcagtta tggcaattaa acagtgttg cgggattcac gaactagttt 900
 25 ggatttctaa ctttgtttcc ttcttctcc tatacccgtc gacattcaat ttactagagg 960
 tagcggctgt tgacaagccc aagatgcac tttgggaaac tgggattatg aggattacca 1020
 ggcattccaca gctggtcggg caggttatat ggtgcttagc tcacacgctg tggattggga 1080
 30 attcagttgc agtggcagct tcagtagggt tgataggaca tcatctggtt ggtgcctgga 1140
 atggggaccg gaggttagcc atacgatatg gtgaggcttt tgaagtcgtg aagaacagaa 1200
 35 cgagtatcat tccatttgca gccattcttg atggctgca aaagttgcct gaagattatt 1260
 acaaggaatt tatcagattg ccatatttat cgataacaac attgacatta ggtgcttact 1320
 40 tcctccacc cattatgcaa gctgccagtt atcggctaca ctggtagtag tactgatggt 1380
 acataactcg tttccataca agatatcgg attacagatt gtatattttt cctcaatata 1440
 45 tataggttac tgatgtctat ttaactactg ttggataaca aagaaagaaa gaagaggaat 1500
 agagagaatt cagtttaatg tgtttgaag taaagttcca acttgtatff cccttcaatt 1560
 tctatatagt gtatatcatg acatatatgt ccttgttat 1599

50 <210> 3
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> Solanum lycopersicum

55 <400> 3

60 Met Ala Thr Ser Ile Phe Leu Ser His Pro Phe Ser His Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Lys His His Lys Ile Pro Ser Pro Lys Gln Thr Ile Ala Ile Ala Tyr
 20 25 30
 65 His Ser Thr Asn Lys Pro Thr Thr Lys Thr Pro Phe Leu Pro Leu Pro
 35 40 45
 70 Thr Ser Phe Phe Pro Phe Pro Ser Asn Pro Arg Lys Glu Phe Trp Pro

ES 2 625 658 T3

5
 50 55 60

10 Ile Ser Val Gly Arg Thr Gln Thr Asp Glu Lys Asp Glu Ile Leu Val
 65 70 75 80

15 Val Gly Glu Asp Ser Ala Glu Phe Glu Leu Ser Lys Gln Lys Ile Ser
 85 90 95

20 Ser Trp Val Tyr Phe Ala Gly Val Leu Gly Val Val Leu Tyr Val Leu
 100 105 110

25 Asn Val Val Trp Ile Asp Asn Ser Thr Gly Phe Gly Lys Ser Phe Ile
 115 120 125

30 Asp Ser Val Ser Ser Ile Ser Asp Ser Pro Glu Ile Val Met Leu Ser
 130 135 140

35 Leu Thr Leu Ile Phe Ala Ile Val His Ser Gly Leu Ala Ser Leu Arg
 145 150 155 160

40 Asp Lys Gly Glu Glu Leu Ile Gly Glu Arg Ala Phe Arg Val Leu Phe
 165 170 175

45 Ala Gly Val Ser Leu Pro Leu Ala Val Ser Thr Ile Val Tyr Phe Ile
 180 185 190

50 Asn His Arg Tyr Asp Gly Val Gln Leu Trp Gln Leu Asn Ser Val Ala
 195 200 205

55 Gly Ile His Glu Leu Val Trp Ile Ser Asn Phe Val Ser Phe Phe Phe
 210 215 220

60 Leu Tyr Pro Ser Thr Phe Asn Leu Leu Glu Val Ala Ala Val Asp Lys
 225 230 235 240

65 Pro Lys Met His Leu Trp Glu Thr Gly Ile Met Arg Ile Thr Arg His
 245 250 255

70 Pro Gln Leu Val Gly Gln Val Ile Trp Cys Leu Ala His Thr Leu Trp
 260 265 270

75 Ile Gly Asn Ser Val Ala Val Ala Ala Ser Val Gly Leu Ile Gly His
 275 280 285

80 His Leu Phe Gly Ala Trp Asn Gly Asp Arg Arg Leu Ala Ile Arg Tyr
 290 295 300

ES 2 625 658 T3

5 Gly Glu Ala Phe Glu Val Val Lys Asn Arg Thr Ser Ile Ile Pro Phe
 305 310 315 320

10 Ala Ala Ile Leu Asp Gly Arg Gln Lys Leu Pro Glu Asp Tyr Tyr Lys
 325 330 335

15 Glu Phe Ile Arg Leu Pro Tyr Leu Ser Ile Thr Thr Leu Thr Leu Gly
 340 345 350

20 Ala Tyr Phe Leu His Pro Ile Met Gln Ala Ala Ser Tyr Arg Leu His
 355 360 365

Trp

20

<210> 4
 <211> 1599
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Tomato ZETA mutant

25

30

<400> 4

35 tgaataataa cataaaaaat tatttttttg aaaagatgaa aaaaataatt tccttttaaa 60
 aatacttgca acaataaaaa tttctcaaaa taattttttt tatgtcgggt aatttgattt 120
 40 tccacctcgg aatcctcttt tctagttact ctaccccaaa tttttattta tttgttgaaa 180
 aaaactaaaa acttgccaa gacaggttta tatatttacc aaaactacac acttagagct 240
 cacataacct tgtaaaaatg gcaacttcaa tttttctctc acaccctttt tctcatttat 300
 45 tatcaaaaca ccataaaatt ccaagtctta aacaaacat agccatagca tatcactcca 360
 ccaacaaacc caccaccaag actccatttt taccattacc cacttccttt tttccatttc 420
 50 cctcaaacc cagaaaggaa ttttgccaa tttcagtggg aagaacacaa acagatgaaa 480
 aagatgaaat cttggtggtg ggtgaagatt ctgctgaatt tgagtatcc aaacaaaaga 540
 tttcatcttg ggtttatttt gctggggttc ttggtgttgt gctttatggt cttaatgttg 600
 55 tttggattga caattctact ggatttgaa aatcattcat tgattctggt tctagtattt 660
 cagatagccc tgaaattgta atgctttccc ttaccttgat tttcgtata gtccacagtg 720
 60 gtcttgctag tcttagagac aaaggtagg aactcattgg agagcgtgct tttcgtgat 780
 tgtttgctgg ggtatctctg ccattggcag tcagcacaat tgtgtatttc attaaccacc 840
 65 gatacgatgg agtgcagtta tggcaattaa acagtgttgc tgggattcac gaactagttt 900
 ggatttctaa cttgtttcc tcttcttcc tataccctgc gacattcaat ttactagagg 960
 tagcggctgt tgacaagccc aagatgcac tttgggaaac tgggattatg aggattacca 1020

70

75

ES 2 625 658 T3

5 ggcattccaca gctggtcggg caggttatat ggtgcttagc tcacacgctg tggattggga 1080
 attcagttgc agtggcagct tcagtaggtt tgataggaca tcactctgttt ggtgcctaga 1140
 10 atggggaccg gaggttagcc atacgatatg gtgaggcttt tgaagtcgtg aagaacagaa 1200
 cgagtatcat tccatttgca gccattcttg atggtcgtca aaagttgcct gaagattatt 1260
 15 acaaggaatt tatcagattg ccatatztat cgataacaac attgacatta ggtgcttact 1320
 tcctccaccc cattatgcaa gctgccagtt atcggctaca ctggtagtag tactgatgtt 1380
 acataactcg tttccataca agatatcgcg attacgagtt gtatatTTTT cctcaatata 1440
 20 tataggttac tgatgtctat ttaactactg ttggataaca aagaaagaaa gaagaggaat 1500
 agagagaatt cagtttaatg tgtttgaaag taaagttcca acttgtattt ccttcaatt 1560
 25 tctatatagt gtatatcatg acatatatgt ccttgttat 1599

30 <210> 5
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 35 <223> Tomato ZETA mutant
 <400> 5

40 Met Ala Thr Ser Ile Phe Leu Ser His Pro Phe Ser His Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 45 Lys His His Lys Ile Pro Ser Pro Lys Gln Thr Ile Ala Ile Ala Tyr
 20 25 30
 50 His Ser Thr Asn Lys Pro Thr Thr Lys Thr Pro Phe Leu Pro Leu Pro
 35 40 45
 55 Thr Ser Phe Phe Pro Phe Pro Ser Asn Pro Arg Lys Glu Phe Trp Pro
 50 55 60
 60 Ile Ser Val Gly Arg Thr Gln Thr Asp Glu Lys Asp Glu Ile Leu Val
 65 70 75 80
 65 Val Gly Glu Asp Ser Ala Glu Phe Glu Leu Ser Lys Gln Lys Ile Ser
 85 90 95
 70 Ser Trp Val Tyr Phe Ala Gly Val Leu Gly Val Val Leu Tyr Val Leu
 100 105 110
 75 Asn Val Val Trp Ile Asp Asn Ser Thr Gly Phe Gly Lys Ser Phe Ile
 115 120 125

ES 2 625 658 T3

5 Asp Ser Val Ser Ser Ile Ser Asp Ser Pro Glu Ile Val Met Leu Ser
130 135 140

10 Leu Thr Leu Ile Phe Ala Ile Val His Ser Gly Leu Ala Ser Leu Arg
145 150 155 160

15 Asp Lys Gly Glu Glu Leu Ile Gly Glu Arg Ala Phe Arg Val Leu Phe
165 170 175

20 Ala Gly Val Ser Leu Pro Leu Ala Val Ser Thr Ile Val Tyr Phe Ile
180 185 190

25 Asn His Arg Tyr Asp Gly Val Gln Leu Trp Gln Leu Asn Ser Val Ala
195 200 205

30 Gly Ile His Glu Leu Val Trp Ile Ser Asn Phe Val Ser Phe Phe Phe
210 215 220

35 Leu Tyr Pro Ser Thr Phe Asn Leu Leu Glu Val Ala Ala Val Asp Lys
225 230 235 240

40 Pro Lys Met His Leu Trp Glu Thr Gly Ile Met Arg Ile Thr Arg His
245 250 255

45 Pro Gln Leu Val Gly Gln Val Ile Trp Cys Leu Ala His Thr Leu Trp
260 265 270

50 Ile Gly Asn Ser Val Ala Val Ala Ala Ser Val Gly Leu Ile Gly His
275 280 285

55 His Leu Phe Gly Ala
290

50 <210> 6
<211> 1599
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

55 <220>
<223> Tomato ZETA mutant

60 <400> 6

60 tgaataataa cataaaaaat ttttttttg aaaagatgaa aaaaataatt tccttttaaa 60
aatacttgca acaaataaaa tttctcaaaa taattttttt tatgtcgggt aatttgattt 120
tccacctcgg aatcctcttt tctagttact ctaccccaaa tttttattta tttgttgaaa 180
aaaactaaaa acttggccaa gacaggttta tatatttacc aaaactacac acttagagct 240
cacataacct tgtaaaaatg gcaacttcaa tttttctctc acaccctttt tctcatttat 300

ES 2 625 658 T3

5 tatcaaaaca ccataaaatt ccaagtccta aacaaacat agccatagca tatcactcca 360
 ccaacaaacc caccaccaag actccatttt taccattacc cacttccttt tttccatttc 420
 cctcaaacc cagaaaggaa ttttgccaa tttcagtgga aagaacacaa acagatgaaa 480
 10 aagatgaaat cttggtggtg ggtgaagatt ctgctgaatt tgagttatcc aaacaaaaga 540
 tttcatcttg ggtttatttt gctggggttc ttggtgttgt gctttatggt cttaatggtg 600
 tttggattga caattctact ggatttggaa aatcattcat tgattctggt tctagtattt 660
 15 cagatagccc tgaaattgta atgctttccc ttaccttgat tttcgtata gtccacagtg 720
 gtcttgctag tcttagagac aaaggtgagg aactcattgg agagcgtgct tttcgtgat 780
 tgtttgctgg ggtatctctg ccattggcag tcagcacaat tgtgtatttc attaaccacc 840
 gatac gatgg agtgcagtta tggcaattaa acagtgttgc tgggattcac gaactagttt 900
 20 ggatttctaa ctttgtttcc ttcttcttcc tatacccgtc gacattcaat ttactagagg 960
 tagcggctgt tgacaagccc aagatgcatc tttaggaaac tgggattatg aggattacca 1020
 ggcatccaca gctggtcggg caggttatat ggtgcttagc tcacacgctg tggattggga 1080
 25 attcagttgc agtggcagct tcagtagggt tgataggaca tcatctgttt ggtgcctaga 1140
 atggggaccg gaggttagcc atacgatatg gtgaggcttt tgaagtcgtg aagaacagaa 1200
 cgagtatcat tccatttgca gccattcttg atggctgca aaagttgcct gaagattatt 1260
 30 acaaggaatt tatcagattg ccatatttat cgataacaac attgacatta ggtgcttact 1320
 tcctccaccc cattatgcaa gctgccagtt atcggctaca ctggtagtag tactgatggt 1380
 acataactcg tttcataca agatatcgcg attacgagtt gtatattttt cctcaatata 1440
 35 tataggttac tgatgtctat ttaactactg ttggataaca aagaaagaaa gaagaggaat 1500
 agagagaatt cagtttaatg tgtttgaaag taaagttcca acttgatttt cccttcaatt 1560
 tctatatagt gtatatcatg acatatatgt ccttgttat 1599

40 <210> 7
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

45 <220>
 <223> Tomato ZETA mutant

50 <400> 7

55 Met Ala Thr Ser Ile Phe Leu Ser His Pro Phe Ser His Leu Leu Ser
 1 5 10 15

60 Lys His His Lys Ile Pro Ser Pro Lys Gln Thr Ile Ala Ile Ala Tyr
 20 25 30

ES 2 625 658 T3

5 His Ser Thr Asn Lys Pro Thr Thr Lys Thr Pro Phe Leu Pro Leu Pro
35 40 45

10 Thr Ser Phe Phe Pro Phe Pro Ser Asn Pro Arg Lys Glu Phe Trp Pro
50 55 60

15 Ile Ser Val Gly Arg Thr Gln Thr Asp Glu Lys Asp Glu Ile Leu Val
65 70 75 80

20 Val Gly Glu Asp Ser Ala Glu Phe Glu Leu Ser Lys Gln Lys Ile Ser
85 90 95

25 Ser Trp Val Tyr Phe Ala Gly Val Leu Gly Val Val Leu Tyr Val Leu
100 105 110

30 Asn Val Val Trp Ile Asp Asn Ser Thr Gly Phe Gly Lys Ser Phe Ile
115 120 125

35 Asp Ser Val Ser Ser Ile Ser Asp Ser Pro Glu Ile Val Met Leu Ser
130 135 140

40 Leu Thr Leu Ile Phe Ala Ile Val His Ser Gly Leu Ala Ser Leu Arg
145 150 155 160

45 Asp Lys Gly Glu Glu Leu Ile Gly Glu Arg Ala Phe Arg Val Leu Phe
165 170 175

50 Ala Gly Val Ser Leu Pro Leu Ala Val Ser Thr Ile Val Tyr Phe Ile
180 185 190

55 Asn His Arg Tyr Asp Gly Val Gln Leu Trp Gln Leu Asn Ser Val Ala
195 200 205

60 Gly Ile His Glu Leu Val Trp Ile Ser Asn Phe Val Ser Phe Phe Phe
210 215 220

65 Leu Tyr Pro Ser Thr Phe Asn Leu Leu Glu Val Ala Ala Val Asp Lys
225 230 235 240

70 Pro Lys Met His Leu
245

<210> 8
<211> 240
<212> PRT
<213> Synechococcus elungatus

<400> 8

65

ES 2 625 658 T3

5

Met Pro Leu Ser Trp Trp Thr Pro Ser His Thr Ile Met Leu Ala Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Phe Ala Ile Ala His Ser Gly Leu Ala Ala Leu Arg Pro
20 25 30

Trp Gly Glu Thr Lys Ile Gly Ala Arg Gly Tyr Arg Ile Leu Phe Ala
35 40 45

Leu Val Ser Leu Pro Leu Ala Val Val Thr Ile Ser Tyr Phe Ile Leu
50 55 60

His Arg Tyr Asp Gly Ala Leu Leu Trp Gln Leu Gln Gly Ile Pro Trp
65 70 75 80

Ile Ala Pro Leu Val Trp Val Leu Thr Ala Ile Ser Phe Leu Leu Leu
85 90 95

Tyr Pro Ala Thr Phe Asn Leu Leu Glu Ile Ala Ala Ile Ala Gln Pro
100 105 110

Gln Val Arg Leu Tyr Glu Thr Gly Ile Thr Arg Ile Thr Arg His Pro
115 120 125

Gln Thr Phe Gly Gln Ile Leu Trp Cys Leu Ala His Ser Leu Trp Leu
130 135 140

Gly Thr Ser Phe Met Met Val Ala Ser Ala Gly Leu Ile Ala His His
145 150 155 160

Leu Phe Ser Ile Trp His Gly Asp Arg Arg Leu Gln Lys Arg Tyr Gly
165 170 175

Glu Ala Phe Glu Ala Leu Lys Ser Arg Thr Ser Ile Ile Pro Phe Leu
180 185 190

Ala Ile Ala Gln Gly Lys Gln Thr Leu Val Trp Lys Glu Phe Leu Arg
195 200 205

Pro Ala Tyr Leu Gly Val Ala Ile Ala Ile Gly Leu Phe Trp Phe Ala
210 215 220

His Arg Trp Ile Pro Gln Ala Thr Ala Ala Leu Ala Glu Ile Gly Trp
225 230 235 240

75 <210> 9
<211> 24
<212> DNA

ES 2 625 658 T3

<213> Artificial sequence
<220>
<223> Primer
5
<400> 9
acttagagct cacataacct tgta 24
10 <210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
15 <220>
<223> Primer
<400> 10
20 tgtatggaaa cgagttatgt aaca 24
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Reivindicaciones

1. Un organismo que produce carotenoides alterado genéticamente que comprende al menos una célula que contiene cromoplasto que tiene expresión reducida de actividad de la proteína Ziso que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 70%, 75%, 80%, 85% o 95% homóloga a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 en comparación con un organismo no alterado correspondiente que tiene la expresión no alterada de la proteína Ziso, en el que el organismo alterado genéticamente tiene un contenido elevado de al menos un carotenoide seleccionado de entre el grupo que consiste en fitoeno, fitoflueno, caroteno zeta y combinaciones de los mismos en comparación con el organismo no alterado correspondiente, seleccionándose dicho organismo genéticamente modificado del grupo que consiste en una planta, un alga y una cianobacteria.
2. El organismo alterado genéticamente de la reivindicación 1,
 en donde la proteína Ziso está codificada por un polinucleótido que tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2; o
 en donde la proteína Ziso comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3; o
 dicho organismo tiene un contenido de fitoeno de al menos 25% (en peso) del contenido total de carotenoides de la célula genéticamente alterada; o
 dicho organismo tiene un contenido de fitoflueno de al menos 15% (en peso) del contenido total de carotenoides de las células alteradas genéticamente; o
 dicho organismo tiene un nivel combinado de fitoeno y fitoflueno de al menos 30% (en peso) del contenido total de carotenoides de la célula genéticamente alterada.
3. El organismo alterado genéticamente de la reivindicación 1, donde la proteína Ziso está codificado por un polinucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico al menos 70%, 75%, 80%, 85% o 95% homóloga a la secuencia de ácido nucleico expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.
4. El organismo alterado genéticamente de la reivindicación 3,
 en donde el polinucleótido que codifica la proteína Ziso comprende al menos una mutación que forma un polinucleótido mutado Ziso,
 preferiblemente
 en el que la al menos una mutación da como resultado la reducción de expresión de la proteína Ziso o en la producción de una proteína Ziso no funcional;
5. El organismo alterado genéticamente de la reivindicación 4, en el que el polinucleótido mutado Ziso comprende la secuencia de ácidos nucleicos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6, preferiblemente en el que el polinucleótido mutado Ziso codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7.
6. El organismo alterado genéticamente de la reivindicación 3, dicho organismo es un organismo transgénico que comprende al menos una célula que comprende una molécula capaz de silenciar el polinucleótido que codifica la proteína Ziso, preferiblemente
 en donde la célula que comprende la molécula capaz de silenciar el polinucleótido que codifica la proteína Ziso es un cromoplasto que contiene células.
7. El organismo transgénico de la reivindicación 6, en el que la molécula de silenciamiento se selecciona del grupo que consiste de molécula de interferencia ARN, una molécula antisentido y una molécula que codifica ribozima, preferiblemente
 en el que la molécula de silenciamiento comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico complementario a al menos 20 nucleótidos de una secuencia de ácidos nucleicos al menos 70%, 75%, 80%, 85% , 90% o 95% homóloga a SEQ ID NO: 2, más preferiblemente en el que la molécula de silenciamiento comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico complementario a al menos 20 nucleótidos de SEQ ID NO: 2; o
 donde la molécula de silenciamiento es una molécula de ARNi.
8. El organismo alterado genéticamente de la reivindicación 1,
 siendo dicho organismo una planta,
 siendo preferiblemente dicho organismo una planta de tomate o que tiene un contenido elevado de al menos uno de fitoeno, fitoflueno, caroteno zeta o combinaciones de los mismos en al menos uno de sus órganos,
 más preferiblemente en donde el órgano se selecciona del grupo que consiste en raíces, tubérculos, flores y fruta o en el que la fruta es un fruto carnoso.
9. Una semilla de la planta alterada genéticamente de la reivindicación 8, en la que una planta que crece de la semilla ha reducido la expresión de Ziso en al menos una célula que contiene cromoplasto en comparación con una

planta cultivada a partir de la semilla no alterada correspondiente, teniendo de ese modo un contenido elevado de al menos uno de fitoeno, fitoflueno, caroteno zeta o combinaciones de los mismos.

5 **10.** Una suspensión o tejido de células de cultivo aislado del organismo alterado genéticamente de la reivindicación 1, en el que las células o cultivo de tejidos comprenden un elevado contenido de al menos uno de fitoeno, fitoflueno, caroteno zeta o combinaciones de los mismos en al menos una célula que contiene cromoplasto.

10 **11.** Un método de elevar el contenido de al menos uno de fitoeno, fitoflueno, caroteno zeta o combinaciones de los mismos en al menos una célula que contiene cromoplasto de un organismo, que comprende la inhibición de la expresión de la proteína Ziso que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 70%, 75%, 80%, 85% o 95% homóloga a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3 en la al menos una célula, produciendo de ese modo un organismo que tiene una cantidad elevada de al menos uno de fitoeno, fitoflueno, caroteno zeta o combinaciones de los mismos en dicha al menos una célula en comparación con una célula que tiene expresión desinhibida de la proteína Ziso, en el que el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en una planta, un alga y una cianobacteria.

15 **12.** El método de la reivindicación 11,

20 en el que la inhibición de la expresión de la proteína Ziso comprende la introducción de una mutación en un polinucleótido que codifica dicha proteína Ziso, preferiblemente en el que los resultados de mutación en la expresión reducida del polinucleótido que codifica la proteína Ziso o en la producción de proteína Ziso no funcional; o

25 en el que el organismo tiene un contenido de fitoeno de al menos 25% (en peso) de carotenoides totales, o un contenido de fitoflueno de al menos 15% (en peso) del contenido total de carotenoides, o un nivel combinado de fitoeno y fitoflueno de al menos 30% (en peso) del contenido total de carotenoides.

30 **13.** El método de la reivindicación 11, en el que la inhibición de la expresión de la proteína Ziso comprende la transformación de al menos una célula del organismo con una molécula diseñada para silenciar la expresión de un polinucleótido que codifica dicha proteína Ziso, preferiblemente en el que el polinucleótido que codifica la proteína Ziso comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2; o donde la molécula de silenciamiento se selecciona del grupo que consiste en una molécula antisentido, una molécula de ARNi y un polinucleótido que codifica el ribozima.

35 **14.** El método de la reivindicación 11, en el que el polinucleótido que codifica la proteína Ziso comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 70%, 75%, 80%, 85% o 95% homóloga a SEQ ID NO: 2.

40 **15.** Una proteína Ziso no funcional que codifica polinucleótido aislado que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5, que preferiblemente tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 4, que preferiblemente tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO : 6; o que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7.

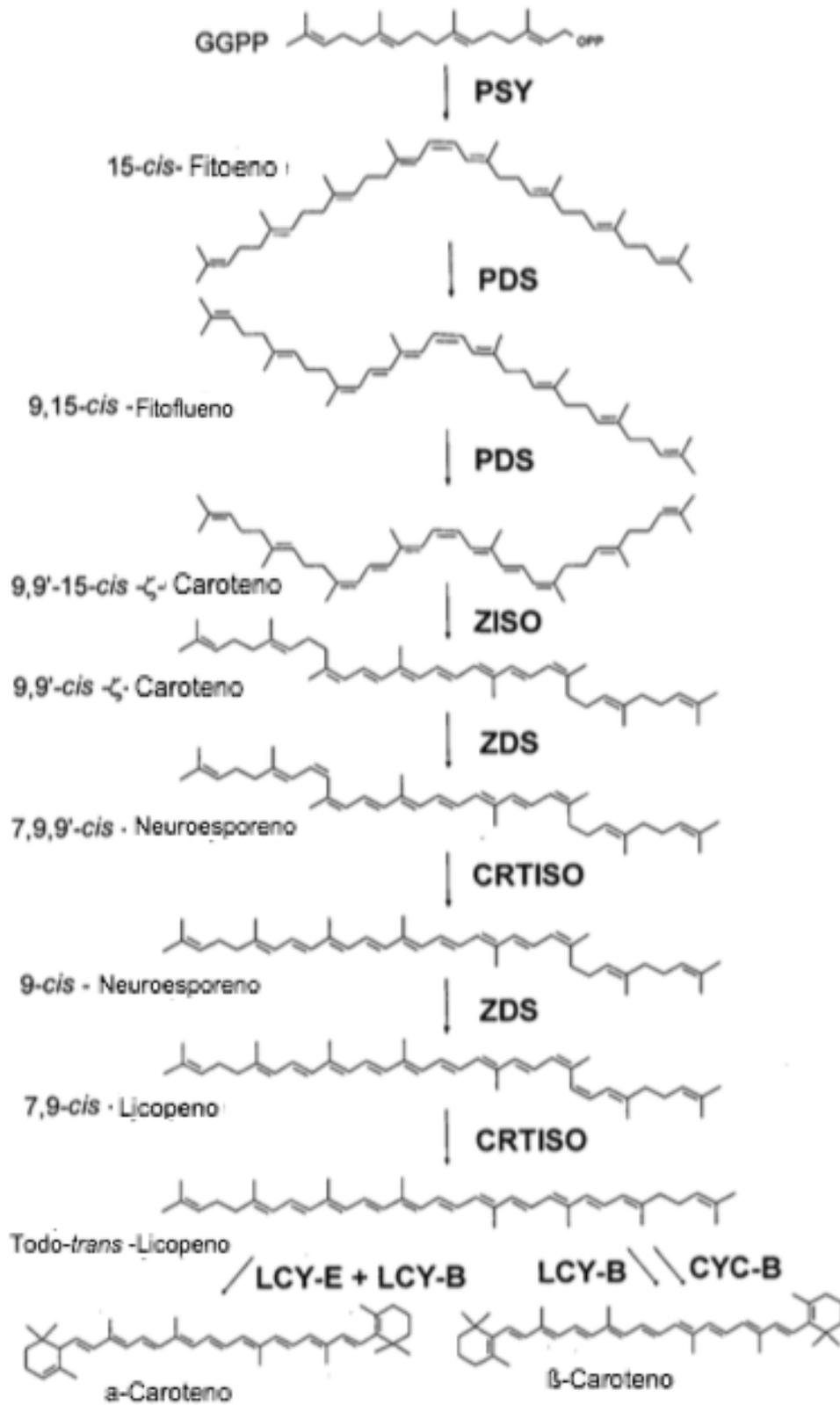


FIGURA 1

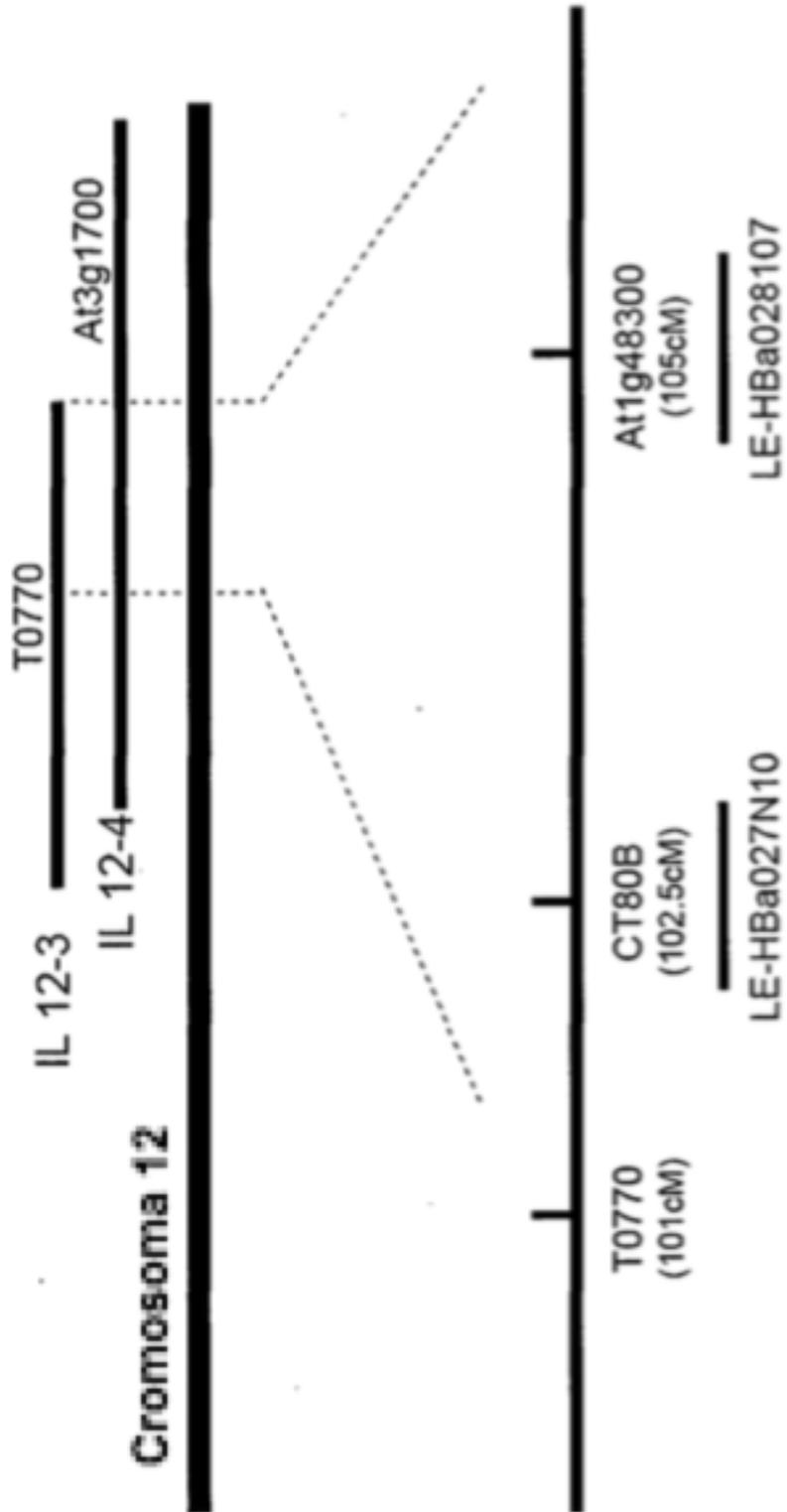


FIGURA 2

60 cccaccgg caatctgtca agagagcaaa agcagagtta aaacgtgtac tggaggacat
 120 taccatgcaa gcatcatcac ttcttggttc ggctcaacca ggcagatact cagttgtata
 180 agaatgaaca cggttgtcat tatgatgta cttttatct attatctttt ccgagcaaat
 240 tatttccctaa attttgttac tcaatttggga gatgacttac tttgtaatga tataaacagg
 300 ttaactaga tacatgattc tcagtgatca tcggccatgg ttagttccctc tccatatata
 360 tctcataacct gttatctgta ttacttggatt cctttactga tagtateatc aaagctgcta
 420 tttgaattga aactgccaca gggagattac atagagttgc ccaggaagaa gcatggtatt
 480 cagtcacccc gactaatatc ttgttaggaa agaaaccctg tggtaacttt tghtaacacaa
 540 ttacttgaat ttccatatta ctcatgttat agagtagcag aattgcttga atctatgca
 600 tgaggaatca tcatatgcac aaggttgatg acgattttca tgateggcatt gatccatata
 660 cctaattgat cgtgagacga ctactagagc aaaggtatat tgactagatt cagtgttgtc
 720 tttccatctt ctttgtggat ttggtagtaa atgaaaacag gtactgactt gactttttat
 780 atttctaaaa tgttaaaaaa tttacaagtt taaaaatgta aaccttctgc ttgtagattc
 840 tcaagcaaca ctaacaaaaa aaaaaaaa aaaggaaaga aaatgtgaaa tgcctttggc
 900 tctgtcttgt ccaatggatt ataagctttg gtttacttgc tataaagaga ctggaagcta
 960 tctcaatgca tcgatacgtt gttttttggt aagagtaacc actcctgaa actatataca
 1020 tcttcccctt acaggttagg cctgttgccg agaacgtggt aagaaagtgt aaaaaa
 1080 gcatgtactg ttcagagtca tctagtgtca tttggttagt tggttaaact gaatttacet
 1140 gctcaactcc cttgttttag attctactat ttatgtacta tttttctttg aggttgaacg
 1200 gtatgtgtcg ttttgacttg tctgtctgtt ctcatattca tatccaagca atggaagaga
 1260 atggtcacaa gaacaacctc ccaagttatg cttcacaaaa gccctgtga aacaacctt
 1320 ccttttcaat ggtgtacatc ctagtgtata aatttgatgt taggtgtgtt attatctctt
 1380 tgctgtgaat ccagggtaaaa gtcatgttaa ttgggtcagt cctcctctgc tggaaaagcc
 1440 ttgtgcttcc aatgcttgggt agaatataga atcaagtga tagtgtatct tttcgatcaa
 1500 tgttttgtgc ttgtaagtig aaaaaaaatg tacaatgag ttttatattg tatccattta
 1560 tgggattgta cttactatc acaacttagt tgatttgact cgactttcaa atcacttcta
 1620 tctgattcac gcggttttagt gattaatgaa atgaaaatag gttgataacg ataaatgta
 1680 gtattcacgc ggttttagtga ttaatgaaat gaaaataggt tgataacgat aaatgtagt
 1740 gacgaataat tctaaaaatg ctggcataca gtatcaccca acaaaatgga tatttacgac
 1800 aaatcaattt tnnacttgat acaagtaaat ttttatcatt acttbaaaag tgtatatata

FIGURA 3

tatatatgat taggtaaaaca ttattttggc gacccaaacc aagaaaaaac aataaaatta 1860
gctacaagta gtgtatcatt tgcccacttt cctccactag ttatccaaaa tgcccaccaa 1920
agagcacaac tcctttaaga tacctttttc ccttgcccta ataaacttgt tttgggtcaca 1980
gttgttaaaa aaaaaaatta aatgtttttg aataataaca taaaaaatta tttttttgaa 2040
aagatgaaaa aaataatttc cttttaaaaa tacttgcaac aaataagatt totcaaaaata 2100
atttttttta tgcgtgtaa tttgattttc cacctcggaa tcctcttttc tagttactct 2160
accccaatt tttatttatt tgtgaaaaa aactaagaac ttggccaaga caggtttata 2220
tatttaccaa aactacacac ttagagctca cataatcttg taaaaatggc aacttcaatt 2280
ttctctcac accctttttc tcatttatta tcaaacacc ataaaaattcc aagtcctaaa 2340
caaaccatag ccatagcata tcactccacc acaaaaccca ccaccaagac tccattttta 2400
ccattacca ctctcttttt tccatttccc tcaaaaccca gaaaggaatt ttggccaatt 2460
tcagtgaggaa gaacacaaa agatgaaaa gatgaaatct tgggtggtggg tgaagattct 2520
gctgaatttg agttatccaa acaaagatt tcatcttggg tttattttgc tggggttctt 2580
ggtgtgtgc tttatgttct taatgttgtt tggattgaca attctactgg atttggaaaa 2640
tcattcatg attctgttct tagtatttca gatagccctg aagtgagtat ttttgcttaa 2700
 ttactttttc tgttctgttt ttatttactt ttgctgaatt gagttttgag gtattgcttt 2760
 tgattatggt ctttaacttg taataatagt tgtataaatt gttagaacag taaaaaaatg 2820
 atatcttttg taaaagggtat aacgcataaa tatgtccttt aacttggcat atctgtgcct 2880
 caaacttttg gcgtgcacac gttgatgctt aaacttgtat agagttaaaa catatgcatt 2940
 ctatgtgtat gttataata gaagagaatt attactcact ttggtgttcc attattctat 3000
 tttatgtttc ttaactttat tgtatagtga ttataaaatt tttgtagttt tctggaacgg 3060
 gacggagttc ccaacttctc ctagcacatt tgctctcctt gtagcacttc tgacaaaagat 3120
 ttagttattt ttcatatgca tattttctta ttgtagtgtt ccagcacacc tttactattt 3180
 taccggtttt acttattttc tcttaccgat ataggtttta ggtaactcta tccactaagc 3240
 gttaggcaaa taggaagaga ttataaacg ctctctttgtt tttggccgct gtcgggattt 3300
 aaaccctggt ctctcattcta gtctaagtga acgctaactc acacccttgt ggcacatcac 3360

FIGURA 3 (CONT 1)

3420 ccactgattg ttgtcttiatg aatttgthta caatgaaata tggcttaaga cttttaagt
 3480 ctgctatcta ggctttagca tataattgag ccgaggttct attggaaca acctccctat
 3540 cctgcaaaagg ttgggtaag gtgtgcatac atcgtacctt ctcagaatc cagaccctat
 3600 gttgtgttg tagattagca tataaattaa aggtggcaac atcagtcac ccgggcctct
 3660 gtataattaa aatcagggac tagtttaac aatcagcact tggggattga gctttagga
 3720 tcaagctttt aagcgttacg gagatgagaa aaagatagat aaaatctttt atctgcaaac
 3780 tcccattcac aataaatttg ttaattattt ttattgattt caatgtttgtt attttcttct
 3840 ttgtttgttt gtcacttggg gttagtcttg ttagttact ttggttaatt caaacgaaat
 3900 tatggaattg gtttacgttc aagactttta caaggggaag cttttgttag catagtttta
 3960 tcaagaact ctatgagata ccaactaata gcaacaaga aaccaacgaa ggagggtcga
 4020 tttgaagtg ttaaccaaca aggttactta tgtttggca actgtagaat aacattatgt
 4080 cttgccttg caatgaagac tatatagcct tgataatgct cggaaagtat ttatttgttc
 4140 tggttcattc tgtcactctt cttggcttga taataggcaa gagatgcatt agattctcga
 4200 tgaatatgca agagatgcat tagattctcg atgaatcata ttggccaaca taaaattgtc
 4260 ttgatttctt tcctgttgtt tcttctttg tacacttagt tattcacgt ccaactttgc
 4320 catcttggtt accagcatac actatataaa tttttcattt cgcgtaccaa aatttctgct
 4380 ttctgagagt ttatccaaat gttctatgc agattgtaat gctttccctt accttgattt
 4440 tgcctatagt ccacagtggg cttgctagtc ttagagacaa aggtgaggaa ctcattggag
 4500 agcgtgcttt tcgtgtattg ttgctgggg tatctctgct attggcagtc agcacaattg
 4560 tgagttttct agtctgccat gcagaaacta agaattttgt ttattttttt gggtacttt
 4620 tctgatttta cggtcgatg cttagatagat gaaaatttaa cataacggaa ggttcttatg
 4680 atgatttaca gtgtatttc ataacacc gatacgatgg agtgcagbta tggcaattaa
 4740 acagtgttgc tgggattcac gaactagttt ggatttctaa ctttggttcc ttcttctcc
 4800 tataccgtc gacattcaat ttactagagg tagcggctgt tgacaagccc aagatgcac
 4860 tttgggaaac tgggattatg aggattacca ggcattccaca ggtaaatgct caattatcac
 4920 ttaaatgtaa cctaccgttg tagaagatac agtctgaatg atttataat gtgccttgc
 4980 ccgaaacacc aatgcgtacc ttactttca aatctcttc caaattaaat ttcaacgttt

FIGURA 3 (CONT 2)

5040 gattcaaatc acttcgcttt gtacctgta ttacatthta attccaggat atgacacttg
 5100 ggaggtagg atgtacgtac gctgacctta ctctacctt tgtggggtag agaggttgtc
 5160 tccgatagac tctcaggtca aaagaagtgt aatcaaagca gataagatag gaagaaaaat
 5220 aatgacaaca aaatactgag atatacagag caaatgaggc aacaggtgtt agaaaaagt
 5280 gaagaataag tactatataa ggagaagatg agaagaggag actagcccc ttcctttccc
 5340 acataaaaag acgacgacac tcgggtatct cataaccttc taccctaac tgaccatata
 5400 ccctcctacc taggattatg tcttcagcaa gctgaagatt agacccccgg tcttcttatt
 5460 ttccaggata tgacgcaagt actatgacag aggaggttta ggtcatgat ttctaatacat
 5520 tatttctgta gggttcagga atttctcttt tttagggtttt tcgtgtatth cagtcagata
 5580 ctcaaaaatta taaatcactt ttgattctta gaaccaagaa gtggattttat cggccaatgg
 5640 ttttctctga aggagttgaa taaggcatgt cacaaaagaat gatatctcaa gaaatgacgg
 5700 gcagaggttg atgcagaacg agtctgtaca tgaatgagg tgaaggttat tgtaatccca
 5760 gttctgctaa taatacataa aagggaagaa acctaccaaa ttgataaagc tgttccataa
 5820 ttgaggattt tagtaagag aaatcatctc aagtcctgaa aatcgagaaa ataatgtct
 5880 ttgtgcata atgttacacg acagtcaggt atttctgctt ctatttgctg tctcatttct
 5940 tagtataagt tattccgtct ttgatagcta attgaagcct ccattcccta tattagctgg
 6000 tgggacaggt tatatggtgc ttagctcaca cgctgtggat tgggaattca gttgcagttg
 6060 cagctcagt aggtttgata ggacatcacc tgtttggtgc ctggaatggg gaccggaggt
 6120 tagccatacg atatggtgag gcttttgaag tcgtgaagaa cagaacgagt atcattccat
 6180 ttgcagccat tcttgatggt cgtaaaaagt tgctgaaga ttattacaag gaatttatca
 6240 gattgccata ttatcagata acaacattga cattaggtgc ttacttctc cacccatta
 6300 tgcaagctgc cagttatcgg ctacactggt agtagtactg atgttacata actcgtttcc
 6360 atacaagata tcgagattac gagttgtata tttttccctca atatatatag gttactgatg
 6420 tctatttaac tactgtttgga taacaaagaa agaaagaaga ggaatagaga gaattcagtt
 6480 taatgtgttt gaaagtaaa ttccaacttg tatttccctt caatttctat atagtgata
 6540 tcatgacata tatgtccttg ttattccaat atataatat atatggtacc aaagtttccg
 6600 agtttgagtt atgttaatga attattattt ttataaaaac gcgatttata tcttttagatg

FIGURA 3 (CONT 3)

aacctcatgg tgtaaaat ttt gttatttca tttagcggct tcaagtaacca aataattaac 6660
 taacggcatt atgtctgaat aaatgattca tcaaaaataac gagttatcat taacattgag 6720
 acatttgaaa tcgccaataa cgtaaaagt tctcaaat tctcatctca atgaactca 6780
 aatatcaagt aatttaaaaa atgatgcaaa tatcaataat tttatggtca gacaaggcct 6840
 acctaaaaagg agcaagtcag ctggacc aaatccaaaaat gaaaaaaa acagattttt 6900
 tttttttttt ttataaatta aacactatc cacttctggt gttgaggaat tatcaaat 6960
 aagtaacca aattcttttg actttttttt actttttgtg ataatagaaga aatacatgtg 7020
 gccaatttga atgatat ttt atatttaaat tcccttttga tttactcttc ctcatgcaat 7080
 gtgattggaa gagtagggaa tgagtagggt cacttaagaa tgcatacatt aaaccaatct 7140
 gaataaat ttcactcgat atttaataact aatcttaag tcttattaaa tttaaattcg 7200
 ttcgaaaaa tttcacatta aataataaga cacttccaa taagataact tcatgtccac 7260
 gattcgaact caaatccta attattatcc acatacatat acttctagga acctttttaa 7320
 cgtggcatat atacatcact cacttaaaaa gaacatacaa gttatatgtc actataaata 7380
 aattattaca taocgataac tatttcatca tctttaatca gaaaaaatta tattcacgct 7440
 tttggataaa aatcggtttt gataagtaac gctttaccct tacaagtga aactgtatat 7500
 tgatcgaagt ccaaaaataaa taticgaaaa taatacaacc gtgtataaaa ctatgtaaac 7560
 cccaccctt cccatatac acaaacactt catgggggtg gaggatttgg ttagtgtgct 7620
 tttgttttta tttcataaaa attggactaa cattgggttg agttgcacag ttaaaccaac 7680
 tatattatat ccacttttatt aagtttctaa cccactccat cttttttaat atttctaatt 7740
 taatgccaca ttgccaccaa cctactttaa tattgggtat gtcttacatt tctataact 7800
 aaatcatat taacttctta tttaaagccaa ttgcttaaca catctcatca ttattattat 7860
 aactcttctt tctatttata taaatctttg tgattttatat gctattataa ttcactattg 7920
 atttcatatt tcatatgcta attggaagaa atatgaagga aaatcagta gagaaat ttt 7980
 tcatgttgcc attctattta ggggttaatt ctgagtcaag tgttgagtg acaaaccaac 8040
 ttgtggaac aaagaattca tcaaaaataa c 8071

FIGURA 3 (CONT 4)

1 TGAATAATAA CATAAAAAAT TATTTTTTTG AAAAGATGAA AAAATAAATT TCCTTTTAAA
 61 AATACCTGCA ACAAATAAAA TTTCTCAAAA TAATTTTTTT TATGTCGGGT AATTGATTT
 121 TCCACCTCGG AATCCTCTTT TCTAGTTACT TACACCCCAA TTTTATAATTA TTTGTTGAAA
 181 AAAACTAAAA ACTTGGCCAA GACAGGTTTA GACAGTTACC TATAATTACC AAAACTACAC ACTTAGAGCT
 241 CACATAACCT TGTAAAA**ATG** GCAACTTCAA GCAACTTACC TTTTCTCTC ACACCCTTTT TCTCATTTAT
 301 TATCAAAAAA CCATAAAAT CCAAAGTCCTA CCAAAACCAT AACATAAGCA TATCACTCCA
 361 CCAACAAACC CACCACCAAG ACTCCATTTT TACCATTACC CACTTCCCTT TTTCCATTT
 421 CCTCAAAACC CAGAAAGGAA TTTTGGCCAA TTTTCAGTGG AAGAACACAA ACAGATGAAA
 481 AAGATGAAAT CTTGGTGGTG GGTGAAGATT CTGCTGAATT TGAGTTATCC AAACAAAAGA
 541 TTTTCATCTTG GGTTTATTTT GCTGGGTTT TGGTGTGT TTTTATGTT CTTAATGTTG
 601 TTTGGATTGA CAATTTCTACT TGAATTTGTA ATGCTTTCCC GGATTTGGAA AATCATTCAAT
 661 CAGATAGCCC TGAATTTGTA TGAATTTGTA ATGCTTTCCC GGATTTGGAA AATCATTCAAT
 721 GTCTTGCTAG TCTTAGAGAC AAAGGTGAGG AAAGGTGAGG AAAGGTGAGG AAAGGTGAGG
 781 TGTITGCTGG GGTATCTCTG CCAATGGCAG CCAATGGCAG CCAATGGCAG CCAATGGCAG
 841 GATACGATGG AGTGCAGTTA TGGCAATTAA TGGCAATTAA TGGCAATTAA TGGCAATTAA
 901 GGATTTCTAA CTTTGTCTCC TTTCTCTTCC TTTCTCTTCC TTTCTCTTCC TTTCTCTTCC
 961 TAGCGGCTGT TGACAAGCCC TGACAAGCCC TGACAAGCCC TGACAAGCCC TGACAAGCCC
 1021 GGATCCACA GCTGGTCGGG CAGGTTATAT CAGGTTATAT CAGGTTATAT CAGGTTATAT
 1081 ATTCAGTTGC AGTGGCAGCT TCAGTAGGTT TCAGTAGGTT TCAGTAGGTT TCAGTAGGTT
 1141 ATGGGGACCG GAGGTTAGCC ATACGATATG ATACGATATG ATACGATATG ATACGATATG
 1201 CGAGTATCAT TCCATTGCA GCCATTCTTG GCCATTCTTG GCCATTCTTG GCCATTCTTG
 1261 ACAAGGAATT TATCAGATTG CCATATTTAT CCATATTTAT CCATATTTAT CCATATTTAT
 1321 TCCTCCACCC CATTATGCAA GCTGCCAGTT GCTGCCAGTT GCTGCCAGTT GCTGCCAGTT
 1381 ACATAACTCG TTTCCATACA AGATATCGCG AGATATCGCG AGATATCGCG AGATATCGCG
 1441 TATAGGTTAC TGATGCTAT TTAACACTG TTAACACTG TTAACACTG TTAACACTG
 1501 AGAGAGAATT CAGTTTAAATG TGTTTGAAAG TGTTTGAAAG TGTTTGAAAG TGTTTGAAAG
 1561 TCTATATAGT GTATATCATG ACAATATATGT ACAATATATGT ACAATATATGT ACAATATATGT

FIGURA 5A

1	TGAATAATAA	CATAAAAAAT	TATTTTTTTG	AAAAGATGAA	AAAAATAAAT	TCCTTTTTAA
61	AATACTTGCA	ACAAATAAAA	TTTTCTCAAAA	TAATTTTTTT	TATGTCGGGT	AATTTGATTT
121	TCCACCTCGG	AATCCTCTTT	TCTAGTTACT	CTACCCCCAA	TTTTTTATTTA	TTTTGTTGAAA
181	AAAACATAAAA	ACTTGCCCAA	GACAGGTTTA	TATATTTACC	AAAACATCAC	ACTTAGAGCT
241	CACATAACCT	TGTA AAA ATG	GCAACTTCAA	TTTTTCTCTC	ACACCCTTTT	TCTCATTTAT
301	TATCAAAACA	CCATAAAAT	CCAAGTCCTA	AACAAACCAT	AGCCATAGCA	TATCACTCCA
361	CCAAACAACC	CACCACCAAG	ACTCCATTTT	TACCATTACC	CAC TTCCTTT	TTTCCATTTT
421	CCTCAAACCC	CAGAAAGGAA	TTTTGGCCAA	TTTCAGTGGG	AAGAACAACAA	ACAGATGAAA
481	AAGATGAAAT	CTTGGTGGTG	GGTGAAGATT	CTGCTGAAAT	TGAGTTATCC	AAACAAAAGA
541	TTTCATCTTG	GGTTTATTTT	GCTGGGGTTC	TTGGTGTGT	GCTTTATGTT	CTTAATGTTG
601	TTTGGATTGA	CAATCTACT	GGATTTGGAA	AATCATTCAT	TGATTCGTGT	TCTAGTATTT
661	CAGATAGCCC	TGAAATTGTA	ATGCTTTCCC	TTACCTTGAT	TTTCGCATA	GTCCACAGTG
721	GTCTTGCTAG	TCTTAGAGAC	AAAGGTGAGG	AACTCATTTG	AGAGCGTGCT	TTTCGTGTAT
781	TGTTTGCTGG	GGTATCTCTG	CCATTTGCCAG	TCAGCACAAAT	TGTGTATTTT	ATTAACCACC
841	GATACGATGG	AGTGCAGTTA	TGGCAATTAA	ACAGTGTTC	TGGGATTCAC	GAACTAGTTT
901	GGATTTCTAA	CTTTGTTTCC	TTCTTCTTCC	TATACCCGTC	GACATTC AAT	TTACTAGAGG
961	TAGCGGCTGT	TGACAAGCCC	AAGATGCATC	TT TAG GAAAC	TGGGATTAG	AGGATTACCA
1021	GGCATCCACA	GCTGGTCGGG	CAGGTTATAT	GGTGTTAGC	TCACACGCTG	TGGATTGGGA
1081	ATTCAGTTGC	AGTGGCAGCT	TCAGTAGGTT	TGATAGGACA	TCATCTGTTT	GGTGCCTAGA
1141	ATGGGGACCG	GAGGTTAGCC	ATACGATATG	GTGAGGCTTT	TGAAGTCGTG	AAGAACAGAA
1201	CGAGTATCAT	TCCATTTGCA	GCCATTTCTTG	ATGGTCTGTA	AAAGTTGCCT	GAAGATTTAT
1261	ACAAGGAATT	TATCAGATTG	CCATATTTAT	CGATAACAAC	ATTGACATTA	GGTGCCTACT
1321	TCCCTCACCC	CATTATGCAA	GCTGCCAGTT	ATCGGCTACA	CTGGTAGTAG	TACTGATGTT
1381	ACATAACTCG	TTTCCATACA	AGATATCGCG	ATTACGAGTT	GTATATTTTT	CCTCAATATA
1441	TATAGGTTAC	TGATGTCTAT	TTAACTACTG	TTGGATAACA	AAGAAAAGAAA	GAAAGAGGAAT
1501	AGAGAGAATT	CAGTTTAAATG	TGTTTGAAAG	TAAAGTTCCA	ACTTGTATTT	CCCTTCAATT
1561	TCTATATAGT	GTATATCATG	ACATATATGT	CCTTGTTTAT		

FIGURA 5B

1 75
 Ziso M82 MATSIFLSHPFSHLLSKHHKIPSPKQTIAYHSTNKPTTKTPELPLPTSFPPSPNPRKEFWPISVGRQTQDEK
 ZISO 89 MATSIFLSHPFSHLLSKHHKIPSPKQTIAYHSTNKPTTKTPELPLPTSFPPSPNPRKEFWPISVGRQTQDEK
 Ziso2083 MATSIFLSHPFSHLLSKHHKIPSPKQTIAYHSTNKPTTKTPELPLPTSFPPSPNPRKEFWPISVGRQTQDEK

76
 Ziso M82 DEILVVGEDSAEFELSKQKISSWVYFAGVLGVVLYVLNVVWIDNSTGFGKSFIDSVSSISDSPEIVMLSLTLIFA
 ZISO 89 DEILVVGEDSAEFELSKQKISSWVYFAGVLGVVLYVLNVVWIDNSTGFGKSFIDSVSSISDSPEIVMLSLTLIFA
 Ziso2083 DEILVVGEDSAEFELSKQKISSWVYFAGVLGVVLYVLNVVWIDNSTGFGKSFIDSVSSISDSPEIVMLSLTLIFA

151 225
 Ziso M82 IVHSGLASLRDKGEELIGERAFRVLFAVSTIVYFINHRYDGVQLWQLNSVAGIHELWISNFVSFFFL
 ZISO 89 IVHSGLASLRDKGEELIGERAFRVLFAVSTIVYFINHRYDGVQLWQLNSVAGIHELWISNFVSFFFL
 Ziso2083 IVHSGLASLRDKGEELIGERAFRVLFAVSTIVYFINHRYDGVQLWQLNSVAGIHELWISNFVSFFFL

300
 Ziso M82 YPSTFNLLLEVAADVDPKMHMLWETGIMRITRHPQLVGQVIWCLAHTLWIGNSVAVAASVGLIGHHLFGAWNNGDRRL
 ZISO 89 YPSTFNLLLEVAADVDPKMHMLWETGIMRITRHPQLVGQVIWCLAHTLWIGNSVAVAASVGLIGHHLFGA★
 Ziso2083 YPSTFNLLLEVAADVDPKMHML★

301 369
 Ziso M82 AIRYGEAFEVVKNRTSIIPFAAILDGRQKLPEDYKEFIRLPYLSITTLTLLGAYFLHPIMQAAASYRLHW

FIGURA 5C

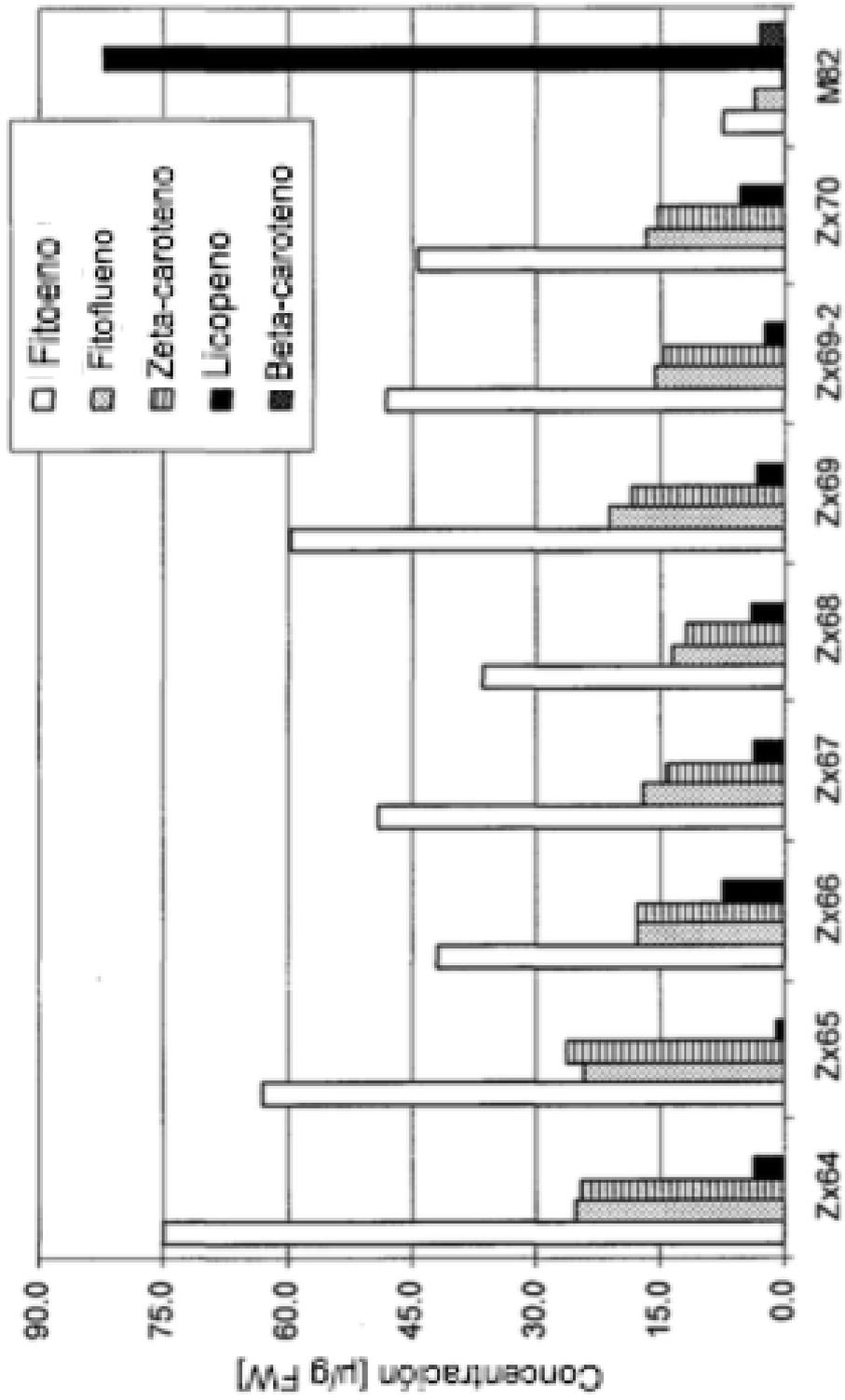


FIGURA 6

```

-----
Ziso 7942 (1)
Ziso M82 f (1) MATSIFLSPFSLKHHKIPSPKQTIAYHSTNKPTTKTFFLPPTSEFFFPSPNPRK
-----
Ziso 7942 (1)
Ziso M82 f (61) EFWPISVGRQTDEKDEILVVGEDSAEFFELSKQKISSWVYFAGVLGVLYLVNVVWIDNS
-----
Ziso 7942 (1)
Ziso M82 f (121) -----MPLS WWT PSH T M L A I L L F A I A H S G L A L R P W G E T K I G A R G Y R I L F A L V S
T G F G K S E I D S V S S I S D S P E I V M L S L I L I F A I V H S G L A S L R D K G E E L I G E R A E R V L F A G V S
-----
Ziso 7942 (52) L P L A V V T I S Y F I L H R Y D G A L L W Q L Q G H P W I A P L V W V L T A T S E L L L Y P A T F N L L E T A A L A Q
Ziso M82 f (181) L P L A V S T I V Y F I N H R Y D G V Q L W Q L N S M A G I H E L V W I S N F V S F F L Y P S T F N L L E V A A V D K
-----
Ziso 7942 (112) P Q V R L Y E T G I T R I T R H P Q T F G Q P L W C L A H S L W L G T S F M V V A S A G L I A H H L F S I W H G D R R L
Ziso M82 f (241) P K M H L W E T G I M R I T R H P Q L V G O V L W C L A H L W L I G N S V A V A S V G L I G H H L F G A W N G D R R L
-----
Ziso 7942 (172) Q K R Y G E A F E A L K S R T S I I P F L A I A Q K Q T L V W K E L R P A Y L G V A I A I G L F W F A E R W I P Q A
Ziso M82 f (301) A I R Y G E A F E V K N R T S I I P F A I L D G R O K L P E D Y Y K E F I R L P Y L S I T T L T L G A Y F L H P I M
-----
Ziso 7942 (232) T A A L A E I G W
Ziso M82 f (361) Q A A S Y R L H W

```

FIGURA 7