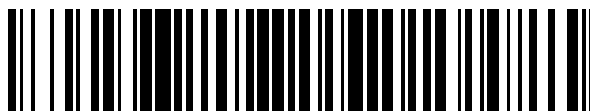


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 259**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/60 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2011 PCT/IL2011/000535**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2012 WO12004795**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2011 E 11741693 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2591112**

54 Título: **Plantas transgénicas que tienen alterada la actividad de la sintetasa DAHP**

30 Prioridad:

06.07.2010 US 361549 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.12.2017

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.
(100.0%)**

**At the Weizmann Institute of Science P.O. Box 95
76100 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

**GALILI, GAD;
AHARONI, ASAPH;
TZIN, VERED;
MALITSKY, SERGEY y
ROGACHEV, ILANA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 648 259 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).

Plantas transgénicas que tienen alterada la actividad de la sintetasa DAHP**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere a plantas transgénicas y métodos para alterar la actividad de la sintasa de 3-Desoxi-D-Arabino-Heptulose 7-Fosfato (DAHPS) en plantas que llevan a una mayor producción de fenilalanina.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] La vía de shikimate, presente en muchos organismos, incluyendo plantas, enlaza el metabolismo de hidratos de carbono para la biosíntesis de compuestos aromáticos. En una secuencia de varios pasos metabólicos, el carbono primario se convierte a través de shikimate en corismato (parte superior de la Fig. 1). Corismato luego sirve como un precursor para la síntesis de los tres aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano (parte inferior de la Fig. 1). En las plantas, los productos de la propia vía del shikimate, así como los aminoácidos aromáticos producidos aguas abajo, están involucrados en la producción de múltiples metabolitos secundarios, como alcaloides, flavonoides, lignina, cumarinas, derivados de indol y otros compuestos fenólicos. Por lo tanto, la vía Shikimate sirve como un puente entre el metabolismo primario y secundario.

[0003] La primera enzima comprometida de la vía de shikimate es sintasa de 3-Desoxi-D-Arabino-Heptulose 7-Fosfato (DAHPS), que convierte fosfoenolpiruvato (PEP) y Eritrosa 4-Fosfato (E-4P) en 3-Desoxi-D-Arabino-Heptulose 7-Fosfato (DAHPS) (Fig. 1). *Escherichia (E.) coli* tiene tres diferentes isoenzimas DAHPS codificadas por los genes *AroF*, *ARO*G y *ARO*H, que codifican proteínas que son retroalimentación inhibida por los aminoácidos aromáticos individuales tirosina (Tyr) fenilalanina (Fe) y triptófano (Trp), respectivamente (Brown, K. Genetics, 1968. 60 (1): 31 - 48). La principal isoforma DAHPS Fe-sensible, lo que hace que hasta el 80% de la actividad total *E. coli* DAHPS, es una proteína homo-tetramérica codificada por el gen *AroG* (Hu, C. et al., J Basic Microbiol, 2003. 43 (5): páginas 399 - 406; Wallace, B. y J. Pittard, J Bacteriol, 1967. 93: 237 - 244). También se ha sugerido que el N-terminal, así como las regiones interiores de este *ARO*G codificado con DAHPS están involucradas en su inhibición por retroalimentación por fenilalanina (Hu et al 2003, *supra*; Xu, J. et al, J Basic Microbiol., 2004. 44 (5): 400 - 406; Ger, Y. et al., J Biochem, 1994. 116 (5): 986 - 990). Las mutaciones que sustituyen a un número de aminoácidos en el *ARO*G codificados con DAHPS, incluyendo prolina en la posición 150 a leucina, leucina en la posición 175 a glutamina, leucina en la posición 179 en ácido aspártico y fenilalanina en la posición 209 a alanina, significativamente reducidos en la medida de la inhibición de retroalimentación de 1 mM de fenilalanina mientras que muestra propiedades cinéticas similares a las de tipo salvaje (Xu et al. 2004, *supra*). Estas mutaciones también se asociaron con la sobreproducción significativa de la fenilalanina en las células bacterianas (Hu et al. 2003, *supra*).

[0004] Patente Europea N° 1270721 da a conocer secuencias de ADN recombinante por retroalimentación que codifican enzimas liberadas por inhibición, en particular un gen *ARO*G mutado de codificación de sintasa de 3-Desoxi-D-ácido arabinohexulónico-7-fosfato, en el que el residuo de prolina 150 está sustituido por un residuo de leucina, plásmidos que contienen estas secuencias de ADN recombinante, microorganismos transformados con estos plásmidos y un proceso para preparar L-triptófano, L-fenilalanina y L-tirosina por fermentación.

[0005] En contraste con *E. coli*, y muchas otras especies bacterianas, la regulación alostérica de la planta DAHPS es todavía cuestionable. (Gilchrist, D. y T. Kosuge, In: B.N. Mifflin, ed, the Biochemistry of Plants, Academic Press, Nueva York, 1980. 5: 507-531; Herrmann, K.M. y L.M. Weaver, Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1999. 50: 473 - 503). Se ha descrito que las actividades *in vitro* de DAHPS de diferentes especies de plantas pueden ser débilmente inhibidas por Trp y Tyr o débilmente activadas por cualquiera de Trp o Tyr. Además, la actividad del frijol (*Vigna radiata*) DAHPS está débilmente inhibida por prefenato y arogenato, los precursores de la biosíntesis de Fe y Tyr. Todavía se desconoce, sin embargo, si esta retroalimentación se debe a la inhibición de la expresión de la enzima o la inhibición de su actividad.

[0006] Plantas de *Arabidopsis* poseen dos genes de DAHPS, *DHS1* (At4G39980) y *DHS2* (At4G33510) además de un gen putativo (*At1g22410*) con alta similitud con *DHS1*. La expresión de *DHS1* en *Arabidopsis* es inducida por heridas físicas o por la infiltración con cepas patógenas *Pseudomonas syringae* (Keith, B. et al, Proc Natl Acad Sci EE.UU., 1991. 88 (19): 8821 a 8825). La presencia de extensiones amino-terminales características de péptidos de tránsito del cloroplasto en las proteínas de *Arabidopsis* codificadas por *DHS1* y *DHS2* apoya la noción de que ambas proteínas se localizan en el cloroplasto. El tomate (*Solanum esculentum*) también contiene dos DHAPS distintos que codifican los genes que contienen los péptidos de tránsito de plastidio y se expresan diferencialmente (Gorlach, J. et al, Plant Mol Biol, 1993. 23 (4): 707-16). Sin embargo, a pesar de la información disponible sobre la expresión y actividad de DAHPS en plantas, aún se desconoce si esta enzima sirve como un regulador principal del flujo a través de la vía Shikimate y por lo tanto si DAHPS es una enzima reguladora clave que une el metabolismo primario y secundario.

[0007] La patente de EE.UU. N° 5.906.925 da a conocer métodos para incrementar el rendimiento de 3-Desoxi-D-Arabino-Heptulose 7-fosfato (DAHPS) en los microorganismos a través de alteraciones genéticas, particularmente

por la sobreexpresión de sintasa de piruvato de fosfenol.

[0008] La patente de EE.UU. Nº 6.911.331 da a conocer fragmento de ácido nucleico aislado que codifica una sintetasa DAHP. La patente también describe la construcción de un gen quimérico que codifica todo o una parte de la sintetasa de DAHP, en orientación sentido o antisentido, en donde la expresión del gen quimérico da como resultado la producción de niveles alterados de la sintetasa de DAHP en una célula hospedadora transformada, que incluye células vegetales.

[0009] La patente de EE.UU. Nº 5.776.736 da a conocer las enzimas de sintasa 3-deshidroquinato, quinasa de siquimato, sintasa de 5-enolpiruvato-shikimato-3-fosfato y sintasa de corismato como enzimas limitantes de la velocidad en la ruta común de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en procariotas. La transformación de células procarióticas con secuencias exógenas de ADN que codifican estas enzimas dio como resultado un aumento significativo en la producción del producto final.

[0010] La patente de EE.UU. Nº 7.790.431 da a conocer enzimas y rutas enzimáticas para la síntesis basada en piruvato de shikimato o al menos un intermedio del mismo o derivado del mismo. La Patente también describe ácidos nucleicos que codifican las enzimas, células transformadas con los mismos, y kits que contienen dichas enzimas, células o ácido nucleico. Una aldolasa KDPGal se usa para realizar la condensación de piruvato con D-eritrosa 4-Fosfato para formar 3-Desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHP); se usa una sintasa de 3-deshidroquinato para convertir el DAHP en 3-deshidroquinato (DHQ); deshidratasa DHQ puede convertir el DHQ en el intermediario clave del shikimato, 3-dehidroshikimato.

[0011] US 2007/118916 da a conocer la expresión de genes de sintetasa DAHP bacterianos o del gen de sintetasa de levadura DAHP en plastidios o las mitocondrias de una planta para la producción de productos químicos finos tales como triptófano, fenilalanina, valina, leucina, isoleucina, ácido esteárico, vitamina E, triglicéridos, lípidos, aceites o similares. Se informa que la expresión de b0754 bacteriano da como resultado niveles aumentados de fenilalanina en un 28 a 122%.

[0012] Publicación de Solicitud Internacional (PCT) Nº WO2009/072118 da a conocer que la transformación de células vegetales con polinucleótido que codifica mutasa de corismato de retroalimentación insensible y prefenato deshidrata resultados en contenido alterado de materias de al menos uno de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano. Sin embargo, estas enzimas se encuentran aguas abajo de la vía Shikimato, y por lo tanto la cantidad de corismato disponible es un "cuello de botella" que dicta los niveles máximos de ácidos aromáticos que pueden producirse.

[0013] Por lo tanto, medios para la modulación de la vía de shikimato en las plantas hacia la producción de mayores tasas de aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano es altamente deseada, ya que estos aminoácidos son componentes esenciales de la síntesis de proteínas y también sirven como precursores para una amplia gama de metabolitos secundarios que son importantes para el crecimiento de las plantas, así como para la nutrición y la salud humana.

RESUMEN

[0014] La presente invención da a conocer que la atenuación de la inhibición por retroalimentación de sintasa de 3-Desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-Fosfato (DHAPS), la primera enzima de la vía de shikimato en las plantas, desencadena la acumulación de los productos directos de la vía Shikimato y del aminoácido aromático fenilalanina. Los niveles de triptófano y tirosina también se incrementan, aunque en menor medida en comparación con el nivel de fenilalanina.

[0015] La presente invención se basa en parte en el descubrimiento inesperado de que la expresión en una célula vegetal del gen *AROG* mutante *E. coli*, que codifica DAHPS habiendo reducido la sensibilidad a la inhibición por retroalimentación por fenilalanina (también denominado aquí como "DAHPS insensible a retroalimentación"), resultó en la sobreproducción de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptófano y tirosina. Sin desear estar sujeto a ninguna teoría o mecanismo de acción específico, el aumento observado en los contenidos de aminoácidos aromáticos puede atribuirse a la sobreproducción de shikimato y/o corismato, que liberan el "cuello de botella" en la producción de metabolitos secundarios derivados de corismato, así como de fenilalanina, triptófano y tirosina. Una ventaja de las enseñanzas de la presente invención se basa en la regulación de una de las primeras enzimas que limitan la velocidad en la ruta de Shikimato, de manera que se incrementa la cantidad de metabolitos precursores. Tener cantidades elevadas de los metabolitos precursores permite la producción de metabolitos secundarios en cantidades elevadas.

[0016] Así, según un aspecto, la presente invención proporciona una planta transgénica que comprende al menos una célula vegetal que comprende un polinucleótido exógeno que codifica sintasa de 3-Desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHPS) que tiene al menos mutación de un punto en una posición seleccionada del grupo que consiste de posición 150, 175, 179 y 209 de *E. coli* tipo salvaje *AROG* DAHPS que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1, donde al menos una mutación puntual reduce la sensibilidad a inhibición

de retroalimentación por fenilalanina, y en la que la planta transgénica comprende una cantidad incrementada de dicha fenilalanina en comparación con una planta no transgénica correspondiente.

[0017] De acuerdo con aspectos adicionales, la presente invención proporciona una semilla de planta producida por la planta transgénica, un cultivo de tejido que comprende al menos una célula transgénica de la planta transgénica, y un método para inducir la síntesis de fenilalanina en una planta.

[0018] Aspectos adicionales y realizaciones específicas de la presente invención se describen en las reivindicaciones pendientes.

[0019] Los inventores de la presente invención han descrito previamente que una parte significativa de la síntesis de los productos de fenilalanina en una célula vegetal ocurren dentro de los plástidos celulares. Por tanto, los polinucleótidos que codifican la AROG DAHPS insensible a la retroalimentación como se describe en la presente memoria pueden comprender además una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito de plastidio. Por consiguiente, el polinucleótido que codifica el péptido de tránsito de plastidio puede comprender una secuencia de ácido nucleico como se expone en SEQ ID NO: 6. Típicamente, los polinucleótidos se diseñan de modo que el péptido de tránsito de plastidio codificado se fusione en el extremo amino del polipéptido codificado.

[0020] Los polinucleótidos descritos en este documento pueden incorporarse en un constructo de ADN que permite su expresión en la célula vegetal. La 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 poliadenilación y similares.

[0021] La construcción de ADN también puede comprender un promotor. El promotor puede ser un promotor constitutivo, inducido o específico de tejido como se conoce en la técnica. El promotor puede ser un promotor constitutivo operable en una célula vegetal. La construcción de ADN puede comprender además señales de terminación de transcripción y secuencia de poliadenilación.

[0022] Opcionalmente, el constructo de ADN comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador de detección que permite una detección conveniente de los polipéptidos recombinantes expresados por la célula vegetal. La construcción de ADN puede comprender además una secuencia de ácido nucleico que codifica tres repeticiones de etiqueta de epítipo de hemaglutinina (HA). Este epítipo permite la detección del polipéptido recombinante usando anticuerpos producidos contra la etiqueta del epítipo de HA, teniendo dicha etiqueta la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 7. La construcción de ADN puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que contiene el péptido de tránsito de plastidio de rbcS3, L175Q AroG DAHPS y tres repeticiones de la etiqueta de epítipo de HA, teniendo dicho polipéptido la SEQ ID N°: 8. La construcción de ADN puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que contiene el péptido de tránsito de plastidio de guisante rbcS3, F209A AroG DAHPS y tres repeticiones de la etiqueta de epítipo de HA, teniendo dicho polipéptido la SEQ ID N°: 9.

[0023] Los polinucleótidos descritos en este documento y/o los constructos de ADN que comprenden el mismo pueden incorporarse en un vector de transformación de plantas.

[0024] La presente invención también abarca semillas de plantas de la planta transgénica, en las que las plantas cultivadas a partir de dichas semillas comprenden al menos una célula que tiene una cantidad aumentada de la fenilalanina en comparación con las plantas cultivadas a partir de semillas de la correspondiente planta no transgénica. También se describen frutos, hojas o cualquier parte de la planta transgénica, así como cultivos de tejidos derivados de los mismos y plantas regeneradas a partir de los mismos.

[0025] De acuerdo con otro aspecto más, la presente invención proporciona un método para inducir la síntesis de fenilalanina en una planta, que comprende (a) transformar al menos una célula vegetal con un DAHPS que codifica polinucleótido exógeno teniendo al menos una mutación puntual en una posición seleccionada del grupo que consiste de posición 150, 175, 179 y 209 de tipo salvaje *E. coli* AROG DAHPS que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1, donde dicha al menos una mutación puntual reduce la sensibilidad a la inhibición por retroalimentación por fenilalanina, y (b) regenerar al menos una célula transformada en una planta transgénica que comprende al menos una célula que tiene un contenido aumentado de dicha fenilalanina en comparación con una célula correspondiente de una planta no transgénica.

[0026] De acuerdo con otro aspecto, el polinucleótido codifica una DAHPS mutante seleccionada del grupo que consiste en L175Q AROG DAHPS y F209A AROG DAHPS.

[0027] El polinucleótido exógeno que codifica L175Q o F209A AROG DAHPS de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención se puede introducir en una construcción de ADN para incluir los elementos enteros necesarios para la transcripción y la traducción, como se describe anteriormente, de tal manera que los polipéptidos se expresan dentro de la célula de la planta.

[0028] La transformación de plantas con un polinucleótido o una construcción de ADN se puede realizar por diversos

medios, como es conocido para un experto en la técnica. Los métodos comunes se ejemplifican por, pero no se limitan a, transformación mediada por *Agrobacterium*, bombardeo con microproyectiles, transferencia mediada por polen, transformación mediada por virus de ARN de planta, transformación mediada por liposoma, transferencia directa de genes (por ejemplo, mediante microinyección) y la electroporación de callos embriogénicos compactos.

5 Las plantas transgénicas de la presente invención pueden por ejemplo ser producidas utilizando transformación mediada por *Agrobacterium*.

[0029] Las plantas transgénicas que comprenden los polinucleótidos descritos en este documento pueden seleccionarse empleando métodos estándar de genética molecular, como son conocidos para una persona de experiencia ordinaria en la técnica. Las plantas transgénicas se pueden seleccionar de acuerdo con su resistencia a un antibiótico. El antibiótico que sirve como un marcador seleccionable puede ser uno del grupo que consiste en Cefotaxima, Vancomicina y Kanamicina. Las plantas transgénicas también se pueden seleccionar de acuerdo con su resistencia a un herbicida. El herbicida puede ser amonio de glufosinato (Basta).

[0030] Cualquier planta puede transformarse con los polinucleótidos descritos en este documento para producir las plantas transgénicas que tienen cantidad elevada de fenilalanina en comparación con la planta no transgénica. La planta puede ser una planta de cultivo, preferiblemente una planta de tomate.

[0031] Otros objetos, características y ventajas de la presente invención quedarán claras a partir de la siguiente descripción y los dibujos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0032]

FIG. 1 muestra el diagrama esquemático de la red metabólica de aminoácidos de siquimato y aromáticos en las plantas. Una flecha continua representa una reacción enzimática de un paso y una serie de flechas representa reacciones de varios pasos enzimáticos. Las líneas grises discontinuas con signos menos o más representan inhibición de retroalimentación y ciclos de activación, respectivamente. Abreviaturas: DAHPS, sintasa de 3-Desoxi-d-arabino-2-heptulosonato 7-fosfato; AS, sintasa de antranilato; CM, mutasa de corismato; PDT, deshidratasa de prefatan; PAT, aminotransferasa de prefatan; AAAAT, aminotransferasa de aminoácido aromática; ADT, deshidratasa de arogenato y ADS, dehidrogenasa de arogenato.

FIG. 2 muestra la expresión del gen AroG bacteriano en Arabidopsis transgénica. La Fig. 2A -Fig 2C muestran diagramas esquemáticos de los genes AroG quiméricos. 35S: PRO-Ω: promotor 35S de virus mosaico de coliflor fusionado a potenciador de traducción Ω o E8: regiones reguladoras de maduración y etileno en un promotor específico del fruto del tomate (*Lycopersicon esculentum*); TP: péptido de tránsito de plástidos; AroG: las DAHPS bacterianas que incluyen (A) WT (secuencia original), (B) variante mutante en aminoácidos situados en posición 175 y (C) variante mutante en aminoácido situado en posición 209; HA, tres copias de la etiqueta del epítipo de hemaglutinina; OCS: terminador de sintasa de octopina. Fig. 2D muestra el análisis de inmunotransferencia de extractos proteicos de líneas transformadas independientemente que reaccionan con anticuerpos anti HA. La banda superior (TP-AroG-HA) representa el polipéptido precursor, mientras que la banda inferior (AroG-HA) representa el polipéptido maduro. El control de carga mostró niveles comparables de proteínas teñidas en los diferentes carriles.

FIG. 3 demuestra los perfiles metabólicos de las plantas de Arabidopsis que expresan los genes AROG_{WT}, AROG₁₇₅ y AROG₂₀₉ son marcadamente diferentes en comparación con el control. El diagrama de conjuntos de datos del Análisis de Componentes Principales (PCA) se obtuvo a partir de 90 metabolitos dirigidos. Triángulos marcan las plantas que expresan el gen AROG_{WT} (cinco líneas); los círculos marcan las plantas que expresan el gen AROG₁₇₅ (cinco líneas); óvulos marcan las plantas que expresan el gen AROG₂₀₉ (una línea); y los cuadrados marcan las plantas de control. Cada punto de datos representa una muestra independiente. Los porcentajes combinados de la primera varianza de dos dimensiones se dan en este panel. Las muestras se extrajeron de tejidos aéreos de plántulas de Arabidopsis de 10 días de edad.

FIG. 4 muestra las diferencias en los niveles de metabolitos en las plantas transgénicas que expresan los genes AROG_{WT}, AROG₁₇₅ y AROG₂₀₉. Cada histograma individual representa el nivel relativo de shikimato, prefenato o fenilalanina en un único fraccionamiento GC-MS derivado de un único extracto (100 mg de tejido derivado de diez plantas de hojas de Arabidopsis de 20 días de edad). Estos histogramas representan aumento de metabolito derivado de líneas transformadas independientemente de AroG_{WT} (cinco líneas), AroG₁₇₅ (cinco líneas), AroG₂₀₉ (una línea) con tres réplicas por plantas del genotipo y de control con cinco repeticiones. El nivel relativo de metabolitos en cada análisis de GC-MS individual se calculó como el área de selección del metabolito dividido por el área de selección del Ribitol estándar interno. Los histogramas de cada genotipo se ordenan (de izquierda a derecha) en un nivel de metabolito relativo incrementado.

FIG. 5 demuestra el nivel relativo de los metabolitos detectados por GC-MS y LC-MS en el control y las plantas transgénicas de Arabidopsis que expresan el gen AroG₁₇₅. Los niveles de metabolitos representan el cambio múltiplo de dos líneas AroG₁₇₅ (AroG₁₇₅₋₂, A2 y AroG₁₇₅₋₂₁, A21) en comparación con plantas de control (Con) (n = 5-6). Las

muestras se extrajeron de tejidos aéreos de plántulas de *Arabidopsis* de 10 días de edad y los metabolitos se detectaron por GC-MS (Fig. 5A - Fig. 5E) y LC-MS (Fig. 5F - Fig. 5AL). Las barras en la parte superior de los histogramas indican el error estándar. Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa entre las dos líneas *AroG₁₇₅* y el genotipo de control utilizando la prueba *t* de Student; con corte FDR (valor $P < 0,05$). Abreviaturas: Cianidina*, cianidina3-O-([2-(6-O-(sinapoyl)-(xilosilo)-6-O-(p-O(glucosilo)-p-coumaroyl-glucósido]-5-O-[6-O (malonilo); Con, control; A2, *AroG₁₇₅₋₂*; A21, *AroG₁₇₅₋₂₁*.

FIG. 6 muestra el efecto de 5-metilo-Trp (5MT) sobre el crecimiento de plantas de *Arabidopsis* que expresan el gen *AroG₁₇₅*. Las semillas fueron germinadas en medios que contienen tres concentraciones de 5MT: 75, 100, 150 μ M y medios sin tratamiento. Los diferentes genotipos probados están indicados cerca de la ubicación de las plántulas en las placas.

FIG. 7 muestra un mapa metabólico que describe los cambios en los niveles de metabolitos específicos en plantas de *Arabidopsis* que expresan el gen *AroG₁₇₅* en comparación con el control.

Los metabolitos cuyos niveles aumentados están marcados en cuadrados pequeños que tienen patrones diferentes, como se indica en la figura. Las flechas rotas representan varios pasos enzimáticos consecutivos. Las flechas negras y grises representan pasos enzimáticos conocidos y desconocidos, respectivamente.

FIG. 8 muestra la caracterización metabólica de las plantas de tomate transgénicas que expresan una enzima *AroG* insensible de retroalimentación bacteriana. Se recogieron muestras de frutos de tomate maduros de generación T1, se extrajeron y se analizaron utilizando la plataforma LC-MS. Los genotipos transgénicos independientes son: *AroG₁₇₅₋₆*, *AroG₁₇₅₋₁₁*, *AroG₂₀₉₋₄*, *AroG₂₀₉₋₈*, *AroG₂₀₉₋₉* y (WT) de tipo salvaje. Fig. 8A: Se obtuvo un diagrama de conjuntos de datos de PCA a partir de 3.094 señales de masa en modo de iones negativos. Cada punto de datos representa una muestra independiente (4-5 repeticiones). Las primeras dos varianzas dimensionales se dan en este panel. Fig. 8B: nivel relativo de Fe, Trp y Tyr. Los asteriscos indicaron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos *AroG* y el WT, utilizando la prueba *t* de Student. Las barras en la parte superior de los histogramas indican errores estándar.

FIG. 9 muestra los perfiles de metabolitos de desarrollar fruto de tomate que expresa el gen *AroG₂₀₉₋₉* y (WT) de tipo salvaje. Fig. 9A: gráfico de PCA de perfiles metabólicos obtenidos por análisis GC-MS (125 metabolitos detectados). Fig. 9B: gráficos PCA de perfiles metabólicos obtenidos mediante análisis UPLC-qTOF-MS. Se tomaron muestras de la fruta en tres etapas de desarrollo: verde maduro (MG; ~ 42 días después de la antesis (DPA)); interruptor (Br; ~ 44 DPA) y rojo (rojo; ~ 48 DPA) y separado de corteza y pulpo (n = 5-6).

FIG. 10 muestra un esquema metabólico que resume los cambios metabólicos en fruto de tomate que expresan el gen *AroG₂₀₉₋₉*. Los metabolitos que sus niveles significativamente aumentaron o disminuyeron en la fruta transgénica (cáscara y pulpo) en comparación con la fruta de control están marcados en dos grupos de tres cuadrados: primer grupo con respecto a la cáscara y segundo grupo con respecto al pulpo. Los círculos marcan compuestos volátiles, que se detectaron solo en la etapa de desarrollo roja. Las flechas rotas representan varios pasos enzimáticos consecutivos.

FIG. 11 demostró el perfil sensorial de fruta de tomate maduro rojo obtenido a partir de plantas transgénicas que expresan el gen *AroG₂₀₉₋₉*. Cada descriptor se calificó en una escala de 0-5 puntos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0033] La presente memoria da a conocer plantas transgénicas transformadas con ácido nucleico exógeno que codifica sintasa de 3-Desoxi-d-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHPS) que tienen una sensibilidad reducida a la inhibición por retroalimentación por un producto de su actividad, el aminoácido aromático fenilalanina, en comparación con un DAHPS de tipo salvaje. La presente especificación muestra por primera vez que la liberación de esta inhibición de retroalimentación en una célula vegetal da como resultado una acumulación aumentada de shikimato y los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano. Además, la presente especificación muestra ahora que la expresión del DAHPS insensible a la realimentación desencadena la expresión de genes asociados con el estrés biótico, incluidos los genes relacionados con la patogénesis, así como los genes asociados con el metabolismo de la pared celular, el metabolismo secundario y el estrés biótico. El metabolismo de la hormona (etileno y ácido salicílico que se produce a través de las vías de biosíntesis de Shikimato y fenilalanina), regulación del estado redox, factores de transcripción y genes de señalización.

[0034] La presente invención muestra ahora que las plantas transgénicas que expresan el gen DAHPS insensible a retroalimentación producen más cantidad de fenilalanina en comparación con las correspondientes plantas no transgénicas. Además, la presente especificación muestra ahora que la expresión de un polipéptido DAHPS bacteriano que tiene sensibilidad reducida a la inhibición por retroalimentación en plantas transgénicas, particularmente dentro del plástido de la célula vegetal, conduce a una producción excesiva de metabolitos secundarios, que requieren fenilalanina y/o tirosina y/o triptófano y/o compuestos intermedios producidos a través de la ruta de la fenilalanina para su biosíntesis. Particularmente, los segundos metabolitos incluyen fenilpropanoides

seleccionados del grupo que consiste en lignina, que es un componente esencial de la pared celular; ácido clorogénico (3-cafeoilquinato), un antioxidante e inhibidor de la actividad promotora de tumores de ésteres de forbol; y flavonoides, que son pigmentos vegetales que contribuyen a la coloración de las plantas y a la protección UV. La alteración de la vía Shikimato también puede conducir a la producción de la clase fenilpropanoides de benceniodes, que son compuestos volátiles esenciales para sabores dulces, florales y afrutados.

[0035] La presente memoria también proporciona un método de producción de plantas transgénicas que tienen mayores cantidades de al menos uno de shikimato, corismato y un aminoácido aromático seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, el triptófano y la tirosina en comparación con una planta no transgénica correspondiente. También se proporcionan células vegetales, que comprenden ácidos nucleicos exógenos que codifican DAHPS que es insensible a la inhibición por retroalimentación, particularmente a la inhibición por retroalimentación por fenilalanina, y semillas de plantas y progenies obtenidas de las plantas transgénicas.

[0036] La presente memoria hace una contribución significativa a la técnica proporcionando nuevas estrategias para diseñar plantas que tienen la capacidad de modificar la producción de metabolitos secundarios. La presente invención utiliza enzimas primarias en la ruta Shikimato, que no se ha demostrado previamente que sean manipuladas en plantas mediante la liberación de la inhibición por retroalimentación, para la superproducción de shikimato y aminoácidos aromáticos así como metabolitos secundarios derivados de los mismos.

[0037] Las plantas son capaces de sobreproducción de metabolitos secundarios que tienen efectos beneficiosos sobre las características de plantas, por ejemplo sabor de frutas y aroma. Además, las plantas sobreproducen metabolitos secundarios requeridos para sus caracterizaciones beneficiosas, que son producidas naturalmente por la planta en cantidades insuficientes para ser utilizadas comercialmente.

Definiciones

[0038] Tal como se usa en el presente documento, los términos "que tienen reducida sensibilidad a la inhibición por retroalimentación", "insensible a la inhibición por retroalimentación" o "retroalimentación insensible" con respecto a la actividad DAHPS refieren a alivio completo o esencial de la inhibición por retroalimentación en 1 mM de Fe, mientras que muestra actividad similar específica enzimática como el tipo salvaje (Hu et al. 2003, *supra*).

[0039] El término "planta" se usa en el presente documento en su sentido más amplio. Incluye, pero no se limita a, cualquier especie de planta leñosa, herbácea, perenne o anual. También se refiere a una pluralidad de células vegetales que se diferencian en gran medida en estructura que está presente en cualquier etapa del desarrollo de una planta. Tales estructuras incluyen, pero no se limitan a, una raíz, tallo, brote, hoja, flor, pétalo, fruta, etc.

[0040] Tal como se utiliza aquí, el término "inhibición por retroalimentación" se refiere a un mecanismo de control celular de la actividad enzimática, en la que una enzima que cataliza la producción de una sustancia en particular en la célula se inhibe cuando dicha sustancia se ha acumulado hasta un cierto nivel.

[0041] El término "producto catabólico fenilalanina" se refiere a clases de compuestos orgánicos derivados de plantas que son biosintetizados a partir del aminoácido fenilalanina, en particular los fenilpropanoides. Los fenilpropanoides tienen una amplia variedad de funciones en la planta, que incluyen defensa contra herbívoros, ataque microbiano u otras fuentes de daño; como componentes estructurales de las paredes celulares; como protección contra la luz ultravioleta; como pigmentos; y como moléculas de señalización.

[0042] El término "sintasa de 3-Desoxi-D-arabino-Heptulosonato 7-Fosfato (DAHPS)" tal como se utiliza aquí se refiere a una proteína que tiene la actividad enzimática de la conversión de fosfoenolpiruvato (PEP) y eritrosa 4-Fosfato (E-4P) en 3-Desoxi-d-Arabino-Heptulosonato 7-Fosfato (DAHP) (Fig. 1).

[0043] 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 de codificación. Un polipéptido puede estar codificado por una secuencia de codificación de longitud completa o por cualquier parte de la misma. El término "partes del mismo" cuando se usa en referencia a un gen se refiere a fragmentos de ese gen. Los fragmentos pueden variar en tamaño desde unos pocos nucleótidos a toda la secuencia del gen 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.

[0044] 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 ubicadas en 5' de la región de codificación 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.

[0045] 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 un híbrido del mismo, 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.

[0046] Una molécula "aislada" de ácido nucleico es una que está separada sustancialmente de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico (es decir, secuencias que codifican otros polipéptidos). Preferiblemente, un ácido nucleico aislado está libre de algunas de las secuencias que flanquean de manera natural el ácido nucleico (es decir, las secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en su replicón natural. Por ejemplo, un ácido nucleico clonado se considera aislado. Un ácido nucleico también se considera aislado si ha sido alterado por la intervención humana, o colocado en un lugar o ubicación que no es su sitio natural, o si se introduce en una célula mediante agroinfección. Además, una molécula de ácido nucleico "aislada", como una molécula de ADNc, puede estar libre de parte del otro material celular con el que está asociado de forma natural, o un medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o precursores químicos u otros productos químicos cuando químicamente sintetizados.

[0047] El término "recombinante" se refiere a una combinación artificial de dos segmentos separados de otro modo de secuencia, por ejemplo, por síntesis química o por la manipulación de segmentos aislados de ácidos nucleicos mediante técnicas de ingeniería genética.

[0048] El término "constructo", como se usa aquí se refiere a una molécula de ácido nucleico ensamblado artificialmente o aislado que incluye el gen de interés. En general, una construcción puede incluir el gen o genes de interés, un gen marcador que en algunos casos también puede ser el 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 construcción incluye vectores, pero no debe verse como limitado a ellos.

[0049] El término "unido operativamente" se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un solo fragmento de ácido nucleico de modo que la función de uno está regulada por el otro. Por ejemplo, un promotor está operativamente unido a una secuencia codificante cuando es capaz de regular la expresión de esa secuencia codificante (es decir, que la secuencia codificante está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias de codificación se pueden unir operativamente a secuencias reguladoras en una orientación sentido o antisentido. En otro ejemplo, las regiones de ARN complementarias de la invención pueden unirse operablemente, directa o indirectamente, 5' al ARNm diana, o 3' al ARNm diana, o dentro del ARNm diana, o una primera región complementaria es 5' y su complemento es 3' al ARNm diana.

[0050] Los términos "elemento promotor", "promotor" o "secuencia promotora" como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ADN que se encuentra en el extremo 5' (es decir, precede) la proteína región de un polímero de ADN que codifica. La ubicación de la mayoría de los promotores conocidos en la naturaleza precede a la región transcrita. El promotor funciona como un interruptor, activando la expresión de un gen. Si el gen está activado, se dice que se transcribe o participa en la transcripción. La transcripción implica la síntesis de ARNm del gen. El promotor, por lo tanto, sirve como un elemento regulador de la transcripción y también proporciona un sitio para el inicio de la transcripción del gen en el ARNm. Los promotores pueden derivarse en su totalidad de un gen nativo, o estar compuestos por diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de ADN sintético. Los expertos en la técnica entienden que los diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos de células, o en diferentes etapas de desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Se reconoce además que, dado que en la mayoría de los casos los límites exactos de las secuencias reguladoras no se han definido completamente, los fragmentos de ADN de alguna variación pueden tener una actividad promotora idéntica. Los promotores que causan que un gen se exprese en la mayoría de los tipos de células en la mayoría de los casos se denominan comúnmente "promotores constitutivos". Nuevos promotores de diversos tipos útiles en las células vegetales se están descubriendo constantemente; se pueden encontrar numerosos ejemplos en Okamura J K y Goldberg R B (1989) *Biochemistry of Plants* 15: 1-82.

[0051] Tal como se utiliza aquí, el término "potenciador" se refiere a una secuencia de ADN que puede estimular la actividad promotora, y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para mejorar el nivel o especificidad tisular de un promotor.

[0052] 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.

[0053] El término "transgénico" cuando se usa en referencia a una planta o semilla (es decir, una "planta transgénica" o una "semilla transgénica") se refiere a una planta o semilla que contiene al menos un polinucleótido transcribible heterólogo en una o más de sus células. El término "material vegetal transgénico" se refiere ampliamente a una planta, una estructura vegetal, un tejido vegetal, una semilla vegetal o una célula vegetal que

contiene al menos un polinucleótido heterólogo en al menos una de sus células. Una "planta transgénica" y una "planta no transgénica correspondiente" como se usa en el presente documento se refieren a una planta que comprende al menos una célula que comprende un polinucleótido heterólogo transcripcional y a una planta del mismo tipo que carece de dicha transcripción heteróloga.

[0054] Los términos "transformantes" o "células transformadas" incluyen la célula transformada primaria y los cultivos derivados de esa célula independientemente del número de transferencias. Toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. La progenie mutante que tiene la misma funcionalidad que el cribado en la célula originalmente transformada se incluye en la definición de transformantes.

[0055] 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. La transformación transitoria puede detectarse, por ejemplo, mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), que detecta la presencia de un polipéptido codificado por uno o más de los polinucleótidos exógenos. Alternativamente, la transformación transitoria se puede detectar mediante la detección de la actividad de la proteína (por ejemplo, β -glucuronidasa) codificado por el polinucleótido exógeno.

[0056] El término "transformante transitorio" se refiere a una célula que ha incorporado transitoriamente uno o más polinucleótidos exógenos. En contraste, el término "transformación estable" o "transformado de forma estable" se refiere a la introducción y la integración de uno o más polinucleótidos exógenos en el genoma de una célula. La transformación estable de una célula se puede detectar mediante hibridación transferencia Southern de ADN genómico de la célula con secuencias de ácido nucleico que son capaces de unirse a uno o más de los polinucleótidos exógenos. Alternativamente, la transformación estable de una célula también se puede detectar mediante la actividad enzimática de un gen integrado en el tejido en crecimiento o mediante la reacción en cadena de la polimerasa del ADN genómico de la célula para amplificar las secuencias de polinucleótidos exógenos. El término "transformante estable" se refiere a una célula que ha integrado de manera estable uno o más polinucleótidos exógenos en el ADN genómico u orgánico. Debe entenderse que una planta o una célula vegetal transformada con los ácidos nucleicos, construcciones y/o vectores de la presente invención pueden transformarse transitoriamente así como de manera estable. Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos es un análogo químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural.

[0057] Según un aspecto, la presente memoria proporciona una planta transgénica que comprende al menos una célula vegetal que comprende un polinucleótido exógeno que codifica sintasa de 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato DAHPS) que tiene sensibilidad reducida a la inhibición por retroalimentación, en la que la planta transgénica comprende una cantidad incrementada de al menos uno de un aminoácido aromático, shikimato, corismato o un producto catabólico del mismo en comparación con una planta no transgénica correspondiente.

[0058] El polinucleótido puede codificar una DAHPS bacteriana. Preferiblemente, el polinucleótido codifica isoenzima DAHPS de *E. coli* insensible a retroalimentación. El polinucleótido puede comprender gen *aroG* de *E. coli* que codifica una DAHPS que tiene una sensibilidad reducida a la inhibición por retroalimentación.

[0059] El gen de *E. coli* que codifica los AROG DAHPS insensibles a retroalimentación tiene al menos una mutación puntual en una posición seleccionada del grupo que consiste de posición 150, 175, 179 y 209 del tipo salvaje de *E. coli* AROG DAHPS, teniendo la secuencia de aminoácido expuesta en SEQ ID NO: 1. De acuerdo con una realización, la prolina en la posición 150 se reemplaza por leucina (P150L). De acuerdo con otras realizaciones, la leucina en la posición 175 se reemplaza por glutamina (L175Q). De acuerdo con otras realizaciones, la leucina en la posición 179 se reemplaza por ácido aspártico (L179D). De acuerdo con realizaciones aún adicionales, la fenilalanina en la posición 209 se reemplaza por alanina (F209A).

[0060] El gen codifica una AROG DAHPS que muestra sensibilidad reducida a la inhibición por retroalimentación por fenilalanina. De acuerdo con estas realizaciones, el polinucleótido codifica DAHPS que tienen la mutación L175Q (designada en lo sucesivo AROG₁₇₅). De acuerdo con otras realizaciones actualmente preferidas, el gen AroG codifica un DAHPS que es insensible a la inhibición por retroalimentación por fenilalanina. De acuerdo con estas realizaciones, el polinucleótido codifica DAHPS que tiene la mutación de F209A (designada en lo sucesivo AROG₂₀₉).

[0061] A pesar de la gran importancia del metabolismo de los aminoácidos aromáticos en producción primaria y secundaria de plantas, aún se conoce muy poco acerca de la regulación de la conversión de los metabolitos de carbono y nitrógeno primarios a través de la vía de shikimato en la biosíntesis de los tres aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano.

[0062] La presente memoria muestra ahora que las plantas de *Arabidopsis* y tomate que expresan el AROG₁₇₅ o

ARO_{G209} han mejorado los niveles de los tres aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano. En *Arabidopsis*, los niveles de fenilalanina y triptófano se encontraron elevados de manera más significativa, mientras que en el tomate el aumento en los niveles de fenilalanina y tirosina fue más prominente. Este hallazgo implica que DAHPS es una enzima limitante que regula su actividad de conversión de metabolitos primarios de carbono mediante la conversión de corismato a aminoácidos aromáticos, así como a metabolitos que se derivan directamente del corismato. Curiosamente, entre los dos aminoácidos aromáticos, la acumulación de fenilalanina fue estimulada a un grado mucho más alto que el triptófano en el *ARO_{G175}* expresando plantas de *arabidopsis* (Fig. 5). Estos resultados son concomitantes con estudios previos de consumo de carbono que sugieren que aproximadamente el 30% del carbono fijado en la fotosíntesis se dirige a la rama de fenilalanina y hacia la biosíntesis de lignina mientras que el flujo hacia la rama de tirosina es mucho más pequeño (Rippert P. y M. Matringe, 2002. *European Journal of Biochemistry* 269 (19): 4753 - 4761; Pribat A. et al., 2010. *Plant cell* 22 (10): 3410 - 22). Sin desear estar sujetos a ninguna teoría o mecanismo de acción específico, estos resultados sugieren que bajo condiciones de crecimiento favorables (sin estrés) la ruta de biosíntesis de fenilalanina compite eficientemente con la ruta de biosíntesis de triptófano sobre su precursor común corismato metabólico (Fig. 7). La dirección hacia la fenilalanina puede deberse a la expresión elevada y/o a la actividad enzimática superior de la mutasa de corismato que conduce a la biosíntesis de fenilalanina sobre la expresión de la sintasa de atrenilato que conduce a la biosíntesis de triptófano (Fig. 1).

[0063] La planta transgénica comprende una mayor cantidad de fenilalanina en comparación con una planta no transgénica correspondiente.

[0064] La planta transgénica puede comprender una mayor cantidad de al menos un producto catabólico de la fenilalanina en comparación con la planta no transgénica correspondiente. El producto catabólico de la fenilalanina se puede seleccionar de varias clases de metabolitos que incluyen, pero no se limitan a: terpenoides; glicoalcaloides (deshidrocoposida G, F o A); carotenoides (fitoeno, fitoflueno o licopeno); fenilpropanoides; lignina (cafeato, ferulato); coumarato y cafeoilquinato; flavonoides (Kaempferol, derivados de quercetina y antocianinas); glucosinolato derivado de fenilalanina (glucosinolato de 2-feniletilo y fenilacetanitrilo); y derivados de salicilato (hexosa de hidroxibenzoato y hexosa de dihidroxibenzoato). La presente invención muestra además que la cantidad de clases adicionales de metabolitos está elevada en la planta transgénica en comparación con una planta no transgénica correspondiente, que incluye, pero no se limita a: monosacárido (manosa, fructosa, guanosina, fructosa-6-fosfato); oligosacárido (maltosa, rafinosa, trehalosa y celobiosa); aminoácidos adicionales (glicina, glutamina, treonina, asparagina); poliaminas (putrescina); conjugados de jasmonato (12-hidroxi jasmonato-hexosa); glucosinolatos derivados de metionina (glucosinolato de 3-benzoiloxipropilo, glucosinolato de 8-metiltilioctilo, glucosinolato de 7-metiltilioheptilo y glucosinolato de metilsulfoniloctilo); y combinaciones de los mismos.

[0065] La presente memoria muestra además que la expresión *Aro_{G175}* desencadena un aumento significativo en la acumulación de shikimato, así como de prefenato, el precursor de la biosíntesis de fenilalanina (Fig. 1, Fig. 4 y Fig. 5A-B). Sin querer limitarse a ninguna teoría o mecanismo de acción específico, estos resultados sugieren que los pasos enzimáticos que implican quinasa shikimato y aminotransferasa de prefenato, convirtiendo los metabolitos de shikimato y prefenatos en sus respectivos metabolitos aguas abajo, shikimato-3-fosfato y arogenato/fenilpiruvato representan enzimas reguladoras del cuello de botella novedosas de las rutas de biosíntesis de aminoácidos aromáticos y Shikimato.

[0066] En *Arabidopsis*, la expresión *ARO_{G175}* aumentó los niveles de una serie de metabolitos secundarios derivados de fenilalanina, incluyendo precursores de lignina y sus derivados, antocianinas, flavonoides, glucosinolatos derivados de fenilalanina, glucosinolatos derivados de triptófano, glucosinolatos derivados de metionina, auxina, conjugados de jasmonato y salicilato (Figs. 5, 7). El salicilato se puede sintetizar a partir de corismato o cinamato o benzoato y sus conjugados incluyen varias formas glucosiladas, como el éster de saliciloilglucosa y el glucósido de saliciloilo. La producción alterada de metabolitos secundarios derivados de fenilalanina se observó previamente tras la expresión de un gen bacteriano de PheA bifuncional (publicación de solicitud internacional n° WO2009/072118). En el fruto del tomate, la expresión *Aro_{G209}* aumentó los niveles de una serie de metabolitos secundarios derivados de fenilalanina incluyendo antocianinas, flavonoides, coumarato y derivados de cafeoilquinato así como monosacáridos y oligosacáridos (Fig. 10 y Tabla 1).

[0067] En conjunto, estos resultados implican la presencia de una interacción transversal de regulación entre los flujos de shikimato y las vías de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y su posterior metabolismo en varios metabolitos secundarios. Los resultados también indican que DAHPS funciona como una enzima reguladora importante en la conversión del metabolismo primario en secundario en las plantas. La manipulación de la expresión de combinaciones de genes, particularmente mutasa de corismato, (CM), deshidratasa de prefenato (PDT) y sintasa de 3-Deoxy-D-Arabin-Heptulosonato 7-Fosfato (DAHPS), que tiene una sensibilidad reducida a la inhibición de la retroalimentación por fenilalanina, puede dar como resultado un efecto sinérgico sobre la acumulación de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina y metabolitos derivados de los mismos.

[0068] Como se muestra en la sección de Ejemplos a continuación, la modulación del gen *DAHPS* desencadena cambios de expresión significativos en un número moderado de genes (109 genes). Parece que un subconjunto considerable de estos genes podría asociarse con estreses bióticos, incluidos los involucrados en el metabolismo hormonal (citoquinina, ácido abscísico, salicilato y jasmonato), varias clases de factores de transcripción (TF) (MYB,

WRKY y APETALA2/proteínas de unión a elementos sensibles al etileno), transportes, genes implicados en señalización (genes AAR de calcio y citoquinina), genes que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) que incluyen proteínas resistentes a la enfermedad (proteínas TIR-NB) y genes implicados en la regulación redox. Estos resultados son concomitantes con los resultados de informes previos que muestran que el ataque de patógenos y la herida física estimulan la expresión de los genes DAHPS endógenos en varias plantas, incluida Arabidopsis (Keith B. et al., 1991. Proceedings of the National Academy of Sciences 88 (19): 8821-8825), tomate (Gorlach J. y col., 1993. Plant Molecular Biology 23 (4): 707-716) y patata (Muday GK y KM Herrmann, 1992. Plant Physiology 98 (2): 496 -500; Jones JD y otros, 1995. Plant Physiology 108 (4): 1413-1421). Estudios adicionales también sugieren que la inhibición antisentido de transcripción de DAHPS de patata redujo el contenido de lignina en la pared celular (Jones et al. 1995, *supra*).

[0069] La presente memoria muestra que en el genotipo *AroG₁₇₅*, el cambio en el nivel de expresión de genes asociados con la síntesis de metabolitos secundarios derivados de fenilalanina, incluyendo fenilpropanoides y metabolitos asociados con la pared celular y el metabolismo de salicilato correlacionado con los cambios en los niveles de estas clases de metabolitos.

[0070] En particular, los niveles de indol-glucosinolatos, glucosinolatos alifáticos y glucosinolatos de fenilalanina se incrementaron significativamente en las líneas *AroG₁₇₅* en correlación con el aumento de los niveles de ARNm de los siguientes genes: (i) el gen que codifica Flavin-Monooxigenasa (glucosinato s-oxigenasa de tipo FMO (AT1G65860; 2,1 veces mayor) que cataliza la conversión de glucosinolatos de metiltioalquilo a glucosinolatos de metilsulfinalquilo y (ii) el gen que codifica CYP81F2, una enzima del citocromo P450 (AT5G57220; 2,7 veces mayor), implicado en el metabolismo de los glucosinolatos de indol. Sin desear estar ligado por ninguna teoría específica o mecanismo de acción, la transcriptom alterada y metaboloma en plantas transgénicas de *AroG₁₇₅* soporta un enlace de regulación entre el metabolismo de glucosinolatos y la vía de shikimato.

[0071] El nivel de expresión de 16 genes, categorizados como genes asociados con el reloj circadiano, también fue inducido en el transcriptoma *AroG₁₇₅₋₂*. Estos genes circadianos relacionados con el reloj incluyen aquellos que codifican los factores de transcripción de MYB (At1G01060 y At2G46830) y las proteínas de unión a ADN de dedo de zinc que regulan la expresión génica (At2G31380 y At5G15850). Anteriormente se descubrió que los grupos de genes regulados circadianos conectaban importantes redes de señalización que coordinan el crecimiento de las plantas con cambios rítmicos en el ambiente, que incluyen la auxina, la biosíntesis de fenilpropanoides y el metabolismo del almidón. Además, mediante expresión del factor de transcripción *PRODUCCIÓN DE PIGMENTO DE ANTOCIANINA 1* (PAP1), que regula la expresión de varios genes que codifican enzimas de flavonoides clave, se ha demostrado que estos genes diana están regulados por el reloj circadiano. La co-regulación de *PAP1* con los genes de la biosíntesis de los fenilpropanoides también ha sugerido que PAP1 actúa como un regulador maestro de la transcripción de reloj controlado de estos genes (Harmer SL et al, 2000. Science 290 (5499): 2110-2113). Por lo tanto, los hallazgos de la presente especificación apoyan la presencia de un nuevo enlace regulador entre la expresión de genes que controlan procesos fisiológicos que están asociados con el reloj circadiano y la conversión de metabolitos primarios a secundarios.

[0072] Otra categoría de genes enriquecidos presenta el aumento de expresión asociado con la asimilación de nitrato, ya que incluía los genes que codifican un transportador de nitrato (At3g21670; *NTP3*) y dos reductasas de nitrato (At1g77760; *NIA1* y At1g37130; *NIA2*). La regulación del metabolismo del nitrógeno está fuertemente asociada con la regulación de la glucólisis y la vía de fosfato de pentosa que sirven como donantes de PEP y E-4P, los dos sustratos de DAHPS (Stitt M., 1999. Current Opinion in Plant Biology 2 (3): 178-186). Además, el metabolismo y la translocación del nitrógeno en las células vegetales tiene un papel regulador importante en la competencia entre los patógenos y sus plantas hospedadoras por la disponibilidad de nitrógeno. En el transcriptoma *AroG₁₇₅*, se indujeron genes asociados con la asimilación de nitrato y resistencia a enfermedades, incluyendo genes que codifican proteínas PR. Sin desear estar ligado a ninguna teoría o mecanismo de acción específico, los resultados de la presente invención sugieren que la actividad de DAHPS, y quizás la actividad de otras enzimas de la ruta de Shikimato, influyen en la red que conecta el metabolismo de nitrógeno con la respuesta de patógenos en plantas de Arabidopsis.

[0073] Varios genes que codifican factores de transcripción putativamente estaban regulados hacia abajo en la línea de *AroG₁₇₅₋₂*, incluyendo por ejemplo las proteínas de tipo dedo de zinc B-caja con un dominio CCT (At3G07650, AT5G48250, At1G28050, At3G20810, At1G07050). La expresión de otros tres genes, que codifican proteínas asociadas con la cascada de reloj circadiano, se redujeron, incluyendo *TOC1* (momento de la expresión CAB 1; AT5G61380), *regulador de Pseudo-respuesta* (AT5G60100) y *ELF4* (floración temprana 4; AT2G40080).

Producción de plantas transgénicas

[0074] La clonación de un polinucleótido que codifica el *AroG* DAHPS puede realizarse por cualquier método tal como es conocido para una persona experta en la técnica. Se pueden usar diversas construcciones de ADN para expresar el *AroG* DAHPS en una planta deseada.

[0075] La presente memoria proporciona una construcción de ADN o un vector de expresión que comprende un

polinucleótido que codifica AroG DAHPS, que puede comprender, además, elementos reguladores, incluyendo, pero no limitado a promotor, un potenciador, y una señal de terminación.

[0076] Entre los promotores más comúnmente utilizados están el promotor de sintasa de nopalina (NOS) (Ebert et al., 1987 Proc Natl Acad Sci EE.UU. 84: 5745-5749), el promotor de sintasa de octapina (OCS), promotores de caulimovirus tal como el promotor 19S del virus del mosaico de coliflor (CaMV) (Lawton et al., 1987 Plant Mol Biol. 9: 315-324), el promotor CaMV 35S (Odell et al., 1985 Nature 313: 810-812), y el promotor 35S del virus mosaico figwort, el promotor inducible por luz de la subunidad pequeña de rubisco, el promotor Adh (Walker et al., 1987 Proc Natl Aca. Sci EE.UU. 84: 6624-66280, el promotor de la sintasa de sacarosa (Yang et al., 1990 Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. 87: 4144-4148), el promotor del complejo del gen R (Chandler et al., 1989. Plant Cell 1: 1175-1183), el promotor del gen de la proteína de unión a la clorofila a/b, etc. Otros promotores comúnmente utilizados son los promotores de los genes ADPGPP del tubérculo de la patata, el promotor de la sintasa de sacarosa, el promotor de la sintasa de almidón unida al gránulo, el promotor del gen de la glutelina, promotor ceroso de maíz, promotor del gen Brittle y promotor Shrunken 2, el promotor del gen de quitinasa ácida, y los promotores del gen zein (15 kD, 16 kD, 19 kD, 22 kD, y 27 kD; Pedersen y col., 1982 Cell 29: 1015 -1026). Una plétora de promotores se describe en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 00/18963. La construcción descrita en este documento puede comprender el promotor constitutivo CaMV 35S o el promotor E8 (Deikman J. y col., Plant Physiol 100: 2013-2017).

[0077] Las "Secuencias no codificantes 3'" se refieren a 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 generalmente se caracteriza por afectar la adición de tratos de ácido poliandiamílico al extremo 3' del precursor de ARNm. El uso de diferentes secuencias 3' no codificantes se ejemplifica por Ingelbrecht I L et al. (1989. Plant Cell 1: 671 - 680).

[0078] Los siguientes elementos se utilizaron para ensamblar las construcciones de ADN descritas en este documento:

1. Una secuencia de ADN que contiene un promotor 35S de virus del mosaico de coliflor (CaMV) además de un potenciador de traducción omega CaMV corriente arriba de la iniciación de traducción codón de ATG, que contiene secuencias de enzimas de restricción, denominado 35S:PRO-Ω (Shaul O. y G. Galili, 1993. Plant Mol Biol 23: 759 - 768).

2. Una secuencia de ADN que contiene E8, un gen relacionado con la biosíntesis de etileno que es inducido por etileno y activado para expresarse al comienzo de la maduración de la fruta. La expresión del gen E8 se regula espacialmente y temporalmente en fruto de tomate maduro (Zhao et al, 2009 J Biosci. 34: 71-83).

3. Una secuencia de ADN que contiene la terminación 3' de la transcripción y señales de poliadenilación del gen de sintasa de octopina de *Agrobacterium tumefaciens*, denominada OCS-TER, con secuencias de enzimas de restricción (Shaul y Galili 1993, *supra*).

Las secuencias descritas anteriormente se usan como elementos reguladores que permiten la expresión de la secuencia de ácido nucleico codificante dentro de una célula vegetal.

4. Una secuencia de ADN que codifica un péptido de guisante rbcS3 plastidio de tránsito (SEQ ID NO: 6), incluyendo las secuencias de enzimas de restricción necesarias (Shaul y Galili 1993, *supra*). El péptido codificado, cuando se unió al polipéptido AroG DAHPS, causó la migración de los últimos al plástido.

5. Una secuencia de ADN del gen de *E. coli* AroG_{WT} (SEQ ID NO: 16) que codifica la enzima de *E. coli* AroG_{WT} DAHPS (que tiene la SEQ ID NO: 1), o una secuencia de ADN de un *E. coli* AroG₁₇₅ mutado (SEQ ID NO: 3) que codifica la enzima mutada AroG₁₇₅ DAHPS (SEQ ID NO: 2) que no es esencialmente sensible a la inhibición por retroalimentación por fenilalanina o una secuencia de ADN de *E. coli* AroG₂₀₉ mutado (SEQ ID NO: 5) que codifica la enzima AroG₂₀₉ DAHPS mutada (SEQ ID NO: 4) que no es esencialmente sensible a la inhibición por retroalimentación por fenilalanina.

6. Una secuencia de ADN que codifica tres copias de una etiqueta de epítipo de hemaglutinina (HA) (SEQ ID NO: 7). Este epítipo permite la detección del polipéptido AroG DAHPS recombinante mediante inmunotransferencias con anticuerpos para la etiqueta del epítipo HA (Shevtsova et al., 2006. Eur J Neurosci 23: 1961-1969).

[0079] Los expertos en la técnica apreciarán que los diversos componentes de las secuencias de ácidos nucleicos y los vectores de transformación descritos en este documento están unidos 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 son bien conocidas por los expertos en la técnica. Tales técnicas incluyen el uso de conectores, tales como enlazadores sintéticos, por ejemplo que incluyen uno o más sitios de enzimas de restricción.

[0080] De acuerdo con todavía otro aspecto, la presente memoria proporciona un método de inducir la síntesis de al menos uno de shikimato, corismato y un aminoácido aromático en una planta, que comprende (a) transformar una célula vegetal con un polinucleótido exógeno que codifica DAHPS insensible a la retroalimentación y (b) regeneración de la célula transformada en una planta transgénica que comprende al menos una célula que tiene un contenido alterado de al menos uno de shikimato, corismato y un ácido aromático en comparación con una célula correspondiente de una planta no transgénica.

[0081] Los métodos para transformar una célula vegetal con secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención son conocidos en la técnica. Como se utiliza en el presente documento, el término "transformación" o "transformar" describe un proceso mediante el cual un ADN extraño, tal como una construcción de ADN, entra y cambia una célula receptora en una célula transformada, genéticamente modificada o transgénica. La transformación puede ser estable, en donde la secuencia de ácido nucleico está integrada en el genoma de la planta y como tal representa un rasgo heredado o estable, o transitorio, en donde la secuencia de ácido nucleico se expresa mediante la célula transformada pero no está integrada en el genoma, y tal representa un rasgo transitorio. La secuencia de ácido nucleico tal como se utiliza en el contexto de la presente memoria descriptiva se puede transformar de manera estable en una célula vegetal.

[0082] Hay varios métodos de introducción de genes extraños en plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (por ejemplo, Potrykus I. 1991. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 42: 205-225; Shimamoto K. et al, 1989. *Nature* 338 : 274-276).

[0083] Los principales métodos de la integración estable de ADN exógeno en el ADN genómico de la planta incluye dos enfoques principales:

Transferencia de genes mediada por *Agrobacterium*: El sistema mediado por *Agrobacterium* incluye el uso de vectores plasmídicos que contienen segmentos de ADN definidos que se integran en el ADN genómico de la planta. Métodos de inoculación del tejido vegetal varían dependiendo de la especie de planta y el sistema de suministro de *Agrobacterium*. Un enfoque ampliamente utilizado es el procedimiento de disco de hoja, que se puede realizar con cualquier explante de tejido que proporcione una buena fuente para iniciar la diferenciación de toda la planta (Horsch et al., 1988. *Plant Molecular Biology Manual* A5, 1-9, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht). Un enfoque complementario emplea el sistema de suministro de *Agrobacterium* en combinación con infiltración al vacío. El sistema de *Agrobacterium* es especialmente útil en la generación de plantas dicotiledóneas transgénicas.

[0084] La captación de ADN directa: Existen varios métodos de transferencia directa de ADN en células de plantas. En la electroporación, los protoplastos se exponen brevemente a un fuerte campo eléctrico, abriendo miniporos para permitir el ingreso del ADN. En la microinyección, el ADN se inyecta mecánicamente directamente en las células utilizando micropipetas. En el bombardeo de micropartículas, el ADN se adsorbe en microproyectiles tales como cristales de sulfato de magnesio o partículas de tungsteno, y los microproyectiles se aceleran físicamente en células o tejidos vegetales.

[0085] Transformación de las construcciones de ADN utilizadas en el contexto de la presente invención en una célula vegetal se puede realizar usando el sistema de *Agrobacterium*.

[0086] La planta transgénica se cultiva entonces bajo condiciones adecuadas para la expresión de la construcción de ADN recombinante o constructos. La expresión de la construcción o construcciones de ADN recombinante altera la cantidad de al menos uno de shikimato, corismato y un ácido aromático de la planta transgénica en comparación con su cantidad en una planta no transgénica.

[0087] La regeneración, el desarrollo y el cultivo de plantas a partir de transformantes de protoplastos vegetales solo o de varios explantes transformados se conoce bien en la técnica (Weissbach y Weissbach, In.: *Methods for Plant Molecular Biology*, (Eds.), 1988 Academic Press, Inc., San Diego, CA). Este proceso de regeneración y crecimiento típicamente incluye los pasos de selección de células transformadas, cultivo de esas células individualizadas a través de las etapas habituales de desarrollo embrionario a través de la etapa de plántulas enraizadas. Los embriones y semillas transgénicas se regeneran de manera similar. Los brotes arraigados transgénicos resultantes se plantan después en un medio de crecimiento vegetal apropiado tal como tierra.

[0088] Selección de plantas transgénicas transformadas con una secuencia de ácido nucleico de la presente invención, tal como para proporcionar plantas transgénicas que tienen cantidad alterada de shikimato, corismato, aminoácidos aromáticos y los metabolitos secundarios derivados de los mismos se lleva a cabo empleando métodos estándar de genética molecular, conocidos por una persona de experiencia ordinaria en la técnica. La secuencia de ácido nucleico comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto que confiere resistencia a antibiótico, y plantas así transgénicas se seleccionan según su resistencia al antibiótico. El antibiótico que sirve como un marcador seleccionable puede ser uno del grupo aminoglucósido que consiste en paromomicina y kanamicina. La secuencia de ácido nucleico puede comprender además una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto que confiere resistencia a un herbicida, incluyendo, pero no limitado a, resistente al glufosinato

de amonio. La secuencia de ácido nucleico puede comprender además un polinucleótido que codifica al menos una copia de la etiqueta de epítipo de hemaglutinina (HA), unido operativamente al polinucleótido que codifica *AroG* DAHPS. La secuencia de ácido nucleico puede comprender un polinucleótido que codifica tres copias del epítipo de hemaglutinina (HA). Las proteínas se extrajeron entonces y las plantas transgénicas se seleccionaron de acuerdo con los extractos de proteínas que reaccionaron con anticuerpos de epítipo HA.

[0089] La extracción y detección de los metabolitos sintetizados por las células de plantas transgénicas se pueden realizar por métodos estándar que son conocidos para un experto en la técnica. Los metabolitos mencionados en este documento pueden ser extraídos y analizados por GC-MS como se describe por Mintz-Oron et al, 2008 (Plant Physiol 147 (2): 823-51), LC-MS y HPLC como se describe por Fraser et al. 2000 (Plant J 24 (4): 551-558) y como se describe en la sección ejemplar a continuación.

[0090] El desarrollo o regeneración de plantas que contienen el gen foráneo, exógeno que codifica una proteína de interés es bien conocido en la técnica. Preferiblemente, las plantas regeneradas son auto-polinización para proporcionar plantas transgénicas homocigóticas. De lo contrario, el polen obtenido de las plantas regeneradas se cruza con plantas cosechadas de semilla de líneas agrónomicamente importantes, o polen de plantas de estas líneas importantes se utiliza para polinizar plantas regeneradas. Una planta transgénica de la presente invención que contiene un polipéptido deseado se cultiva utilizando métodos bien conocidos para un experto en la técnica.

[0091] Existe una variedad de métodos en la técnica para la regeneración de plantas a partir de tejido vegetal. El método particular de regeneración dependerá del tejido vegetal de partida y de la especie de planta particular a regenerar.

[0092] También se describen semillas o partes de plantas obtenidas a partir de las plantas transgénicas. Partes de la planta incluyen tejidos diferenciados y no diferenciados, incluyendo, pero no limitados a, raíces, tallos, brotes, hojas, polen, semillas, tejido tumoral y diversas formas de células y cultivo tales como células individuales, protoplastos, embriones y tejido calloso. El tejido de la planta puede estar en la planta o en órgano, tejido o cultivo celular.

[0093] Los siguientes ejemplos describen a continuación los medios y métodos para la producción de las plantas transgénicas de la presente memoria descriptiva. A menos que se indique otra cosa en los Ejemplos, todas las técnicas de ADN y ARN recombinantes, así como métodos hortícolas, se llevan a cabo de acuerdo con protocolos estándar como es conocido por una persona con una experiencia ordinaria en la técnica.

EJEMPLOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Construcción de plásmidos y transformación de plantas

[0094] La secuencia de ADN de codificación del gen de *E. coli* *AroG*, que codifica la DAHPS, se amplificó por PCR con los siguientes oligonucleótidos: hacia 5' CATGCTGCTGATGAATTATCAGAACGACGA -3' delantero (SEQ ID NO: 10) que introduce un sitio de restricción *SphI* (subrayado); y 5'- GGAATTC CCCGCGACGCGCTTTTACTG -3' inverso (SEQ ID NO: 11) que introduce un sitio de restricción *EcoRI* (subrayado). Se construyeron dos tipos de genes recombinantes: *AroGWT* (la secuencia original), que codifica la enzima sensible a la retroalimentación, y *AroG175*, que tiene una mutación puntual en el 524bp (que conduce a la sustitución Leu175Glu), que codifica la enzima insensible de retroalimentación. *AroG175* se construyó usando PCR con los oligonucleótidos siguientes: 5'- GTGCACCGCGAACAGGCATCAGGGCTT-3' directo (SEQ ID NO: 12) y 5'- AAGCCCTGATGCCITGTCGCGGTGCAC -3' inverso (SEQ ID NO: 13). El *AroG209*, que tiene una mutación puntual en el 625-626bp (que conduce a la sustitución Phe209Ala), que codifica la enzima insensible de retroalimentación. *AroG209* se construye utilizando PCR con los oligonucleótidos siguientes: 5'- GCGCCGCACTGCGCCCTGTCCGTAACG-3' directo (SEQ ID NO: 14) y 5' 'CGTTACGGACAGGGCGCAGTGCGGCGC -3' inverso (SEQ ID NO: 15). El péptido de tránsito de plastidio de subunidad 3A pequeña RuBisCO (Shaul, O. y G. Galili Plant Mol Biol, 1993. 23: p. 759-768) se fusionó en marco al extremo 5' del marco de lectura abierto *AroG*. El *AroG* 3' se fusionó a tres copias de una etiqueta de epítipo HA fusionado a un terminador de la sintasa de octopina. El gen quimérico y el vector se digirieron con las enzimas de restricción NotI (BioLab) respectivamente y se combinaron por ligasa T4 ADN (Biolabs) y todo el fragmento se subclonó en el plásmido Ti pBART, un derivado de pART27 (Gleave, AP, Plant Mol Biol 1992 20 (6): 1203-7). Para la alineación de secuencias, se utilizó la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). La cepa EHA-105 *Tumefaciens Agrobacterium* (*A. tumefaciens*) se transformó con los plásmidos por electroforesis usando el aparato Gene Pulser (Bio Rad).

[0095] (WT) de tipo salvaje *Arabidopsis thaliana*, plantas de ecotipo Colombia se inocularon sumergiendo inflorescencias en el cultivo *A. tumefaciens* transformado como se describe anteriormente (Clough, S.J. y A.F. Bent, 1998. Plant J 16 (6): 735-43).

[0096] Tomate de tipo salvaje, plantas de ecotipo M82 se inocularon sumergiendo cotiledón en el cultivo *A. tumefaciens* transformado como se describe anteriormente (McCormic S., Plant Tissue Manual. 1991. B6:109; Fillati, J.J. et al, 1987. Bio/Technology 5: 726-730).

5 Material vegetal y condiciones de crecimiento

[0097] Se recogieron semillas de Arabidopsis, se secaron y se sembraron en suelo. Se seleccionaron plántulas jóvenes para la selección de plantas transgénicas mediante pulverización con Basta (glufosinato de amonio; Bayer CropScience). Las semillas de tomate esterilizadas y sembradas en placas de Petri que contienen medio completo Nitsch pH 6 (Duchefa, Haarlem, Países Bajos) suplementado con 1% de sacarosa y 1% de agar planta. Para la selección de las plantas de tomate transgénico, 50 µg/ml kanamicina se añadió al medio de crecimiento. Las semillas se embebieron durante 48 horas a 4°C y se transfirieron a una sala de crecimiento de clima controlado con un régimen de 16 h de luz/oscuridad de 8 h (condiciones de día largo) en 22°C.

[0098] Se midieron las plantas de generación T2 de prueba de progenie y las líneas con una sola inserción de genes fueron seleccionados sobre la base de 3:1 segregación genética. El ensayo de resistencia al análogo de 5MT Trp (Sigma/Aldrich) se realizó como se ha descrito anteriormente (Li J. y R.L. Last, 1996. Plant Physiol 110 (1): 51-59; Tzin V. et al, 2009. Plant Journal 60 (1): 156-167).

[0099] Las plántulas resistentes se retiraron al suelo y se cultivaron en el invernadero a 22°C bajo condiciones de día largo. Para ensayar la respuesta de crecimiento de las plantas a 5MT (Sigma/Aldrich), semillas de plantas homocigotos para *AroG₁₇₅* y plantas de control fueron germinadas en un medio Nitsch como se describe anteriormente suplementado con 75, 100 o 150 µM de 5MT (Li y Last 1996, *supra*)

25 Selección de líneas transformadas

[0100] El análisis de transferencia Western se realizó utilizando anticuerpos de etiqueta anti-HA con el fin de identificar las plantas mutadas que traducen el gen quimérico (Stepansky, A. y G. Galili Plant Physiol, 2003. 133 (3): p 1407-1415). Además, plantas de generación T₂ se midieron para la prueba de progenie y las líneas con un gen de inserción solo se seleccionaron sobre la base de segregación genética 3:1.

Análisis de la metabolómica

Preparación de muestras de líneas transgénicas de arabidopsis

[0101] El análisis metabólico se realizó con tejidos aéreos de las plantas de semillero de Arabidopsis (100 mg de polvo congelado) expresando *AroG_{WT}* y *AroG₁₇₅* y líneas de control (n = 5-6). Para el análisis UPLCqTOF-MS, las muestras de Arabidopsis se extrajeron en 450 µl de metanol 80%. Se describieron anteriormente la preparación de la muestra y las condiciones de inyección (Mintz-Oron, S. et al, Plant Physiol, 2008. 147 (2): 823-51). Para el análisis de GC-MS, se recogieron las plántulas, se congelaron, se molieron y se extrajeron en 450 µl de metanol, 750 µl de metanol, 750 µl de agua y 375 µl de cloroformo como se ha descrito previamente (Malitsky, S. et al., Plant Physiol, 2008. 148 (4): 2021-2049). Para evaluar si las diferentes líneas en el análisis varían en su composición de metabolitos, se realizó la prueba t de Student (software JMP). Los valores P resultantes se controlan para pruebas hipótesis múltiple utilizando un FDR de corte 5% (Hochberg Y. y Y. Benjamini 1990. Statistics in Medicine 9 (7): 811-818). Las parcelas de PCA se generaron usando el software TMEV4 (Saeed, Al et al, Biotechniques, 2003. 34 (2): 374-378; Scholz, M. et al, 2004. Bioinformatics, 20 (15): 2447-2454).

Preparación de muestras de líneas transgénicas de tomate

[0102] El análisis no específico metabólico se realizó con tres etapas de desarrollo de los frutos de tomate (500 mg de polvo congelado) que expresan el *AroG₁₇₅* y *AroG₂₀₉* y WT (n = 5), se extrajo en 1,5 ml de metanol al 100%. Las condiciones de preparación e inyección ejemplares se realizaron como se ha descrito previamente (Mintz-Oron, S., et al Plant Physiol, 2008. 147 (2): P 823-51).

55 Análisis UPLC-qTOF-MS- y GC-MS

[0103] El análisis de los datos UPLC-QTOF-MS en bruto se realizó usando el software XCMS que realiza la alineación de cromatograma, detección de señal de masa y la integración de picos (Smith, C. et al, Anal Chem, 2006. 78: 779 -787) desde el paquete bioconductor (v. 2.1) para el lenguaje estadístico R (v. 2.6.1). XCMS se usó con los siguientes parámetros: FWHM = 10,8, paso = 0,05, pasos = 4, mzdif = 0,07, snthresh = 8, max = 1000. Las inyecciones de muestras en los modos de ionización positivo y negativo se realizaron en los conjuntos de inyección separados y pre-procesamiento se hizo para cada modo de ionización de forma independiente. Iones de masas diferenciales se determinaron utilizando la prueba t de Student (software JMP). El análisis GC-MS se realizó como se ha descrito previamente (Malitsky, S. et al, Plant Physiol, 2008. 148 (4): 2021-2049), (n = 5-6) El software Xcalibur v.1.4 (Thermo Finnigan; <http://www.thermo.com/>) fue utilizado para el análisis de datos y los compuestos se identificaron por comparación de su índice de retención (RI) y el espectro de masa a las generadas por patrones

auténticas analizadas en el mismo instrumento. En los casos en que las normas no estaban disponibles, los compuestos se identifican putativamente por comparación de su RI y espectro de masas a los presentes en la biblioteca de espectros de masas de Max-Planck-Institute for Plant Physiology, Golm, Alemania (Q_MSRI_ID, http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb/gmd/msri/gmd_msri.html) y la biblioteca de espectros de masas comercial NIST05 (www.nist.gov). Los valores de respuesta para metabolitos resultantes del método de procesamiento de Xcalibur se normalizaron al estándar interno ribitol. El análisis de la prueba t de Student se realizó en el nivel de metabolitos con cambios significativos en los dos genotipos transformados *AroG₁₇₅* utilizando el software JMP. A continuación, las parcelas de PCA se generaron usando el software TMEV4 (Saeed et al 2003,., *Supra*; Scholz et al 2004. *Supra*).

Extracción de ARN y Análisis de Microensayo

[0104] Todos los experimentos que analizan los niveles de expresión de ARN se realizaron usando dos réplicas de tejidos aéreos de plántulas de *Arabidopsis* de 10 días de edad a partir de plantas cultivadas en condiciones de ambiente controlado. El ARN total se extrajo como se ha descrito anteriormente (Chomczynski P., 1993. *Biotechniques* 15 (3): 532-537) y se trató con ADNasa RQ-1 (Promega). A continuación, el ARN se amplificó usando etiquetado Affimetrix de 1 ciclo utilizando el protocolo estándar de Affymetrix. La hibridación, el etiquetado, escaneo y la extracción de datos se realizaron de acuerdo a los protocolos estándar de Affymetrix. El análisis del transcriptoma se llevó a cabo utilizando el software Partek Genome Suite (www.partek.com). El pre-procesamiento se llevó a cabo usando el algoritmo de Robust Microarray Averaging (RMA) (Irizarry R.A. et al, 2003. *Biostatistics* 4 (2): 249-264). Se realizó un análisis ANOVA unidireccional, se calculó el cambio entre las líneas (dos veces) y FDR se aplicó para corregir la forma de comparaciones múltiples (Hochberg y Benjamini 1990, *supra*). El análisis de exceso de representación se realizó mediante la herramienta PageMan (<http://mapman.mpimp-golm.mpg.de/general/ora/ora.shtml>) (Usadel B. et al, 2006. *BMC Bioinformatics*. 7: 535). La visualización de las rutas metabólicas y otras categorías funcionales se preformó con la herramienta de software MapMan (Usadel B. et al, 2005. *Plant Physiol* 138 (3): 1195-1204). Se utilizó el número locus común (AGI) de nomenclatura TAIR (<http://www.arabidopsis.org>). Para una RT-PCR cuantitativa de dos pasos, RT-PCRs de Platinum SYBR SuperMix (Invitrogen) se midieron en un instrumento ABI 7300 (Applied Biosystems). Cada muestra se amplificó por PCR usando la misma cantidad de molde de ADNc en reacciones por triplicado como se ha descrito previamente (Mintz-Oron et al. 2008, *supra*).

Ejemplo 1: Generación de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan una enzima DAHPS insensible a la retroalimentación bacteriana y análisis metabólicos iniciales

[0105] Para estudiar la importancia de DAHPS en la regulación de los flujos haciendo puente con metabolismo primario y secundario en las plantas, las plantas de *Arabidopsis* se transformaron con ya sea un *AroG_{WT}* quimérico o genes *AroG₁₇₅* o *AroG₂₀₉* (Fig. 2, paneles A, B y C respectivamente) que codifica el WT dirigido al plástido y las enzimas DAHPS insensibles a la retroalimentación bacteriana, respectivamente (Hu et al., 2003, *supra*). Al orientar las enzimas bacterianas en el plástido, donde la vía de shikimato opera en las plantas, se obtuvo mediante una fusión en el marco de un ADN que codifica un péptido de tránsito de plastidio en el extremo 5' de las secuencias de ADN codificantes de los dos genes quiméricos. Los genes quiméricos también se fusionaron en el marco en su 3' a una etiqueta de epítipo ADN que codifica la hemaglutinina (HA) (Fig. 2 AC), para permitir la detección de los genes recombinantes en las plantas transgénicas. Para examinar los polipéptidos producidos por los transgenes *AroG* quiméricos, proteínas de plantas transformadas de forma independiente se sometieron a análisis de inmunotransferencia con anticuerpos anti-HA. Como se muestra en la figura 2D, el análisis de inmunotransferencia revelaron que las plantas transgénicas que expresan los constructos plastídicos *AroG* produjeron dos bandas de polipéptidos derivadas de *AroG*: (i) la banda inferior correspondiente en tamaño al polipéptido *AroG* bacteriano maduro (42,5 kD); y (ii) la banda superior, que corresponde en tamaño a la *AroG* no procesada que contiene el péptido de tránsito de plastidio (48,1 kD). Esto indicó que una porción importante de los polipéptidos *AroG_{WT}*, *AroG₁₇₅* y *AroG₂₀₉*, producidos por estos transgenes, se procesaron para eliminar el péptido de tránsito de plastidio y se translocaron en los plástidos. Plantas T2 homocigóticas se generaron que contenía una sola inserción, en función de su segregación 3:1 para la resistencia a la selección Basta en el estado heterocigoto, y se utilizaron para el análisis adicional. Las plantas que expresan *AroG_{WT}* y *AroG₁₇₅* transgénicos tenían fenotipos comparables a las plantas de control (datos no mostrados) y eran completamente fértiles.

[0106] Una visión global del efecto de la expresión de los transgenes *AroG_{WT}*, *AroG₁₇₅* y *AroG₂₀₉* sobre el metabolismo de la planta se obtuvo mediante la realización de cromatógrafo de gas-espectrometría de masas de análisis (GC-MS) de compuestos polares de extractos derivatizados; plantas de 20 días de edad de cuatro plantas transformadas de forma independiente de cada uno de los genotipos (2-3 análisis independientes de cada genotipo, cada uno derivado de extractos hechos de ~ 7 plantas), así como plantas WT (cinco análisis independientes) se tomaron para el análisis. El conjunto de datos se analizó primero por un Análisis de Componentes Principales (PCA). En este análisis, los perfiles metabólicos de control y genotipos *AroG_{WT}* se agruparon, y fueron completamente separados de los genotipos *AroG₁₇₅* y *AroG₂₀₉* (Fig. 3). Curiosamente, también había una cierta separación entre los cinco genotipos *AroG₁₇₅* (Fig. 3), lo que implica un efecto de los diferentes niveles de expresión *AroG₁₇₅* en cada uno de estos genotipos en la medida de la alteración metabólica.

[0107] A fin de probar si expresión *AroG_{WT}*, *AroG₁₇₅* y *AroG₂₀₉* altera los niveles de metabolitos asociados con el shikimato y rutas de biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Fig. 1), las señales de masa asociadas con tales metabolitos que podrían ser detectadas en el GC-MS (véase la sección material y métodos) se examinó específicamente. Como se muestra en la Fig. 4, los niveles de shikimato, preferato y fenilalanina (véase las ubicaciones de metabolitos en la Fig. 1) fueron mayores en las diferentes líneas *AroG₁₇₅* y *AroG₂₀₉*, pero no en los genotipos *AroG_{WT}*, en comparación con las plantas de control. Esto sugirió que el rasgo de retroalimentación de insensibilidad de enzima *AroG₁₇₅* es esencial para la mejora del flujo del metabolismo de carbono primario a través de la vía de shikimato en la producción de aminoácidos aromáticos. Las plantas que expresan el *AroG₁₇₅* por lo tanto polipéptido se estudiaron adicionalmente.

Ejemplo 2: Análisis metabólico de plantas de *Arabidopsis* que expresan el gen *AroG₁₇₅*

[0108] El efecto de expresión *AroG₁₇₅* en una amplia gama de metabolitos primarios y secundarios se examinó en dos líneas *AroG₁₇₅*, *AroG₁₇₅₋₂* y *AroG₁₇₅₋₂₁* homocigotos transformadas independientemente. Estas líneas expresan nivel medio (*AroG₁₇₅₋₂*) o relativamente alto (nivel *AroG₁₇₅₋₂₁*) del polipéptido *AroG₁₇₅* (Fig 2D.), y contenían una única inserción, en función de su segregación 3:1 para la resistencia a antibióticos. Tejidos aéreos de plántulas de 10 días de edad de estas dos líneas, así como el genotipo de control se sometieron a GC-MS y análisis de cromatografía líquida-espectroscopia de masas dirigidos y no dirigidos (LC-MS). Gráfico PCA de los datos GC-MS visualizó separación significativa entre los dos genotipos *AroG₁₇₅* y el genotipo de control (Fig. 3). Además, PCA de los datos de LC-MS demostró una relativamente pequeña separación entre el *AroG₁₇₅₋₂* y la línea de control, mientras que una separación considerablemente mayor entre la *AroG₁₇₅₋₂₁* y las líneas tanto de control como *AroG₁₇₅₋₂* (datos no mostrados). El análisis de los niveles de metabolitos específicos por la GC-MS y LC-MS (Fig. 5) también mostró que, como se esperaba, los cambios en los niveles de metabolitos específicos fueron principalmente más fuertes en la línea *AroG₁₇₅₋₂₁* que la línea *AroG₁₇₅₋₂*. Análisis GC-MS mostró que los niveles de cinco metabolitos se incrementaron significativamente en las líneas *AroG*, incluyendo los metabolitos primarios shikimato, preferato y fenilalanina (Fig. 5A-C), así como metabolitos de fenilacetónitrilo secundarios (isotiocianato) y homogentisato (derivado de Tyr que es un precursor de los tocoferoles y tocotrienoles) (Fig. 5D, E).

[0109] En el análisis LC-MS, la línea *AroG₁₇₅₋₂* generalmente mostrará cambios más suaves en los niveles de los diferentes metabolitos en comparación con la línea *AroG₁₇₅₋₂₁* (datos no mostrados). Por lo tanto, el análisis de LC-MS no específica se centró sólo en metabolitos que su nivel fue significativamente diferente entre la línea *AroG₁₇₅₋₂₁* y el control, pero también mostró dirección similar de cambio en la línea *AroG₁₇₅₋₂*. El análisis de LC-MS no específica de línea *AroG₁₇₅₋₂* reveló un total de 4473 señales de masa, de los cuales los niveles de 2414 se alteraron significativamente (regulados hacia arriba o abajo) en comparación con el control. Suponiendo un promedio de cinco señales de masa por solo metabolito (Malitsky S. et al, 2008. Plant Physiology 148 (4): 2021-2049), expresión *AroG₁₇₅* en la línea *AroG₁₇₅₋₂₁* resultó en niveles alterados de ~ 500 metabolitos. En lo que respecta a los otros dos aminoácidos aromáticos, este análisis mostró que el nivel de triptófano era 2,6 veces mayor en la línea *AroG₁₇₅₋₂*, en comparación con el control, mientras que su nivel en la línea *AroG₁₇₅₋₂* no fue significativamente diferente del control (Fig. 5F). El nivel de tirosina no fue alterado en estas dos líneas transgénicas en comparación con el control (datos no mostrados). Estos resultados implican que las plantas de semillero de *Arabidopsis* poseen: (i) canalización más fuerte de corismato en la rama Phe/Tyr que hacia la rama Trp y (ii) canalización más fuerte de la rama Phe/Tyr hacia Phe que hacia la biosíntesis de Tyr (véase Fig. 1).

[0110] El análisis LC-MS también mostró que el nivel de una serie de metabolitos secundarios de fenilpropanoides derivados de fenilalanina es significativamente mayor en *AroG₁₇₅₋₂₁* en comparación con las plantas de control (Fig. 5G-Z). Estos metabolitos secundarios incluyen: Phe-3-carboxi-2-hidroxi, hexosa de cumarato (I-III), hexosa de ferulato (I-III), un derivado de ácido ferúlico (I-III), hexosa de sinapoil, kaempferol desoxihexosa-hexosa-desoxihexosa, sinapato, coniferina, alcohol sinapílico, malato de sinapoil, desoxihexosa-desoxihexosa de kaempferol, desoxihexosa de kaempferol, cianidina 3-O-[2-(2-(sinapoil)xilosilo)-6-O-(4(glucosilo)-p-cumaroil)glucósido]glucósido]5-[6-O-(malonilo)-glucósido y glucosinolatos de 2-feniletilo. El nivel de algunos metabolitos secundarios derivados de triptófano también fueron significativamente mayores en la línea *AroG₁₇₅₋₂*, incluyendo los glucosinolatos de triptófano derivados de glucosinolatos 4-hidroxi-indolilo-3-metilo, glucosinolatos de 1-metoxiindol, 1-(1H-indol-3-carboxilato de etilo)-glucopiranososa, y glucosinolato de 4-metoxiindol, así como el conjugado IAA; 4-O-(indol-3-acetilo)-dihexosa-(Fig. 5AA-AE). Metabolitos adicionales que sus niveles eran más altos en línea *AroG₁₇₅₋₂₁* incluyen los conjugados de hormona jasmonato (12-hidroxi-jasmonato de hexosa) y derivados de salicilato (hexosa de dihidroxibenzoato y hexosa de hidroxibenzoato), así como los glucosinolatos derivados de Met: glucosinolatos de metilsulfoniloctilo, glucosinolatos de 3-benzoiloxipropilo, glucosinolatos de 7-metiltioheptilo y glucosinolatos de 8-metiltiooctilo (Fig. 5AF-AL).

[0111] Dado que el nivel de triptófano fue mayor en el *AroG₁₇₅₋₂₁*, pero no en el *AroG₁₇₅₋₂*, en comparación con las líneas de control (Fig. 5F), decidimos examinar indirectamente si la expresión *AroG₁₇₅* también influye en el flujo de corismato para triptófano (Fig. 1). Para abordar esta cuestión se utilizó el análogo de triptófano 5-metilo-Trp (5MT) que ralentiza la velocidad de la biosíntesis de triptófano (Widholm JM, 1972. Biochimica et Biophysica Acta 279 (1): 48-57; Kisaka H. et al., 1996. Breeding Science 46: 221-226). Las plantas que son resistentes a 5MT normalmente muestran niveles de triptófano incrementados. Los inventores de la presente invención han demostrado previamente que la expresión del gen *E. coli PheA** (que codifica una deshidratasa de mutasa/preferato de corismato insensible a

retroalimentación bifuncional que convierte corismato a través de prefenato a fenilpiruvato) en *Arabidopsis* hacen las plantas más sensibles al crecimiento en medio que contiene 5MT (Tzin V. et al, 2009. Plant J. 60 (1): 156-67). Como se muestra en la figura 6, el crecimiento de las cuatro líneas que expresan *AroG*₁₇₅ en medio que contiene 5MT era considerablemente mejor que el de las plantas de control, apoyando los datos analíticos que indican que la expresión de *AroG*₁₇₅ regula hacia arriba la biosíntesis de triptófano.

Ejemplo 3: Generación de plantas de tomate transgénicas que expresan una enzima DAHPS insensible a retroalimentación bacteriana y análisis metabólicos iniciales

[0112] Para estudiar la importancia de DAHPS en la regulación de los flujos que hace puente de metabolismo primario y secundario en las plantas, las plantas de tomate fueron transformadas ya sea con genes quiméricos *AroG*₁₇₅ o *AroG*₂₀₉ (Fig. 2, paneles B y C, respectivamente) que codifica las enzimas de DAHPS bacterianas insensibles. Al orientar las enzimas bacterianas en el plástido, donde la vía de shikimato opera en plantas se obtuvo mediante una fusión en el marco de un ADN que codifica un péptido de tránsito de plastidio en el extremo 5' de las secuencias de ADN codificantes de los dos genes quiméricos. Los genes quiméricos también se fusionaron en el marco en su 3' a una etiqueta de epítipo ADN que codifica la hemaglutinina (HA) (Fig. 2 BC). Plantas de tomate T₁ fueron probadas genéticamente para la presencia de inserción *AroG* y la resistencia a kanamicina (datos no mostrados). Las plantas que expresan *AroG*₁₇₅ y *AroG*₂₀₉ transgénicas tenían fenotipos comparables a las plantas de control y eran completamente fértiles (datos no mostrados).

[0113] En la primera etapa de estudiar el efecto de la expresión de los transgenes *AroG*₁₇₅ y *AroG*₂₀₉ sobre el metabolismo de la planta, se realizó el análisis LC-MS para la fruta de tomate maduro a partir de cinco genotipos transformados de forma independiente para cada una de las plantas transgénicas (5-6 análisis independientes de cada genotipo; cada derivado de extractos hechos de ~ 10 plantas), así como plantas WT (cinco análisis independientes). Para obtener una visión global sobre los efectos metabólicos de los genotipos *AroG*₁₇₅ y *AroG*₂₀₉, el conjunto de datos se analizaron por primera vez por una parcela de PCA. En este análisis, el perfil metabólico del control se separó completamente de los genotipos *AroG*₁₇₅ y *AroG*₂₀₉ (Fig. 8A). Curiosamente, también había una cierta separación entre las dos genotipos *AroG*₁₇₅ (*ARO*G₁₇₅₋₆ y *ARO*G₁₇₅₋₁₁) y tres genotipos *AroG*₂₀₉ (*ARO*G₂₀₉₋₄, *ARO*G₂₀₉₋₈ y *ARO*G₂₀₉₋₉) lo que implica un efecto de los diferentes niveles de expresión de la *AroG* insensible a retroalimentación en cada uno de estos genotipos en la medida de la alteración metabólica. Para probar además si expresión *AroG*₁₇₅ y *AroG*₂₀₉ altera los niveles de los aminoácidos aromáticos, sus señales de masa se examinaron específicamente. Los niveles de los tres aminoácidos aromáticos se incrementaron significativamente en los cinco genotipos (Fig 8B). Los metabolitos acumulados en el desarrollo de fruto de tomate obtenido a partir de plantas que expresan *AroG*₂₀₉ se presentan en la Tabla 1. Se muestra un nivel aumentado de un número de metabolitos secundarios de fenilalanina derivados incluyendo antocianinas, flavonoides, cumarato y derivados de cafeoilquinato así como monosacáridos y oligosacáridos.

Tabla 1: La acumulación de metabolitos en el desarrollo de fruto de tomate obtenido a partir de plantas que expresan genes *AroG*₂₀₉₋₉ y en la fruta obtenida a partir de plantas de tomate de tipo salvaje (WT).

Metabolito		Corteza			Pulpo		
		MG	Br	Maduro	MG	Br	Maduro
Aminoácidos							
	Phe	1,0	4,7	89,0	0,9	2,4	22,1
	Tyr	1,6	2,4	171,9	0,9	2,7	15,3
	Trp	0,6	2,2	4,1	0,5	1,4	1,4
	Asn	0,4	0,5	0,5	0,6	0,9	0,5
	Gln	0,1	0,1	0,4	0,3	0,7	0,4
	Gly	0,5	1,3	1,7	1,0	1,2	1,5
	Ile	0,7	1,2	2,2	1,0	1,1	2,0
	N-acetilo-glutamato	0,1	0,2	0,4	0,7	0,8	0,4
	Thr	0,5	1,0	1,1	0,7	1,0	1,2
Ácido orgánico							
	Ácido fumárico	1,5	1,8	2,5	1,0	1,2	1,2
	Ácido prefénico	7,6	354,3	604,8	3,4	276,3	235,9
	Ácido shikímico	2,3	2,5	17,4	1,1	2,5	62,9
Azúcares							
	Celobiosa	0,9	1,3	8,0	1,0	1,2	22,0
	Fructosa	1,7	1,0	1,0	1,2	1,0	1,1
	Fructosa-6-fosfato	0,5	0,8	0,9	0,8	0,7	0,6
	Maltosa	1,3	1,2	1,4	1,2	0,9	1,5
	Manosa	1,7	1,2	1,2	1,1	1,0	1,1
	Rafinosa	1,2	2,0	103,1	0,4	2,8	92,3
	Trehalosa	0,5	0,7	73,6	1,8	0,9	5,3
Poliamina							
	Putrescina	1,1	0,6	0,3	0,8	0,8	0,2
Nucleósidos							
	Guanosina	0,8	0,9	1,9	1,0	0,7	1,6
Fenilpropanoides							
	Ácido 3-Cafeoilquínico	0,9	1,3	2,9	1,9	1,1	2,2
	Ácido 4-Cafeoilquínico	0,7	1,0	2,1	1,3	0,8	1,4
	Ácido coumárico	0,7	2,7	164,8	0,4	2,6	613,6
	Ácido coumárico hexósido or deriv I	N,D	N,D	N,D	1,1	1,8	114,5

Fenilpropanoides							
	Ácido cumárico-hexosa	0,8	0,6	15,3	0,4	0,4	1,1
Metabolito		Corteza			Pulpo		
	Kaempferol-glucosa-ramnosa	1,0	0,9	0,6	1,1	0,9	108,7
	Naringenina	0,9	0,4	0,6	0,5	10,1	1,8
	Naringenina calcona-hexosa IV	0,8	0,7	5,2	N,D	N,D	N,D
	Quercetina	0,4	0,7	2,6	0,2	0,7	1,1
	Quercetina-hexosa-deoxihexosa-pentosa-p-ácido cumárico	1,0	1,1	3,9	N,D	N,D	N,D
	Ácido tricafeoilquínico	0,9	0,7	2,3	0,6	1,2	2,0
Alcaloides esteroideales							
	Dehidrolicoperósido G, F, A	2,8	1,1	2,6	1,5	1,5	2,9
Cartenoides							
	Fitoeno	N,D	N,D	0,2	N,D	N,D	< 0,001
	Fitoflueno	N,D	N,D	0,1	N,D	N,D	< 0,001
	Tipo licopeno	N,D	N,D	0,3	N,D	N,D	0,55

[0114] Los niveles de metabolitos se muestran como cambio de veces $\pm$ SE de cinco (análisis UPLC-qTOF-MS) o seis (análisis de GC-MS) o cuatro muestras independientes (UPLC) en comparación con el WT. Los niveles de metabolitos se presentan como cambio de veces ($AroG_{209-2}/WT$) en cada etapa de desarrollo. Las tres etapas de desarrollo son: verde maduro (MG; ~ 42 días después de la antesis (DPA)), interruptor (Br; ~ 44 DPA) y rojo (rojo; ~ 48 DPA) y se separaron a corteza y pulpo. Valores P se muestran como $<0,05$ (FDR). Términos en negrita indican un aumento estadísticamente significativo como analizados por ANOVA de dos vías y la prueba t de Student. N. D. no detectado.

Ejemplo 4: Análisis metabólico de los frutos de tomate que expresan el gen *AroG*₂₀₉

[0115] El efecto de expresión *AroG*₂₀₉ de generación T2 en una amplia gama de metabolitos primarios y secundarios se examinó en genotipos *AroG*₂₀₉₋₉ homocigotos transformados seleccionados. Este genotipo contenía una sola inserción, basada en PCR y resistencia a los antibióticos. Con el fin de estudiar los efectos de expresión *AroG*₂₀₉ sobre el metabolismo del fruto de tomate, fruto de tomate en tres etapas de desarrollo fueron sometidos a análisis Lc-MA: verde maduro (alrededor de 42 días después de la antesis (DPA)); disyuntor (alrededor de 44 DPA); y rojo (aproximadamente 48 DPA). 5-6 análisis independientes de *AroG*₂₀₉ y genotipos WT en cada etapa de desarrollo fueron examinados. Cada análisis se derivó de extractos hechos de tres frutas recolectadas a partir de 10 plantas. Para obtener una visión global de los efectos metabólicos de la expresión *AroG*₂₀₉ en tejido piel de tomate, un PCA se realizó de conjuntos de datos obtenidos a partir de 2.725 señales de masas en modo de ión negativo. Curiosamente, la fase verde madura tanto de *AroG*₂₀₉₋₉ como WT se combinan, una separación débil se produce en la etapa de interruptor y una separación completa se produce en la etapa roja (Fig. 9A). Parcelas de PCA de perfiles metabólicos obtenidos por análisis UPCL-QTOF se presenta en la Fig. 9B. El cambio de veces más significativamente se produjo en la etapa de desarrollo de color rojo y el nivel de señales de masa 1.000 únicas se incrementó significativamente. El nivel de los tres aminoácidos aromáticos fue significativamente mayor en la etapa de rojo de genotipo *AroG*₂₀₉₋₉, con mayor aumento en el nivel de fenilalanina y tirosina (Fig. 10 y en la Tabla 1). El análisis metabólico también mostró que el aumento de los niveles de una serie de fenilpropanoides de fenilalanina derivados de metabolitos secundarios, así como el producto catabólico de la tirosina. El panel organoléptico que ensayó fruta roja madura obtenida a partir de planta *AroG*₂₀₉₋₉ que expresa fruta determinó que la fruta poseía mejor sabor floral (Fig. 11).

Ejemplo 5: Efectos de la expresión *AroG*₁₇₅ en las redes de expresión génica

[0116] Se estudió el efecto de la expresión *AroG*₁₇₅ del transcriptoma mundial de Arabidopsis. Un análisis de micromatrices se realizó con muestras extraídas de tejidos aéreos de 10 días de control de edad y plántulas *AroG*₁₇₅₋₂, utilizando el Affymetrix ATH1 GeneChip. Se seleccionó la línea *AroG*₁₇₅₋₂ que se mostró tener un cambio moderado en el metabolito, para reducir la posibilidad de efectos pleiotrópicos. El análisis ANOVA de los resultados de microensayos siguió múltiples hipótesis la prueba utilizando un corte de FDR al 5%, indicando que la expresión de un número relativamente pequeño de genes (109 genes) mostró un cambio significativo y por lo menos de 2 veces entre el control y línea *AroG*₁₇₅₋₂, lo que indica un efecto relativamente moderado de expresión *AroG* en el transcriptoma de Arabidopsis.

[0117] Los genes que fueron consistentemente regulados hacia arriba (77 genes) y hacia abajo (32 genes) se clasificaron por análisis de representación excesiva usando las herramientas de software PageMan y MapMan (<http://mapman.mpimgolm.mpg.de/general/ora/ora.shtml>; (Usadel et al 2006, *supra*). Los principales efectos del gen *AroG*₁₇₅₋₂ incluía una estimulación de la expresión de 37 genes relacionados con el estrés biótico (Tablas 2 y 3).

Tabla 2: Categorías sobre representadas de gen regulado hacia arriba (mínimo aumento en dos veces)

BIN (número de categoría) Página Man	Categoría principal	Sub categoría (1)	Sub categoría (2)	número de conjunto de sonda	Valor P (FDR)
10	Pared celular			3	1,2E-08
10,8		Pectinesterasas		2	5,4E-06
12	Metabolismo de nitrato			3	5,4E-06
12,1,1		Reductasa de nitrato		2	5,4E-06
16	Metabolismo secundario			7	2,9E-19
16,2		Fenilpropanoides		2	5,4E-06
16,4		N misc		3	1,2E-08
16,4,1			Tipo alcaloide	3	1,2E-08
17	Metabolismo de hormona			4	2,8E-11
17,4		Citoquinina		2	5,4E-06
17,4,2			Citoquinina-transducción de señal	2	5,4E-06
20	Estrés			10	2,7E-27
20,1		Estrés biótico		9	1,3E-24
21	Regulación de redox			3	1,2E-08
27	ARN			12	1,1E-32
27,3		Regulación de transcripción		12	1,1E-32
27,3,26			MYB - familia de factor de transcripción	2	5,4E-06
27,3,3			AP2/EREBP, APETALA2/ Etileno- familia de proteína de unión a elemento responsivo	2	5,4E-06
27,3,5			ARR-familia de factor de transcripción	2	5,4E-06
27,3,7			C2C2(Zn) familia de dedo de zinc tipo constans (reloj circadiano)	2	5,4E-06
29	Proteína			2	5,4E-06
29,4		modificación postranslacional		2	5,4E-06
30	Señalización			7	2,9E-19
30,2		Quinasas de receptor		3	1,2E-08
30,3		Calcio		4	2,8E-11
33	Desarrollo			3	1,2E-08
34	Transporte			5	6,2E-14

Tabla 3: Categorías sobre representadas de genes regulados hacia abajo (mínimo disminución en dos veces)

BIN (número de categoría) Página Man	Categoría principal	Sub categoría (1)	Sub categoría (2)	número de conjunto de sonda	Valor P (FDR)
11	Metabolismo lípido			2	9,2E-07
27,3	ARN	Regulación de transcripción		8	3,1E-25
27,3,66			Familia de factor de transcripción Psudo ARR	2	9,2E-07
27,3,7			C2C2(Zn) familia de dedo de zinc tipo constans (reloj circadiano)	3	8,4E-10
29	Proteína			2	9,2E-07
29,5		Degradación de proteína		2	9,2E-07

[0118] La categoría de estrés biótico incluía genes asociados con el metabolismo de hormonas (citoquininas, ácido abscísico, salicilato y jasmonato), factores de transcripción (MYBs, WRKYs y APETALA2/proteínas de unión de elemento sensible a etileno), señalización (genes AAR de calcio y citoquinina), la patogénesis (proteínas PR), resistencia a las enfermedades (proteínas TIR-NB), los transportadores y la regulación redox. Además, se indujeron los genes que supuestamente codifican proteínas asociadas con el metabolismo secundario, incluyendo el metabolismo de fenilpropanoide, glucosinolatos Met-alifáticos y un gen asociado con indol-glucosinolatos Trp-derivados. Otra categoría enriquecida muestra que una mayor expresión se asoció con la asimilación de nitrato. Notablemente, el nivel de expresión de 16 genes, categorizados como genes asociados con el reloj circadiano, también se indujo en el transcriptoma *AroG₁₇₅₋₂*. Estos genes relacionados con reloj circadiano incluían los que codifican factores de transcripción MYB, las proteínas de tipo caja B de dedo de zinc con un dominio de unión de ADN-CCT y otros tres genes, que codifican proteínas asociadas con la cascada de reloj circadiano incluyendo *TOC1*, *regulador de Pseudo-respuesta* y *ELF4* (floración temprana 4). Para corroborar los resultados de microensayos, un análisis cuantitativo de RT-PCR se realizó también en una muestra representativa de genes cuyo nivel de ARNm fue mayor en el *AroG₁₇₅₋₂* que en la línea de control en el análisis de microensayos. Este análisis, que se realizó en líneas tanto *AroG₁₇₅₋₂* como *AroG₁₇₅₋₂₁*, confirmó los resultados de expresión génica obtenidos por el análisis de microensayos.

Ejemplo 6: Perfil aromático de fruta de *AroG₂₀₉₋₉* expresar plantas de tomate

[0119] Un panel de 10 expertos de sabor entrenados evaluaron el aroma de muestras de fruta obtenidas de plantas de tomate que expresan el gen *AroG₂₀₉₋₉*. Las pruebas preliminares se llevaron a cabo para mejorar la capacidad de los evaluadores para reconocer defectos de olor y consistentemente cuantificar propiedades sensoriales. Los panelistas previamente habían sido entrenados en la descripción cuantitativa de los atributos de tomate de acuerdo con los ensayos de selección basados en normas francesas (ISO8586-1, AFNOR V09-003). Para cada muestra de fruta, aromas evaluaron las frutas enteras para elaborar perfiles de corteza y cortar las frutas - para la evaluación de la pulpa. La evaluación de aroma se llevó a cabo por oler las muestras de todos los miembros del panel. Varios atributos fueron elegidos: ácido floral, fresco, verde, mohoso metálico, maduro, especiado y dulce, además de la intensidad global de aroma. Los valores de puntuación fueron entre 0 (ninguno) a 5 (muy fuerte). Cuando se hayan completado, los miembros del grupo examinaron sus puntuaciones y coincidieron en la última puntuación de resumen de cada grupo de aroma. Los resultados se resumen en la Fig. 11, demostrando que varios atributos de aroma son más significativos en la fruta obtenida a partir de la planta transgénica en comparación con la fruta de plantas de tomate de tipo salvaje.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0120]

<110> YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.

<120> PLANTAS TRANSGÉNICAS QUE TIENEN ACTIVIDAD DE SINTETASA DAHP ALTERADA

<130> YEDA/0104 PCT

<150> 61/361549

<151> 2010-07-06

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

5

<210> 1

<211> 350

<212> PRT

<213> Escherichia coli

10

<400> 1

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 648 259 T3

5 Met Asn Tyr Gln Asn Asp Asp Leu Arg Ile Lys Glu Ile Lys Glu Leu
 1 5 10 15
 10 Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Glu Lys Phe Pro Ala Thr Glu Asn Ala
 20 25 30
 15 Ala Asn Thr Val Ala His Ala Arg Lys Ala Ile His Lys Ile Leu Lys
 35 40 45
 20 Gly Asn Asp Asp Arg Leu Leu Val Val Ile Gly Pro Cys Ser Ile His
 50 55 60
 25 Asp Pro Val Ala Ala Lys Glu Tyr Ala Thr Arg Leu Leu Ala Leu Arg
 65 70 75 80
 30 Glu Glu Leu Lys Asp Glu Leu Glu Ile Val Met Arg Val Tyr Phe Glu
 85 90 95
 35 Lys Pro Arg Thr Thr Val Gly Trp Lys Gly Leu Ile Asn Asp Pro His
 100 105 110
 40 Met Asp Asn Ser Phe Gln Ile Asn Asp Gly Leu Arg Ile Ala Arg Lys
 115 120 125
 45 Leu Leu Leu Asp Ile Asn Asp Ser Gly Leu Pro Ala Ala Gly Glu Phe
 130 135 140
 50 Leu Asp Met Ile Thr Pro Gln Tyr Leu Ala Asp Leu Met Ser Trp Gly
 145 150 155 160
 55 Ala Ile Gly Ala Arg Thr Thr Glu Ser Gln Val His Arg Glu Leu Ala
 165 170 175
 60 Ser Gly Leu Ser Cys Pro Val Gly Phe Lys Asn Gly Thr Asp Gly Thr
 180 185 190

ES 2 648 259 T3

5 Ile Lys Val Ala Ile Asp Ala Ile Asn Ala Ala Gly Ala Pro His Cys
 195 200 205
 Phe Leu Ser Val Thr Lys Trp Gly His Ser Ala Ile Val Asn Thr Ser
 210 215 220
 10 Gly Asn Gly Asp Cys His Ile Ile Leu Arg Gly Gly Lys Glu Pro Asn
 225 230 235 240
 Tyr Ser Ala Lys His Val Ala Glu Val Lys Glu Gly Leu Asn Lys Ala
 245 250 255
 15 Gly Leu Pro Ala Gln Val Met Ile Asp Phe Ser His Ala Asn Ser Ser
 260 265 270
 20 Lys Gln Phe Lys Lys Gln Met Asp Val Cys Ala Asp Val Cys Gln Gln
 275 280 285
 25 Ile Ala Gly Gly Glu Lys Ala Ile Ile Gly Val Met Val Glu Ser His
 290 295 300
 Leu Val Glu Gly Asn Gln Ser Leu Glu Ser Gly Glu Pro Leu Ala Tyr
 305 310 315 320
 30 Gly Lys Ser Ile Thr Asp Ala Cys Ile Gly Trp Glu Asp Thr Asp Ala
 325 330 335
 35 Leu Leu Arg Gln Leu Ala Asn Ala Val Lys Ala Arg Arg Gly
 340 345 350
 <210> 2
 <211> 350
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Mutante de E. coli AroG175
 45 <400> 2
 50 Met Asn Tyr Gln Asn Asp Asp Leu Arg Ile Lys Glu Ile Lys Glu Leu
 1 5 10 15
 Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Glu Lys Phe Pro Ala Thr Glu Asn Ala
 20 25 30
 55 Ala Asn Thr Val Ala His Ala Arg Lys Ala Ile His Lys Ile Leu Lys
 35 40 45
 60 Gly Asn Asp Asp Arg Leu Leu Val Val Ile Gly Pro Cys Ser Ile His
 50 55 60
 65

ES 2 648 259 T3

5 Asp Pro Val Ala Ala Lys Glu Tyr Ala Thr Arg Leu Leu Ala Leu Arg
 65 70 75 80
 Glu Glu Leu Lys Asp Glu Leu Glu Ile Val Met Arg Val Tyr Phe Glu
 85 90 95
 10 Lys Pro Arg Thr Thr Val Gly Trp Lys Gly Leu Ile Asn Asp Pro His
 100 105 110
 15 Met Asp Asn Ser Phe Gln Ile Asn Asp Gly Leu Arg Ile Ala Arg Lys
 115 120 125
 Leu Leu Leu Asp Ile Asn Asp Ser Gly Leu Pro Ala Ala Gly Glu Phe
 130 135 140
 20 Leu Asp Met Ile Thr Pro Gln Tyr Leu Ala Asp Leu Met Ser Trp Gly
 145 150 155 160
 25 Ala Ile Gly Ala Arg Thr Thr Glu Ser Gln Val His Arg Glu Gln Ala
 165 170 175
 30 Ser Gly Leu Ser Cys Pro Val Gly Phe Lys Asn Gly Thr Asp Gly Thr
 180 185 190
 Ile Lys Val Ala Ile Asp Ala Ile Asn Ala Ala Gly Ala Pro His Cys
 195 200 205
 35 Phe Leu Ser Val Thr Lys Trp Gly His Ser Ala Ile Val Asn Thr Ser
 210 215 220
 40 Gly Asn Gly Asp Cys His Ile Ile Leu Arg Gly Gly Lys Glu Pro Asn
 225 230 235 240
 45 Tyr Ser Ala Lys His Val Ala Glu Val Lys Glu Gly Leu Asn Lys Ala
 245 250 255
 Gly Leu Pro Ala Gln Val Met Ile Asp Phe Ser His Ala Asn Ser Ser
 260 265 270
 50 Lys Gln Phe Lys Lys Gln Met Asp Val Cys Ala Asp Val Cys Gln Gln
 275 280 285
 55 Ile Ala Gly Gly Glu Lys Ala Ile Ile Gly Val Met Val Glu Ser His
 290 295 300
 60 Leu Val Glu Gly Asn Gln Ser Leu Glu Ser Gly Glu Pro Leu Ala Tyr
 305 310 315 320
 Gly Lys Ser Ile Thr Asp Ala Cys Ile Gly Trp Glu Asp Thr Asp Ala
 325 330 335

Leu Leu Arg Gln Leu Ala Asn Ala Val Lys Ala Arg Arg Gly
340 345 350

5

<210> 3
<211> 1050
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> polinucleótido que codifica el mutante E. coli AroG175

15 <400> 3

	atgaattatc agaacgacga ttacgcacgc aaagaaatca aagagttact tcctcctgtc	60
20	gcattgctgg aaaaattccc cgctactgaa aatgccgcga atacggttgc ccatgcccga	120
	aaagcgatcc ataagatcct gaaaggtaat gatgatcgcc tgttggttgt gattggccca	180
	tgctcaattc atgatcctgt cgcggcaaaa gagtatgcca ctcgcttgct ggcgctgcgt	240
25	gaagagctga aagatgagct ggaatcgcga atgcgcgtct attttgaaaa gccgcgtacc	300
	acggtgggct ggaaagggct gattaacgat ccgcatatgg ataatagctt ccagatcaac	360
	gacggtctgc gtatagcccg taaattgctg cttgatatta acgacagcgg tctgccagcg	420
30	gcagggtgagt ttctcgatat gatcacccca caatatctcg ctgacctgat gagctggggc	480
	gcaattggcg cacgtaccac cgaatcgag gtgcaccgcg aacaggcatc agggctttct	540
	tgtccggctg gcttcaaaaa tggcaccgac ggtacgatta aagtggctat cgatgccatt	600
35	aatgccgccg gtgcgccgca ctgcttcctg tccgtaacga aatgggggca ttcggcgatt	660
	gtgaatacca gcggtaacgg cgattgccat atcattctgc gcggcggtaa agagcctaac	720
	tacagcgcga agcacgttgc tgaagtgaag gaagggtga acaaagcagg cctgccagca	780
40	caggatgatga tcgatttcag ccatgctaac tcgtccaaac aattcaaaaa gcagatggat	840
	gtttgtgctg acgtttgcca gcagattgcc ggtggcgaaa aggccattat tggcgatg	900
	gtggaaagcc atctggtgga aggcaatcag agcctcgaga gcggggagcc gctggcctac	960
45	ggtaagagca tcaccgatgc ctgcatcgcc tgggaagata ccgatgctct gttacgtcaa	1020
	ctggcgaatg cagtaaaagc gcgtcgcggg	1050

50 <210> 4
<211> 350
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> mutante E. coli AroG209

<400> 4

60	Met Asn Tyr Gln Asn Asp Asp Leu Arg Ile Lys Glu Ile Lys Glu Leu	1 5 10 15
----	---	-----------

65	Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Glu Lys Phe Pro Ala Thr Glu Asn Ala	20 25 30
----	---	----------

ES 2 648 259 T3

5 Ala Asn Thr Val Ala His Ala Arg Lys Ala Ile His Lys Ile Leu Lys
 35 40 45
 10 Gly Asn Asp Asp Arg Leu Leu Val Val Ile Gly Pro Cys Ser Ile His
 50 55 60
 15 Asp Pro Val Ala Ala Lys Glu Tyr Ala Thr Arg Leu Leu Ala Leu Arg
 65 70 75 80
 20 Glu Glu Leu Lys Asp Glu Leu Glu Ile Val Met Arg Val Tyr Phe Glu
 85 90 95
 25 Lys Pro Arg Thr Thr Val Gly Trp Lys Gly Leu Ile Asn Asp Pro His
 100 105 110
 30 Met Asp Asn Ser Phe Gln Ile Asn Asp Gly Leu Arg Ile Ala Arg Lys
 115 120 125
 35 Leu Leu Leu Asp Ile Asn Asp Ser Gly Leu Pro Ala Ala Gly Glu Phe
 130 135 140
 40 Leu Asp Met Ile Thr Pro Gln Tyr Leu Ala Asp Leu Met Ser Trp Gly
 145 150 155 160
 45 Ala Ile Gly Ala Arg Thr Thr Glu Ser Gln Val His Arg Glu Leu Ala
 165 170 175
 50 Ser Gly Leu Ser Cys Pro Val Gly Phe Lys Asn Gly Thr Asp Gly Thr
 180 185 190
 55 Ile Lys Val Ala Ile Asp Ala Ile Asn Ala Ala Gly Ala Pro His Cys
 195 200 205
 60 Ala Leu Ser Val Thr Lys Trp Gly His Ser Ala Ile Val Asn Thr Ser
 210 215 220
 65 Gly Asn Gly Asp Cys His Ile Ile Leu Arg Gly Gly Lys Glu Pro Asn
 225 230 235 240
 Tyr Ser Ala Lys His Val Ala Glu Val Lys Glu Gly Leu Asn Lys Ala
 245 250 255
 Gly Leu Pro Ala Gln Val Met Ile Asp Phe Ser His Ala Asn Ser Ser
 260 265 270
 Lys Gln Phe Lys Lys Gln Met Asp Val Cys Ala Asp Val Cys Gln Gln
 275 280 285
 Ile Ala Gly Gly Glu Lys Ala Ile Ile Gly Val Met Val Glu Ser His
 290 295 300

ES 2 648 259 T3

Leu Val Glu Gly Asn Gln Ser Leu Glu Ser Gly Glu Pro Leu Ala Tyr
305 310 315 320

5 Gly Lys Ser Ile Thr Asp Ala Cys Ile Gly Trp Glu Asp Thr Asp Ala <210>
325 330 335 5
<211>
1052
<212>
ADN
<213>

Leu Leu Arg Gln Leu Ala Asn Ala Val Lys Ala Arg Arg Gly
340 345 350

Secuencia artificial

15 <220>
<223> polinucleótido que codifica el mutante E. coli AroG209
<400> 5

20 tgatgaatta tcagaacgac gatttacgca tcaaagaaat caaagagtta cttcctcctg 60
tcgcattgct ggaaaaattc cccgctactg aaaatgccgc gaatacgggt gcccatgccc 120
25 gaaaagcgat ccataagatc ctgaaaggta atgatgatcg cctgttggtt gtgattggcc 180
catgctcaat tcatgatcct gtcgcggcaa aagagtatgc cactcgcttg ctggcgctgc 240
gtgaagagct gaaagatgag ctggaaatcg taatgcgcgt ctattttgaa aagccgcgta 300
30 ccacgggtggg ctggaaaggg ctgattaacg atccgcatat ggataatagc ttccagatca 360
acgacgggtct gcgtatagcc cgtaaattgc tgcttgatat taacgacagc ggtctgccag 420
cggcaggtga gtttctcgat atgatcacc cacaatatct cgctgacctg atgagctggg 480
35 gcgcaattgg cgcacgtacc accgaatcgc aggtgcaccg cgaactggca tcagggcttt 540
cttgtccggt cggcttcaaa aatggcaccg acggtacgat taaagtggct atcgatgcca 600
ttaatgccgc cgggtgcgcc cactgcgcc tgtccgtaac gaaatggggg cattcggcga 660
40 ttgtgaatac cagcggtaac ggcgattgcc atatcattct gcgcggcggt aaagagccta 720
actacagcgc gaagcacgtt gctgaagtga aagaagggt gaacaaagca ggcctgccag 780
cacaggatgat gatcgatttc agccatgcta actcgtccaa acaattcaaa aagcagatgg 840
45 atgtttgtgc tgacgtttgc cagcagattg ccggtggcga aaaggccatt attggcgtga 900
tggtggaaag ccatctggtg gaaggcaatc agagcctcga gagcggggag ccgctggcct 960
acggtaagag catcaccgat gcctgcatcg gctgggaaga taccgatgct ctgttacgtc 1020
50 aactggcgaa tgcagtaaaa gcgcgtcgcg gg 1052

<210> 6
<211> 187
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> polinucleótido que codifica péptido de tránsito de plastidio guisante rbcS3
60 <400> 6

65

ES 2 648 259 T3

	gtcgactaga aaatggcttc tatgatatcc tcttcagctg tgactacagt cagccgtgct	60
	tctacggtgc aatcggccgc ggtggctcca ttcggcggcc tcaaattccat gactggattc	120
5	ccagttaaga aggtcaacac tgacattact tccattacaa gcaatggtgg aagagtaaag	180
	tgcatgc	187
10	<210> 7 <211> 105 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> secuencia polinucleotídica que codifica tres repeticiones de etiqueta de epítipo HA <400> 7	
20	atcttttacc catac gatgt tcctgactat gcgggctatc cctatgacgt cccggactat	60
	gcaggatcct atccatatga cgttccagat tacgctgctc agtag	105
25	<210> 8 <211> 445 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Polipéptido TP-AroG175-3HA <400> 8	
35	Met Ala Ser Met Ile Ser Ser Ser Ala Val Thr Thr Val Ser Arg Ala	
	1 5 10 15	
40	Ser Thr Val Gln Ser Ala Ala Val Ala Pro Phe Gly Gly Leu Lys Ser	
	20 25 30	
45	Met Thr Gly Phe Pro Val Lys Lys Val Asn Thr Asp Ile Thr Ser Ile	
	35 40 45	
50	Thr Ser Asn Gly Gly Arg Val Lys Cys Met Leu Met Asn Tyr Gln Asn	
	50 55 60	
55	Asp Asp Leu Arg Ile Lys Glu Ile Lys Glu Leu Leu Pro Pro Val Ala	
	65 70 75 80	
60	Leu Leu Glu Lys Phe Pro Ala Thr Glu Asn Ala Ala Asn Thr Val Ala	
	85 90 95	
65	His Ala Arg Lys Ala Ile His Lys Ile Leu Lys Gly Asn Asp Asp Arg	
	100 105 110	
70	Leu Leu Val Val Ile Gly Pro Cys Ser Ile His Asp Pro Val Ala Ala	
	115 120 125	
75	Lys Glu Tyr Ala Thr Arg Leu Leu Ala Leu Arg Glu Glu Leu Lys Asp	
	130 135 140	
	30	

ES 2 648 259 T3

5	Glu 145	Leu	Glu	Ile	Val	Met 150	Arg	Val	Tyr	Phe	Glu 155	Lys	Pro	Arg	Thr	Thr 160
10	Val	Gly	Trp	Lys	Gly 165	Leu	Ile	Asn	Asp	Pro 170	His	Met	Asp	Asn	Ser 175	Phe
15	Gln	Ile	Asn	Asp 180	Gly	Leu	Arg	Ile	Ala 185	Arg	Lys	Leu	Leu	Leu 190	Asp	Ile
20	Asn	Asp	Ser 195	Gly	Leu	Pro	Ala	Ala 200	Gly	Glu	Phe	Leu	Asp 205	Met	Ile	Thr
25	Pro	Gln 210	Tyr	Leu	Ala	Asp	Leu 215	Met	Ser	Trp	Gly	Ala 220	Ile	Gly	Ala	Arg
30	Thr 225	Thr	Glu	Ser	Gln	Val 230	His	Arg	Glu	Gln	Ala 235	Ser	Gly	Leu	Ser	Cys 240
35	Pro	Val	Gly	Phe	Lys 245	Asn	Gly	Thr	Asp	Gly 250	Thr	Ile	Lys	Val	Ala 255	Ile
40	Asp	Ala	Ile	Asn 260	Ala	Ala	Gly	Ala	Pro 265	His	Cys	Phe	Leu	Ser 270	Val	Thr
45	Lys	Trp	Gly 275	His	Ser	Ala	Ile	Val 280	Asn	Thr	Ser	Gly	Asn 285	Gly	Asp	Cys
50	His	Ile 290	Ile	Leu	Arg	Gly	Gly 295	Lys	Glu	Pro	Asn	Tyr 300	Ser	Ala	Lys	His
55	Val 305	Ala	Glu	Val	Lys	Glu 310	Gly	Leu	Asn	Lys	Ala 315	Gly	Leu	Pro	Ala	Gln 320
60	Val	Met	Ile	Asp	Phe 325	Ser	His	Ala	Asn	Ser 330	Ser	Lys	Gln	Phe	Lys 335	Lys
65	Gln	Met	Asp	Val 340	Cys	Ala	Asp	Val	Cys 345	Gln	Gln	Ile	Ala	Gly 350	Gly	Glu
70	Lys	Ala	Ile 355	Ile	Gly	Val	Met	Val 360	Glu	Ser	His	Leu	Val 365	Glu	Gly	Asn
75	Gln	Ser 370	Leu	Glu	Ser	Gly	Glu 375	Pro	Leu	Ala	Tyr	Gly 380	Lys	Ser	Ile	Thr
80	Asp 385	Ala	Cys	Ile	Gly	Trp 390	Glu	Asp	Thr	Asp	Ala 395	Leu	Leu	Arg	Gln	Leu 400
85	Ala	Asn	Ala	Val	Lys 405	Ala	Arg	Arg	Gly	Glu 410	Phe	Ile	Phe	Tyr	Pro 415	Tyr

5

10 Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
420 425 430

15 Gly Ser Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ala Gln
435 440 445

<210> 9

<211> 445

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido TP-AroG209-3HA

25 <400> 9

30

35

40

45

50

55

60

65

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Met Ala Ser Met Ile Ser Ser Ser Ala Val Thr Thr Val Ser Arg Ala
1 5 10 15
Ser Thr Val Gln Ser Ala Ala Val Ala Pro Phe Gly Gly Leu Lys Ser
20 25 30
Met Thr Gly Phe Pro Val Lys Lys Val Asn Thr Asp Ile Thr Ser Ile
35 40 45
Thr Ser Asn Gly Gly Arg Val Lys Cys Met Leu Met Asn Tyr Gln Asn
50 55 60
Asp Asp Leu Arg Ile Lys Glu Ile Lys Glu Leu Leu Pro Pro Val Ala
65 70 75 80
Leu Leu Glu Lys Phe Pro Ala Thr Glu Asn Ala Ala Asn Thr Val Ala
85 90 95
His Ala Arg Lys Ala Ile His Lys Ile Leu Lys Gly Asn Asp Asp Arg
100 105 110
Leu Leu Val Val Ile Gly Pro Cys Ser Ile His Asp Pro Val Ala Ala
115 120 125
Lys Glu Tyr Ala Thr Arg Leu Leu Ala Leu Arg Glu Glu Leu Lys Asp
130 135 140
Glu Leu Glu Ile Val Met Arg Val Tyr Phe Glu Lys Pro Arg Thr Thr
145 150 155 160
Val Gly Trp Lys Gly Leu Ile Asn Asp Pro His Met Asp Asn Ser Phe
165 170 175
Gln Ile Asn Asp Gly Leu Arg Ile Ala Arg Lys Leu Leu Leu Asp Ile
180 185 190
Asn Asp Ser Gly Leu Pro Ala Ala Gly Glu Phe Leu Asp Met Ile Thr
195 200 205

5

10 Pro Gln Tyr Leu Ala Asp Leu Met Ser Trp Gly Ala Ile Gly Ala Arg
210 215 220

15 Thr Thr Glu Ser Gln Val His Arg Glu Leu Ala Ser Gly Leu Ser Cys
225 230 235 240

20 Pro Val Gly Phe Lys Asn Gly Thr Asp Gly Thr Ile Lys Val Ala Ile
245 250 255

25 Asp Ala Ile Asn Ala Ala Gly Ala Pro His Cys Ala Leu Ser Val Thr
260 265 270

30 Lys Trp Gly His Ser Ala Ile Val Asn Thr Ser Gly Asn Gly Asp Cys
275 280 285

35 His Ile Ile Leu Arg Gly Gly Lys Glu Pro Asn Tyr Ser Ala Lys His
290 295 300

40 Val Ala Glu Val Lys Glu Gly Leu Asn Lys Ala Gly Leu Pro Ala Gln
305 310 315 320

45 Val Met Ile Asp Phe Ser His Ala Asn Ser Ser Lys Gln Phe Lys Lys
325 330 335

50 Gln Met Asp Val Cys Ala Asp Val Cys Gln Gln Ile Ala Gly Gly Glu
340 345 350

55 Lys Ala Ile Ile Gly Val Met Val Glu Ser His Leu Val Glu Gly Asn
355 360 365

60 Gln Ser Leu Glu Ser Gly Glu Pro Leu Ala Tyr Gly Lys Ser Ile Thr
370 375 380

65 Asp Ala Cys Ile Gly Trp Glu Asp Thr Asp Ala Leu Leu Arg Gln Leu
385 390 395 400

Ala Asn Ala Val Lys Ala Arg Arg Gly Glu Phe Ile Phe Tyr Pro Tyr
405 410 415

70 Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
420 425 430

75 Gly Ser Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ala Gln
435 440 445

<210> 10
 <211> 31
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador sintético

 10 <400> 10
 catgcatgct gatgaattat cagaacgacg a 31

 <210> 11
 <211> 27
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador sintético
 20
 <400> 11
 gcgacgcgct ttactg ggaattcccc 27

 <210> 12
 25 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> cebador sintético

 <400> 12
 gtgcaccgcg aacaggcatc agggctt 27

 35 <210> 13
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> cebador sintético

 <400> 13
 45 aagccctgat gcctgttcgc ggtgcac 27

 <210> 14
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> cebador sintético

 <400> 14
 55 gcgccgcact gcgccctgtc cgtaacg 27

 <210> 15
 <211> 27
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador sintético

 65 <400> 15
 cgttacggac agggcgcagt gcggcgc 27

ES 2 648 259 T3

<210> 16
 <211> 1053
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 16

10	atgaattatc agaacgacga ttacgcatc aaagaaatca aagagttact tcctcctgtc	60
	gcattgctgg aaaaattccc cgctactgaa aatgccgcga atacggttgc ccatgcccga	120
	aaagcgatcc ataagatcct gaaaggtaat gatgatcgcc tgttggttgt gattggccca	180
15	tgctcaattc atgatacctgt cgcggcaaaa gagtatgcca ctgccttgct ggcgctgcgt	240
	gaagagctga aagatgagct ggaaatcgta atgcgcgtct attttgaana gccgcgtacc	300
	acggtgggct ggaaagggct gattaacgat ccgcatatgg ataatagctt ccagatcaac	360
20	gacgggtctgc gtatagcccc taaattgctg cttgatatta acgacagcgg tctgccagcg	420
	gcaggtgagt ttctcgatat gatcaccca caatatctcg ctgacctgat gagctggggc	480
	gcaattggcg cacgtaccac cgaatcgag gtgcaccgcg aactggcatc agggctttct	540
25	tgtccggtcg gcttcaaaaa tggcaccgac ggtacgatta aagtggctat cgatgccatt	600
	aatgccgccg gtgcgccgca ctgcttcctg tccgtaacga aatgggggca ttcggcgatt	660
	gtgaatacca gcggtaacgg cgattgccat atcattctgc gcggcggtaa agagcctaac	720
30	tacagcgcgga agcacgttgc tgaagtgaana gaagggtga acaaagcagg cctgccagca	780
	caggatgatga tcgatttcag ccatgctaac tcgtccaaac aattcaaaaa gcagatggat	840
	gtttgtgctg acgtttgcca gcagattgcc ggtggcgaaa aggccattat tggcgtgatg	900
35	gtggaaagcc atctggtgga aggcaatcag agcctcgaga gcggggagcc gctggcctac	960
	ggtaagagca tcaccgatgc ctgcatcggc tgggaagata ccgatgctct gttacgtcaa	1020
	ctggcgaatg cagtaaaagc gcgtcgcggg taa	1053

40

45

50

55

60

65

5 Reivindicaciones

1. Una planta transgénica que comprende al menos una célula vegetal que comprende un polinucleótido exógeno que codifica sintasa de 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHPS) que tiene al menos una mutación puntual en una posición seleccionada del grupo que consiste de posición 150, 175, 179 y 209 del tipo salvaje *de E. coli AroG* DAHPS que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1, donde dicha al menos una mutación puntual reduce la sensibilidad a la inhibición por retroalimentación por fenilalanina, y en la que la planta transgénica comprende una cantidad incrementada de dicha fenilalanina en comparación con una planta no transgénica correspondiente.
2. La planta transgénica de la reivindicación 1, en la que prolina en la posición 150 se sustituye por leucina (P150L), leucina en la posición 175 se sustituye por glutamina (L175Q), leucina en la posición 179 se sustituye por ácido aspártico (L179D) y fenilalanina en la posición 209 es reemplazada por alanina (F209A).
3. La planta transgénica de la reivindicación 2, en la que el polinucleótido codifica mutante *E. coli AroG* DAHPS que tiene una sensibilidad reducida a la inhibición por retroalimentación por fenilalanina, en la que leucina en la posición 175 se sustituye por glutamina (L175Q), que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2, preferiblemente en la que el polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 3; o en la que el polinucleótido codifica mutante *E. coli AroG* DAHPS que tiene una sensibilidad reducida a la inhibición por retroalimentación por fenilalanina, en la que la fenilalanina en la posición 209 se sustituye por alanina (F209A), que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4, preferiblemente en la que el polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 5.
4. Una semilla de planta producida por la planta transgénica de la reivindicación 1 y que comprende un polinucleótido exógeno que codifica la sintasa de 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHPS) que tiene al menos una mutación puntual en una posición seleccionada del grupo que consiste de posición 150, 175, 179 y 209 del tipo salvaje *de E. coli AroG* DAHPS que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1, donde dicha al menos una mutación puntual reduce la sensibilidad a la inhibición por retroalimentación por fenilalanina, y en la que la semilla es capaz de cría de una planta transgénica que tiene una mayor cantidad de dicha fenilalanina en comparación con una planta no transgénica correspondiente.
5. Un cultivo de tejido que comprende al menos una célula transgénica de la planta de la reivindicación 1 o un protoplasto derivado del mismo, la planta o protoplastos que comprende un polinucleótido exógeno que codifica sintasa de 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfatasa (DAHPS) que tiene al menos una mutación puntual en una posición seleccionada del grupo que consiste de posición 150, 175, 179 y 209 del tipo salvaje *de E. coli AroG* DAHPS que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1, en la que al menos un punto de mutación reduce la sensibilidad a la inhibición por retroalimentación por fenilalanina.
6. El cultivo de tejido de la reivindicación 5, en el que dicho cultivo de tejido regenera una planta transgénica que tiene una mayor cantidad de dicha fenilalanina en comparación con una planta no transgénica correspondiente.
7. Una planta transgénica regenerada a partir de cultivo de tejido de la reivindicación 5, la planta transgénica que comprende un polinucleótido exógeno que codifica sintasa de 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHPS) que tiene al menos una mutación puntual en una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en la posición 150, 175, 179 y 209 del tipo salvaje *de E. coli AroG* DAHPS que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1, en la que al menos una mutación puntual reduce la sensibilidad a la inhibición por retroalimentación por fenilalanina.
8. Un método para inducir la síntesis de fenilalanina en una planta, que comprende
 - (a) transformar una célula vegetal con un polinucleótido exógeno que codifica DAHPS teniendo al menos una mutación puntual en una posición seleccionada del grupo que consiste de posición 150, 175, 179 y 209 del tipo salvaje *de E. coli AroG* DAHPS que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1, donde al menos una mutación puntual reduce la sensibilidad a la inhibición por retroalimentación por fenilalanina, y
 - (b) regenerar la célula transformada en una planta transgénica que comprende al menos una célula que tiene un mayor contenido de dicha fenilalanina en comparación con una célula correspondiente de una planta no transgénica.
9. El método de la reivindicación 8, en el que la planta transgénica regenerada comprende un aumento de la cantidad de dicha fenilalanina en comparación con una planta no transgénica correspondiente.

10. El método de la reivindicación 8, en el que prolina en la posición 150 se sustituye por leucina (P150L), leucina en la posición 175 se sustituye por glutamina (L175Q), leucina en la posición 179 se sustituye por aspartato (L179D) y fenilalanina en la posición 209 se sustituye por alanina (F209A).

11. El método de la reivindicación 10, en el que, si prolina en la posición 150 se sustituye por leucina (P150L), leucina en la posición 175 se sustituye por glutamina (L175Q), leucina en la posición 179 se sustituye por aspartato (L179D) y fenilalanina en la posición 209 es reemplazada por alanina (F209A), el polinucleótido que codifica mutante *E. coli* AroG DAHPS que tiene una sensibilidad reducida a la inhibición por retroalimentación por fenilalanina en el que leucina en la posición 175 se sustituye por glutamina (L175Q), que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2, preferiblemente en el que el polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 3; o el polinucleótido que codifica mutante *E. coli* AroG DAHPS que tiene una sensibilidad reducida a la inhibición por retroalimentación por fenilalanina en el que la fenilalanina en la posición 209 se sustituye por alanina (F209A), que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4, preferiblemente en el que polinucleótidos comprenden la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 5.

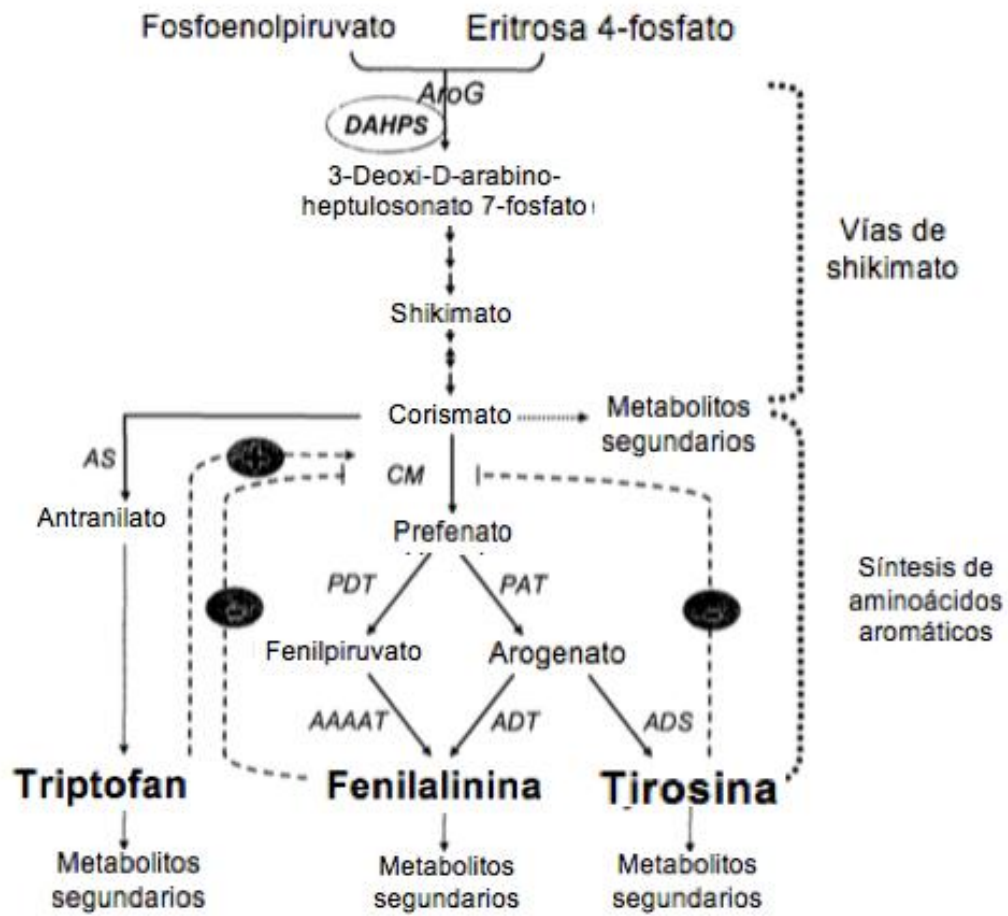


Figura 1

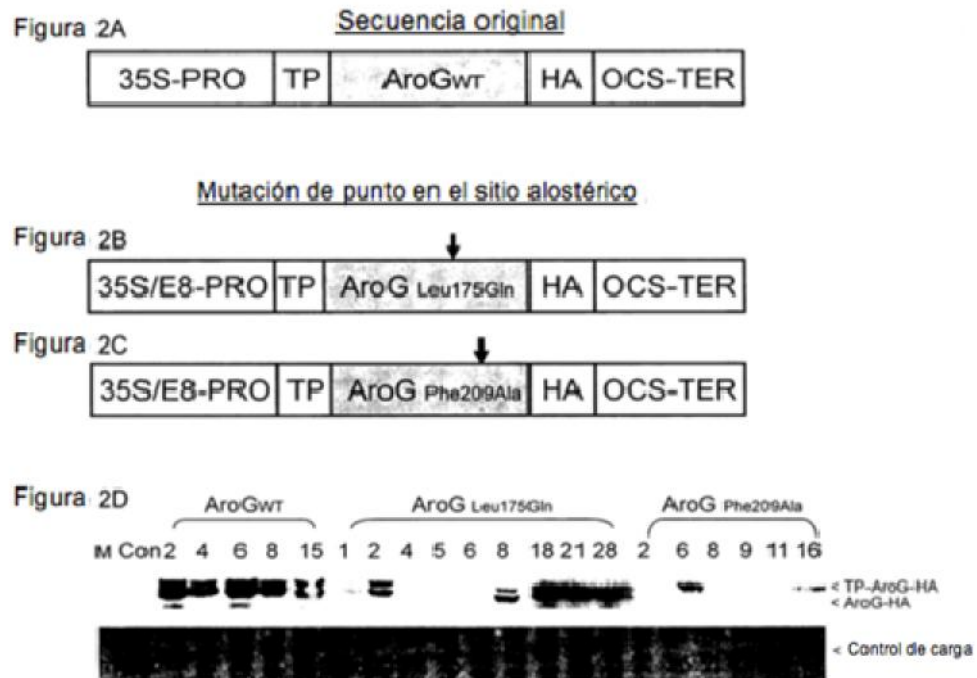


Figura 2

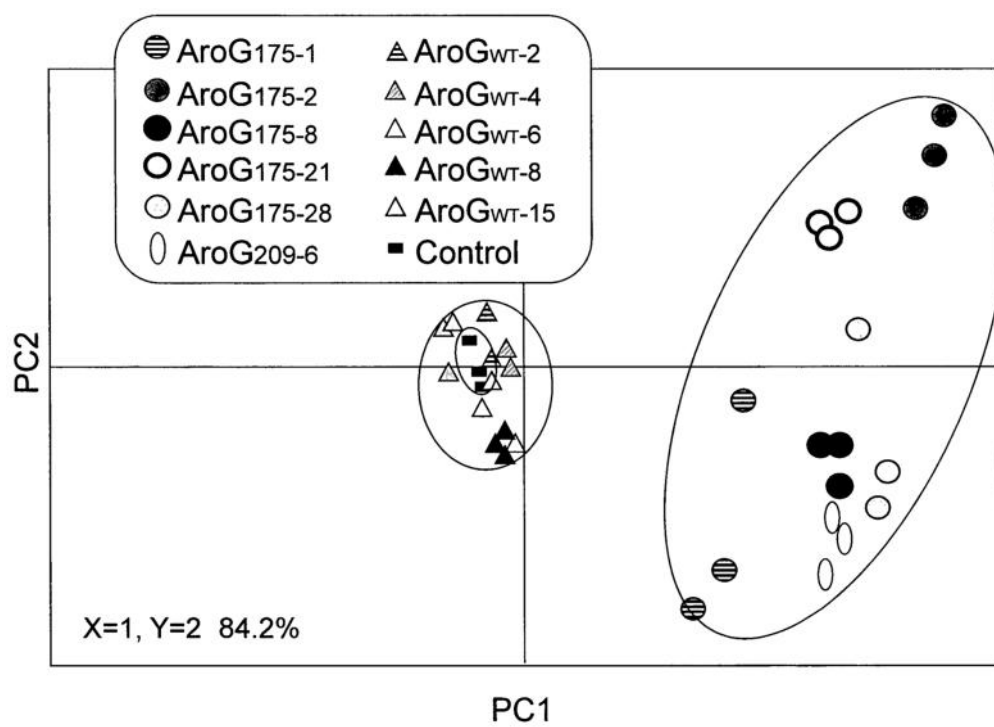


Figura 3

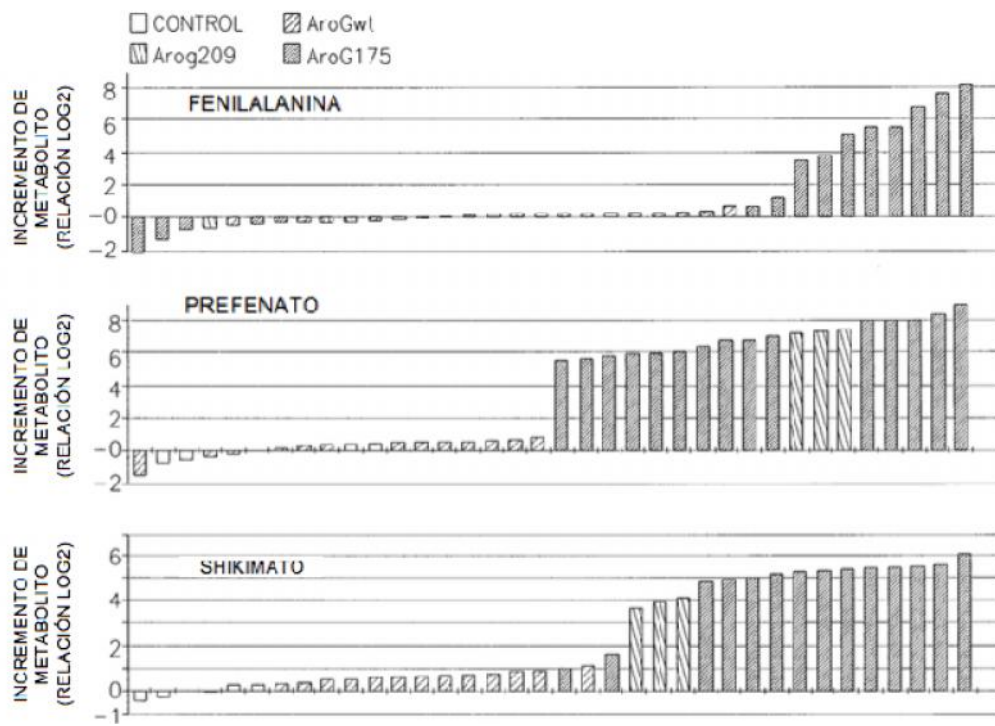
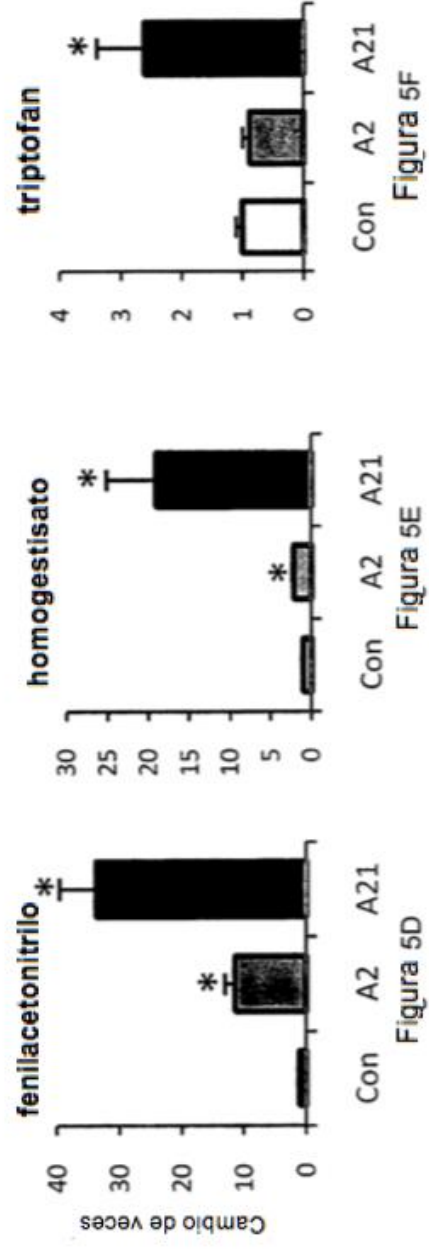
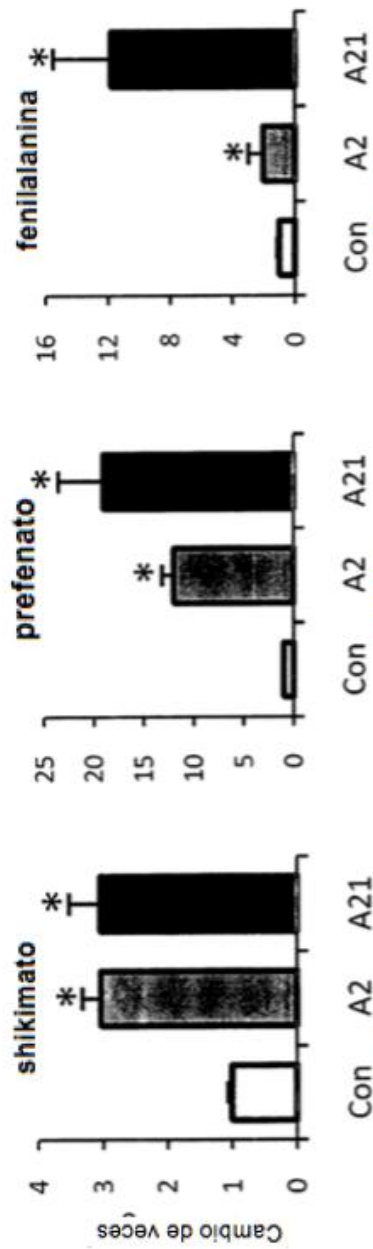


Figura 4



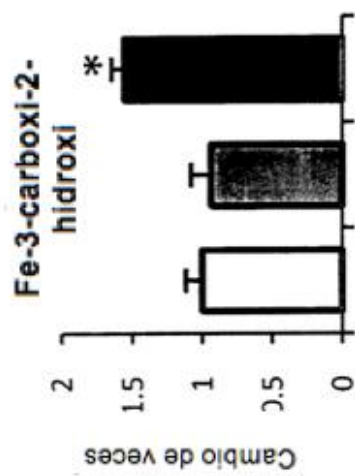


Figura 5G

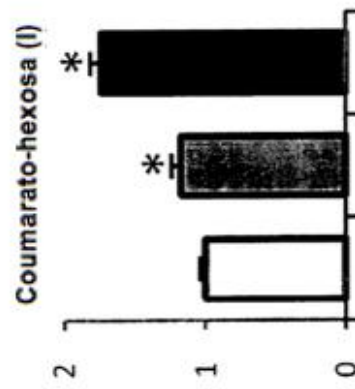


Figura 5H

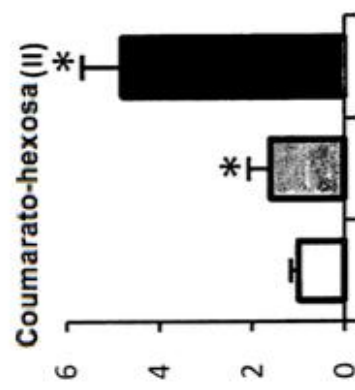


Figura 5I

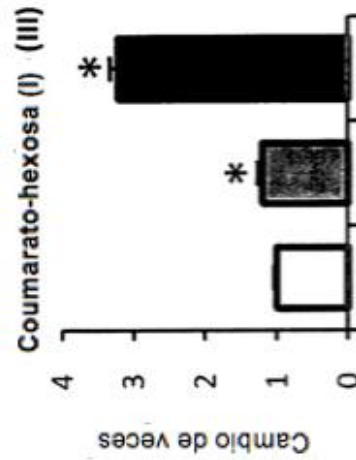


Figura 5J

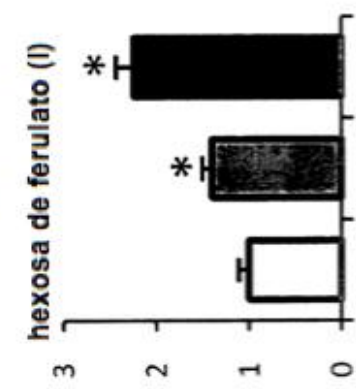


Figura 5K

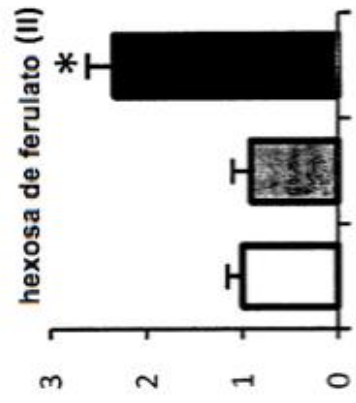
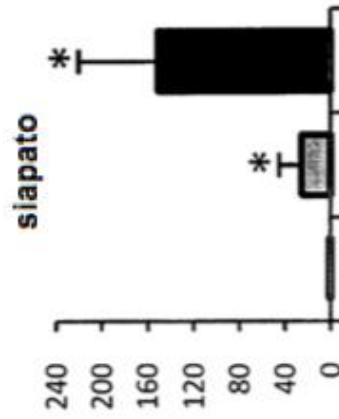
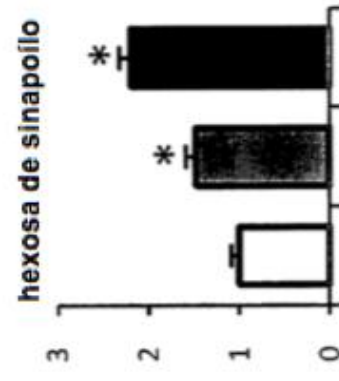
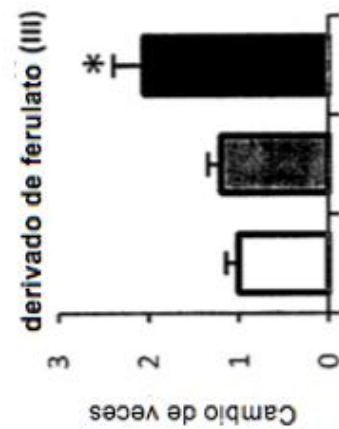
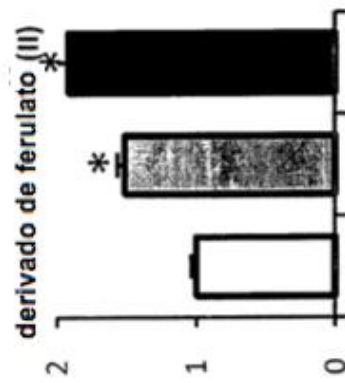
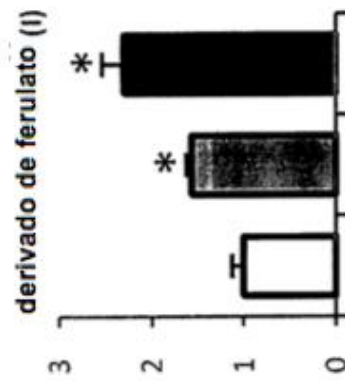
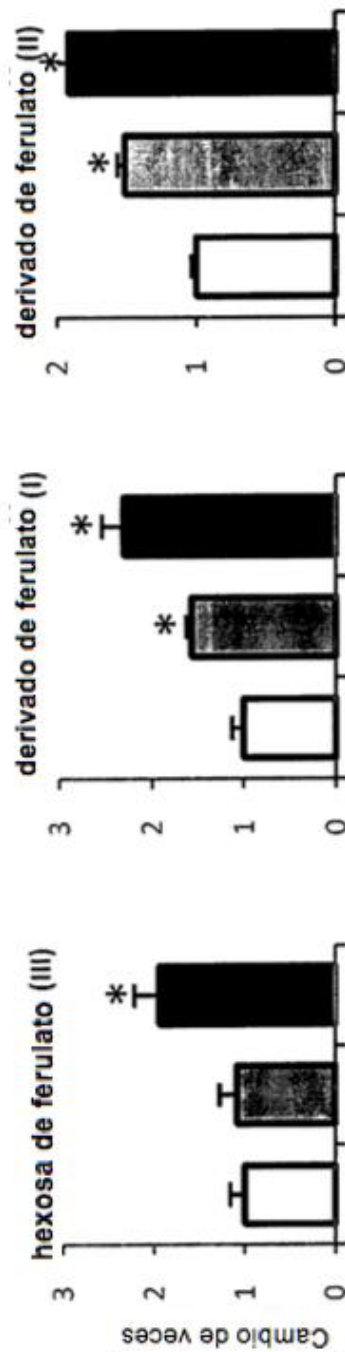
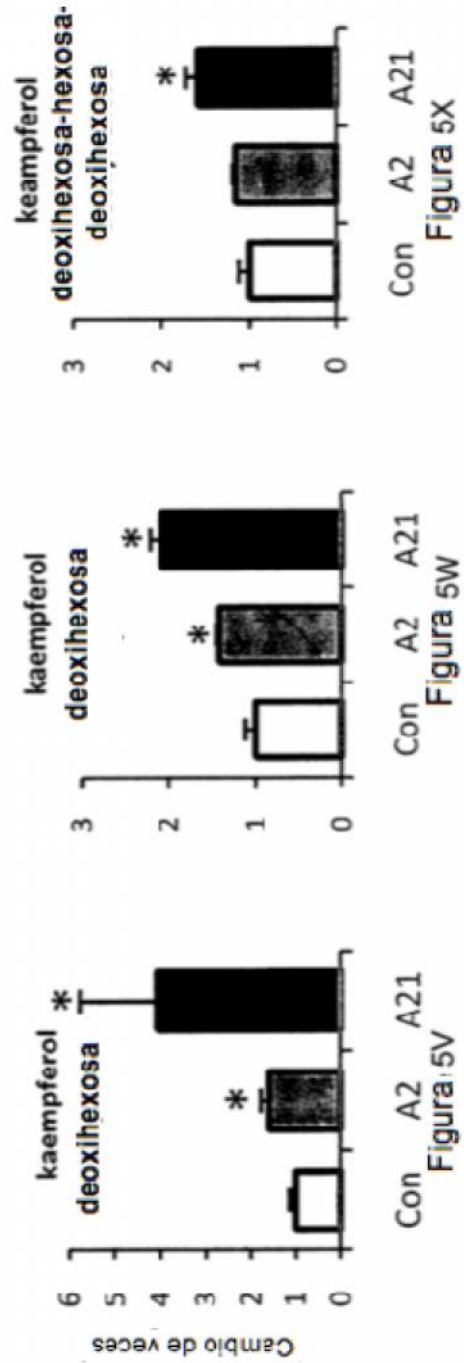
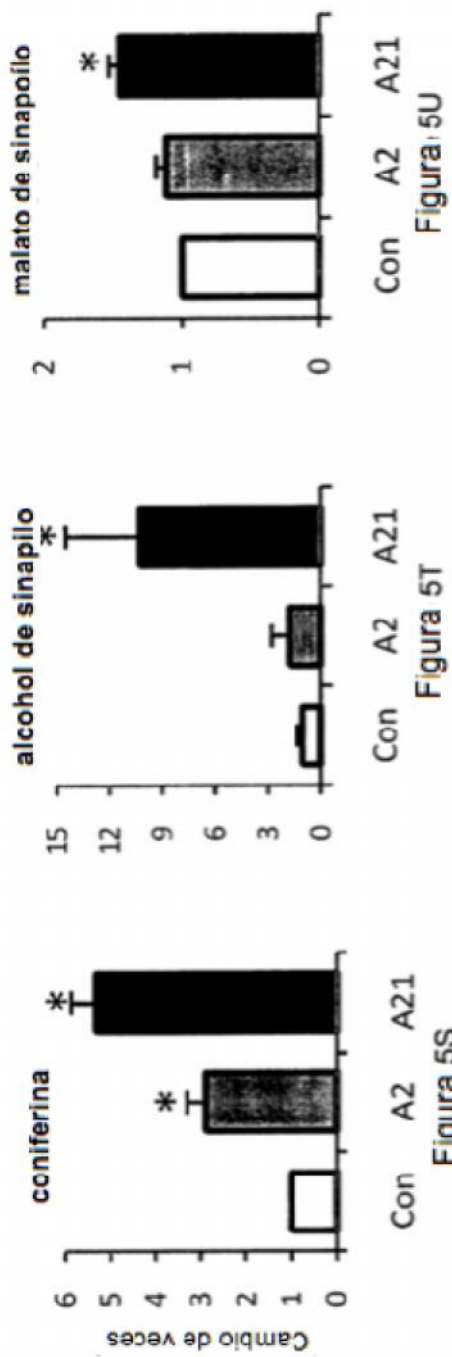
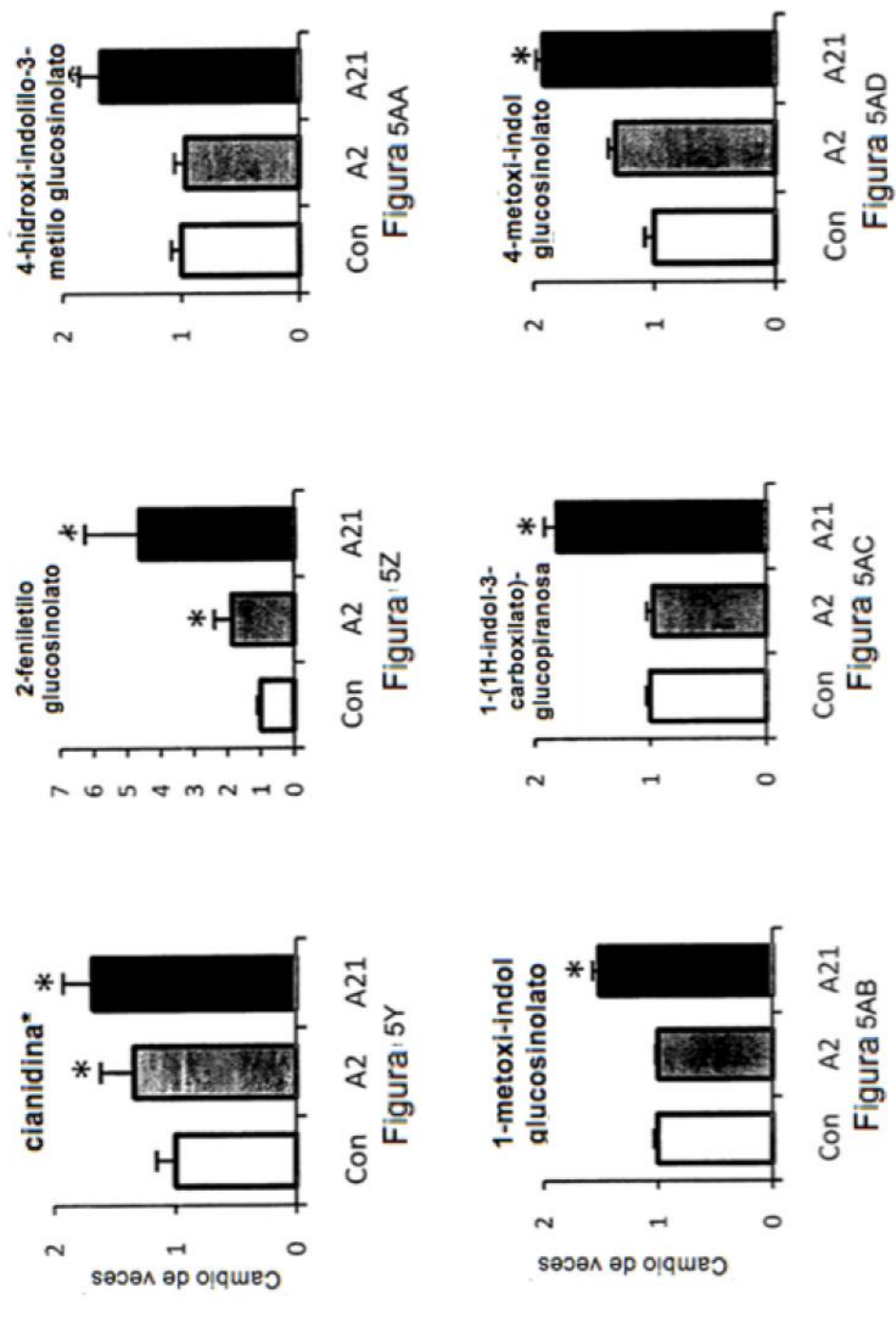


Figura 5L







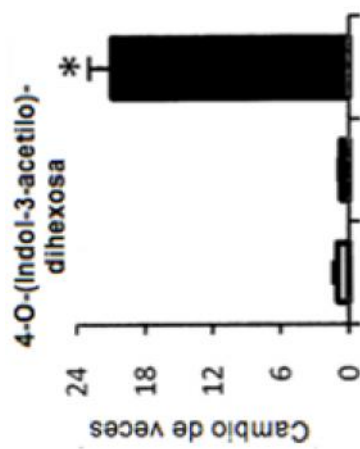


Figura 5AE

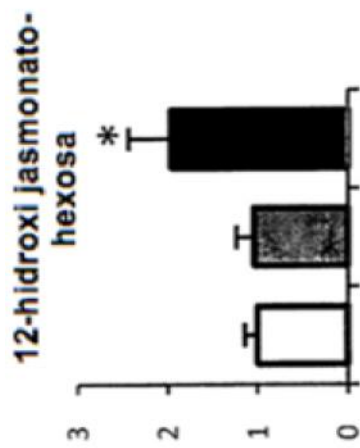


Figura 5AF

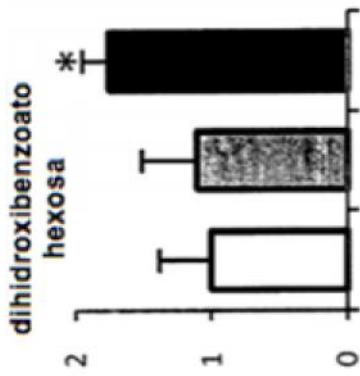


Figura 5AG

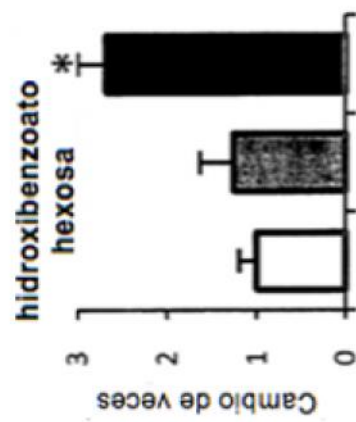


Figura 5AH

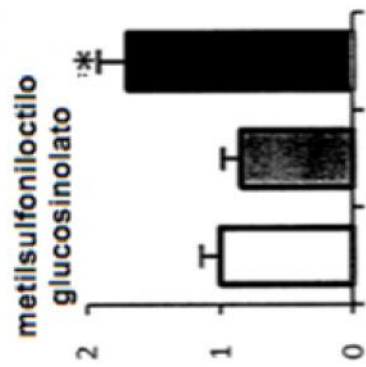


Figura 5AI

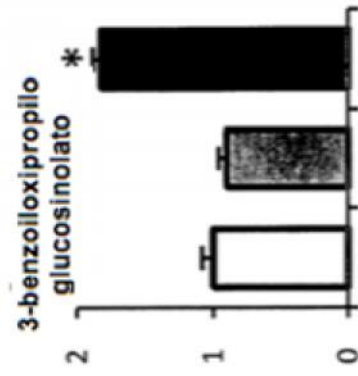
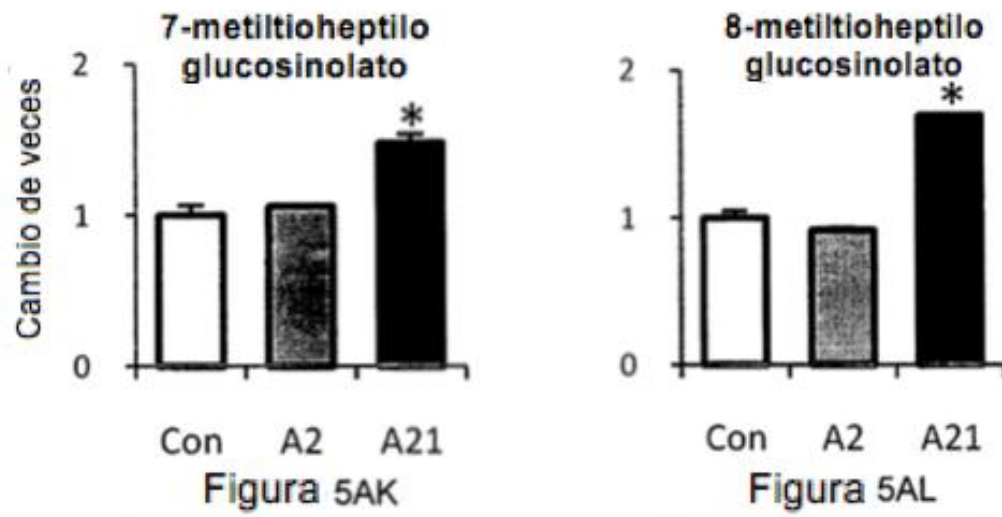


Figura 5AJ



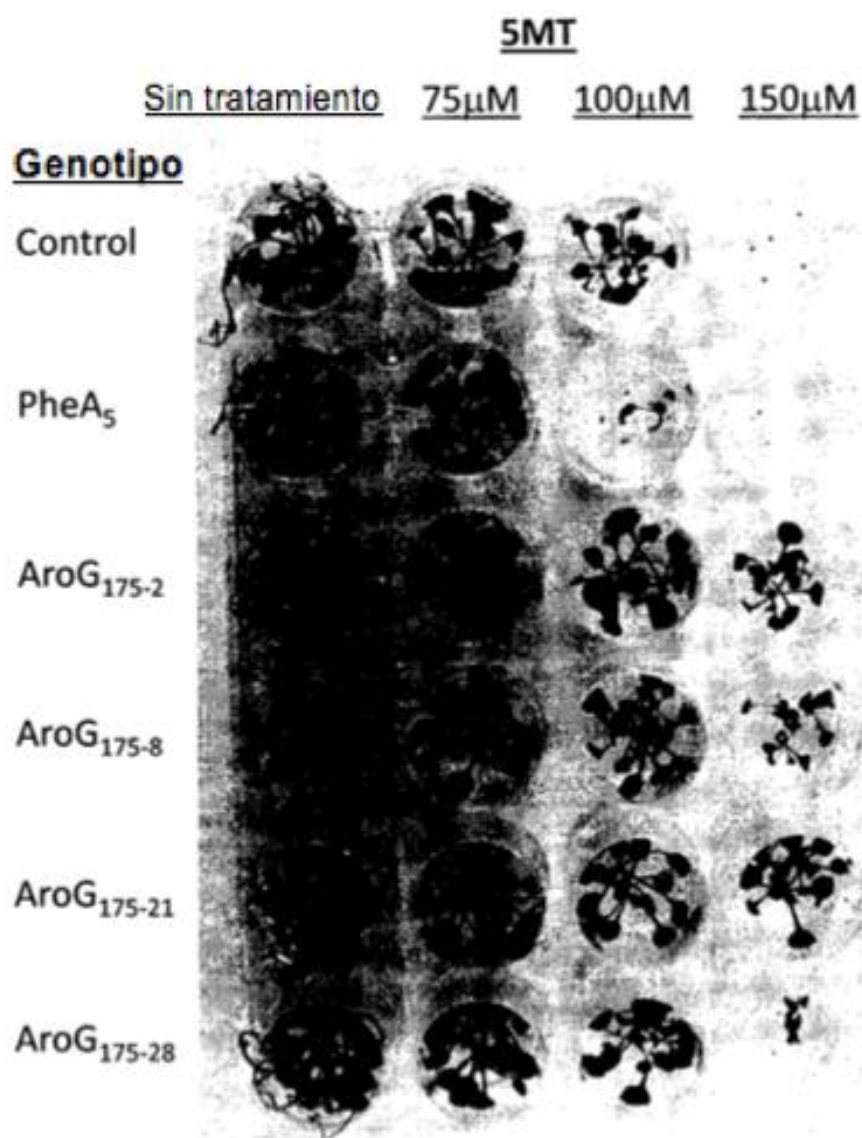


Figura 6

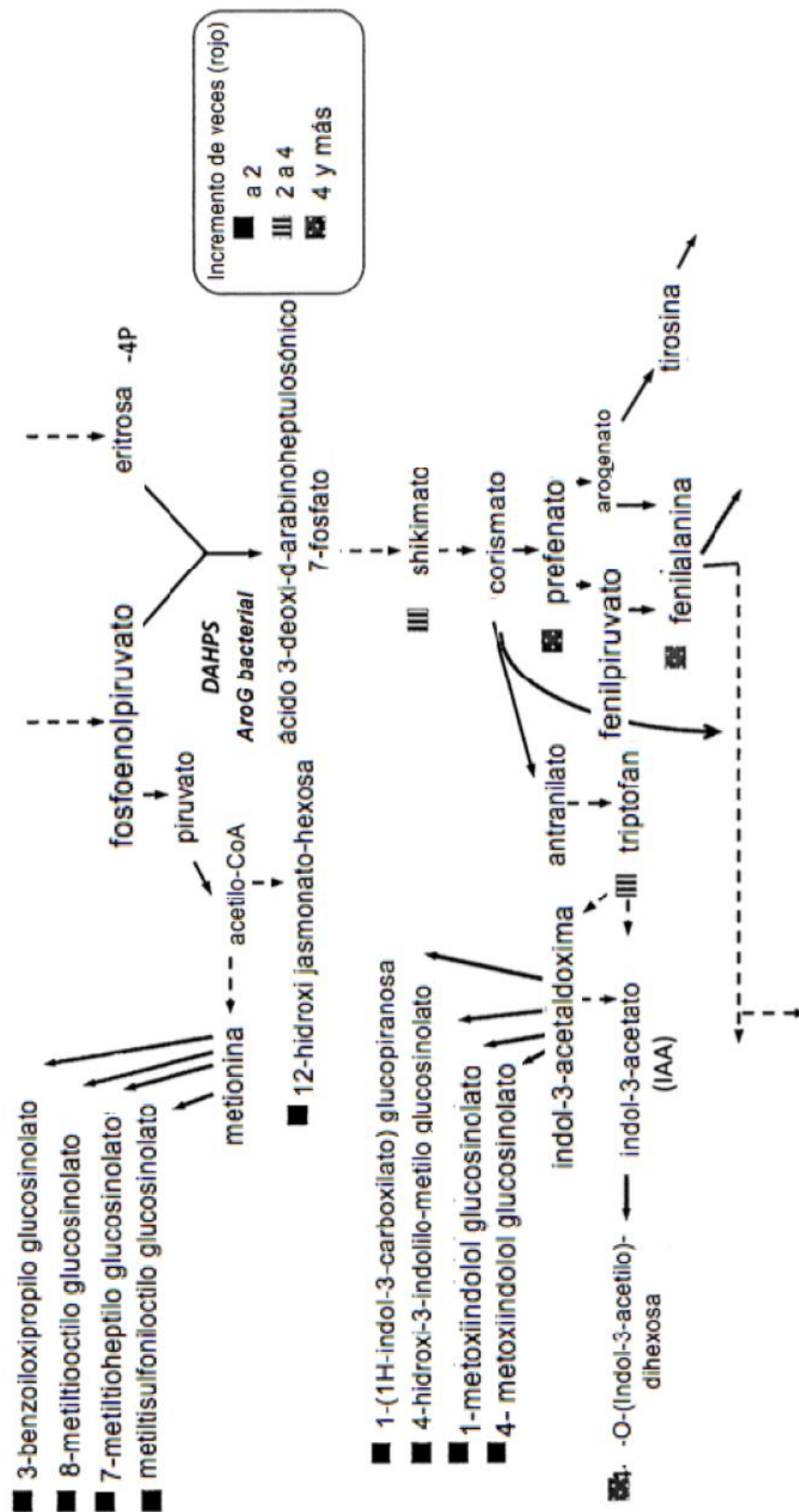


Figura 7

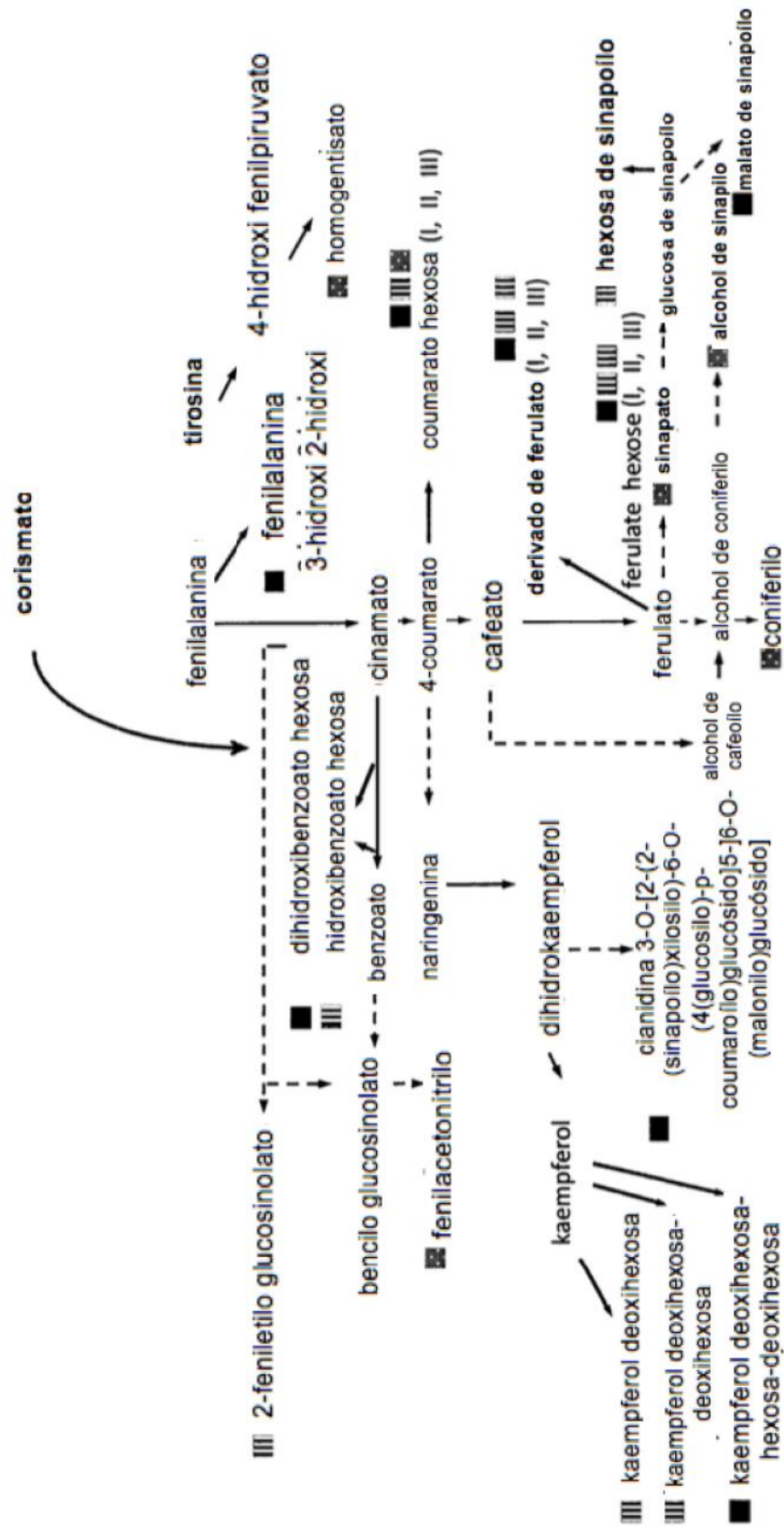


Figura 7 (CONT)

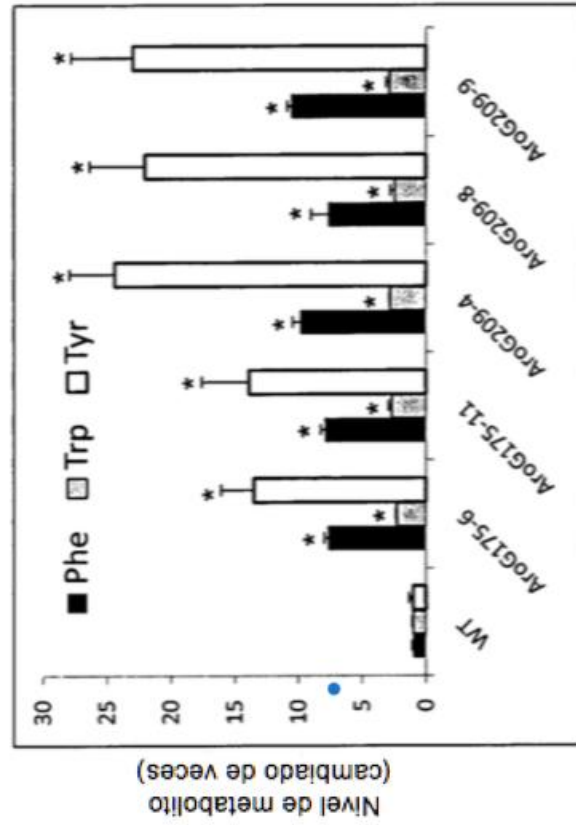


Figura 8B

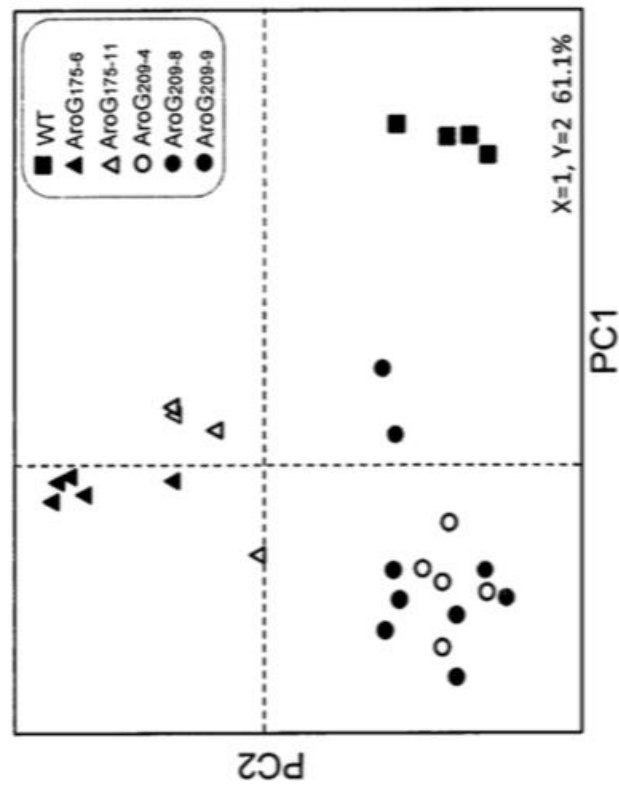


Figura 8A



Figura 9A

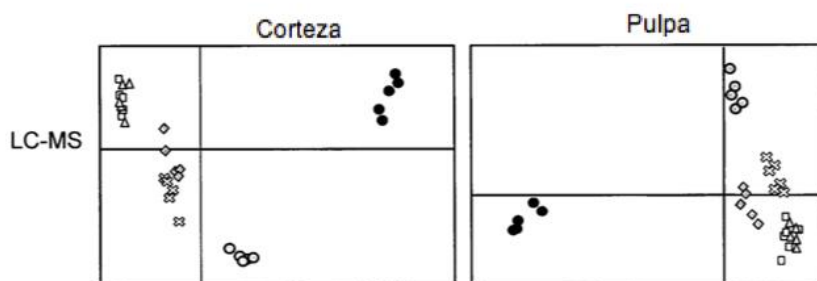


Figura 9B

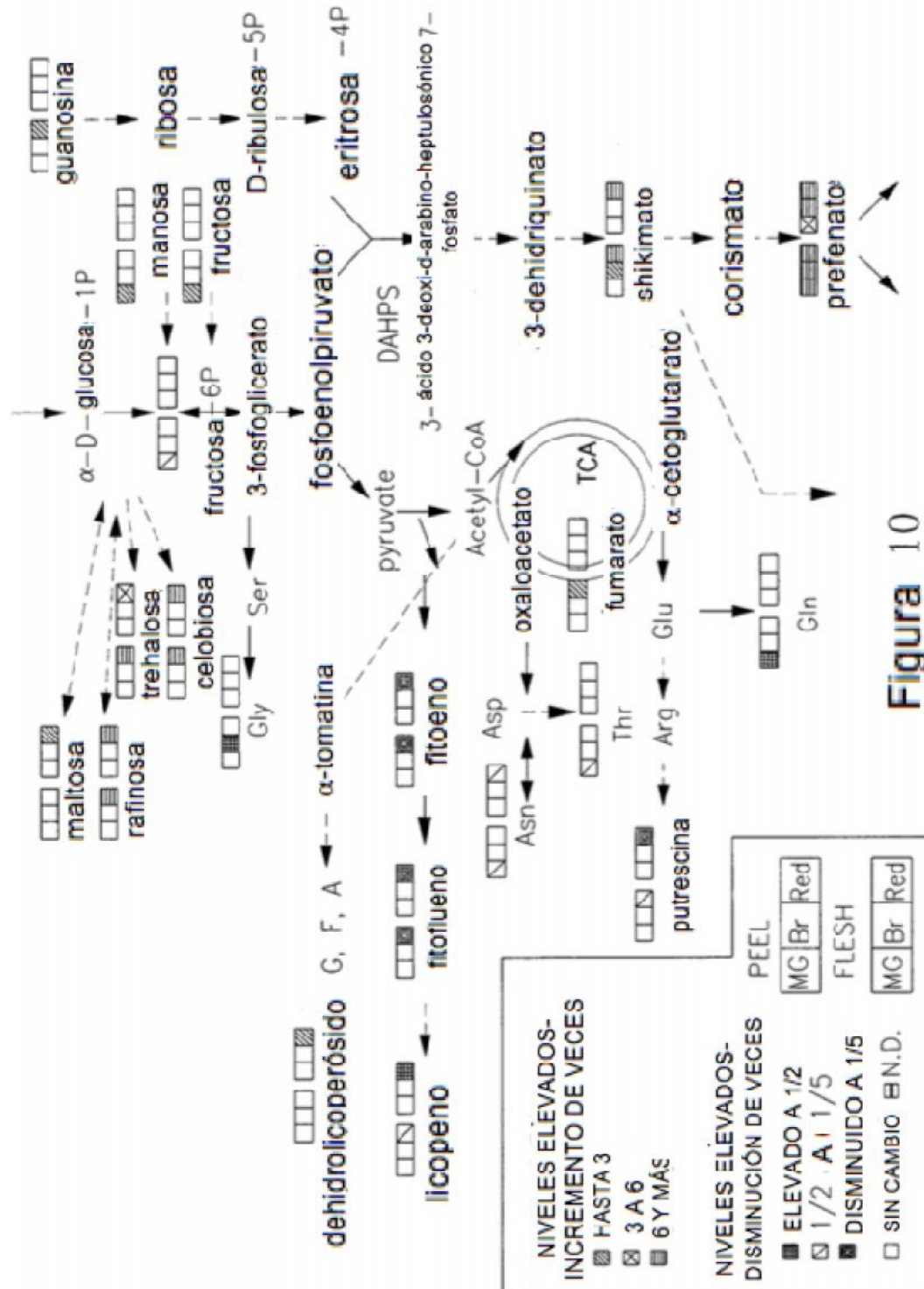


Figura 10

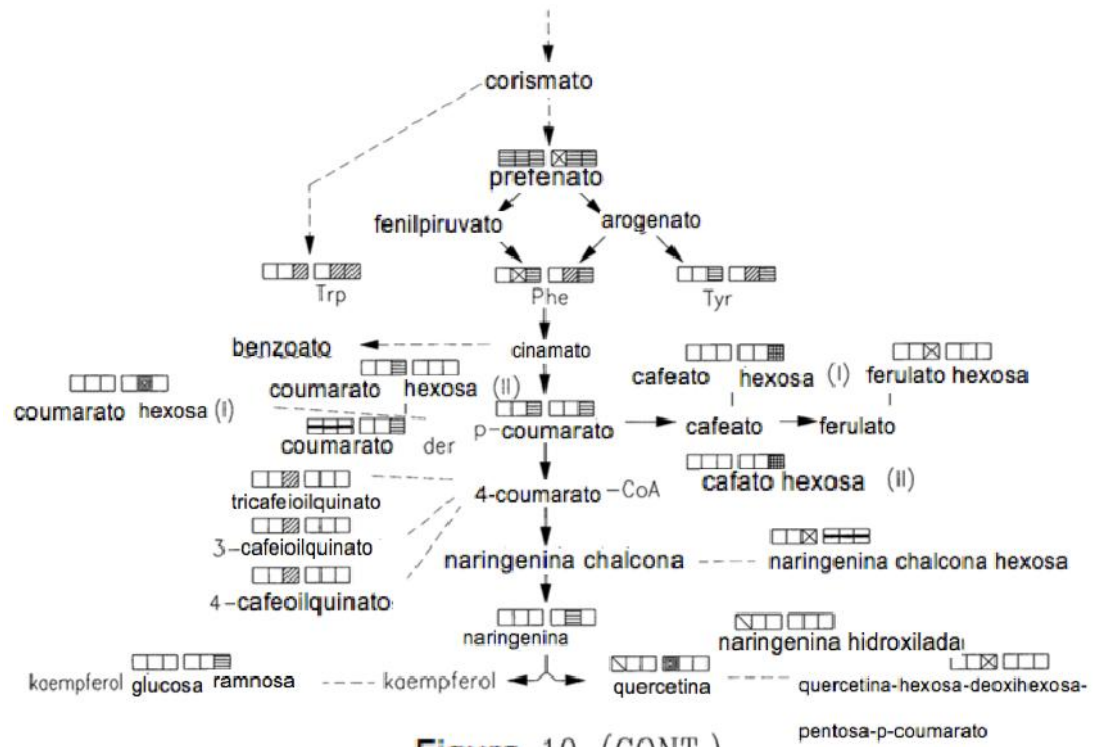


Figura 10 (CONT.)

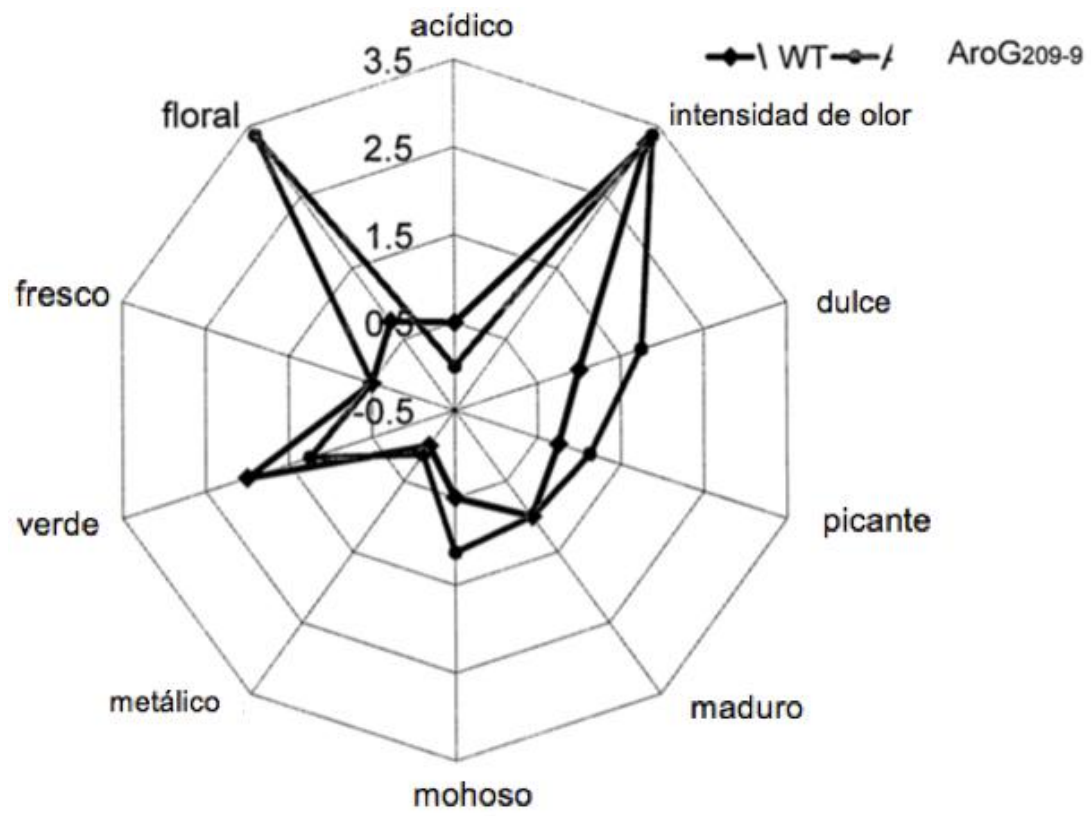


Figura 11