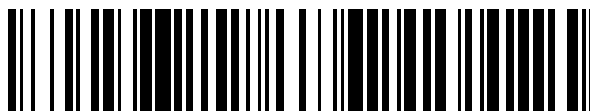


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 413**

51 Int. Cl.:

A01H 15/00 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.09.2013** **PCT/US2013/061475**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.03.2014** **WO14047653**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2013** **E 13838210 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019** **EP 2897454**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para prolongar la vida útil de productos vegetales**

30 Prioridad:

24.09.2012 US 201261704602 P

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

28.05.2020

73 Titular/es:

SEMINIS VEGETABLE SEEDS, INC. (100.0%)
800 North Lindbergh Boulevard
St. Louis, MO 63167, US

72 Inventor/es:

FEIKERT, MICHELE;
FROMAN, BYRON;
GARVEY, GRAEME, S.;
KELLY, LEO y
WAYCOTT, BILL

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 763 413 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos y composiciones para prolongar la vida útil de productos vegetales

Campo de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos y composiciones para aumentar la vida útil de las plantas y partes de plantas.

Descripción de la técnica relacionada

Las polifenol oxidasas (PPO) son un grupo de proteínas de unión al cobre, con amplia distribución filogenética de bacterias a mamíferos, que catalizan la oxidación de compuestos fenólicos a quinonas que producen pigmentos marrones en los tejidos lesionados. La PPO se ha implicado en la formación de pigmentos, eliminación de oxígeno y mecanismos de defensa contra patógenos de plantas e insectos herbívoros. Se considera que la oxidación de los sustratos fenólicos por PPO es la principal causa de la coloración marrón de muchas frutas y verduras durante la maduración, manipulación, almacenamiento y procesamiento. Este problema es de considerable importancia para la industria alimenticia, ya que afecta la calidad nutricional y el aspecto, reduce la aceptabilidad del consumidor y, por lo tanto, también genera un impacto económico significativo, tanto para los productores de alimentos como para la industria del procesamiento de alimentos.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención proporciona composiciones para la aplicación tópica a una planta o parte de la misma, que comprende una cantidad de un compuesto inhibidor de la Polifenol Oxidasa 11 (PPO11) eficaz para suprimir la expresión de un gen de la PPO11, que codifica el polipéptido codificado por la SEQ ID NÚM.: 9, en el que la expresión del gen de la PPO11 en ausencia del compuesto inhibidor se correlaciona positivamente con el pardeamiento de la planta o parte de la misma, en el que el compuesto inhibidor de la PPO11 comprende un polinucleótido antisentido o ARNs que suprime dicha expresión de un gen de la PPO11 y comprende al menos 130 nucleótidos contiguos de un polinucleótido seleccionado de las SEQ ID NÚM.: 1-4 y 9, o un complemento de los mismos. La composición también puede comprender un agente de transferencia, un tampón, o una preparación de organosilicona como agente de transferencia. El compuesto inhibidor de la PPO11 comprende un polinucleótido antisentido o ARNs eficaz para suprimir la expresión de la PPO11. En realizaciones adicionales, el compuesto inhibidor de la PPO11 comprende una molécula de polinucleótido que tiene al menos 300, 301 a 500, o al menos 500 o más nucleótidos de longitud. En realizaciones adicionales, la planta es la lechuga y el gen de la PPO11 está codificado por una secuencia que comprende la SEQ ID NÚM.: 9. En ciertas realizaciones, la cantidad de compuesto inhibidor de la PPO11 es eficaz para aumentar la vida útil de un producto vegetal procesado.

En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos para reducir el pardeamiento o aumentar la vida útil de una planta, o parte de la misma, que comprende aplicar tópicamente a una superficie de la planta o una parte de la misma una cantidad de la composición descrita anteriormente para suprimir la expresión de un gen de la PPO11, que codifica el polipéptido codificado por la SEQ ID NÚM.: 9, y en el que la planta es una planta de lechuga.

En aún otro aspecto, la invención proporciona casetes de expresión que comprenden un ADN seleccionado unido operativamente a un promotor heterólogo, en el que el ADN seleccionado codifica un ARN antisentido, un ARNi, o un ARNsi eficaz para suprimir la expresión de un gen de la PPO11, en el que la expresión del gen de la PPO11 se correlaciona positivamente con el pardeamiento de la planta, o parte de la misma o vida útil reducida de la planta o parte o producto de la misma, en el que el ADN seleccionado comprende al menos 130 nucleótidos contiguos de un polinucleótido seleccionado de las SEQ ID NÚM.: 1-4 y 9, o un complemento de los mismos. En ciertas realizaciones, el promotor es un promotor específico de hoja. En varios aspectos, el ADN seleccionado está operativamente unido al promotor en orientación antisentido. En ciertas realizaciones, la expresión del ADN seleccionado induce el silenciamiento génico, escisión de ARNm, o traducción reprimida del ARNm del gen de la PPO11. En estas realizaciones, la transcripción del ADN seleccionado suprime la expresión del gen de PPO que se correlaciona positivamente con el pardeamiento de la planta, o porción de la misma o vida útil reducida de la planta, o porción o producto de la misma. La invención también incluye vectores que comprenden el casete de expresión descrito anteriormente.

En aún otro aspecto adicional, la invención proporciona plantas transgénicas o partes de las mismas que comprenden el casete de expresión descrito anteriormente. La planta es una planta de lechuga. En ciertas realizaciones, la planta puede ser una planta transgénica R0, una planta de progenie de cualquier generación de una planta transgénica R0, en la que la planta transgénica ha heredado el ADN seleccionado de la planta transgénica R0.

En aún otro aspecto adicional, la invención proporciona la semilla de la planta transgénica descrita anteriormente, en el que la semilla comprende el casete de expresión. En ciertas realizaciones, la semilla produce una planta que exhibe un aumento de la vida útil y una reducción de las pérdidas poscosecha. La invención también incluye células transgénicas de la planta transgénica descrita anteriormente, en la que la célula comprende el casete de expresión.

En ciertos aspectos adicionales, la invención proporciona procedimientos de regulación por disminución de la actividad de un gen de la PPO11, que codifica el polipéptido codificado por la SEQ ID NÚM.: 9, en una planta de lechuga, los procedimientos comprenden transformar en la planta de lechuga un casete de expresión proporcionado por la invención; y seleccionar una planta de lechuga con actividad de la PPO de la PPO11 disminuida en comparación con una planta de lechuga en la que no se ha introducido el casete de expresión. En ciertas realizaciones, el gen de la PPO11 codifica ARNm que comprende la SEQ ID NÚM.: 9. El ADN seleccionado se puede unir operativamente al promotor en la orientación antisentido; o puede estar en una orientación sentido y antisentido. En realizaciones adicionales, el polinucleótido es una construcción antisentido o ARNi, o el ADN seleccionado codifica una ribozima o proteína de dedos de cinc que inhibe la expresión de la PPO11.

En aspectos aún adicionales, la invención proporciona procedimientos para preparar alimentos para humanos que comprenden cultivar la planta de lechuga de la invención en condiciones de crecimiento de plantas para producir tejido vegetal a partir de la planta de lechuga; y preparar alimentos para consumo humano o animal a partir del tejido vegetal.

Además se desvelan en la presente memoria procedimientos para identificar plantas que tienen expresión reducida o que carecen de expresión de un gen de la PPO11 u ortólogo del mismo, que comprenden obtener una pluralidad de plantas, en las que la expresión se correlaciona positivamente con el pardeamiento o vida útil reducida de un producto procesado de la planta, seleccionar una o más plantas analizadas que comprenden una expresión disminuida del gen de la PPO11 u ortólogo del mismo en relación con la expresión del gen de la PPO11 u ortólogo del mismo en una planta de referencia de la misma especie de cultivo, una planta progenitora, o una planta isogénica de otro modo, y que muestra un pardeamiento o vida útil reducida. La pluralidad de plantas se puede obtener por mutagénesis aleatoria, pueden ser plantas transgénicas, pueden comprender 10, 100 o 1000 o más plantas, y/o pueden ser variedades de la misma especie vegetal. El análisis de la expresión del gen de la PPO puede comprender determinar una abundancia de ARN PPO11, determinar la actividad de la PPO o determinar la abundancia de una proteína o ARN codificado por la SEQ ID NÚM.: 9. El procedimiento también puede comprender cruzar las una o más plantas con expresión reducida de la PPO11 con una planta diferente.

Además se desvelan en la presente memoria procedimientos para identificar un polimorfismo genéticamente unido a un gen de la PPO11 u ortólogo del mismo, que comprende: obtener ADN de una población de plantas en la que los miembros de la población varían para la expresión de la PPO11; e identificar al menos un primer polimorfismo en dicha población que está asociado con una expresión reducida de la PPO11 en relación con los miembros de la población que no comprenden dicho polimorfismo.

Además se desvelan en la presente memoria procedimientos para reproducción de la lechuga que comprenden analizar plantas de lechuga, o semillas que producen las plantas de lechuga, para determinar la presencia de al menos un primer marcador genético unido genéticamente a una región cromosómica que confiere una expresión reducida de la PPO11 en relación con una planta que carece de la región, en la que la región es un QTL que contribuye baja expresión de la PPO11 entre 185700k y 185800k en el cromosoma 4 de la lechuga; y seleccionar al menos una primera planta o semilla de lechuga que produce la planta que comprende el marcador genético y el QTL que confiere una expresión reducida de la PPO11; y cruzar la primera planta consigo misma o con una segunda planta para producir plantas de progenie que comprenden el QTL que confiere una expresión reducida de la PPO.

Además se desvelan en la presente memoria procedimientos para identificar una planta de lechuga que muestra una reducción del pardeamiento o un aumento de la vida útil que comprende: detectar en una primera planta de lechuga al menos un alelo de un marcador que está asociado con una reducción del pardeamiento o un aumento de la vida útil, en la que el marcador está genéticamente unido a una región entre 185700k y 185800k en el cromosoma 4 de la lechuga.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1: En la lechuga existen once genes de la PPO putativos. En base al análisis de la sustitución de nucleótidos por 100 residuos de nucleótidos, se muestra el nivel relativo de homología entre los genes de la PPO.

FIG. 2: Se analizaron las abundancias de transcritos de los 11 genes de la PPO de la lechuga 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72 y 96 horas después de la cosecha para identificar los genes de la PPO que se correlacionan en la expresión con la incidencia del pardeamiento en nervaduras de lechuga no tratada. Sorprendentemente, a pesar de la alta homología entre los genes de la PPO, la PPO11 se identificó como el transcrito cuya expresión se correlacionó y predijo el fenotipo de pardeamiento visual.

FIGS. 3A-B: La FIG. 3A representa una fuerte correlación entre los niveles de expresión de la PPO11 9 días después del procesamiento y el almacenamiento a baja temperatura con calificaciones de cambio de la coloración visual para dos variedades de cruza de romana y crujiente y tres de iceberg cultivadas en San Juan Bautista. Cada punto representa la media de cuadrados mínimos para un cultivar único con seis replicados biológicos tanto para la expresión génica como para las calificaciones visuales. La FIG. 3B es un experimento de validación con 10 cultivares cultivados en Yuma, AZ, que nuevamente demuestra una

correlación estadísticamente significativa entre los niveles de expresión de la PPO11 9 días después del procesamiento y el almacenamiento a baja temperatura con calificaciones de cambio de la coloración visual para dos cultivares cruza de romana y crujiente, tres de iceberg y cinco de romana. Cada punto representa la media de cuadrados mínimos para un cultivar único con seis replicados biológicos tanto para la expresión génica como para las calificaciones visuales. Lechuga Iceberg "ICE", cruza crujiente-romana "CRC" y romana "ROM".

FIG. 4: Gráfico de cambio de la coloración visual versus PAL1, T₀; versus PPO2, T₀; versus PPO11, T₉; versus PPO8, T₀. RQ PAL 1, T₀ = cuantificación relativa de ubiquitina (RQ) para el homólogo de fenilalanina liasa 1 (PAL1), en el momento 0 (T₀). Esta matriz de correlación producida en JMPv10 muestra la variable individual, es decir, las puntuaciones promedio de pardeamiento visual en el eje vertical en la fila en la que se enumera la variable y en el eje horizontal en la columna en la que se enumera. Se representa gráficamente la expresión génica más correlacionada en la cosecha o 9 días después del procesamiento. La PPO11 muestra el mayor intervalo de expresión (~200 a ~11000).

FIG. 5: Se representa un histograma de la actividad total de la PPO (conversión $\mu\text{M min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de catecol) para una población de 23 cultivares de lechuga romana según se evaluó a partir del tejido de la nervadura media central en el momento del procesamiento. Los recuentos en el eje vertical son el número de cultivares con una actividad de U PPO en el intervalo indicado. Esto muestra a partir de una selección de cultivares de élite de lechuga romana que hay un intervalo de 3 veces en la actividad total de la PPO en el tejido de la nervadura media central. Las subselecciones de los cultivares de la actividad más alta y más baja de la PPO de este experimento se eligieron para fenotipificación por cambio de coloración visual/vida útil.

FIG. 6: Predicciones de actividad enzimática de la PPO del cambio de coloración visual. Se muestra un gráfico de barras del cambio de la coloración visual para un subconjunto de líneas previamente seleccionadas para que tengan la actividad de U PPO más alta o más baja de una selección de 23 lechugas romanas como se describe (véase la FIG. 5). Los números más altos en el eje vertical indican más cambio de coloración. Los cultivares codificados se agrupan por actividad alta o baja de la PPO previamente determinada. El nivel de actividad no fue predictivo de la vida útil, dado que dos de las líneas de actividad enzimática más altas fueron las más resistentes en el fenotipo de cambio de coloración.

Breve descripción del listado de secuencias

SEQ ID NÚM.: 1 – secuencia PPO11_Trigger1 (189 nt).

SEQ ID NÚM.: 2 – PPO11_Trigger2 (225 nt).

SEQ ID NÚM.: 3 – PPO11_Trigger3 (225 nt).

SEQ ID NÚM.: 4 – PPO11_Trigger4 (226 nt).

SEQ ID NÚM.: 5 – ADNss PPO11_antisense (25 nt).

SEQ ID NÚM.: 6 – ADNss PPO11_antisense (25 nt).

SEQ ID NÚM.: 7 – PPO11_ARNDs (25 nt).

SEQ ID NÚM.: 8 – PPO11_ARNDs (25 nt).

SEQ ID NÚM.: 9 – ARNm de la PPO11 deducido de Lactuca sativa (lechuga) (1922 nt).

SEQ ID NÚM.: 10 – Secuencia flanqueante de la PPO11 (Secuencia Chr4:185719000-185720000).

SEQ ID NÚM.: 11 – Secuencia flanqueante de la PPO11 (Secuencia Chr4:1185723000-185724000).

SEQ ID NÚM.: 12 - 34 – Cebadores de PCR específicos del gen.

Descripción detallada de la invención

Las polifenol oxidasas (PPO) son un grupo de proteínas de unión al cobre, con amplia distribución filogenética de bacterias a mamíferos que catalizan la oxidación de compuestos fenólicos a quinonas y producen pigmentos marrones en los tejidos lesionados. La presente invención supera las limitaciones de la técnica anterior al proporcionar nuevos procedimientos, composiciones y plantas para extender la vida útil de los productos vegetales mediante la reducción específica de la expresión de una PPO que se correlaciona positivamente con el pardeamiento en las plantas. La PPO11 de la lechuga proporciona un ejemplo de una PPO que se correlaciona con el pardeamiento de la lechuga. Es sabido que la expresión de la PPO11 aumenta con el tiempo después de la cosecha y se correlaciona con una vida útil reducida y un aumento del pardeamiento. Se desvelan composiciones que comprenden compuestos inhibidores selectivos de la PPO para inhibir una PPO específica que se correlaciona positivamente con el pardeamiento tal como PPO11, y procedimientos para reducir el pardeamiento o aumentar la

vida útil. También se desvelan casetes y vectores de expresión que comprenden un ADN seleccionado cuya expresión es eficaz para suprimir la expresión de la PPO11, reducir el pardeamiento y/o aumentar la vida útil de las plantas o partes de plantas. También se desvelan plantas transgénicas o plantas que comprenden compuestos inhibidores de la PPO11 y procedimientos para producirlos. También se desvelan en la presente memoria plantas o variedades de plantas que albergan un gen de la PPO o mutaciones promotoras que generan una expresión reducida del gen de la PPO y procedimientos para analizar la expresión del gen de la PPO como un sustituto para el pardeamiento. En particular, el gen de la PPO que se correlaciona positivamente con el pardeamiento es un gen de la PPO11 de la lechuga. Además, se desvelan procedimientos para producir genes de la PPO con expresión reducida.

10 Definiciones

En la descripción y las tablas de la presente memoria, se utilizan varios términos. Para proporcionar una comprensión clara y coherente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, se proporcionan las siguientes definiciones. A menos que se indique lo contrario, los términos se deben entender de acuerdo con el uso convencional por parte de los expertos en la técnica relevante.

15 Como se usa en la presente memoria, la expresión "compuesto inhibidor selectivo de la PPO" se refiere a un compuesto que suprime o reduce la actividad de la actividad enzimática de la PPO, o expresión de la PPO, tal como, por ejemplo, síntesis de ARNm que codifica un polipéptido PPO (transcripción) y/o síntesis de un polipéptido de la PPO a partir de ARNm de la PPO (traducción). El compuesto inhibidor selectivo de la PPO puede inhibir específicamente una PPO que se correlaciona positivamente con el pardeamiento de la planta. El compuesto
20 inhibidor de la PPO puede ser un inhibidor de la PPO11 o el gen correspondiente en manzanas o patatas.

Como se usa en la presente memoria, una PPO que se correlaciona positivamente con el pardeamiento de la planta se refiere a un homólogo de la PPO específico que exhibe un aumento de expresión después de la cosecha cuando aumenta o se produce el pardeamiento/cambio de coloración. El aumento de la expresión se puede observar durante el periodo de 36 horas después de la cosecha. La PPO que se correlaciona positivamente con el
25 pardeamiento de la planta (superficie de la planta o partes de una planta) también exhibe un aumento de la expresión que se correlaciona con el cambio de la coloración visual de la superficie de la planta. Tal PPO puede ser la PPO11. La PPO puede ser un homólogo de la PPO11 de la lechuga correlacionado con la presencia de pardeamiento, tal como de la manzana o patata, que por lo tanto puede ser la diana para la reducción del pardeamiento.

30 Como se usa en la presente memoria, el término "casete de expresión" se refiere a una secuencia de ADN que comprende un ADN seleccionado a transcribir. Además, el casete de expresión comprende al menos todos los elementos de ADN necesarios para la expresión. Después de una transformación exitosa, el casete de expresión dirige la maquinaria de la célula para fabricar ARN. El casete de expresión puede ser un casete de expresión de ARNi o ARNsi que suprime la expresión de una PPO que se correlaciona positivamente con el pardeamiento de una
35 planta.

Se pueden transformar diferentes casetes de expresión en diferentes organismos, que incluyen bacterias, levaduras, plantas y células de mamíferos, a condición de que se usen las secuencias reguladoras correctas.

40 Como se usa en la presente memoria, la expresión "abundancia de una proteína" se refiere a la cantidad de la proteína específica con respecto a la cantidad de proteína total o con respecto al peso o volumen de la célula, tejido, planta o parte de la planta analizada.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "abundancia de un ARNm" se refiere a la cantidad del ARNm específico con respecto a la cantidad de proteína total o con respecto al peso o volumen de la célula, tejido, planta o parte de la planta analizada.

45 Como se usa en la presente memoria, el término "expresión" se refiere a la combinación de procedimientos intracelulares, que incluyen la transcripción y traducción experimentada por una molécula de ADN codificadora tal como un gen estructural para producir un polipéptido.

Como se usa en la presente memoria, el término "transformación genética" se refiere al procedimiento de introducción de una secuencia o construcción de ADN (por ejemplo, un vector o casete de expresión) en una célula o protoplasto en el que se incorpora este ADN exógeno a un cromosoma o es capaz de replicación autónoma.

50 Como se usa en la presente memoria, el término "heterólogo" se refiere a una secuencia que normalmente no está presente en un genoma del huésped dado en el contexto genético en el que se encuentra actualmente la secuencia. A este respecto, la secuencia puede ser nativa para el genoma del huésped, pero se puede reordenar con respecto a otras secuencias genéticas dentro de la secuencia del huésped. Por ejemplo, una secuencia reguladora puede ser heteróloga ya que está unida a una secuencia codificadora diferente con respecto a la secuencia reguladora nativa.

55 Como se usa en la presente memoria, el término "obtener" cuando se usa junto con una célula vegetal transgénica o planta transgénica, significa 1) transformar una célula vegetal o planta no transgénica para crear la célula vegetal o

planta transgénica, o para 2) plantar semillas de planta transgénica para producir la célula vegetal o planta transgénica. Tal semilla de planta transgénica puede ser de una planta transgénica R0 o puede ser de una progenie de cualquier generación de la misma que hereda una secuencia transgénica dada de una planta progenitora transgénica inicial.

5 Como se usa en la presente memoria, el término "promotor" se refiere a un sitio de reconocimiento en una secuencia de ADN o grupo de secuencias de ADN que proporciona un elemento de control de expresión para un gen estructural y al cual se une específicamente la ARN polimerasa e inicia la síntesis de ARN (transcripción) de ese gen.

10 Como se usa en la presente memoria, la expresión "planta transgénica R0" se refiere a una planta que se ha transformado genéticamente o se ha regenerado a partir de una célula o células vegetales que se han transformado genéticamente.

Como se usa en la presente memoria, el término "regeneración" se refiere al procedimiento de cultivo de una planta a partir de una célula vegetal (por ejemplo, protoplastos, callos o explantes de planta).

15 Como se usa en la presente memoria, la expresión "construcción de transformación" se refiere a una molécula de ADN quimérico que está diseñada para la introducción en un genoma del huésped mediante transformación genética. Las construcciones de transformación preferidas comprenden todos los elementos genéticos necesarios para dirigir la expresión de uno o más genes exógenos. En particular, puede ser deseable introducir una construcción de transformación en una célula huésped en forma de un casete de expresión.

20 Como se usa en la presente memoria, el término "célula transformada" se refiere a una célula cuyo complemento de ADN se ha alterado mediante la introducción de una molécula de ADN exógeno en dicha célula.

25 Como se usa en la presente memoria, el término "transgén" se refiere a un segmento de ADN que se ha incorporado a un genoma del huésped o que es capaz de replicación autónoma en una célula huésped y es capaz de causar la expresión de una o más secuencias codificadoras. Los transgenes de ejemplo proporcionan a la célula huésped, o a las plantas regeneradas a partir de ella, un nuevo fenotipo con respecto a la célula o planta no transformada correspondiente. Los transgenes se pueden introducir directamente en una planta mediante transformación genética, o se pueden heredar de una planta de cualquier generación anterior transformada con el segmento de ADN.

30 Como se usa en la presente memoria, el término "planta transgénica" se refiere a una planta o planta de progenie de cualquier generación posterior derivada de la misma, en la que el ADN de la planta o la progenie de la misma contiene un segmento de ADN exógeno introducido no presente de forma natural en una planta no transgénica de la misma cepa. La planta transgénica puede contener adicionalmente secuencias que son nativas para la planta siendo transformada, pero en las que el gen "exógeno" se ha alterado para alterar el nivel o patrón de expresión del gen, por ejemplo, mediante el uso de uno o más elementos reguladores heterólogos u otros.

35 Como se usa en la presente memoria, el término "vector" se refiere a una molécula de ADN diseñada para transformación en una célula huésped. Algunos vectores pueden ser capaces de replicarse en una célula huésped. Un plásmido es un vector de ejemplo, tal como los casetes de expresión aislados del mismo.

Como se usa en la presente memoria, los términos "ADN", "molécula de ADN" y "molécula de polinucleótido de ADN" se refieren a una molécula de ADN de cadena simple o cadena doble de origen genómico o sintético, tal como un polímero de base de desoxirribonucleótido o una molécula de polinucleótido de ADN.

40 Como se usa en la presente memoria, los términos "secuencia de ADN", "secuencia de nucleótidos de ADN" y "secuencia de polinucleótidos de ADN" se refieren a la secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN. ADNss se refiere a ADN de cadena simple; ADNds se refiere a ADN de cadena doble.

45 Como se usa en la presente memoria, el término "gen" se refiere a cualquier porción de un ácido nucleico que proporciona la expresión de un transcrito o codifica un transcrito. Por lo tanto, un "gen" incluye una región promotora, regiones no traducidas 5', regiones que codifican transcritos que pueden incluir regiones intrónicas y regiones no traducidas 3'.

Como se usa en la presente memoria, los términos "ARN", "molécula de ARN" y "molécula de polinucleótido de ARN" se refieren a una molécula de ARN de cadena simple o de ARN de cadena doble de origen genómico o sintético, tal como un polímero de bases de ribonucleótido que comprenden regiones de cadena simple o cadena doble. ARNss se refiere específicamente a ARN de cadena simple; ds se refiere a ARN de cadena doble.

50 A menos que se indique lo contrario, las secuencias de nucleótidos en el texto de la presente memoria descriptiva se presentan, cuando se leen de izquierda a derecha, en la dirección 5' a 3'. La nomenclatura usada en la presente memoria es la requerida por Title 37 of the United States Code of Federal Regulations § 1.822 y expuesta en las tablas de WIPO Standard ST.25 (1998), Appendix 2, Tables 1 and 3.

Como se usa en la presente memoria, una "superficie de una planta" se refiere a cualquier porción exterior de una

planta. Por lo tanto, las superficies de plantas incluyen las superficies de flores, tallos, tubérculos, frutas, anteras, polen, hojas, raíces o semillas. Una superficie de una planta puede estar en una porción de una planta que está unida a otras porciones de una planta o en una porción de una planta que está separada de la planta.

5 Como se usa en la presente memoria, la frase "el polinucleótido no está operativamente unido a un promotor" se refiere a un polinucleótido que no está unido covalentemente a una secuencia promotora polinucleotídica que se reconoce específicamente por una proteína de ARN polimerasa II dependiente de ADN o por una ARN polimerasa dependiente de ARN viral de tal manera que el polinucleótido se transcribe mediante la proteína de ARN polimerasa II dependiente de ADN o ARN polimerasa dependiente de ARN viral. Un polinucleótido que no está operativamente unido a un promotor se puede transcribir mediante una ARN polimerasa dependiente de ARN de la planta.

10 Como se usa en la presente memoria, un polinucleótido puede estar en forma de ADNss, que abarca equivalentes de ADNds, equivalentes de ARNds, equivalentes de ARNss, complementos de ARNss, ADNss según lo mostrado, y complementos de ADNss.

15 Como se usa en la presente memoria, una primera secuencia de ácido nucleico, ADN seleccionado, o polinucleótido está "operativamente" conectada o "unida" con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está operativamente unido a una secuencia de ARN y/o codificadora de proteína, o una secuencia que codifica un ARNi, un ARNsi o un ácido nucleico que codifica un oligonucleótido antisentido si el promotor proporciona la transcripción o expresión del ARN o la secuencia de codificación. En general, las secuencias de ADN unidas operativamente son contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificadoras de proteínas, están en el mismo marco de lectura. El ADN seleccionado se refiere a un segmento de ADN que se desea introducir o se ha introducido en el genoma de una planta mediante transformación genética.

El ADN seleccionado puede ser una construcción antisentido o ARNi. Alternativamente, el ADN seleccionado puede codificar una ribozima, o proteína de dedo de cinc.

25 Como se usa en la presente memoria, la frase "preparación de organosilicona" se refiere a un líquido que comprende uno o más compuestos de organosilicona, en el que el líquido o los componentes contenidos allí, cuando se combinan con un polinucleótido en una composición que se aplica tópicamente a la superficie de la planta diana, permiten que el polinucleótido entre en una célula vegetal. Los ejemplos de preparaciones de organosilicona incluyen preparaciones comercializadas con los nombres comerciales "Silwet®" o "BREAK-THRU®" y las preparaciones proporcionadas en la siguiente Tabla. Una preparación de organosilicona puede permitir que un polinucleótido entre en una célula vegetal de manera que permita una supresión mediada por el polinucleótido de la expresión del gen diana en la célula vegetal.

30 Como se usa en la presente memoria, las frases "pardeamiento reducido", "vida útil aumentada", "vida útil mejorada", "pérdidas poscosecha reducidas" o "aumento de la vida útil y reducción de las pérdidas poscosecha" se refieren a cualquier aumento mensurable en la vida útil, reducción en el pardeamiento, o reducción en la pérdida poscosecha observada en una planta o parte de la misma sometida a los procedimientos divulgados en comparación con la planta o parte de la misma no sometida a los procedimientos divulgados. Se puede determinar un aumento en la vida útil o una reducción en la pérdida poscosecha en una planta o parte de planta en comparación con una planta de control o parte de planta que no se ha tratado con una composición que comprende un polinucleótido y un agente de transferencia. Cuando se usa en este contexto, una planta de control es una planta que no se ha sometido a un tratamiento con un compuesto inhibidor de la PPO o un polinucleótido, plantas no transgénicas o plantas que no muestran una expresión reducida de una PPO. Dichas plantas de control pueden incluir plantas no tratadas o plantas tratadas simuladas. Las frases se pueden referir a plantas no transgénicas o plantas que no comprenden un casete de expresión que suprime eficazmente la actividad de la PPO.

35 Como se usa en la presente memoria, las frases "proporciona una reducción", "eficaz para suprimir" y "suprime eficazmente" cuando se usa en el contexto de un transcrito o una proteína en una planta o parte de planta, se refiere a cualquier disminución mensurable en el nivel de transcrito o proteína en una planta o parte de planta. Por lo tanto, la expresión de un gen se puede suprimir cuando existe una reducción en los niveles de un transcrito del gen, una reducción en los niveles de una proteína codificada por el gen, una reducción en la actividad del transcrito del gen, una reducción en la actividad de una proteína codificada por el gen, cualquiera de las condiciones anteriores o cualquier combinación de las condiciones anteriores. En este contexto, la actividad de un transcrito incluye su capacidad de traducirse en una proteína y/o ejercer cualquier efecto biológico o bioquímico mediado por ARN. En este contexto, la actividad de una proteína incluye su capacidad para ejercer cualquier efecto biológico o bioquímico mediado por proteínas. Se puede determinar una supresión de la expresión génica en una planta o parte de la planta en una comparación de los niveles o actividades del producto génico en una planta tratada con una planta o parte de planta de control que no se ha tratado con una composición que comprende un polinucleótido y un agente de transferencia. Cuando se usa en este contexto, una planta de control o parte de planta es una planta o parte de planta que no se ha sometido a tratamiento con polinucleótido y un agente de transferencia. Dichas plantas de control o partes de plantas pueden incluir plantas y partes de plantas no tratadas o tratadas en forma simulada. Se puede determinar una reducción del nivel de un transcrito o proteína en una planta o parte de planta en comparación con una planta de control o parte de planta que no se ha tratado con una composición que comprende un

polinucleótido y un agente de transferencia. Cuando se usa en este contexto, una planta de control o parte de planta es una planta o parte de planta que no se ha sometido a tratamiento con un compuesto inhibidor de la PPO, un polinucleótido. Tales plantas de control o partes de plantas pueden incluir plantas y partes de plantas no tratadas o tratadas en forma simulada. Las frases se pueden referir a plantas no transgénicas o plantas que no comprenden un casete de expresión que tiene los nucleótidos continuos de un gen PPO, o una planta que no comprende un transgén.

Como se usa en la presente memoria, la frase "en la que dicha planta no comprende un transgén" se refiere a una planta que carece de una molécula de ADN que comprende un promotor que está operativamente unido a un polinucleótido o un vector viral recombinante.

Como se usa en la presente memoria, el término "transcrito" corresponde a cualquier ARN que se produce a partir de un gen mediante el procedimiento de transcripción. Por lo tanto, un transcrito de un gen puede comprender un producto de transcripción primario que puede contener intrones o puede comprender un ARN maduro que carece de intrones.

Como se usa en la presente memoria, "polinucleótido" se puede referir a una molécula de ADN o ARN que contiene múltiples nucleótidos y generalmente se refiere tanto a "oligonucleótidos" (una molécula de polinucleótido de 18-25 nucleótidos de longitud) como a polinucleótidos más largos de 26 o más nucleótidos. Las composiciones divulgadas en la presente memoria incluyen oligonucleótidos que tienen una longitud de 18-25 nucleótidos (18 unidades repetitivas, 19 unidades repetitivas, 20 unidades repetitivas, 21 unidades repetitivas, 22 unidades repetitivas, 23 unidades repetitivas, 24 unidades repetitivas, o 25 unidades repetitivas), y mayor, o polinucleótidos de longitud media que tienen una longitud de 26 o más nucleótidos (polinucleótidos de 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95, aproximadamente 100, aproximadamente 110, aproximadamente 120, aproximadamente 130, aproximadamente 140, aproximadamente 150, aproximadamente 160, aproximadamente 170, aproximadamente 180, aproximadamente 190, aproximadamente 200, aproximadamente 210, aproximadamente 220, aproximadamente 230, aproximadamente 240, aproximadamente 250, aproximadamente 260, aproximadamente 270, aproximadamente 280, aproximadamente 290, o aproximadamente 300 nucleótidos), o polinucleótidos largos que tienen una longitud mayor que 300 nucleótidos (por ejemplo, polinucleótidos de entre 300 a 400 nucleótidos, entre 400 a 500 nucleótidos, entre 500 a 600 nucleótidos, entre 600 a 700 nucleótidos, entre 700 a 800 nucleótidos, entre 800 a 900 nucleótidos, entre 900 a 1000 nucleótidos, entre 300 a 500 nucleótidos, entre 300 a 600 nucleótidos, entre aproximadamente 300 a 700 nucleótidos, entre 300 a 800 nucleótidos, entre aproximadamente 300 a 900 nucleótidos, o aproximadamente 1000 nucleótidos de longitud, o incluso mayor que 1000 nucleótidos de longitud, por ejemplo, hasta la longitud completa de un gen diana de la polifenol oxidasa (PPO), tal como PPO11, que incluye porciones codificadoras o no codificadoras o codificadoras y no codificadoras del gen diana de la polifenol oxidasa (PPO). Cuando un polinucleótido es de cadena doble, su longitud se puede describir de manera similar en términos de pares de bases.

Las composiciones de polinucleótidos usadas en los procedimientos desvelados en la presente memoria incluyen composiciones que incluyen oligonucleótidos, polinucleótidos o una mezcla de ambos, que incluyen: ARN o ADN o híbridos de ARN/ADN u oligonucleótidos o polinucleótidos modificados químicamente o una mezcla de los mismos. El polinucleótido puede ser una combinación de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos, por ejemplo, polinucleótidos sintéticos que consisten principalmente en ribonucleótidos, pero con uno o más desoxirribonucleótidos terminales o polinucleótidos sintéticos que consisten principalmente en desoxirribonucleótidos, pero con uno o más dideoxirribonucleótidos terminales. El polinucleótido puede incluir nucleótidos no canónicos tal como inosina, tiouridina o pseudouridina. El polinucleótido puede incluir nucleótidos modificados químicamente. Los ejemplos de oligonucleótidos o polinucleótidos modificados químicamente son bien conocidos en la técnica; véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patentes de los Estados Unidos 2011/0171287, 2011/0171176, 2011/0152353, 2011/0152346 y 2011/0160082. Los ejemplos ilustrativos incluyen la estructura de fosfodiéster natural de un oligonucleótido o polinucleótido que se puede modificar parcial o completamente con fosforotioato, fosforoditioato o modificaciones de enlaces internucleotídicos de metilfosfonato, se pueden usar bases de nucleósidos modificadas o azúcares modificados en síntesis de oligonucleótidos o polinucleótidos, y los oligonucleótidos o polinucleótidos se pueden etiquetar con un resto fluorescente (por ejemplo, fluoresceína o rodamina) u otra etiqueta (por ejemplo, biotina).

Los polinucleótidos pueden ser ARN de cadena simple o de cadena doble, ADN de cadena simple o de cadena doble, híbridos de ADN/ARN de cadena doble y análogos modificados de los mismos. Los polinucleótidos que proporcionan ARN de cadena simple en la célula vegetal pueden ser: (a) una molécula de ARN de cadena simple (ARNss), (b) una molécula de ARN de cadena simple que se autohíbrida para formar una molécula de ARN de cadena doble, (c) una molécula de ARN de cadena doble (ARNds), (d) una molécula de ADN de cadena simple (ADNss), (e) una molécula de ADN de cadena simple que se autohíbrida para formar una molécula de ADN de cadena doble, (f) una molécula de ADN de cadena simple que incluye un gen Pol III modificado que se transcribe a una molécula de ARN, (g) una molécula de ADN de cadena doble (ADNds), (h) una molécula de ADN de cadena doble que incluye un gen Pol III modificado que se transcribe a una molécula de ARN, e (i) una molécula de

ARN/ADN hibridada de cadena doble, o sus combinaciones. Estos polinucleótidos pueden comprender tanto residuos de ácido ribonucleico como residuos de ácido desoxirribonucleico. Estos polinucleótidos pueden incluir nucleótidos modificados químicamente o nucleótidos no canónicos. En los procedimientos desvelados en la presente memoria, los polinucleótidos pueden incluir ADN de cadena doble formado por hibridación intramolecular, ADN de cadena doble formado por hibridación intermolecular, ARN de cadena doble formado por hibridación intramolecular o ARN de cadena doble formado por hibridación intermolecular. Cuando el polinucleótido es un ARNds, la cadena antisentido puede comprender al menos 18 nucleótidos que son esencialmente complementarios al gen de la polifenol oxidasa (PPO) diana. Los polinucleótidos pueden incluir ADN de cadena simple o ARN de cadena simple que se autohibrida para formar una estructura de horquilla que tiene una estructura al menos parcialmente de cadena doble que incluye al menos un segmento que se hibrida al ARN transcrito desde el gen al que se dirige la supresión. Sin pretender estar ligado a ningún mecanismo, se considera que dichos polinucleótidos son o producen ARN de cadena simple con al menos un segmento que se hibrida con ARN transcrito del gen al que se dirige la supresión. Los polinucleótidos se pueden unir operativamente a un promotor, generalmente un promotor funcional en una planta, por ejemplo, un promotor pol II, un promotor pol III, un promotor pol IV o un promotor pol V.

Las moléculas de polinucleótidos desveladas en la presente memoria están diseñadas para modular la expresión mediante la inducción de la regulación o supresión de un gen endógeno de la polifenol oxidasa (PPO), tal como PPO11, para reducir la expresión de la PPO11 en una planta y están diseñadas para tener una secuencia de nucleótidos esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a la secuencia de nucleótidos de un gen endógeno de la polifenol oxidasa (PPO) de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir de un gen endógeno de la polifenol oxidasa (PPO) de una planta, que puede ser una secuencia codificadora o no codificadora. Estas moléculas polinucleotídicas eficaces que modulan la expresión se denominan en la presente memoria "activador o activadores". Por "esencialmente idéntico" o "esencialmente complementario" se entiende que los polinucleótidos activadores (o al menos una cadena de un polinucleótido de cadena doble) tienen identidad o complementariedad suficiente con el gen endógeno o el ARN transcrito del gen endógeno de la polifenol oxidasa (PPO) (por ejemplo, el transcrito) para suprimir la expresión del gen endógeno de la polifenol oxidasa (PPO) (por ejemplo, para lograr una reducción en los niveles o la actividad del transcrito del gen y/o la proteína codificada). Los polinucleótidos activadores desvelados en la presente memoria se pueden dirigir a un transgén de la polifenol oxidasa (PPO) presente en la planta. No se requiere que los polinucleótidos de los procedimientos y composiciones desvelados en la presente memoria tengan una identidad de 100 por ciento para una complementariedad con el gen endógeno de la polifenol oxidasa (PPO) o con el ARN transcrito del gen endógeno de la polifenol oxidasa (PPO) (es decir, el transcrito) para suprimir la expresión del gen endógeno de la polifenol oxidasa (PPO) (es decir, para lograr una reducción en los niveles o la actividad del transcrito del gen o proteína codificada). Por lo tanto, el polinucleótido o una porción del mismo se puede diseñar de modo que sea esencialmente idéntico o esencialmente complementario con una secuencia de al menos 18 o 19 nucleótidos contiguos en el gen diana o el ARN mensajero transcrito del gen diana (por ejemplo, el transcrito). Un polinucleótido "esencialmente idéntico" puede tener una identidad de secuencia de 100 por ciento o al menos aproximadamente 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 por ciento de identidad de secuencia cuando se compara con la secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen diana endógeno o en un ARN transcrito del gen diana (por ejemplo, el transcrito). Un polinucleótido "esencialmente complementario" puede tener una complementariedad de secuencia de 100 por ciento o al menos aproximadamente 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 por ciento de complementariedad de secuencia cuando se compara con la secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen diana o en el ARN transcrito del gen diana.

Los polinucleótidos usados en los procedimientos y composiciones desvelados en la presente memoria pueden ser esencialmente idénticos o esencialmente complementarios a cualquiera de: i) regiones conservadas de genes de la Polifenol Oxidasa (PPO) de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas; ii) regiones conservadas de genes de la Polifenol Oxidasa (PPO) de plantas monocotiledóneas; o iii) regiones conservadas de genes de la Polifenol Oxidasa (PPO) de plantas dicotiledóneas. Tales polinucleótidos que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios a dichas regiones conservadas se pueden usar para mejorar la vida útil y reducir las pérdidas poscosecha mediante la supresión de la expresión de genes de la Polifenol Oxidasa (PPO) en varias plantas dicotiledóneas y/o monocotiledóneas.

Los polinucleótidos que contienen apareamientos erróneos con el gen o transcrito diana en consecuencia se pueden usar en ciertas composiciones y procedimientos desvelados en la presente memoria. Un polinucleótido puede comprender al menos 19 nucleótidos contiguos que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios con dicho gen o dicho transcrito o comprender al menos 19 nucleótidos contiguos que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios con el gen diana o el transcrito del gen diana. Un polinucleótido de 19 nucleótidos continuos que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario al gen diana endógeno o a un ARN transcrito del gen diana (por ejemplo, el transcrito) puede tener 1 o 2 errores de apareamientos con el gen o transcrito diana. Un polinucleótido de 20 o más nucleótidos que contiene un tramo de 19 nucleótidos contiguos de identidad o complementariedad con el gen diana endógeno o con un ARN transcrito del gen diana puede tener 1 o 2 errores de apareamientos con el gen o transcrito diana. Un polinucleótido de 21 nucleótidos continuos que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario al gen diana endógeno o a un ARN transcrito del gen diana (por ejemplo, el transcrito) puede tener 1, 2 o 3 errores de apareamientos con el gen o transcrito diana. Un polinucleótido de 22 o más nucleótidos que contiene un tramo de 21 nucleótidos contiguos de identidad o

complementariedad con el gen diana endógeno o un ARN transcrito del gen diana puede tener 1, 2 o 3 errores de apareamientos con el gen o transcrito diana. Al diseñar polinucleótidos con errores de apareamientos con un gen diana endógeno o con un ARN transcrito del gen diana, se pueden usar errores de apareamientos de ciertos tipos y en ciertas posiciones con mayor probabilidad de tolerancia. En ciertos ejemplos, los errores de apareamientos formados entre los residuos de adenina y citosina o guanosina y uracilo se usan según lo descrito por Du *et al.* Nucleic Acids Research, 2005, vol. 33, No. 5 1671-1677. En ciertos ejemplos, los errores de apareamientos en regiones de superposición de 19 pares de bases pueden estar en las posiciones de baja tolerancia 5, 7, 8 u 11 (desde el extremo 5' de una diana de 19 nucleótidos) con residuos de error de apareamiento de nucleótidos bien tolerados, en las posiciones de tolerancia media 3, 4, y 12-17, y/o en las posiciones de nucleótidos de alta tolerancia en cualquier extremo de la región de complementariedad (es decir, las posiciones 1, 2, 18 y 19) como se describe por Du *et al.* Nucleic Acids Research, 2005, vol. 33, No. 5 1671-1677. También se prevé que los errores de apareamientos tolerados se pueden determinar empíricamente en ensayos en los que el polinucleótido se aplica a las plantas a través de los procedimientos desvelados en la presente memoria y las plantas tratadas analizadas para la supresión de la expresión génica de la Polifenol Oxidasa (PPO) o la aparición de una vida útil mejorada y pérdidas poscosecha reducidas.

Las moléculas de polinucleótidos se pueden diseñar de modo de tener 100% de identidad de secuencia o complementariedad con un alelo o un miembro de la familia de una secuencia codificadora o no codificadora del gen de la polifenol oxidasa (PPO) diana dado. Los genes de la polifenol oxidasa (PPO) diana incluyen tanto los genes de la polifenol oxidasa (PPO) de SEQ ID NÚM.: 1-23 así como los genes ortólogos de la polifenol oxidasa (PPO) obtenibles de otros cultivos. Alternativamente, las moléculas de polinucleótidos se pueden diseñar de modo de tener 100 por ciento de identidad de secuencia o complementariedad con múltiples alelos o miembros de la familia de un gen diana dado.

Las composiciones y procedimientos de polinucleótidos desvelados en la presente memoria típicamente efectúan la regulación o modulación (por ejemplo, supresión) de la expresión génica durante un periodo de la vida de la planta tratada de al menos 1 semana o más y típicamente de manera sistémica. Por ejemplo, a los pocos días de tratar una hoja de planta con una composición de polinucleótidos desvelada en la presente memoria, se pueden detectar ARNs primarios y transcritos en otras hojas laterales a y por encima de la hoja tratada y en el tejido apical. Se desvelan procedimientos para suprimir sistémicamente la expresión de un gen en una planta, los procedimientos comprenden tratar dicha planta con una composición que comprende al menos un polinucleótido y un agente de transferencia, en la que dicho polinucleótido comprende al menos 18 o al menos 19 nucleótidos contiguos que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios a un gen o un transcrito que codifica un gen de la polifenol oxidasa (PPO) de la planta, por lo que la expresión del gen en dicha planta o su progenie se suprime sistémicamente en comparación con una planta de control que no se ha tratado con la composición.

Las composiciones usadas para suprimir un gen diana pueden comprender uno o más polinucleótidos que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios a múltiples genes, o a múltiples segmentos de uno o más genes. Las composiciones usadas para suprimir un gen diana pueden comprender uno o más polinucleótidos que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios a múltiples segmentos consecutivos de un gen diana, múltiples segmentos no consecutivos de un gen diana, múltiples alelos de un gen diana o múltiples genes diana de una o más especies.

El polinucleótido puede incluir dos o más copias de una secuencia de nucleótidos (de 18 o más nucleótidos) en la que las copias se disponen en forma de tándem. Alternativamente, el polinucleótido puede incluir dos o más copias de una secuencia de nucleótidos (de 18 o más nucleótidos) en la que las copias están dispuestas en forma de repetición invertida (formando una cadena al menos parcialmente autocomplementaria). El polinucleótido puede incluir copias en tándem y de repetición invertida. Ya sea que esté dispuesta en forma de repetición en tándem o repetición invertida, cada copia puede ser directamente contigua a la siguiente, o los pares de copias pueden estar separados por un espaciador opcional de uno o más nucleótidos. El espaciador opcional puede ser una secuencia no relacionada (es decir, no esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a las copias, ni esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos del gen diana endógeno o ARN transcrito del gen diana endógeno). Alternativamente, el espaciador opcional puede incluir una secuencia que es complementaria a un segmento del gen diana endógeno adyacente al segmento al que se dirigen las copias. El polinucleótido puede incluir dos copias de una secuencia de nucleótidos de entre 20 y 30 nucleótidos, en la que las dos copias están separadas por un espaciador no mayor que la longitud de la secuencia de nucleótidos.

Traslape

Las moléculas activadoras de polinucleótidos se pueden identificar mediante el "traslape" de dianas génicas en fragmentos de longitud aleatoria, por ejemplo, 200-300 polinucleótidos de longitud, con regiones parcialmente superpuestas, por ejemplo, aproximadamente 25 regiones superpuestas de nucleótidos a lo largo de la longitud del gen diana. Se pueden alinear múltiples secuencias del gen diana y las regiones de secuencia de polinucleótidos con homología en común se identifican como posibles moléculas activadoras para múltiples dianas. Se pueden alinear múltiples secuencias diana y las regiones de secuencia con poca homología se identifican como posibles moléculas activadoras para distinguir selectivamente dianas. Para suprimir selectivamente un gen único, las secuencias

activadoras se pueden seleccionar de regiones que son únicas para el gen diana, ya sea de la región transcrita o de las regiones no codificadoras, por ejemplo, regiones promotoras, regiones 3' no traducidas e intrones.

Los fragmentos de polinucleótidos se diseñan a lo largo de las regiones codificadoras de longitud completa y no traducidas de un gen de la polifenol oxidasa (PPO) o miembro de la familia como fragmentos superpuestos contiguos de 200-300 polinucleótidos de longitud o longitudes de fragmentos que representan un porcentaje del gen diana de la polifenol oxidasa (PPO). Estos fragmentos se aplican por vía tópica (como ADNss o ARNss, sentido o antisentido, ARNds, o ADNds) para determinar la eficacia relativa para proporcionar el fenotipo con vida útil aumentada y pérdidas poscosecha reducidas. Los fragmentos que proporcionan la actividad deseada también se pueden subdividir en 50-60 fragmentos de polinucleótidos que se evalúan para proporcionar el fenotipo con vida útil aumentada y pérdidas poscosecha reducidas. Después, los fragmentos de 50-60 bases con la actividad deseada se pueden subdividir en fragmentos de 19-30 bases que se evalúan para proporcionar el fenotipo con vida útil aumentada y pérdidas poscosecha reducidas. Una vez que se determina la eficacia relativa, los fragmentos se usan individualmente o en combinación en una o más mezclas para determinar la composición o mezcla activadora eficaz de polinucleótidos activadores para proporcionar el fenotipo con vida útil aumentada y pérdidas poscosecha reducidas.

Se alinean las secuencias codificadoras y/o no codificadoras de las familias de genes de la polifenol oxidasa (PPO) en el cultivo de interés y se evalúan 200-300 fragmentos de polinucleótidos de las regiones menos homólogas entre las secuencias alineadas usando polinucleótidos aplicados tópicamente (como ADNss o ARNss sentido o antisentido, ARNds, o ADNds) para determinar su eficacia relativa mediante la provisión del fenotipo con vida útil aumentada y pérdidas poscosecha reducidas. Los segmentos eficaces también se subdividen en 50-60 fragmentos de polinucleótidos, priorizados por menor homología y se reevalúan usando polinucleótidos aplicados tópicamente. Los 50-60 fragmentos de polinucleótidos eficaces se subdividen en 19-30 fragmentos de polinucleótidos, priorizados por menor homología, y se evalúan nuevamente para la inducción del fenotipo con vida útil aumentada y pérdidas poscosecha reducidas. Una vez que se determina la eficacia relativa, los fragmentos se usan individualmente, o se evalúan nuevamente en combinación con uno o más de otros fragmentos para determinar la composición activadora o la mezcla de polinucleótidos activadores para proporcionar el fenotipo con rendimiento/calidad.

Se alinean las secuencias codificadoras y/o no codificadoras de las familias de genes de la polifenol oxidasa (PPO) en el cultivo de interés y se evalúan 200-300 fragmentos de polinucleótidos de las regiones más homólogas entre las secuencias alineadas usando polinucleótidos aplicados tópicamente (como ADNss o ARNss sentido o antisentido, ARNds, o ADNds) para determinar su eficacia relativa mediante la provisión del fenotipo con vida útil aumentada y pérdidas poscosecha reducidas. Los segmentos eficaces se subdividen en 50-60 fragmentos de polinucleótidos, priorizados por mayor homología y se reevalúan usando polinucleótidos aplicados tópicamente. Los 50-60 fragmentos de polinucleótidos eficaces se subdividen en 19-30 fragmentos de polinucleótidos, priorizados por mayor homología, y se evalúan nuevamente para la inducción del fenotipo con vida útil aumentada y pérdidas poscosecha reducidas. Una vez que se determina la eficacia relativa, los fragmentos se utilizan individualmente, o en combinación con uno o más de otros fragmentos para determinar la composición activadora o la mezcla de polinucleótidos activadores para proporcionar el fenotipo con vida útil aumentada y pérdidas poscosecha reducidas.

También, se desvelan en la presente memoria procedimientos para identificar un polinucleótido preferido para proporcionar una vida útil aumentada y pérdidas poscosecha reducidas en una planta. Las poblaciones de polinucleótidos candidatos que son esencialmente idénticas o esencialmente complementarias con un gen de la polifenol oxidasa (PPO) o transcrito del gen de la polifenol oxidasa (PPO) se pueden generar por una variedad de enfoques, que incluyen cualquiera de los enfoques de traslape, menor homología o mayor homología proporcionados en la presente memoria. Dichas poblaciones de polinucleótidos también pueden generarse u obtenerse a partir de cualquiera de los polinucleótidos o genes proporcionados en la presente memoria en el listado de secuencias. Dichas poblaciones de polinucleótidos también se pueden generar u obtener a partir de cualquier gen que sea ortólogo a los genes proporcionados en la presente memoria en el listado de secuencias. Dichos polinucleótidos se pueden aplicar tópicamente a una superficie de plantas en una composición que comprende al menos un polinucleótido de dicha población y un agente de transferencia para obtener las plantas tratadas. Se identifican las plantas tratadas que exhiben supresión del gen de la polifenol oxidasa (PPO) y/o exhiben una vida útil aumentada y pérdidas poscosecha reducidas, de este modo identificando un polinucleótido preferido con vida útil aumentada y pérdidas poscosecha reducidas en una planta. La supresión del gen de la polifenol oxidasa (PPO) se puede determinar mediante cualquier ensayo para los niveles y/o actividad de un producto génico de la polifenol oxidasa (PPO) (es decir, transcrito o proteína). Los ensayos adecuados para las transcritos incluyen ensayos de transcriptasa inversa PCR® (qRT-PCR) semicuantitativos o cuantitativos. Los ensayos adecuados para proteínas incluyen inmunoensayos semicuantitativos o cuantitativos, ensayos de actividad bioquímica o ensayos de actividad biológica. Los polinucleótidos se pueden aplicar solos. Alternativamente, los polinucleótidos se pueden aplicar en mezclas de múltiples polinucleótidos. Cuando se identifica un grupo de polinucleótidos que proporciona la supresión del gen de la polifenol oxidasa (PPO) y/o una vida útil aumentada y pérdidas poscosecha reducidas, la mezcla se somete a desreplicación y se vuelve a analizar según sea necesario o deseado para identificar uno o más polinucleótidos preferidos que aumentan la vida útil aumentada y reducen las pérdidas poscosecha en una planta.

Los procedimientos para fabricar polinucleótidos son bien conocidos en la técnica. Dichos procedimientos para

fabricar polinucleótidos pueden incluir biosíntesis *in vivo*, síntesis enzimática *in vitro*, o síntesis química. Las moléculas de ARN se pueden obtener mediante síntesis *in vivo* o *in vitro* a partir de moldes de ADN en los que un promotor adecuado está operativamente unido al polinucleótido y se proporciona una ARN polimerasa dependiente de ADN adecuada. Las ARN polimerasas dependientes de ADN incluyen *E. coli* u otras ARN polimerasas bacterianas así como las ARN polimerasas de bacteriófago tal como las ARN polimerasas T7, T3 y SP6. La preparación comercial de oligonucleótidos a menudo proporciona dos desoxirribonucleótidos en el extremo 3 de la cadena de sentido. Las moléculas de polinucleótidos largos se pueden sintetizar a partir de kits comercialmente disponibles, por ejemplo, kits de Applied Biosystems/Ambion (Austin, TX) que tienen un ADN ligado en el extremo 5' que codifica un promotor de la polimerasa T7 de bacteriófago que produce cadenas de ARN que se pueden ensamblar en un ARNds. Alternativamente, las moléculas de ARNds se pueden producir a partir de casetes de expresión en células bacterianas que tienen actividad enzimática de ARNasa III regulada o deficiente. Las moléculas polinucleótidas largas también se pueden ensamblar a partir de múltiples fragmentos de ARN o ADN. Los parámetros de diseño tal como la puntuación de Reynolds (Reynolds *et al.* Nature Biotechnology 22, 326 - 330 (2004) y Tuschl rules (Pei and Tuschl, Nature Methods 3 (9): 670-676, 2006) son conocidos en la técnica y se pueden usar para seleccionar secuencias de polinucleótidos eficaces en el silenciamiento génico. Se puede usar diseño aleatorio o selección empírica de secuencias de polinucleótidos para seleccionar secuencias de polinucleótidos eficaces en el silenciamiento génico. La secuencia de un polinucleótido se puede analizar frente al ADN genómico de la planta deseada para minimizar el silenciamiento accidental de otros genes.

Si bien no existe un límite superior para las concentraciones y las dosis de las moléculas de polinucleótidos que pueden ser útiles en los procedimientos y composiciones desvelados en la presente memoria, generalmente se buscan concentraciones y dosis eficaces más bajas por propósitos de eficiencia. Las concentraciones se pueden ajustar en consideración del volumen de pulverización o tratamiento aplicado a las hojas de la planta u otras superficies de las partes de la planta, tal como pétalos de flores, tallos, tubérculos, frutas, anteras, polen, hojas, raíces o semillas. Un tratamiento útil para plantas herbáceas usando moléculas de polinucleótidos de 25 unidades repetitivas-puede ser aproximadamente 1 nanomol (nmol) de moléculas de polinucleótidos por planta, por ejemplo, de 0,05 a 1 nmol de polinucleótidos por planta. Otros tratamientos para plantas herbáceas incluyen intervalos útiles de 0,05 a 100 nmol, o 0,1 a 20 nmol, o 1 nmol a 10 nmol de polinucleótidos por planta. En ciertos casos, se aplican 40 a 50 nmol de un polinucleótido de ADNss. En ciertos casos, se aplican 0,5 nmol a 2 nmol de un ARNds. En ciertos casos, se aplica una composición que contiene 0,5 a 2,0 mg/ml, o aproximadamente 0,14 mg/ml de ARNds o ADNss (21 unidades repetitivas). En ciertos casos, se aplica una composición de 0,5 a 1,5 mg/ml de un polinucleótido de ARNds largo (es decir, 50 a 200 o más nucleótidos). En ciertos casos, se aplica 1 nmol a 5 nmol de un ARNds a una planta. En ciertos casos, la composición de polinucleótidos aplicada tópicamente a la planta contiene el al menos un polinucleótido a una concentración de 0,01 a 10 miligramos por mililitro, o 0,05 a 2 miligramos por mililitro, o 0,1 a 2 miligramos por mililitro. Las plantas muy grandes, los árboles o las vides pueden requerir cantidades proporcionalmente mayores de polinucleótidos. Cuando se usan moléculas de ARNds largas que se pueden procesar en múltiples oligonucleótidos, se pueden usar concentraciones más bajas. Para ilustrar esto, el factor IX, cuando se aplica a moléculas de oligonucleótidos, se usa arbitrariamente para indicar un tratamiento de 0,8 nmol de molécula de polinucleótido por planta; 10X, 8 nmol de molécula de polinucleótido por planta; y 100X, 80 nmol de molécula de polinucleótido por planta.

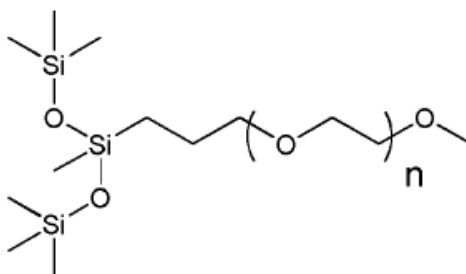
Las composiciones de polinucleótidos desveladas en la presente memoria son útiles en composiciones, tal como líquidos que comprenden moléculas de polinucleótidos, solas o en combinación con otros componentes en el mismo líquido o en líquidos aplicados por separado que proporcionan un agente de transferencia. Como se usa en la presente memoria, un agente de transferencia es un agente que, cuando se combina con un polinucleótido en una composición que se aplica tópicamente a una superficie de planta diana, permite que el polinucleótido entre en una célula vegetal. Un agente de transferencia puede ser un agente que condiciona la superficie del tejido vegetal, por ejemplo, semillas, hojas, tallos, raíces, flores o frutos, para que las moléculas de polinucleótidos penetren en las células vegetales. La transferencia de polinucleótidos a las células vegetales se puede facilitar mediante la aplicación previa o simultánea de un agente de transferencia de polinucleótidos al tejido vegetal. El agente de transferencia se puede aplicar después de la aplicación de la composición de polinucleótidos. El agente de transferencia de polinucleótidos permite una vía para polinucleótidos a través de barreras de cera de cutícula, estomas y/o pared celular o barreras de membrana en las células vegetales. Los agentes de transferencia adecuados para facilitar la transferencia del polinucleótido a una célula vegetal incluyen agentes que aumentan la permeabilidad del exterior de la planta o que aumentan la permeabilidad de las células vegetales a oligonucleótidos o polinucleótidos. Dichos agentes incluyen un agente químico, o un agente físico, o combinaciones de los mismos para facilitar la transferencia de la composición a una célula vegetal. Los agentes químicos para acondicionamiento o transferencia incluyen (a) tensioactivos, (b) un disolvente orgánico o una solución acuosa o mezclas acuosas de disolventes orgánicos, (c) agentes oxidantes, (d) ácidos, (e) bases, (f) aceites, (g) enzimas, o combinaciones de los mismos. El procedimiento puede incluir opcionalmente una etapa de incubación, una etapa de neutralización (por ejemplo, para neutralizar un ácido, base o agente oxidante, o para inactivar una enzima), una etapa de enjuague o combinaciones de las mismas. Los agentes o tratamientos para el acondicionamiento de una planta para la permeación por polinucleótidos pueden incluir emulsiones, emulsiones inversas, liposomas y otras composiciones de tipo micelar. Los agentes o tratamientos para el acondicionamiento de una planta para la permeación por polinucleótidos pueden incluir contraiones u otras moléculas que es sabido que se asocian con moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, iones de amonio inorgánicos, iones de alquilamonio, iones de litio, poliaminas tal como

- espermina, espermidina, o putrescina y otros cationes. Los disolventes orgánicos útiles para acondicionar una planta para la permeación por polinucleótidos incluyen DMSO, DMF, piridina, N-pirrolidina, hexametilfosforamida, acetonitrilo, dioxano, polipropilenglicol, otros disolventes miscibles con agua o que disuelven los fosfonucleótidos en sistemas no acuosos (tal como los usados en reacciones sintéticas). Se pueden usar aceites de origen natural o sintéticos con o sin tensioactivos o emulsionantes, por ejemplo, aceites de origen vegetal, aceites de cultivo (tal como los enumerados en el 9th Compendium of Herbicide Adjuvants, disponibles públicamente en la red informática mundial (internet) herbicide.adjuvants.com), por ejemplo, se pueden usar aceites parafínicos, ésteres de ácidos grasos de poliol o aceites con moléculas de cadena corta modificadas con amidas o poliaminas tal como polietilenimina o N-pirrolidina. Los agentes de transferencia incluyen preparaciones de organosilicona.
- 5 Una preparación de organosilicona que está disponible comercialmente como tensioactivo Silwet® L-77 con número CAS 27306-78-1 y número EPA: CAL.REG.NO. 5905-50073-AA, y actualmente disponible en Momentive Performance Materials, Albany, New York, se puede usar para preparar una composición de polinucleótidos. Se puede usar una preparación de organosilicona Silwet L-77 como tratamiento prepulverización de hojas de plantas u otras superficies de plantas, las concentraciones recién preparadas en el intervalo de 0,015 a 2 por ciento en peso (porcentaje en peso) (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,015, 0,02, 0,025, 0,03, 0,035, 0,04, 0,045, 0,05, 0,055, 0,06, 0,065, 0,07, 0,075, 0,08, 0,085, 0,09, 0,095, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,5% en peso) son eficaces en la preparación de una hoja u otra superficie de planta para la transferencia de moléculas de polinucleótido en las células vegetales a partir de una aplicación tópica en la superficie. En ciertos procedimientos y composiciones desvelados en la presente memoria, se puede usar una composición que comprende una molécula de polinucleótido y una preparación de organosilicona que comprende Silwet L-77 en el intervalo de 0,015 a 2 por ciento en peso (porcentaje en peso) (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,015, 0,02, 0,025, 0,03, 0,035, 0,04, 0,045, 0,05, 0,055, 0,06, 0,065, 0,07, 0,075, 0,08, 0,085, 0,09, 0,095, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,5% en peso). En ciertos procedimientos y composiciones desvelados en la presente memoria, se puede usar una composición que comprende una molécula de polinucleótido y una preparación de organosilicona que comprende Silwet L-77 en el intervalo de 0,3 a 1 por ciento en peso (porcentaje en peso) o 0,5 a 1% en peso (por ciento en peso).
- 10 En ciertos procedimientos y composiciones desvelados en la presente memoria, se puede usar una composición que comprende una molécula de polinucleótido y una preparación de organosilicona que comprende Silwet L-77 en el intervalo de 0,3 a 1 por ciento en peso (porcentaje en peso) o 0,5 a 1% en peso (por ciento en peso). Cualquiera de las preparaciones de organosilicona disponibles comercialmente proporcionadas en la siguiente Tabla 1 se puede usar como agentes de transferencia en una composición de polinucleótidos. Cuando se usa una preparación de organosilicona de la Tabla como tratamiento prepulverización de hojas de plantas u otras superficies, las concentraciones recién preparadas en el intervalo de 0,015 a 2 por ciento en peso (porcentaje en peso) (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,015, 0,02, 0,025, 0,03, 0,035, 0,04, 0,045, 0,05, 0,055, 0,06, 0,065, 0,07, 0,075, 0,08, 0,085, 0,09, 0,095, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,5% en peso) pueden ser eficaces para preparar una hoja u otra superficie de planta para la transferencia de las moléculas de polinucleótido en las células vegetales a partir de una aplicación tópica en la superficie. En ciertos procedimientos y composiciones desvelados en la presente memoria, puede ser una composición que comprende una molécula de polinucleótido y una preparación de organosilicona de la Tabla 1 en el intervalo de 0,015 a 2 por ciento en peso (porcentaje en peso) (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,015, 0,02, 0,025, 0,03, 0,035, 0,04, 0,045, 0,05, 0,055, 0,06, 0,065, 0,07, 0,075, 0,08, 0,085, 0,09, 0,095, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,5 (por ciento en peso).

Tabla 1. Preparaciones de organosilicona de ejemplo organosilicona

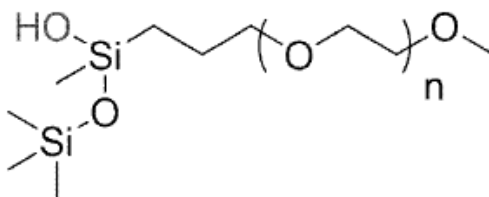
Nombre	Número CAS	Fabricante ^{1,2}
BREAK-THRU® S 321	na	Evonik Industries AG
BREAK-THRU® S 200	67674-67-3	Evonik Industries AG
BREAK-THRU® OE 441	68937-55-3	Evonik Industries AG
BREAK-THRU® S 278	27306-78-1	Evonik Goldschmidt
BREAK-THRU® S 243	na	Evonik Industries AG
Silwet® L-77	27306-78-1	Momentive Performance Materials
Silwet® HS 429	na	Momentive Performance Materials
Silwet® HS 312	na	Momentive Performance Materials
BREAK-THRU® S 233	134180-76-0	Evonik Industries AG
Silwet® HS 508		Momentive Performance Materials
Silwet® HS 604		Momentive Performance Materials
1 Evonik Industries AG, Essen, Germany		
2 Momentive Performance Materials, Albany, New York		

Las preparaciones de organosilicona usadas en los procedimientos y composiciones desvelados en la presente memoria pueden comprender uno o más compuestos de organosilicona eficaces. Como se usa en la presente memoria, la frase "compuesto de organosilicona eficaz" se usa para describir cualquier compuesto de organosilicona que se encuentra en una preparación de organosilicona que permite que un polinucleótido entre en una célula vegetal. Un compuesto de organosilicona eficaz puede permitir que un polinucleótido entre en una célula vegetal de una manera que permita la supresión mediada por el polinucleótido de la expresión del gen diana en la célula vegetal. En general, los compuestos de organosilicona eficaces incluyen compuestos que pueden comprender: i) un grupo principal de trisiloxano que está unido covalentemente a, ii) un ligador de alquilo que incluye, un ligador de n-propilo, que está unido covalentemente a, iii) una cadena de poliglicol, que está covalentemente unido a, iv) un grupo terminal. Los grupos principales de trisiloxano de tales compuestos de organosilicona eficaces incluyen heptametiltrisiloxano. Los ligadores de alquilo pueden incluir un ligador de n-propilo. Las cadenas de poliglicol incluyen polietilenglicol o polipropilenglicol. Las cadenas de poliglicol pueden comprender una mezcla que proporciona una longitud de cadena promedio "n" de aproximadamente "7,5". La longitud de cadena promedio "n" puede oscilar de 5 a 14. Los grupos terminales pueden incluir grupos alquilo tal como un grupo metilo. Se considera que los compuestos de organosilicona eficaces incluyen tensioactivos de etoxilato de trisiloxano o heptametiltrisiloxano modificado con óxido de polialquileno.



(Compuesto I: heptametiltrisiloxano modificado con óxido de polialquileno, promedio $n=7,5$).

Un compuesto de organosilicona que se considera ineficaz comprende la fórmula:



Una preparación de organosilicona que comprende un compuesto de organosilicona que comprende un grupo principal de trisiloxano se puede usar en los procedimientos y composiciones desvelados en la presente memoria. Una preparación de organosilicona que comprende un compuesto de organosilicona que comprende un grupo principal de hexametiltrisiloxano se puede usar en los procedimientos y composiciones divulgadas en la presente memoria. Una composición de organosilicona que comprende el Compuesto I se puede usar en los procedimientos y composiciones desvelados en la presente memoria. Una composición de organosilicona que comprende el Compuesto I se puede usar en los procedimientos y composiciones desvelados en la presente memoria. En ciertos procedimientos y composiciones desvelados en la presente memoria, se puede usar una composición que comprende una molécula de polinucleótido y uno o más compuestos de organosilicona eficaces en el intervalo de 0,015 a 2 por ciento en peso (porcentaje en peso) (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,015, 0,02, 0,025, 0,03, 0,035, 0,04, 0,045, 0,05, 0,055, 0,06, 0,065, 0,07, 0,075, 0,08, 0,085, 0,09, 0,095, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,5% en peso).

Las composiciones de polinucleótidos que comprenden una preparación de organosilicona pueden comprender una sal tal como cloruro de amonio, bromuro de tetrabutilfosfonio, y/o sulfato de amonio. Cloruro de amonio, bromuro de tetrabutilfosfonio, y/o sulfato de amonio se pueden proporcionar en la composición de polinucleótidos a una concentración de 0,5% a 5% (p/v). Una concentración de cloruro de amonio, bromuro de tetrabutilfosfonio, y/o sulfato de amonio de 1% a 3%, o aproximadamente 2% (p/v) también se puede usar en las composiciones de polinucleótidos que comprenden una preparación de organosilicona. Las composiciones de polinucleótidos pueden comprender una sal de amonio a una concentración mayor o igual a 300 milimolar. Las composiciones de polinucleótidos que comprenden una preparación de organosilicona pueden comprender sulfato de amonio a concentraciones de 80 a 1200 mM o 150 mM a 600 mM.

Las composiciones de polinucleótidos también pueden comprender una sal de fosfato. Las sales de fosfato usadas en las composiciones incluyen las sales de fosfato de calcio, magnesio, potasio, o sodio. Las composiciones de polinucleótidos pueden comprender una sal de fosfato a una concentración de al menos aproximadamente 5 milimolar, al menos aproximadamente 10 milimolar, o al menos aproximadamente 20 milimolar. Las composiciones de polinucleótidos pueden comprender una sal de fosfato en un intervalo de 1 mM a 25 mM o en un intervalo de 5 mM a 25 mM. Las composiciones de polinucleótidos pueden comprender fosfato de sodio a una concentración de al menos 5 milimolar, al menos 10 milimolar, o al menos 20 milimolar. Las composiciones de polinucleótidos pueden comprender fosfato de sodio a una concentración de aproximadamente 5 milimolar, aproximadamente 10 milimolar, o aproximadamente 20 milimolar. Las composiciones de polinucleótidos pueden comprender una sal de fosfato de sodio en un intervalo de 1 mM a 25 mM o en un intervalo de 5 mM a 25 mM. Las composiciones de polinucleótidos pueden comprender una sal de fosfato de sodio en un intervalo de 10 mM a 160 mM o en un intervalo de 20 mM a 40 mM. Las composiciones de polinucleótidos pueden comprender a fosfato de sodio también a un pH de aproximadamente 6,8.

Otros agentes de transferencia o adyuvantes útiles para los agentes de transferencia que se pueden usar en las composiciones de polinucleótidos divulgadas en la presente memoria pueden incluir tensioactivos y/o moléculas eficaces contenidas en los mismos. Los tensioactivos y/o moléculas eficaces contenidas en los mismos incluyen sales de sodio o litio de ácidos grasos (tal como sebo o seboaminas o fosfolípidos) y tensioactivos de organosilicona. Las composiciones de polinucleótidos que comprenden un agente de transferencia se pueden formular con contraiones u otras moléculas que es sabido que se asocian con moléculas de ácido nucleico. Los ejemplos ilustrativos incluyen iones de tetraalquilamonio, iones de trialquilamonio, iones de sulfonio, iones de litio y poliaminas tal como espermina, espermidina o putrescina. Las composiciones de polinucleótidos se pueden formular con un herbicida no polinucleotídico. Las moléculas herbicidas no polinucleotídicas incluyen glifosato, herbicidas de ácido benzoico de tipo auxina que incluyen dicamba, clorambeno y TBA, glufosinato, herbicidas de tipo auxina que incluyen herbicidas de ácido fenoxicarboxílico, herbicidas de ácido piridin carboxílico, herbicidas de ácido quinolincarboxílico, herbicidas de ácido pirimidin carboxílico, y herbicidas de benazolin-etilo, sulfonilureas, imidazolinonas, bromoxinilo, delapon, ciclohexanediona, herbicidas inhibidores de la protoporfirinógeno oxidasa e inhibidores de la 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa.

Los polinucleótidos usados en las composiciones que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios para el gen o transcrito diana pueden comprender el ácido nucleico predominante en la composición. Por lo tanto, los polinucleótidos que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios para el gen o transcrito diana pueden comprender al menos aproximadamente 50%, 75%, 95%, 98%, o 100% de los ácidos nucleicos proporcionados en la composición por concentración de masa o molar. Sin embargo, en los

polinucleótidos que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios para el gen o transcrito diana pueden comprender al menos 1% a 50%, 10% a 50%, 20% a 50%, o 30% a 50% de los ácidos nucleicos proporcionados en la composición por concentración de masa o molar. También se desvelan composiciones en las que los polinucleótidos que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios para el gen o transcrito diana pueden comprender al menos 1% a 100%, 10% a 100%, 20% a 100%, 30% a 50%, o 50% a 100% de los ácidos nucleicos proporcionados en la composición por concentración de masa o molar.

Se desvelan polinucleótidos que comprenden ADNss, ADNds, ARNss, ARNds, o híbridos de ARN/ADN que son esencialmente idénticos o complementarios a ciertos genes o transcritos diana de plantas y que se pueden usar en composiciones que contienen agentes de transferencia que incluyen preparaciones de organosilicona, para suprimir esos genes diana cuando se aplican en forma tópica a las plantas, en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos coasignada Núm. 13/042856. Diversas moléculas herbicidas polinucleotídicas, composiciones que comprenden tales moléculas herbicidas polinucleotídicas y agentes de transferencia que incluyen preparaciones de organosilicona, y procedimientos por los cuales se obtienen efectos herbicidas por la aplicación tópica de tales composiciones a las plantas se desvelan en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos coasignada Núm. 13/042856. Los genes que codifican proteínas que pueden proporcionar tolerancia a un herbicida y/o que son dianas de un herbicida se denominan colectivamente en la presente memoria "genes diana herbicidas". Los genes diana herbicidas incluyen una 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), una glifosato oxidorreductasa (GOX), una glifosato descarboxilasa, una glifosato-N-acetil transferasa (GAT), una dicamba monooxigenasa, una fosfinotricina acetiltransferasa, dehalogenasa de ácido 2,2-dicloropropiónico, una acetohidroxiácido sintasa, una acetolactato sintasa, una haloarilnitrilasa, una acetil-coenzima A carboxilasa (ACCase), una dihidropteroato sintasa, una fitoeno desaturasa (PDS), una protoporfirina IX oxigenasa (PPO), una hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD), una para-aminobenzoato sintasa, una glutamina sintasa, una celulosa sintasa, una beta tubulina y un gen de serina hidroximetiltransferasa. Se ha demostrado que los efectos de aplicar ciertas composiciones que comprenden polinucleótidos que son esencialmente idénticos o complementarios a ciertos genes diana de herbicida y agentes de transferencia en plantas que contienen los genes diana de herbicida se potencian o mejoran mediante la aplicación posterior de un herbicida que localiza el mismo gen que el polinucleótido en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos coasignada Núm. 13/042856. Por ejemplo, las composiciones que comprenden polinucleótidos que localizan el gen diana del herbicida EPSPS se potenciaron con glifosato en experimentos desvelados en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos coasignada Núm. 13/042856.

Las composiciones y procedimientos desvelados en la presente memoria, cuando comprenden un polinucleótido y un agente de transferencia en consecuencia también pueden comprender un segundo polinucleótido que comprende al menos 19 nucleótidos contiguos que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios con un transcrito a una proteína que confiere resistencia a un herbicida. El segundo polinucleótido no comprende necesariamente un polinucleótido que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a un transcrito que codifica una proteína de una planta diana que confiere resistencia a dicha molécula herbicida. En consecuencia, en un ejemplo, el segundo polinucleótido puede ser esencialmente idéntico o esencialmente complementario a un transcrito que codifica una proteína que confiere resistencia a un herbicida en una maleza (tal como un transcrito que codifica EPSPS) pero puede no ser esencialmente idéntico o esencialmente complementario a un transcrito que codifica una proteína que confiere resistencia a este mismo herbicida en una planta de cultivo. Las composiciones de polinucleótidos que comprenden un agente de transferencia pueden comprender glicerina. La glicerina se puede proporcionar en la composición a una concentración de 0,1% a 1% (p/v o v/v). Una concentración de glicerina de 0,4% a 0,6%, o aproximadamente 0,5% (p/v o v/v) también se puede usar en las composiciones de polinucleótidos que comprenden un agente de transferencia.

Las composiciones de polinucleótidos que comprenden un agente de transferencia pueden comprender además disolventes orgánicos. Dichos disolventes orgánicos incluyen DMSO, DMF, piridina, N-pirrolidina, hexametilfosforamida, acetonitrilo, dioxano, polipropilenglicol, otros disolventes miscibles con agua o que disuelven fosfonucleótidos en sistemas no acuosos (tal como se usa en las reacciones sintéticas).

Las composiciones de polinucleótidos que comprenden un agente de transferencia también pueden comprender aceites derivados de manera natural o sintéticos con o sin tensioactivos o emulsionantes. Tales aceites incluyen aceites de origen vegetal, aceites de cultivos (tal como los enumerados en 9th Compendium of Herbicide Adjuvants, disponibles públicamente en línea en www.herbicide.adjuvants.com), aceites parafinicos, ésteres de ácidos grasos de poliol o aceites con moléculas de cadena corta modificadas con amidas o poliaminas tal como polietilenimina o N-pirrolidina.

Los procedimientos desvelados en la presente memoria pueden incluir una o más aplicaciones de la composición que comprenden un polinucleótido y un agente de transferencia o uno o más componentes eficaces contenidos en el mismo. En ciertos procedimientos, una o más aplicaciones de un agente de transferencia o uno o más componentes eficaces contenidos en el mismo pueden preceder una o más aplicaciones de la composición que comprende un polinucleótido y un agente de transferencia. Cuando un agente de transferencia y/o uno o más componentes eficaces contenidos en el mismo se usa por sí mismo como un pretratamiento o como parte de una composición que incluye un polinucleótido, las moléculas de polinucleótido pueden ser oligonucleótidos de ARN de cadena doble, oligonucleótidos de ARN de cadena simple, polinucleótidos de ARN de cadena doble, polinucleótidos de ARN de

cadena simple, oligonucleótidos de ADN de cadena doble, oligonucleótidos de ADN de cadena simple, polinucleótidos de ADN de cadena doble, polinucleótidos de ADN de cadena simple, oligonucleótidos o polinucleótidos de ARN u ADN modificados químicamente o mezclas de los mismos.

Las composiciones y procedimientos desvelados en la presente memoria son útiles para modular o suprimir la expresión de un gen diana endógeno o gen diana transgénico en una célula vegetal o planta. En ciertos procedimientos y composiciones desvelados en la presente memoria, la expresión de genes diana de la polifenol oxidasa (PPO) se puede suprimir completa, parcial y/o transitoriamente para dar como resultado una vida útil aumentada y pérdidas poscosecha reducidas. Un gen diana puede incluir una secuencia codificadora (proteína codificadora o traducible), una secuencia no codificadora (no traducible) o una secuencia codificadora y no codificadora. Las composiciones desveladas en la presente memoria pueden incluir polinucleótidos y oligonucleótidos diseñados para localizar múltiples genes diana, o múltiples segmentos de uno o más genes. El gen diana puede incluir múltiples segmentos consecutivos de un gen diana, múltiples segmentos no consecutivos de un gen diana, múltiples alelos de un gen diana o múltiples genes diana de una o más especies. Los ejemplos de genes diana de la presente invención incluyen genes endógenos de la polifenol oxidasa (PPO) y transgenes de la polifenol oxidasa (PPO).

Los genes diana de la polifenol oxidasa (PPO) y las plantas que contienen tales genes diana de la polifenol oxidasa (PPO) se pueden obtener de: i) plantas de cultivo en hilera que incluyen maíz, soja, algodón, canola, remolacha azucarera, alfalfa, caña de azúcar, arroz y trigo; ii) plantas hortícolas que incluyen tomate, patata, pimiento dulce, pimiento picante, melón, sandía, pepino, berenjena, coliflor, brócoli, lechuga, espinaca, cebolla, guisantes, zanahorias, maíz dulce, repollo chino, puerro, hinojo, zapallo, calabaza o calabacín, rábano, repollos de Bruselas, tomatillo, frijoles, frijoles secos u okra; iii) plantas culinarias que incluyen albahaca, perejil, café o té; iv) plantas frutales que incluyen manzana, pera, cereza, durazno, ciruela, albaricoque, banana, plátano, uva de mesa, uva de vinificación, cítricos, palta, mango o bayas; v) un árbol cultivado para uso ornamental o comercial, que incluye un árbol frutal o nueces; o, vi) una planta ornamental (por ejemplo, una planta con flores ornamentales o arbustos o césped). Los procedimientos y composiciones desvelados en la presente memoria también se pueden aplicar a plantas producidas mediante un procedimiento de corte, clonación o injerto (es decir, una planta que no crece de una semilla) que incluye árboles frutales y plantas que incluyen cítricos, manzanas, paltas, tomates, berenjenas, pepino, melones, sandías y uvas, así como varias plantas ornamentales. En la presente memoria se proporcionan tales plantas de cultivo en hilera, hortícolas, culinarias, frutales, arbóreas u ornamentales que presentan mejoras que resultan de la supresión de la expresión del gen de la polifenol oxidasa (PPO). Tales partes de plantas de cultivo en hilera, hortícolas, culinarias, frutales, ornamentales o productos vegetales procesados que exhiben una vida útil aumentada y pérdidas poscosecha reducidas que resultan de la supresión de la expresión del gen de la polifenol oxidasa (PPO) también se desvelan en la presente memoria. Dichas partes de plantas pueden incluir flores, tallos, tubérculos, frutas, anteras, meristemos, óvulos, polen, hojas o semillas. Tales productos vegetales procesados obtenidos de las partes de la planta pueden incluir una harina, una pulpa, un alimento para animales, o un producto alimenticio.

Además se divulga en la presente memoria un procedimiento para modular la expresión de un gen de la polifenol oxidasa (PPO) en una planta que incluye (a) acondicionamiento de una planta para permeación mediante polinucleótidos y (b) tratamiento de la planta con las moléculas de polinucleótidos, en el que las moléculas de polinucleótidos incluyen al menos un segmento de 18 o más nucleótidos contiguos clonados o identificados de otra manera del gen diana de la polifenol oxidasa (PPO) en orientación antisentido o sentido, por lo que las moléculas de polinucleótidos penetran el interior de la planta e inducen la modulación del gen diana de la polifenol oxidasa (PPO). El acondicionamiento y la aplicación de polinucleótidos se puede realizar por separado o en una etapa única. Cuando el acondicionamiento y la aplicación de polinucleótidos se realizan en etapas separadas, el acondicionamiento puede preceder o seguir a la aplicación de polinucleótidos en minutos, horas o días. Se puede realizar más de una etapa de acondicionamiento o más de una aplicación de molécula de polinucleótido en la misma planta. En el procedimiento, el segmento se puede clonar o identificar a partir de (a) partes codificadoras (codificación de proteínas), (b) partes no codificadoras (promotor y otras moléculas relacionadas con genes), o (c) partes codificadoras y no codificadoras del gen diana de la polifenol oxidasa (PPO). Las partes no codificadoras incluyen ADN, tal como las regiones promotoras o el ARN transcrito por el ADN que proporciona moléculas reguladoras de ARN, que incluyen: intrones, regiones no traducidas 5' o 3' y microARN (ARNmi), ARNsi de actuación en trans, ARNsi antisentido y otros ARN pequeños con función reguladora o ARN que tienen una función estructural o enzimática que incluyen: ribozimas, ARN ribosomales, ARNt, aptámeros y riboswitches. Cuando el polinucleótido usado en la composición comprende una secuencia promotora esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a al menos 18 nucleótidos contiguos del promotor del gen diana endógeno de la polifenol oxidasa (PPO), la secuencia promotora del polinucleótido no está operativamente unida a otra secuencia que se transcribe desde la secuencia promotora.

Las composiciones que comprenden un polinucleótido y un agente de transferencia desveladas en la presente memoria se pueden aplicar tópicamente a una planta o parte de la planta mediante cualquier procedimiento conveniente, por ejemplo, pulverización o revestimiento con un polvo, o con una composición líquida que comprende cualquiera de una emulsión, suspensión o solución. Tales pulverizaciones o revestimientos aplicados tópicamente se pueden aplicar sobre el total o cualquier porción de la superficie de la planta o parte de la planta. De manera similar,

las composiciones que comprenden un agente de transferencia u otro pretratamiento se pueden aplicar a la planta o parte de la planta mediante cualquier procedimiento conveniente, por ejemplo, pulverización o lavado con una solución, emulsión o suspensión. Las composiciones que comprenden un polinucleótido y un agente de transferencia desveladas en la presente memoria se pueden aplicar tópicamente a partes de plantas que incluyen flores, tallos, tubérculos, meristemos, óvulos, frutos, anteras, polen, hojas, raíces o semillas.

La aplicación de composiciones que comprenden un polinucleótido y un agente de transferencia a semillas se desvela específicamente en la presente. Las semillas se pueden poner en contacto con tales composiciones por pulverización, nebulización o inmersión.

La aplicación de composiciones que comprenden un polinucleótido y un agente de transferencia a plantas, partes de plantas o semillas en particular puede proporcionar una vida útil aumentada y pérdidas poscosecha reducidas en plantas de progenie, partes de plantas o semillas derivadas de esas plantas, partes de plantas tratadas o semillas. Las plantas de progenie, partes de plantas o semillas derivadas de esas plantas, partes de plantas o semillas tratadas pueden exhibir una vida útil aumentada y pérdidas poscosecha reducidas que resultan de la supresión de la expresión del gen de la polifenol oxidasa (PPO). Los procedimientos y composiciones desvelados en la presente memoria pueden proporcionar una vida útil aumentada y pérdidas poscosecha reducidas en plantas de progenie o semillas como resultado de la supresión heredada de forma epigenética de la expresión génica de la polifenol oxidasa (PPO). Dichas plantas de progenie pueden exhibir una vida útil aumentada y pérdidas poscosecha reducidas por la supresión heredada de forma epigenética de la expresión del gen de la polifenol oxidasa (PPO) que no es causada por un transgén en el que el polinucleótido está operativamente unido a un promotor, un vector viral o una copia del polinucleótido que se integra en una ubicación no nativa en el ADN cromosómico de la planta. Sin pretender limitarse a la teoría, las plantas de progenie o semillas derivadas de esas plantas, partes de plantas o semillas tratadas pueden exhibir una vida útil aumentada y pérdidas poscosecha reducidas a través de un mecanismo epigenético que proporciona la propagación de una condición epigenética en la que la supresión de la expresión del gen de la polifenol oxidasa (PPO) se produce en las plantas de progenie, partes de plantas o semillas de plantas. Las plantas de progenie o semillas que exhiben una vida útil aumentada y pérdidas poscosecha reducidas como resultado de la supresión heredada de forma epigenética de la expresión del gen de la polifenol oxidasa (PPO) también pueden exhibir una mayor metilación, y en particular, una mayor metilación de los residuos de la citosina, en el gen endógeno de la polifenol oxidasa (PPO) de la planta. Las partes de plantas, que incluyen semillas, de las plantas de progenie que exhiben una vida útil aumentada y pérdidas poscosecha reducidas como resultado de la supresión heredada forma epigenética de la expresión del gen de la polifenol oxidasa (PPO), también pueden exhibir una mayor metilación y, en particular, una mayor metilación de los residuos de la citosina, en el gen endógeno de la polifenol oxidasa (PPO). Los niveles de metilación del ADN en el ADN que codifica el gen endógeno de la polifenol oxidasa (PPO) se pueden comparar en plantas que exhiben una vida útil aumentada y pérdidas poscosecha reducidas y plantas de control que no exhiben la vida útil aumentada y pérdidas poscosecha reducidas para correlacionar la presencia de la vida útil mejorada y pérdidas poscosecha reducidas para la supresión heredada de forma epigenética de la expresión del gen de la polifenol oxidasa (PPO) e identificar plantas que comprenden la vida útil mejorada y pérdidas poscosecha reducidas heredadas de forma epigenética.

Se pueden usar diversos procedimientos para pulverizar composiciones sobre plantas o partes de plantas para aplicar tópicamente a una superficie de planta una composición que comprende un polinucleótido que comprende un agente de transferencia. En el campo, una composición se puede aplicar con una pluma que se extiende sobre los cultivos y administra la composición a la superficie de las plantas o con un pulverizador sin pluma que distribuye una composición en un área amplia. Los pulverizadores agrícolas adaptados para la pulverización direccional, difusión o en bandas también se pueden usar en ciertas realizaciones. También se pueden usar pulverizadores adaptados para pulverizar partes particulares de plantas, que incluyen hojas, la parte inferior de las hojas, tallos, órganos reproductores masculinos tal como panojas, meristemos, polen y óvulos. Las composiciones también se pueden administrar por vía aérea, tal como por un avión de fumigación de cultivos. La pulverización se puede administrar con un pulverizador de mochila presurizado calibrado para administrar la tasa adecuada de la composición. Tal pulverizador de mochila es un pulverizador presurizado de dióxido de carbono con un ventilador plano 11015 o una boquilla de pulverización equivalente con un ensamblaje de boquilla única personalizada (para minimizar el desperdicio) a una presión de pulverización de aproximadamente 0,25 MPa y/o se puede usar cualquier pulverizador de boquilla única que proporciona una franja de pulverización eficaz de 60 cm por encima del dosel de las plantas de cultivo de 7,6 a 30,5 cm (3 a 12 pulgadas) de alto. Las plantas en un invernadero o cámara de crecimiento se pueden tratar usando un pulverizador de tipo oruga o un pulverizador de laboratorio con una boquilla de pulverización 11001XR o equivalente para administrar la solución de muestra a una tasa determinada. Una tasa de ejemplo y no limitante es de aproximadamente 140 l/ha a aproximadamente 0,25 MPa de presión.

También se contempla que una parte de la planta se puede pulverizar con la composición que comprende un polinucleótido que comprende un agente de transferencia. Dichas partes de plantas se pueden pulverizar antes o después de la cosecha para proporcionar una vida útil aumentada y pérdidas poscosecha reducidas en la parte de la planta que resulta de la supresión de la expresión del gen de la polifenol oxidasa (PPO). Las composiciones se pueden aplicar tópicamente a las partes de plantas unidas a una planta mediante una pulverización como se describió anteriormente. Las composiciones se pueden aplicar tópicamente a las partes de plantas que se separan de una planta mediante una pulverización como se describió anteriormente o mediante un procedimiento alternativo.

Los procedimientos alternativos para aplicar composiciones a las partes separadas incluyen pasar las partes de plantas a través de una pulverización por una cinta transportadora o canal, o sumergir las partes de plantas en la composición.

Las composiciones que comprenden polinucleótidos y agentes de transferencia se pueden aplicar a plantas o partes de plantas en una o más etapas de desarrollo según se desee y/o según sea necesario. La aplicación de composiciones a semillas de pregerminación y/o a plántulas de posgerminación se desvela en la presente memoria. Las semillas se pueden tratar con composiciones de polinucleótidos desveladas en la presente memoria mediante procedimientos que incluyen pulverización, inmersión o cualquier procedimiento que proporciona revestimiento, imbibición y/o absorción de la composición de polinucleótidos por la semilla. Las semillas se pueden tratar con composiciones de polinucleótidos usando sistemas de tratamiento por partidas de semillas o sistemas de tratamiento de flujo continuo. Los sistemas de revestimiento de semillas se describen al menos en las Patentes de los Estados Unidos Núm. 6.582.516, 5.891.246, 4.079.696 y 4.023.525. El tratamiento de semillas también se puede realizar en equipos de tratamiento a escala comercial o de laboratorio, tal como un tambor giratorio, una mezcladora o un granulador en paila. Una composición de polinucleótidos usada para tratar semillas puede contener uno o más componentes deseables, que incluyen diluyentes líquidos, aglutinantes que sirven como matriz para el polinucleótido, agentes de carga para proteger las semillas durante condiciones de estrés y plastificantes para mejorar la flexibilidad, adhesión y/o untuosidad del revestimiento. Además, para las composiciones de polinucleótidos oleosas que contienen escasos o ningún agente de carga, se pueden agregar agentes secantes tal como carbonato de calcio, caolín o arcilla de bentonita, perlita, tierra de diatomeas o cualquier otro material adsorbente. El uso de tales componentes en tratamientos de semillas se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.876.739. Se pueden incorporar ingredientes adicionales en las composiciones de polinucleótidos usadas en los tratamientos de semillas. Dichos ingredientes incluyen: agentes adhesivos convencionales, agentes dispersantes tal como metilcelulosa (Methocel A15LV o Methocel A15C, por ejemplo, sirven como agentes dispersantes/adhesivos combinados para su uso en tratamientos de semillas), alcohol polivinílico (por ejemplo, Elvanol 51-05), lecitina (por ejemplo, Yelkinol P), dispersantes poliméricos (por ejemplo, polivinilpirrolidona/acetato de vinilo PVPNA S-630), espesantes (por ejemplo, espesantes de arcilla tal como Van Gel B para mejorar la viscosidad y reducir la sedimentación de las suspensiones de partículas), estabilizantes de emulsión, tensioactivos, compuestos anticongelantes (por ejemplo, urea) y tinturas, colorantes que se pueden combinar con composiciones que comprenden un polinucleótido y un agente de transferencia. Otros ingredientes usados en composiciones que se pueden aplicar a las semillas se pueden encontrar en McCutcheon's, vol. 1, "Emulsifiers and Detergents," MC Publishing Company, Glen Rock, N.J., U.S.A., 1996 y en McCutcheon's, vol. 2, "Functional Materials," MC Publishing Company, Glen Rock, N.J., U.S.A., 1996. Los procedimientos para aplicar composiciones a semillas y composiciones plaguicidas que se pueden usar para tratar semillas se describen en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 20080092256.

Se contempla la aplicación de las composiciones en etapas vegetativas tempranas, medias y tardías del desarrollo de la planta. También se contempla la aplicación de las composiciones en etapas reproductivas tempranas, medias y tardías. También se contempla la aplicación de las composiciones a partes de plantas en diferentes etapas de maduración.

Se desvelan procedimientos y composiciones de polinucleótidos que se pueden aplicar a células/tejidos de plantas vivas para suprimir la expresión de un gen de la polifenol oxidasa 11 (PPO11) y que proporcionan una vida útil aumentada, pardeamiento reducido, pérdidas de poscosecha reducidas o sus combinaciones a una planta de cultivo en necesidad de dicho beneficio. También se desvelan en la presente memoria plantas y partes de plantas que exhiben una vida útil aumentada y pérdidas poscosecha reducidas, así como productos procesados de tales plantas o partes de plantas. Las composiciones se pueden aplicar tópicamente a la superficie de una planta, tal como a la superficie de una hoja, tubérculo o fruto, y las composiciones pueden incluir un agente de transferencia. Los aspectos del procedimiento se pueden aplicar a varios cultivos, por ejemplo, que incluyen lechuga, manzanas y patatas. Los procedimientos y composiciones desvelados en la presente memoria también se pueden aplicar a plantas producidas mediante un procedimiento de corte, clonación o injerto (es decir, una planta que no crece de una semilla) que incluye árboles y plantas frutales. Los árboles frutales producidos por tales procedimientos incluyen cítricos y manzanos. Las plantas producidas por tales procedimientos incluyen paltas, tomates, berenjenas, pepinos, melones, sandías y uvas, así como varias plantas ornamentales.

Sin limitarse a la teoría, se considera que las composiciones y procedimientos desvelados en la presente memoria operan a través de una o más de las diversas vías celulares naturales involucradas en la supresión génica mediada por ARN, como se describe generalmente en Brodersen and Voinnet (2006), *Trends Genetics*, 22:268-280; Tomari and Zamore (2005) *Genes & Dev.*, 19:517-529; Vaucheret (2006) *Genes Dev.*, 20:759-771; Meins *et al.* (2005) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21:297-318; and Jones-Rhoades *et al.* (2006) *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57:19-53. La supresión génica mediada por ARN generalmente implica un producto intermedio de ARN de cadena doble (ARNds) que se forma intramolecularmente dentro de una molécula de ARN única o en forma intermolecular entre dos moléculas de ARN. Este intermedio de ARNds más largo es procesado por una ribonucleasa de la familia de ARNasa III (Dicer o ribonucleasa tipo Dicer) en uno o más ARN de cadena doble más cortos, una de cuyas cadenas se incorpora al complejo de silenciamiento inducido por ARN ("RISC"). Por ejemplo, la vía de ARNsi implica la escisión de un intermedio de ARN de cadena doble más largo a pequeños ARN interferentes ("ARNsi"). Se considera que el

tamaño de los ARNsi oscila de 19 a 25 pares de bases, pero las clases más comunes de ARNsi en plantas incluyen las que contienen 21 a 24 pares de bases (Véase, Hamilton *et al.* (2002) EMBO J., 21: 4671- 4679).

Construcciones de transformación de plantas

Los vectores usados para la transformación de plantas pueden incluir, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, YAC (cromosomas artificiales de levadura), BAC (cromosomas artificiales bacterianos) o cualquier otro sistema de clonación adecuado, así como fragmentos de ADN de los mismos. Por lo tanto, cuando se usa el término "vector" o "vector de expresión", se incluyen todos los tipos de vectores anteriores, así como las secuencias de ácido nucleico aisladas de los mismos. Se contempla que la utilización de sistemas de clonación con gran capacidad de inserción permite la introducción de grandes secuencias de ADN que comprenden más de un gen seleccionado. Esto se puede usar para introducir genes correspondientes a una vía biosintética completa en una planta. La introducción de tales secuencias se puede facilitar mediante el uso de cromosomas artificiales bacterianos o de levadura (BAC o YAC, respectivamente), o incluso cromosomas artificiales de plantas. Por ejemplo, el uso de los BAC para la transformación mediada por *Agrobacterium* fue desvelado por Hamilton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93 (18): 9975-9979, 1996.

Los casetes de expresión que se han aislado de tales vectores son particularmente útiles para la transformación. Los segmentos de ADN usados para transformar células vegetales, obviamente, en general comprenden el ADNc, el gen o los genes que se desean introducir y que se han expresado en las células huésped. Estos segmentos de ADN también pueden incluir estructuras tal como promotores, potenciadores, poliligadores o incluso genes reguladores, según se desee. El segmento de ADN o gen seleccionado para la introducción celular a menudo codifica una proteína que se expresa en las células recombinantes resultantes que producen un rasgo detectable o seleccionable y/o que imparten un fenotipo mejorado a la planta transgénica resultante. Sin embargo, esto puede no ser siempre el caso, y también se incluyen en la presente memoria las plantas transgénicas que incorporan transgenes no expresados. Los componentes preferidos que probablemente se incluyen en los vectores usados son los siguientes.

A. Elementos reguladores

Los ejemplos de promotores para la expresión de una secuencia de ácido nucleico incluyen promotores de plantas tal como el promotor CaMV 35S (Odell *et al.*, 1985) u otros tal como CaMV 19S (Lawton *et al.*, 1987), nos (Ebert *et al.*, 1987), Adh (Walker *et al.*, 1987), sacarosa sintasa (Yang and Russell, 1990), una tubulina, actina (Wang *et al.*, 1992), cab (Sullivan *et al.*, 1989), PEPCasa (Hudspeth and Grula, 1989) o los asociados con el complejo del gen R (Chandler *et al.*, 1989). También se considera que los promotores específicos de tejido, tal como los promotores de células de raíz (Conkling *et al.*, 1990) y los potenciadores específicos de tejido (Fromm *et al.*, 1986) son útiles, al igual que los promotores inducibles, tal como los promotores inducibles por ABA y por turgencia. El promotor PAL2 puede ser particularmente útil (Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos 2004/0049802).

La secuencia de ADN entre el sitio de inicio de la transcripción y el comienzo de la secuencia codificadora, es decir, la secuencia líder no traducida, también puede influir en la expresión génica. Por lo tanto, se puede desear emplear una secuencia líder particular con una construcción de transformación de la invención. Se considera que las secuencias líderes preferidas incluyen aquellas que comprenden secuencias predichas para dirigir la expresión óptima del gen unido, es decir, que incluyen una secuencia líder de consenso preferida que puede aumentar o mantener la estabilidad del ARNm y evitar el inicio inadecuado de la traducción. La selección de tales secuencias será conocida por los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación. Típicamente se prefieren secuencias derivadas de genes con alta expresión en las plantas.

Se contempla que se pueden construir vectores para uso de acuerdo con la presente divulgación de modo que incluyan un elemento potenciador ocs. Este elemento se identificó por primera vez como un potenciador palindrómico de 16 pb del gen de la octopina sintasa (ocs) de *Agrobacterium* (Ellis *et al.*, 1987), y está presente en al menos otros 10 promotores (Bouchez *et al.*, 1989). El uso de un elemento potenciador, tal como el elemento ocs y particularmente copias múltiples del elemento, puede actuar para aumentar el nivel de transcripción de los promotores adyacentes cuando se aplica en el contexto de la transformación de la planta.

Se prevé que las secuencias de polinucleótidos o secuencias de ADN seleccionadas se pueden introducir bajo el control de nuevos promotores o potenciadores, o promotores o elementos de control homólogos o específicos de tejido. Los vectores para uso en el direccionamiento de genes específicos de tejido en plantas transgénicas típicamente incluyen promotores específicos de tejido y también pueden incluir otros elementos de control específicos de tejido, tal como secuencias potenciadoras. Los promotores que dirigen la expresión específica o mejorada en ciertos tejidos vegetales serán conocidos por los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación. Estos incluyen, por ejemplo, el promotor rbcS, específico para tejido verde; los promotores ocs, nos y mas que tienen mayor actividad en las raíces o el tejido foliar lesionado. Se pueden emplear promotores que causan baja expresión del ADN seleccionado. Los promotores de baja expresión se pueden obtener por mutación y/o recombinación de elementos de ADN de promotores que causan una alta expresión o mediante la selección de elementos reguladores corriente arriba de genes que causan la expresión de ARNm o proteína con baja abundancia.

B. Terminadores

Las construcciones de transformación preparadas de acuerdo con la divulgación típicamente incluyen una secuencia de ADN de extremo 3' que actúa como una señal para terminar la transcripción y permitir la poliadenilación del ARNm producido mediante la codificación de secuencias operativamente unidas a un promotor. Los ejemplos de terminadores que se consideran útiles en este contexto incluyen los del gen de nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (extremo 3' nos) (Bevan *et al.*, 1983), el terminador para el transcrito T7 del gen de octopina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*, y el extremo 3' de los genes del inhibidor de proteasa I o II de patata o tomate. Los elementos reguladores tal como un intrón Adh (Callis *et al.*, 1987), el intrón de sacarosa sintasa (Vasil *et al.*, 1989) o el elemento omega TMV (Gallie *et al.*, 1989), también se pueden incluir cuando se desee.

C. Péptidos de tránsito o señal

Las secuencias que se unen a la secuencia codificadora de un gen expresado, que se eliminan en forma postraducciona del producto de traducción inicial y que facilitan el transporte de la proteína hacia o a través de las membranas intracelulares o extracelulares, se denominan secuencias de tránsito (normalmente en vacuolas, vesículas, plástidos y otras organelas intracelulares) y señal (normalmente al retículo endoplásmico, aparato de Golgi y fuera de la membrana celular). Al facilitar el transporte de la proteína dentro de los compartimientos dentro y fuera de la célula, estas secuencias pueden aumentar la acumulación de producto génico al protegerlas de la degradación proteolítica. Estas secuencias también permiten que las secuencias de ARNm adicionales de genes de alta expresión se unan a la secuencia codificadora de los genes. Debido a que el ARNm que se traduce en los ribosomas es más estable que el ARNm desnudo, la presencia de ARNm traducible frente al gen puede aumentar la estabilidad general del transcrito de ARNm del gen y, por lo tanto, aumentar la síntesis del producto génico. Debido a que las secuencias de tránsito y señal generalmente se eliminan en forma postraducciona del producto de traducción inicial, el uso de estas secuencias permite la adición de secuencias traducidas extra que pueden no aparecer en el polipéptido final. También se contempla que la localización de ciertas proteínas puede ser deseable para mejorar la estabilidad de la proteína (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.545.818).

Además, los vectores se pueden construir y emplear en la localización intracelular de un producto génico específico dentro de las células de una planta transgénica o en la localización de una proteína en el ambiente extracelular. Esto generalmente se logra mediante la unión de una secuencia de ADN que codifica una secuencia de péptido de tránsito o señal a la secuencia codificadora de un gen particular. El péptido de tránsito o señal resultante transporta la proteína a un destino intracelular o extracelular particular, respectivamente, y posteriormente se elimina en forma postraducciona.

D. Genes marcadores

Mediante el empleo de una proteína marcadora seleccionable o detectable, se puede proporcionar o mejorar la capacidad de identificar transformantes. Los "genes marcadores" son genes que imparten un fenotipo distinto a las células que expresan la proteína marcadora y, por lo tanto, permiten que dichas células transformadas se distingan de las células que no tienen el marcador. Dichos genes pueden codificar un marcador seleccionable o detectable, de acuerdo con si el marcador confiere un rasgo que se puede "seleccionar" por medios químicos, es decir, mediante el uso de un agente selectivo (por ejemplo, un herbicida o antibiótico), o si es simplemente un rasgo que se puede identificar mediante observación o prueba, es decir, mediante "detección" (por ejemplo, la proteína verde fluorescente). Obviamente, se conocen en la técnica muchos ejemplos de proteínas marcadoras adecuadas que se pueden emplear.

También se incluyen dentro de los términos marcadores seleccionables o detectables genes que codifican un "marcador secretable" cuya secreción se puede detectar como un medio para identificar o seleccionar células transformadas. Los ejemplos incluyen marcadores que son antígenos secretables que se pueden identificar por interacción de anticuerpos, o incluso enzimas secretables que se pueden detectar por su actividad catalítica. Las proteínas secretables se dividen en varias clases, que incluyen las proteínas pequeñas y difusibles detectables, por ejemplo, mediante ELISA; enzimas activas pequeñas detectables en solución extracelular (por ejemplo, alfa-amilasa, beta-lactamasa, fosfinotricina acetiltransferasa); y proteínas que se insertan o quedan atrapadas en la pared celular (por ejemplo, proteínas que incluyen una secuencia líder como la que se encuentra en la unidad de expresión de extensina o PR S de tabaco).

Muchas regiones codificadoras de marcadores seleccionables se conocen y se pueden usar, que incluyen neo (Potrykus *et al.*, 1985), que proporciona resistencia a la kanamicina y se puede seleccionar usando kanamicina, G418 y paromomicina; bar, que confiere resistencia a bialafos o fosfinotricina; una proteína mutante de EPSP sintasa (Hinchee *et al.*, 1988) que confiere resistencia a glifosato; una nitrilasa tal como bxn de *Klebsiella ozaenae* que confiere resistencia a bromoxinilo (Stalker *et al.*, 1988); una acetolactato sintasa mutante (ALS) que confiere resistencia a imidazolinona, sulfonilurea u otros productos químicos inhibidores de ALS (Solicitud de Patente Europea 154, 204, 1985); una DHFR resistente a metotrexato (Thillet *et al.*, 1988), una dalapon dehalogenasa que confiere resistencia al herbicida dalapon; o una antranilato sintasa mutada que confiere resistencia al 5-metil triptofano.

Un marcador seleccionable ilustrativo capaz de usarse en sistemas para seleccionar transformantes es aquel que codifica la enzima fosfinotricina acetiltransferasa, tal como el gen bar de *Streptomyces hygroscopicus* o el gen pat de

Streptomyces viridochromogenes. La enzima fosfotricina acetil transferasa (PAT) inactiva el principio activo en el herbicida bialafos, fosfotricina (PPT). PPT inhibe la glutamina sintetasa (Murakami *et al.*, 1986; Twell *et al.*, 1989) lo que causa una rápida acumulación de amoníaco y muerte celular.

Los marcadores detectables que se pueden emplear incluyen una beta-glucuronidasa (GUS) o un gen uidA que codifica una enzima para la que se conocen diversos sustratos cromogénicos; un gen del locus R, que codifica un producto que regula la producción de pigmentos de antocianinas (color rojo) en tejidos vegetales (Dellaporta *et al.*, 1988); un gen de beta-lactamasa (Sutcliffe, 1978), que codifica una enzima para la que se conocen diversos sustratos cromogénicos (por ejemplo, PADAC, una cefalosporina cromogénica); un gen xylE (Zukowsky *et al.*, 1983) que codifica una catecol dioxigenasa que puede convertir catecoles cromogénicos; un gen de alfa-amilasa (Ikuta *et al.*, 1990); un gen de tirosinasa (Katz *et al.*, 1983) que codifica una enzima capaz de oxidar tirosina a DOPA y dopaquinona que a su vez se condensa para formar el compuesto melanina fácilmente detectable; un gen de beta-galactosidasa, que codifica una enzima para la cual hay sustratos cromogénicos; un gen de luciferasa (lux) (Ow *et al.*, 1986), que permite la detección de bioluminiscencia; un gen de aequorina (Prasher *et al.*, 1985) que se puede emplear en la detección de bioluminiscencia sensible al calcio; o un gen que codifica la proteína fluorescente verde (Sheen *et al.*, 1995; Haseloff *et al.*, 1997; Reichel *et al.*, 1996; Tian *et al.*, 1997; documento WO 97/41228). También se contempla el gen que codifica la proteína fluorescente verde (GFP) como un gen indicador particularmente útil (Sheen *et al.*, 1995; Haseloff *et al.*, 1997; Reichel *et al.*, 1996; Tian *et al.*, 1997; documento WO 97/41228). La expresión de la proteína fluorescente verde se puede visualizar en una célula o planta como fluorescencia después de la iluminación por longitudes de onda de luz particulares.

Construcciones antisentido y de ARNi

Los tratamientos antisentido y de ARNi representan una forma de alterar la actividad de la PPO11. En particular, las construcciones que comprenden una secuencia codificadora de la biosíntesis de la PPO11, que incluye fragmentos de la misma, en orientación antisentido, o combinaciones de orientación sentido y antisentido, se pueden usar para disminuir o eliminar eficazmente la expresión de un gen de la PPO11 en una planta y obtener una mejora en la vida útil como se describe en la presente memoria. Por consiguiente, estos se pueden usar para "inactivar" la PPO11 o secuencias homólogas de la misma.

Las técnicas para ARNi son bien conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Lehner *et al.* (2004) y Downward (2004). La técnica se basa en el hecho de que el ARN de cadena doble es capaz de dirigir la degradación del ARN mensajero con una secuencia complementaria con una u otra cadena (Fire *et al.*, 1998). Por lo tanto, mediante la expresión de una secuencia codificadora particular en orientación sentido y antisentido, ya sea como un fragmento o una porción más larga de la secuencia codificadora correspondiente, la expresión de esa secuencia codificadora se puede regular por disminución.

La metodología antisentido, y en algunos aspectos de ARNi, aprovecha el hecho de que los ácidos nucleicos tienden a aparearse con secuencias "complementarias". Por complementarias, se entiende que los polinucleótidos son aquellos que son capaces de aparear bases de acuerdo con las reglas de complementariedad estándares de Watson-Crick. Es decir, las purinas más grandes se aparean con las pirimidinas más pequeñas para formar combinaciones de guanina apareada con citosina (G:C) y adenina apareada con timina (A:T) en el caso de ADN, o adenina apareada con uracilo (A:U) en el caso del ARN. La inclusión de bases menos comunes tal como inosina, 5-metilcitosina, 6-metiladenina, hipoxantina y otras en las secuencias de hibridación no interfiere en el apareamiento.

La localización de ADN de cadena doble (ds) con polinucleótidos lleva a la formación de una triple hélice; la localización de ARN lleva a la formación de una doble hélice. Los oligonucleótidos antisentido, cuando se introducen en una célula diana, se unen específicamente a su polinucleótido diana e interfieren en la transcripción, procesamiento, transporte, traducción y/o estabilidad del ARN. Las construcciones antisentido y de ARNi, o del ADN que codifica dichos ARN, pueden emplearse para inhibir la transcripción o traducción génica o ambas dentro de una célula huésped, *in vitro* o *in vivo*, tal como dentro de una célula vegetal huésped. Tal oligonucleótido puede comprender cualquier porción única de una secuencia de ácido nucleico desvelada en la presente memoria. Dicha secuencia puede comprender al menos 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 o más ácidos nucleicos contiguos de la secuencia de ácido nucleico de un gen de la PPO11, y/o sus complementos, que pueden estar en orientación sentido y/o antisentido. Al incluir secuencias tanto en orientación sentido como antisentido, se puede lograr un aumento de la supresión de la secuencia codificadora correspondiente.

Se pueden diseñar construcciones que sean complementarias a la totalidad o parte del promotor y otras regiones de control, exones, intrones o incluso límites exón-intrón de un gen. Se contempla que las construcciones más eficaces incluyen regiones complementarias a las uniones de empalme intrón/exón. Por lo tanto, se prefiere una construcción con complementariedad con las regiones dentro de 50-200 bases de una unión de empalme intrón-exón. Se ha observado que se pueden incluir algunas secuencias de exón en la construcción sin afectar seriamente su selectividad específica. La cantidad de material exónico incluido oscila de acuerdo con las secuencias de exón e intrón particulares usadas. Se puede analizar fácilmente si se incluye demasiado ADN de exón simplemente mediante el análisis de las construcciones *in vitro* para determinar si está afectada la función celular normal o si está afectada la expresión de genes relacionados que tienen secuencias complementarias.

Como se indicó anteriormente, "complementarias" o "antisentido" significa secuencias de polinucleótidos que son sustancialmente complementarias en su longitud completa y tienen muy pocos errores de apareamiento de bases. Por ejemplo, las secuencias de quince bases de longitud se pueden denominar complementarias cuando tienen nucleótidos complementarios en trece o catorce posiciones. Naturalmente, las secuencias que son completamente complementarias son secuencias completamente complementarias en la totalidad de su longitud y no tienen errores de apareamiento de bases. También se contemplan otras secuencias con grados de homología más bajos. Por ejemplo, se puede diseñar una construcción de ARNi o antisentido que tiene regiones limitadas de alta homología, pero que también contiene una región no homóloga (por ejemplo, ribozima; véase arriba). Estas moléculas, aunque tienen menos de 50% de homología, se pueden unir a secuencias diana en condiciones apropiadas.

Puede ser ventajoso combinar porciones de ADN genómico con ADNc o secuencias sintéticas para generar construcciones específicas. Por ejemplo, cuando se desea un intrón en la construcción final, es necesario utilizar un clon genómico. El ADNc o un polinucleótido sintetizado pueden proporcionar sitios de restricción más convenientes para la porción restante de la construcción y, por lo tanto, se pueden usar para el resto de la secuencia.

Procedimientos de transformación genética

Se considera que los procedimientos adecuados para la transformación de células vegetales u otras incluyen prácticamente cualquier procedimiento por el cual se puede introducir el ADN en una célula, tal como mediante la administración directa de ADN, tal como mediante la transformación de protoplastos mediada por PEG (Omirulleh *et al.*, 1993), por captación de ADN mediada por desecación/inhibición (Potrykus *et al.*, 1985), por electroporación (Patente de los Estados Unidos Núm. 5,384,253), por agitación con fibras de carburo de silicio (Kaeppeler *et al.*, 1990; Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.302.523 y 5.464.765), por transformación mediada por *Agrobacterium* (Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.591.616 y 5.563.055) y por aceleración de partículas revestidas de ADN (Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.550.318; 5.538.877; y 5.538.880). Mediante la aplicación de tales técnicas, prácticamente se pueden transformar de manera estable las células de cualquier especie vegetal, y estas células se pueden desarrollar en plantas transgénicas.

A. Transformación mediada por *Agrobacterium*

La transferencia mediada por *Agrobacterium* es un sistema ampliamente aplicable para introducir genes en las células vegetales dado que el ADN se puede introducir en tejidos de plantas enteras, de este modo evitando la necesidad de regeneración de una planta intacta a partir de un protoplasto. El uso de vectores integradores de plantas mediados por *Agrobacterium* para introducir ADN en las células vegetales es bien conocido en la técnica. Véanse, por ejemplo, los procedimientos descritos por Fraley *et al.* (1985), Rogers *et al.* (1987) y la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.563.055.

La transformación mediada por *Agrobacterium* es más eficaz en plantas dicotiledóneas y es el procedimiento preferible para la transformación de dicotiledóneas, que incluyen *Arabidopsis*, tabaco, tomate, alfalfa y patata. En efecto, aunque la transformación mediada por *Agrobacterium* se ha usado de manera rutinaria con plantas dicotiledóneas durante varios años, solo recientemente se ha vuelto aplicable a las plantas monocotiledóneas. Los avances en las técnicas de transformación mediadas por *Agrobacterium* actualmente han hecho que la técnica sea aplicable a casi todas las plantas monocotiledóneas. Por ejemplo, las técnicas de transformación mediadas por *Agrobacterium* actualmente se han aplicado al arroz (Hiei *et al.*, 1997; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.591.616), trigo (McCormac *et al.*, 1998), cebada (Tingay *et al.*, 1997; McCormac *et al.*, 1998), alfalfa (Thomas *et al.*, 1990) y maíz (Ishidia *et al.*, 1996).

Los vectores modernos de transformación por *Agrobacterium* son capaces de replicación en *E. coli*, así como en *Agrobacterium*, lo que permite manipulaciones convenientes como las descritas (Klee *et al.*, 1985). Además, los recientes avances tecnológicos en vectores para la transferencia génica mediada por *Agrobacterium* han mejorado la disposición de los genes y los sitios de restricción en los vectores para facilitar la construcción de vectores capaces de expresar diversos genes que codifican polipéptidos. Los vectores descritos (Rogers *et al.*, 1987) tienen regiones multiligadoras convenientes flanqueadas por un promotor y un sitio de poliadenilación para la expresión directa de genes codificadores de polipéptidos insertados y son adecuados para los propósitos de la presente. Además, el *Agrobacterium* que contiene genes Ti tanto armados como desarmados se puede usar para las transformaciones. En las cepas de plantas en las que la transformación mediada por *Agrobacterium* es eficaz, es el procedimiento de elección debido a la naturaleza fácil y definida de la transferencia génica.

B. Electroporación

Para efectuar la transformación por electroporación, se pueden emplear tejidos friables, tal como un cultivo en suspensión de células o callos embriogénicos o, alternativamente, se pueden transformar embriones inmaduros u otro tejido organizado directamente. En esta técnica, se puede degradar parcialmente las paredes celulares de las células seleccionadas mediante su exposición a las enzimas que degradan la pectina (pectilasas) o por lesión mecánica de manera controlada. Los ejemplos de algunas especies que se han transformado por electroporación de células intactas incluyen el maíz (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.384.253; Rhodes *et al.*, 1995; D'Halluin *et al.*, 1992), trigo (Zhou *et al.*, 1993), tomate (Hou and Lin, 1996), soja (Christou *et al.*, 1987) y tabaco (Lee *et al.*,

1989).

También se pueden emplear protoplastos para la transformación por electroporación de plantas (Bates, 1994; Lazzeri, 1995). Por ejemplo, la generación de plantas de soja transgénicas por electroporación de protoplastos derivados de cotiledones se describe por Dhir and Widholm en la Publicación de la Solicitud de Patente Internacional WO 9217598. Otros ejemplos de especies para las que se ha descrito la transformación de protoplastos incluyen cebada (Lazzeri, 1995), sorgo (Battraw *et al.*, 1991), maíz (Bhattacharjee *et al.*, 1997), trigo (He *et al.*, 1994) y tomate (Tsukada, 1989).

C. Bombardeo con microproyectiles

Otro procedimiento para administrar segmentos de ADN transformantes a las células vegetales es el bombardeo con microproyectiles (Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.550.318; 5.538.880; 5.610.042, y la Solicitud de PCT WO 94/09699). En este procedimiento, las partículas se pueden revestir con ácidos nucleicos y administrar a las células mediante una fuerza impulsora. Los ejemplos de partículas incluyen aquellas compuestas de tungsteno, platino y preferentemente oro. Se contempla que en algunos casos la precipitación de ADN sobre las partículas metálicas no sea necesaria para la administración de ADN a una célula receptora usando bombardeo con microproyectiles. Sin embargo, se contempla que las partículas pueden contener ADN en lugar de estar revestidas con ADN. Por lo tanto, se propone que las partículas revestidas con ADN pueden aumentar el nivel de administración de ADN a través del bombardeo de partículas, pero no son, en sí mismas, necesarias.

Para el bombardeo, las células en suspensión se concentran en filtros o medio de cultivo sólido. Alternativamente, los embriones inmaduros u otras células diana se pueden disponer en medio de cultivo sólido. Las células para bombardear se colocan a una distancia adecuada debajo de la placa de detención de macroproyectiles.

Un procedimiento ilustrativo para administrar ADN a las células vegetales por aceleración es el Sistema de Administración de Partículas Biolísticas, que se puede usar para impulsar partículas revestidas con ADN o células a través de un tamiz, tal como un tamiz de acero inoxidable o Nytex, sobre una superficie de filtro revestida con células de plantas monocotiledóneas cultivadas en suspensión. El tamiz dispersa las partículas para que no se administren a las células receptoras en agregados de gran tamaño. Las técnicas de bombardeo con microproyectiles son ampliamente aplicables y se pueden usar para transformar prácticamente cualquier especie vegetal. Los ejemplos de especies que se han transformado por bombardeo con microproyectiles incluyen especies monocotiledóneas tal como el maíz (Solicitud de PCT WO 95/06128), cebada (Ritala *et al.*, 1994; Hensgens *et al.*, 1993), trigo (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.563.055), arroz (Hensgens *et al.*, 1993), avena (Torbet *et al.*, 1995; Torbet *et al.*, 1998), centeno (Hensgens *et al.*, 1993), caña de azúcar (Bower *et al.*, 1992) y sorgo (Casa *et al.*, 1993; Hagio *et al.*, 1991); así como diversas dicotiledóneas que incluyen tabaco (Tomes *et al.*, 1990; Buising and Benbow, 1994), soja (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.322.783), girasol (Knittel *et al.*, 1994), maní (Singsit *et al.*, 1997), algodón (McCabe and Martinell, 1993), tomate (VanEck *et al.*, 1995) y legumbres en general (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.563.055).

D. Otros procedimientos de transformación

La transformación de protoplastos se puede lograr usando procedimientos basados en la precipitación de fosfato de calcio, tratamiento con polietilenglicol, electroporación y combinaciones de estos tratamientos (véase, por ejemplo, Potrykus *et al.*, 1985; Lorz *et al.*, 1985; Omirulleh *et al.*, 1993; Fromm *et al.*, 1986; Uchimiya *et al.*, 1986; Callis *et al.*, 1987; Marcotte *et al.*, 1988).

La aplicación de estos sistemas a diferentes cepas de plantas depende de la capacidad de regenerar dicha cepa de planta particular a partir de protoplastos. Se han descrito procedimientos ilustrativos para la regeneración de cereales a partir de protoplastos (Toriyama *et al.*, 1986; Yamada *et al.*, 1986; Abdullah *et al.*, 1986; Omirulleh *et al.*, 1993 y Patente de los Estados Unidos Núm. 5.508.184). Los ejemplos del uso de la transformación de absorción directa de protoplastos de cereales incluyen la transformación del arroz (Ghosh-Biswas *et al.*, 1994), sorgo (Battraw and Hall, 1991), cebada (Lazzeri, 1995), avena (Zheng and Edwards, 1990) y maíz (Omirulleh *et al.*, 1993).

Para transformar cepas de plantas que no se pueden regenerar con éxito a partir de protoplastos, se pueden utilizar otras formas de introducir ADN en células o tejidos intactos. Por ejemplo, la regeneración de cereales a partir de embriones inmaduros o explantes se puede efectuar como se describe (Vasil, 1989). Además, la transformación mediada por fibra de carburo de silicio se puede usar con o sin formación de protoplastos (Kaeppler, 1990; Kaeppler *et al.*, 1992; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.563.055). La transformación con esta técnica se logra mediante la agitación de las fibras de carburo de silicio junto con las células en una solución de ADN. El ADN ingresa pasivamente a medida que se perforan las células. Esta técnica se ha usado con éxito con, por ejemplo, maíz y cereales de monocotiledóneas (Solicitud de PCT WO 95/06128 Thompson, 1995) y arroz (Nagatani, 1997).

E. Cultivos de tejido

Los cultivos de tejido se pueden usar en ciertas técnicas de transformación para la preparación de células para la transformación y regeneración de plantas a partir de estas. El mantenimiento de cultivos de tejido requiere el uso de medios y ambientes controlados. "Medios" se refiere a las numerosas mezclas de nutrientes que se utilizan para

cultivar células *in vitro*, es decir, fuera del organismo vivo intacto. El medio normalmente es una suspensión de varias categorías de ingredientes (sales, aminoácidos, reguladores del crecimiento, azúcares, tampones) que se requieren para el crecimiento de la mayoría de los tipos de células. Sin embargo, cada tipo de célula específico requiere un intervalo específico de proporciones de ingredientes para el crecimiento, y un intervalo aún más específico de fórmulas para un crecimiento óptimo. La tasa de crecimiento celular también varía entre los cultivos iniciados con la variedad de medios que permiten el crecimiento de ese tipo celular.

Los medios de nutrientes se preparan como un líquido, pero este se puede solidificar mediante la adición del líquido a materiales capaces de proporcionar un soporte sólido. Agar es el más comúnmente usado para este propósito. Bactoagar, agar Hazelton, Gelrite y Gelgro son tipos específicos de soportes sólidos que son adecuados para el crecimiento de células vegetales en cultivo de tejido.

Algunos tipos de células crecen y se dividen en suspensión líquida o en medios sólidos. Como se desvela en la presente memoria, las células vegetales crecen en suspensión o en medio sólido, pero la regeneración de plantas a partir de cultivos en suspensión requiere normalmente la transferencia del medio líquido a sólido en algún punto del desarrollo. El tipo y el grado de diferenciación de las células en cultivo se ven afectados no solo por el tipo de medio usado y por el ambiente, por ejemplo, el pH, sino también por el hecho de si el medio es sólido o líquido.

El tejido que se puede cultivar en un cultivo incluye células de meristemo, callo de Tipo I, Tipo II y Tipo III, embriones inmaduros y células gaméticas tal como microsporas, polen, espermatozoides y óvulos. Los callos de Tipo I, Tipo II y Tipo III se pueden iniciar a partir de fuentes de tejido que incluyen embriones inmaduros, meristemos apicales de plántulas, raíces, hojas y microsporas. Las células que son capaces de proliferar como callos también son células receptoras para la transformación genética.

Las células somáticas son de varios tipos. Las células embriogénicas son un ejemplo de células somáticas que se pueden inducir para regenerar una planta a través de la formación de embriones. Las células no embriogénicas son las que típicamente no responden de tal manera. Se pueden usar ciertas técnicas que enriquecen las células receptoras dentro de una población celular. Por ejemplo, el desarrollo de callos de Tipo II, seguido de la selección manual y el cultivo de tejido embriogénico friable, generalmente da como resultado un enriquecimiento de las células. Las técnicas de selección manual que se pueden emplear para seleccionar células diana pueden incluir, por ejemplo, evaluar la morfología y diferenciación celular, o se pueden usar diversos medios físicos o biológicos. La criopreservación también es un procedimiento de selección posible para las células receptoras.

La selección manual de células receptoras, por ejemplo, mediante la selección de células embriogénicas de la superficie de un callo de Tipo II, es un medio que se puede usar en un intento para enriquecer células particulares antes del cultivo (ya sea cultivadas en medios sólidos o en suspensión).

Cuando se emplean, las células cultivadas se pueden cultivar sobre soportes sólidos o en forma de suspensiones líquidas. En cualquier caso, los nutrientes se pueden proporcionar a las células en forma de medios y bajo condiciones ambientales controladas. Existen muchos tipos de medios de cultivo de tejidos compuestos por varios aminoácidos, sales, azúcares, reguladores del crecimiento y vitaminas. La mayoría de los medios empleados en la práctica de la divulgación tienen algunos componentes similares, pero pueden diferir en la composición y las proporciones de sus ingredientes de acuerdo con la aplicación particular prevista. Por ejemplo, varios tipos de células generalmente crecen en más de un tipo de medio, pero exhiben diferentes tasas de crecimiento y diferentes morfologías, de acuerdo con los medios de crecimiento. En algunos medios, las células sobreviven, pero no se dividen. Se han descrito previamente varios tipos de medios adecuados para el cultivo de células vegetales. Los ejemplos de estos medios incluyen el medio N6 descrito por Chu *et al.* (1975) y medio MS (Murashige and Skoog, 1962).

Producción y caracterización de plantas transformadas en forma estable

Después de efectuar la administración de ADN exógeno a las células receptoras, las siguientes etapas generalmente se refieren a la identificación de las células transformadas para su posterior cultivo y regeneración de plantas. Para mejorar la capacidad de identificar transformantes, se puede desear emplear un gen marcador seleccionable o detectable con un vector de transformación preparado como se desvela en la presente memoria. En este caso, generalmente se puede analizar la población celular potencialmente transformada mediante la exposición de las células a un agente o agentes selectivos, o se pueden detectar las células por el rasgo del gen marcador deseado.

A. Selección

Se considera que el ADN se introduce solo en un pequeño porcentaje de células diana en cualquier estudio. Con el fin de proporcionar un sistema eficaz para la identificación de las células que reciben ADN e integrarlo en sus genomas, se puede emplear un medio para seleccionar las células que se transforman de manera estable. Un ejemplo de dicho procedimiento es introducir en la célula huésped un gen marcador que confiere resistencia a algún agente normalmente inhibidor, tal como un antibiótico o herbicida. Los ejemplos de antibióticos que se pueden usar incluyen los antibióticos de aminoglicósidos neomicina, kanamicina y paromomicina, o el antibiótico higromicina. La

resistencia a los antibióticos aminoglicósidos es conferida por enzimas de aminoglucósido fosfotransferasa tal como la neomicina fosfotransferasa II (NPT II) o NPT I, mientras que la resistencia a higromicina es conferida por la higromicina fosfotransferasa.

- 5 Las células potencialmente transformadas se exponen después al agente selectivo. En la población de células sobrevivientes son aquellas células en las que, generalmente, el gen que confiere resistencia se ha integrado y expresado en niveles suficientes para permitir la supervivencia celular. Las células también se pueden analizar para confirmar la integración estable del ADN exógeno.

- 10 Un herbicida que constituye un agente de selección deseable es el herbicida de amplio espectro bialafos. Bialafos es un antibiótico tripeptídico producido por *Streptomyces hygroscopicus* y está compuesto por fosfinotricina (PPT), un análogo del ácido L-glutámico y dos residuos de L-alanina. Tras la eliminación de los residuos de L-alanina por peptidasas intracelulares, se libera la PPT, que es un potente inhibidor de la glutamina sintetasa (GS), una enzima fundamental implicada en la asimilación de amoníaco y el metabolismo del nitrógeno (Ogawa *et al.*, 1973). La PPT sintética, el principio activo en el herbicida Liberty también es eficaz como agente de selección. La inhibición de GS en las plantas por PPT causa la rápida acumulación de amoníaco y la muerte de las células vegetales.

- 15 El organismo productor de bialafos y otras especies del género *Streptomyces* también sintetiza una enzima de fosfinotricina acetil transferasa (PAT) que está codificada por el gen bar en *Streptomyces hygroscopicus* y el gen pat en *Streptomyces viridochromogenes*. El uso del gen de resistencia a herbicidas que codifica la fosfinotricina acetil transferasa (PAT) se menciona en el documento DE 3642 829, en el que el gen se aísla de *Streptomyces viridochromogenes*. En el organismo de origen bacteriano, esta enzima acetila el grupo amino libre de PPT, lo que evita la autotoxicidad (Thompson *et al.*, 1987). El gen bar se ha clonado (Murakami *et al.*, 1986; Thompson *et al.*, 1987) y expresado en tabaco, tomate, patata (De Block *et al.*, 1987) Brassica (De Block *et al.*, 1989) y maíz transgénicos (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.550.318). En informes anteriores, algunas plantas transgénicas que expresaban el gen de resistencia eran completamente resistentes a las formulaciones comerciales de PPT y bialafos en invernaderos.

- 25 Otro ejemplo de un herbicida que es útil para la selección de líneas celulares transformadas es el herbicida de amplio espectro glifosato. El glifosato inhibe la acción de la enzima EPSPS que es activa en la vía de biosíntesis de aminoácidos aromáticos. La inhibición de esta enzima lleva a la inanición de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptofano y los metabolitos secundarios derivados de los mismos. La Patente de los Estados Unidos Núm. 4.535.060 describe el aislamiento de mutaciones EPSPS que confieren resistencia al glifosato en el gen *Salmonella typhimurium* para EPSPS, aroA. El gen EPSPS se clonó a partir de *Zea mays* y se introdujeron *in vitro* mutaciones similares a las encontradas en un gen aroA resistente al glifosato. Los genes mutantes que codifican enzimas EPSPS resistentes a glifosato se describen, por ejemplo, en el documento WO 97/4103. El gen EPSPS mutante mejor caracterizado que confiere resistencia al glifosato comprende cambios de aminoácidos en los residuos 102 y 106, aunque se prevé que otras mutaciones también son útiles (PCT/WO97/4103).

- 35 Para usar el sistema selectivo de bar-bialafos o EPSPS-glifosato, el tejido transformado se cultiva durante 0-28 días en medio no selectivo y después se transfiere a un medio que contiene 1-3 mg/l de bialafos o 1-3 mM de glifosato según sea apropiado. Si bien típicamente se prefieren los intervalos de 1-3 mg/l de bialafos o 1-3 mM de glifosato, se propone que los intervalos de 0,1-50 mg/l de bialafos o 0,1-50 mM de glifosato son de utilidad.

- 40 Un ejemplo de un rasgo marcador detectable es la enzima luciferasa. En presencia del sustrato luciferina, las células que expresan luciferasa emiten luz que se puede detectar en una película fotográfica o de rayos X, en un luminómetro (o contador de centelleo líquido), mediante dispositivos que mejoran la visión nocturna o mediante una cámara de video altamente sensible a la luz, tal como una cámara de recuento de fotones. Estos ensayos no son destructivos y las células transformadas también se pueden cultivar después de la identificación. La cámara de recuento de fotones es especialmente valiosa ya que permite identificar células o grupos de células específicas que expresan luciferasa y manipularlas en tiempo real. Otro marcador detectable que se puede usar de manera similar es el gen que codifica la proteína fluorescente verde.

B. Regeneración y producción de semillas

- 50 Las células que sobreviven a la exposición al agente selectivo, o las células que han obtenido una puntuación positiva en un ensayo de detección, se pueden cultivar en un medio que soporta la regeneración de plantas. En un ejemplo, los medios MS y N6 se pueden modificar mediante la inclusión de sustancias adicionales tal como reguladores del crecimiento. Uno de estos reguladores de crecimiento es dicamba o 2,4-D. Sin embargo, se pueden emplear otros reguladores del crecimiento, que incluyen NAA, NAA + 2,4-D o picloram. Se ha descubierto que la mejora de los medios en estas y otras formas facilita el crecimiento de las células en etapas de desarrollo específicas. El tejido se puede mantener en un medio básico con reguladores del crecimiento hasta que haya suficiente tejido disponible para comenzar los esfuerzos de regeneración de la planta, o después de rondas repetidas de selección manual, hasta que la morfología del tejido sea adecuada para la regeneración, al menos 2 semanas, y después transferirse al medio propicio para la maduración de los embrioides. Los cultivos se transfieren cada 2 semanas en este medio. El desarrollo del brote indica el momento de transferencia al medio carente de reguladores de crecimiento.

Las células transformadas, identificadas por selección o detección y cultivadas en un medio adecuado que soporta la regeneración, después se dejan madurar en plantas. Las plántulas en desarrollo se transfieren a una mezcla de crecimiento de plantas sin suelo y se endurecen, por ejemplo, en una cámara de ambiente controlado, por ejemplo, a aproximadamente 85% de humedad relativa, 600 ppm de CO₂ y 25-250 µmol (microeinstein) m² s⁻¹ de luz. Las plantas pueden madurar en una cámara de crecimiento o invernadero. Las plantas se pueden regenerar de aproximadamente 6 semanas a 10 meses después de que se identifica un transformante, de acuerdo con el tejido inicial. Durante la regeneración, las células crecen en medio sólido en recipientes de cultivo de tejido. Los recipientes ilustrativos son las placas de Petri y Plant Cons. Las plantas en regeneración se pueden cultivar a aproximadamente 19 a 28 °C. Después de que las plantas en regeneración han alcanzado la etapa de desarrollo de brotes y raíces, se pueden transferir a un invernadero para crecimiento y pruebas adicionales.

Las semillas en plantas transformadas ocasionalmente pueden requerir el rescate de embriones debido al cese del desarrollo de semillas y la senescencia prematura de las plantas. Para rescatar embriones en desarrollo, se extirpan de semillas desinfectadas en la superficie 10-20 días después de la polinización y se cultivan. Un medio usado para el cultivo en esta etapa comprende sales MS, sacarosa al 2% y 5,5 g/l de agarosa. En el rescate de embriones, los embriones grandes (definidos como con una longitud mayor que 3 mm) se germinan directamente en un medio adecuado. Los embriones más pequeños que estos se pueden cultivar durante 1 semana en medios que contienen los ingredientes anteriores junto con ácido abscísico 10⁻⁵ M y después se pueden transferir a un medio libre de regulador de crecimiento para la germinación.

C. Caracterización

Para confirmar la presencia del ADN exógeno o "transgén" en las plantas en regeneración, se pueden realizar una variedad de ensayos. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos "biológicos moleculares", tal como Southern y Northern blotting y PCRTM; ensayos "bioquímicos", tal como detección de la presencia de un producto proteico, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISA y Western blots) o por función enzimática; ensayos de partes de plantas, tal como ensayos de hojas o raíces; y también, mediante el análisis del fenotipo de la planta regenerada entera.

D. Integración de ADN, expresión y herencia de ARN

El ADN genómico se puede aislar de líneas celulares o de cualquier parte de la planta para determinar la presencia del gen exógeno mediante el uso de técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Cabe señalar que las secuencias intactas no siempre están presentes, presumiblemente debido a la reorganización o supresión de secuencias en la célula. La presencia de elementos de ADN introducidos a través de los procedimientos de esta invención se puede determinar, por ejemplo, por reacción en cadena de la polimerasa (PCRTM). Usando esta técnica, los fragmentos discretos de ADN se amplifican y detectan por electroforesis en gel. Este tipo de análisis permite determinar si un gen está presente en un transformante estable, pero no prueba la integración del gen introducido en el genoma de la célula huésped. Sin embargo, típicamente este es el caso en que el ADN se ha integrado en el genoma de todos los transformantes que demuestran la presencia del gen a través del análisis PCRTM. Además, normalmente no es posible usar técnicas de PCRTM para determinar si los transformantes tienen genes exógenos introducidos en diferentes sitios en el genoma, es decir, si los transformantes son de origen independiente. Se contempla que usando técnicas de PCRTM es posible clonar fragmentos del ADN genómico del huésped adyacente a un gen introducido.

La prueba positiva de la integración del ADN en el genoma del huésped y las identidades independientes de los transformantes se pueden determinar usando la técnica de hibridación Southern. Usando esta técnica, se pueden identificar secuencias de ADN específicas que se introdujeron en el genoma del huésped y secuencias de ADN huésped flanqueantes. Por lo tanto, el patrón de hibridación Southern de un transformante dado sirve como una característica de identificación de ese transformante. Además, a través de la hibridación Southern es posible demostrar la presencia de genes introducidos en el ADN de alto peso molecular, es decir, confirmar que el gen introducido se ha integrado en el genoma de la célula huésped. La técnica de hibridación Southern proporciona información que se obtiene usando PCRTM, por ejemplo, la presencia de un gen, pero también demuestra la integración en el genoma y caracteriza cada transformante individual.

Se contempla que por el uso de las técnicas de hibridación de dot o slot blot que son modificaciones de las técnicas de hibridación Southern se puede obtener la misma información que se deriva de PCRTM, por ejemplo, la presencia de un gen.

Las técnicas de hibridación PCRTM y Southern se pueden usar para demostrar la transmisión de un transgén a la progenie. En la mayoría de los casos, el patrón de hibridación Southern característico para un transformante dado se segrega en la progenie como uno o más genes mendelianos (Spencer *et al.*, 1992), lo que indica la herencia estable del transgén.

Si bien las técnicas de análisis de ADN se pueden llevar a cabo usando ADN aislado de cualquier parte de una planta, el ARN solo se expresa en tipos de células o tejidos particulares y, por lo tanto, es necesario preparar ARN para el análisis de estos tejidos. Las técnicas de PCRTM también pueden usarse para la detección y cuantificación de ARN producido a partir de genes introducidos. En esta aplicación de PCRTM, en primer lugar es necesario transcribir

inversamente el ARN en el ADN, usando enzimas tal como la transcriptasa inversa, y después mediante el uso de técnicas convencionales de PCR™ amplificar el ADN. En la mayoría de los casos, las técnicas de PCR™, aunque útiles, no demuestran la integridad del producto de ARN. Se puede obtener información adicional sobre la naturaleza del producto de ARN mediante Northern blotting. Esta técnica demuestra la presencia de una especie de ARN y da información sobre la integridad de dicho ARN. La presencia o ausencia de una especie de ARN también se puede determinar utilizando hibridaciones Northern de dot o slot blot. Estas técnicas son modificaciones de Northern blotting y solo demuestran la presencia o ausencia de una especie de ARN.

E. Expresión génica

Si bien se pueden usar Southern blotting y PCR™ para detectar el gen en cuestión, no proporcionan información sobre si se está expresando la proteína correspondiente. La expresión se puede evaluar mediante la identificación específica de los productos de proteína de los genes introducidos o evaluar los cambios fenotípicos provocados por su expresión.

Los ensayos para la producción e identificación de proteínas específicas pueden hacer uso de propiedades fisicoquímicas, estructurales, funcionales u otras propiedades de las proteínas. Las propiedades fisicoquímicas o estructurales únicas permiten que las proteínas se separen e identifiquen mediante procedimientos electroforéticos, tal como la electroforesis en gel nativo o desnaturalizante o enfoque isoeléctrico, o mediante técnicas cromatográficas tal como intercambio iónico o cromatografía de exclusión en gel. Las estructuras únicas de las proteínas individuales ofrecen oportunidades para el uso de anticuerpos específicos para detectar su presencia en formatos tal como un ensayo ELISA. Las combinaciones de enfoques se pueden emplear con una especificidad aún mayor, tal como la transferencia Western en la que los anticuerpos se usan para localizar productos génicos individuales que se han separado por técnicas electroforéticas. Se pueden emplear técnicas adicionales para confirmar absolutamente la identidad del producto de interés, tal como la evaluación por secuenciación de aminoácidos después de la purificación. Aunque estos se encuentran entre los más comúnmente empleados, además se pueden usar otros procedimientos.

Los procedimientos de ensayo también se pueden usar para identificar la expresión de proteínas por su funcionalidad, especialmente la capacidad de las enzimas para catalizar reacciones químicas específicas que involucran sustratos y productos específicos. Estas reacciones se pueden seguir mediante la provisión y cuantificación de la pérdida de sustratos o la generación de productos de las reacciones mediante procedimientos físicos o químicos. Los ejemplos son tan variados como la enzima a analizar y pueden incluir ensayos de actividad enzimática PAT siguiendo la producción de fosfinotricina acetilada radiomarcada a partir de fosfinotricina y ¹⁴C-acetil CoA o actividad de antranilato sintasa siguiendo la pérdida de fluorescencia de antranilato, por nombrar dos.

Muy frecuentemente la expresión de un producto génico se determina mediante la evaluación de los resultados fenotípicos de su expresión. Estos ensayos también pueden adoptar muchas formas, que incluye el análisis de cambios en la composición química, la morfología o las propiedades fisiológicas de una planta. La composición química se puede alterar mediante la expresión de genes que codifican enzimas o proteínas de almacenamiento que cambian la composición de aminoácidos y se pueden detectar mediante análisis de aminoácidos, o mediante enzimas que cambian la cantidad de almidón que se puede analizar mediante espectrometría de reflectancia en el infrarrojo cercano. Los cambios morfológicos pueden incluir una mayor estatura o tallos más gruesos. Con mayor frecuencia, los cambios en la respuesta de las plantas o partes de las plantas a los tratamientos impuestos se evalúan en condiciones cuidadosamente controladas denominadas bioensayos.

Reproducción de plantas

Además de la transformación directa de un genotipo de planta particular con una construcción preparada como se desvela en la presente memoria, se pueden fabricar plantas transgénicas mediante el cruzamiento de una planta que tiene un ADN seleccionado con una segunda planta que carece de la construcción. Por ejemplo, una secuencia codificadora de biosíntesis de lignina seleccionada se puede introducir en una variedad de planta particular mediante cruzamiento, sin la necesidad de transformar directamente una planta de esa variedad dada. Por lo tanto, se contempla una planta directamente transformada o regenerada a partir de células que se han transformado como se desvela en la presente memoria, pero también se contempla la progenie de tales plantas.

Como se usa en la presente memoria, el término "progenie" indica la descendencia de cualquier generación de una planta progenitora preparada, en la que la progenie comprende una construcción de ADN seleccionada. "Cruzar" una planta para proporcionar una línea vegetal que tiene uno o más transgenes añadidos en relación con una línea vegetal de partida, como se desvela en la presente memoria, se define como las técnicas que resultan en la introducción de un transgén en una línea vegetal mediante el cruzamiento de una línea de partida con una línea vegetal donante que comprende un transgén. Para lograr esto, por ejemplo, se pueden realizar las siguientes etapas:

- (a) plantar semillas de la primera planta progenitora (línea de partida) y la segunda (línea vegetal donante que comprende un transgén de interés);

- (b) cultivar las semillas de la primera y segunda planta progenitora en plantas que dan flores;
- (c) polinizar una flor de la primera planta progenitora con polen de la segunda planta progenitora; y
- (d) cosechar semillas producidas en la planta progenitora que portan la flor fertilizada.

El retrocruzamiento se define en la presente memoria como el procedimiento que incluye las etapas de:

- 5 (a) cruzar una planta de un primer genotipo que contiene un gen, secuencia de ADN o elemento deseado con una planta de un segundo genotipo que carece del gen, secuencia de ADN o elemento deseado;
- (b) seleccionar una o más plantas de progenie que contienen el gen, secuencia de ADN o elemento deseado;
- (c) cruzar la planta de progenie con una planta del segundo genotipo; y
- 10 (d) repetir las etapas (b) y (c) con el fin de transferir una secuencia de ADN deseada de una planta de un primer genotipo a una planta de un segundo genotipo.

Ejemplos

Ejemplo 1: La actividad enzimática total de la PPO no predice el rendimiento de la vida útil

Se sembró un panel de 23 cultivares que incluye controles de cambio de coloración en un ensayo de tres replicados en un ambiente único. Los cultivares se cosecharon el mismo día y se determinó la actividad enzimática total de la PPO. Se observó una distribución normal de las unidades totales de actividad de la PPO (Actividad de U PPO = $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ug}^{-1}$) entre los 23 cultivares. Las variedades con las cinco actividades de la PPO más altas y las cinco más bajas se cultivaron en un segundo ambiente y la vida útil se determinó usando un diseño de bloques completos aleatorios de 6 replicados. Se reconoció que la actividad de la cosecha no predijo el rendimiento de la vida útil, las dos variedades más resistentes al cambio de coloración en este conjunto se identificaron como de alta actividad enzimática. En una comparación de la actividad enzimática de la PPO de cosecha (total) para 8 cosechas diferentes de controles de cambio de coloración, 7 de 8 comparaciones no se diferenciaron estadísticamente. Estos resultados fueron sorprendentes e inesperados porque anteriormente se ha considerado que la actividad enzimática, la suma total de la actividad de todas las enzimas activas, era un predictor de la vida útil.

Ejemplo 2: La expresión de la PPO11 aumenta con el tiempo después de la cosecha

Se identificaron once (11) homólogos del gen de la PPO, mostrados en la FIG. 1, y 3 homólogos del gen de PAL en la lechuga. El análisis de la expresión génica de estos homólogos enzimáticos de la vía de cambio de coloración se evaluó para determinar su correlación con el fenotipo de cambio de coloración/rendimiento de vida útil. La capacidad de correlacionar la actividad de la enzima de la PPO en la cosecha o la inducción de genes de la vía específica con el rendimiento de la vida útil proporcionó una herramienta de selección focalizada para permitir un programa de reproducción para mejorar el rendimiento de la vida útil.

Protocolo RT PCR: se realizaron QRT-PCR como se describe en el manual del operador usando un Stratagene MX3000PTM. Los cebadores de PCR específicos de genes se diseñaron usando criterios que incluyen una temperatura de fusión predicha de al menos 58 °C, una longitud del cebador de 22-24 nucleótidos, un contenido de guanosa-citosina de al menos 48% y una longitud de amplicón de 120-150 pb. La especificidad del cebador se confirmó mediante análisis de curva de fusión, mediante una eficacia de amplificación del producto de 1,0 $\pm$ 0,1, y mediante una verificación de secuencia de al menos ocho amplicones de PCR clonados para cada gen. Las reacciones con agua en lugar del molde de ADNc se realizaron con cada par de cebadores como control. Se utilizó el perfil térmico estándar: 95 °C durante 10 min, después 60 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 53 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos. La señal de fluorescencia se capturó al final de cada ciclo, y se realizó un análisis de la curva de fusión desde la temperatura de apareamiento hasta 95 °C con captura de datos cada 0,2 °C durante una retención de 1 segundo. La cantidad de cada transcrito es el promedio de dos replicados técnicos. Todos los gráficos de amplificación se analizaron con el software MX3000PTM para obtener valores de ciclo umbral (Ct). La abundancia del transcrito se normalizó a la abundancia del transcrito de ubiquitina (número de acceso GenBank EF681766).

Los resultados se muestran en la FIG. 2, que proporciona un experimento a lo largo del tiempo del perfil de expresión de la PPO. Dos homólogos de la PPO, PPO2 y PPO11, se regularon por acumulación después de la cosecha. La PPO11 es la PPO más regulada por acumulación durante el experimento de curso de tiempo. La expresión de la PPO1 y PPO10 disminuyó con el tiempo. La expresión de la PPO8 no cambió con el tiempo.

Ejemplo 3: Determinación de la vida útil de la lechuga

El estándar actual de la industria para evaluar el rendimiento, pardeamiento o vida útil de la lechuga es evaluar una variedad de lechuga en un envase de atmósfera modificada 14 días después del procesamiento y asegurar que se produce menos de 2% de rosado o pardeamiento visible. El rendimiento de las variedades individuales más allá de 4

días ha sido desconocido. Se evalúa el rendimiento de las variedades de lechuga cortada en un ensayo de aire ambiente a 4 °C. Dicha evaluación permite distinguir rápidamente el rendimiento de la variedad de lechuga. Además, se probó la correlación de la actividad enzimática de la polifenol oxidasa (PPO) en la nervadura central de cada variedad con el rendimiento de la lechuga.

- 5 Para llevar a cabo la evaluación de la vida útil, se recolectan seis cabezas de lechuga y se empaquetan en una caja de cartón encerado. Un camión refrigerado, ajustado a 5 °C (41 ° F), se usa para el transporte de las muestras.

- 10 Las cabezas individuales se retiran de la bolsa de plástico y se coloca la etiqueta ID en una bandeja azul única. Se colocan dos tubos vacíos de 50 ml con código de barras en la bandeja y la muestra puede avanzar para corte. Se quitan las hojas dañadas exteriores y se corta la base. El tallo se retira y se descarta, las hojas internas del corazón (amarillas y con una longitud menor que 15,2 cm (6 pulgadas)) se descartan. De cada cabeza, se apartan dos hojas de las hojas externas e internas para la evaluación de la nervadura central, se recolectan 12 hojas en total. Todas las hojas de lechuga restantes se cortan para evaluar la vida útil.

- 15 Evaluación de la nervadura central: de los 12 pecíolos (6 cabezas x 2 hojas), el material de hoja superior y el material del borde a lo largo de los 2/3 de la nervadura de la lechuga se retiran con un cuchillo. Se descarta el material de hoja y se retienen los 2/3 inferiores de las nervaduras centrales. Todas las nervaduras se cortan en rodajas de 2,5 cm (1 pulgada), se mezclan a mano y después se submuestran en tubos que se llenan hasta la línea de 30 ml.

- 20 La lechuga romana, CRC y tipo espinaca se preparan de la siguiente manera. Se quita el material de hoja por encima de la nervadura. Se retira el exceso de material de hoja paralelo a la nervadura para dejar solo 2,5-5 cm (1-2 pulgadas) de material de hoja a cada lado de la nervadura. Si la hoja es lo suficientemente estrecha, esta etapa no se realiza. Las nervaduras y los pedazos de hojas flanqueantes se cortan en trozos de 1,9 cm (3/4 de pulgada) perpendiculares a la longitud de la nervadura. Todo el material se recolecta y se sumerge en agua fresca fría usando un gran filtro tipo canasta, se transfiere a un centrifugador eléctrico de ensaladas y se seca durante 60 segundos. Se recolectan tres recipientes amplios tipo almeja completos hasta 946,35 ml (códigos de barras individuales), si están disponibles. Toda lechuga cortada restante se recolecta en una bandeja negra con código de barras.

- 30 Lechuga tipo iceberg: se debe preparar de la siguiente manera: la lechuga se corta en tiras de 1,9 cm (3/4 de pulgada) y después estas tiras se cortan en un ángulo de 90 ° en cuadrados de 1,9 cm (3/4 de pulgada). Todo el material se recolecta en un recipiente azul, se lava en una canasta de malla y se seca por centrifugación durante 60 segundos en una centrifugadora eléctrica de ensalada. Se recolectan tres recipientes amplios tipo almeja completos hasta 946,35 ml (códigos de barras individuales), si están disponibles. Toda lechuga cortada restante se recoge en una bandeja negra con código de barras. Las muestras se barren en orden, los tubos falcon se almacenan a -80 °C, y las muestras se califican visualmente y el análisis de imágenes se realiza mediante calificaciones visuales y análisis de imágenes.

- 35 Calificaciones visuales: Comenzando 72 h después del procesamiento, cada muestra se puntúa en una escala de calificación de 1 (mejor) a 5 (peor) contra fotos de referencia por múltiples individuos de forma independiente. Es necesario asegurar una iluminación adecuada para discernir las diferencias en el pardeamiento. Idealmente, las muestras se califican los días 3, 5 y 7 de acuerdo con las fotos de referencia, y con el momento en que las evaluaciones del recipiente tipo almeja se han de realizar como bloques desde el campo. Se registra la puntuación combinada para cada almeja.

- 40 Análisis de imagen: Los trozos de lechuga en cada bandeja negra se fotografían en los mismos puntos de tiempo que las calificaciones visuales. Se usa una estación de luz con barras luminosas de Rosco Litepad HO+, de 7,6 cm x 30,5 cm (3" x 12"), colocadas en un ángulo de 40° horizontal a cada lado a una distancia de 45,7 cm (18") de la superficie de trabajo. Las imágenes se recogen con una cámara Canon EOS Rebel T3 que se coloca a 53 cm por encima de la plataforma. La cantidad de cambio de coloración se determina mediante análisis de imagen usando un programa Matlab adaptado para cuantificar la cantidad de píxeles marrones en relación con la cantidad de píxeles que representan el área total de las hojas de lechuga.

Ejemplo 4: La expresión de la PPO11 se correlaciona con el pardeamiento y la vida útil reducida

- 50 Los niveles de expresión de la PPO2, PPO8, PPO10, PPO11 y PAL1 se determinaron mediante el análisis de las extracciones de ARN de la nervadura central de los materiales recolectados al momento del procesamiento o después de 7-9 días de almacenamiento en aire ambiente a 4 °C. Las muestras de ARN se prepararon usando el kit de reactivo de ARN de planta PureLink® (Ambion) siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante. Se realizaron QRT-PCR como se describe en el manual del operador usando un Stratagene MX3000PTM. Se diseñaron cebadores de PCR específicos del gen (véase la Tabla 2). Todos los gráficos de amplificación se analizaron con el software MX3000PTM para obtener valores de ciclo umbral (Ct). La abundancia de los transcritos se normalizó a la abundancia del transcrito de ubiquitina (número de acceso GenBank EF681766).

Tabla 2. Cebadores de PCR específicos del gen:

SEQ ID NÚM.	Amplicón	Nombre del cebador	Etiqueta fluorescente	5'→3'
SEQ ID NÚM.:12	PAL1	PALL-F	-	CGTCGAGATTCTGCGAG AAAG
SEQ ID NÚM.:13	PAL1	PALL-R	-	GCAAACGTCGTCGATGT AAGC
SEQ ID NÚM.:14	PAL1	LsPAL1Probe	6FAM	CTCCTCCGTGTTGTTGAT CGTGAATACGTC
SEQ ID NÚM.:14	PAL1	LsPAL1Probe	6FAM	CTCCTCCGTGTTGTTGAT CGTGAATACGTC
SEQ ID NÚM.:15	PPO1	PPO1-F	-	GCAAGTTCAATAAAGCCA TCGA
SEQ ID NÚM.:16	PPO1	PPO1-R	-	CGCAATAGGCACAATGA ACATT
SEQ ID NÚM.:17	PPO1	LsPPO1Probe	6FAM	CCCAGATGACGATCCTC GTAGCTTTAAGC
SEQ ID NÚM.:18	PPO10	PPO10-F	-	AAGGCTTCCAGAAACAT CAAGAA
SEQ ID NÚM.:19	PPO10	PPO10-R	-	AGACTCGCCGGAAAAAC ATCT
SEQ ID NÚM.:20	PPO10	LsPPO10Probe	6FAM	CATGCCCATGAACACATA CCCTTTGCA
SEQ ID NÚM.:21	PPO11	PPO11-F	-	GCAAGATCAAGAAGCTC GCTGTA
SEQ ID NÚM.:22	PPO11	PPO11-R	-	ACTCGCCGGAAAAACAT CTTT
SEQ ID NÚM.:23	PPO11	LsPPO11Probe	6FAM	CGAGCCGATGAACACAT ACCCTTTGC

SEQ ID NÚM.	Amplicón	Nombre del cebador	Etiqueta fluorescente	5'→3'
SEQ ID NÚM.:24	PPO2	PPO2-F	-	GACGTACCATGGCTAAA AAGCAA
SEQ ID NÚM.:25	PPO2	PPO2-R	-	CGATGGATTTCCTCGCA ACT
SEQ ID NÚM.:26	PPO2	LsPPO2Probe	6FAM	CCAGTCCCACGTGCACC CAGG
SEQ ID NÚM.:27	PPO8	PPO8-F	-	GCTGCAACAGACCCGGT TA
SEQ ID NÚM.:28	PPO8	PPO8-R	-	CTGGCGGGTCCTTCTGA TT
SEQ ID NÚM.:29	PPO8	LsPPO8Probe	6FAM	CCGAAGAGGAACAACAC AAAGGACTTCCC
SEQ ID NÚM.:30	Ubiquitina	Ubiquitina-F	-	TTGTCTTGAATTTTAGCT TTGACGTT
SEQ ID NÚM.:31	Ubiquitina	Ubiquitina-R	-	CCTTGACCGGAAAAACA ATCA
SEQ ID NÚM.:32	Ubiquitina	LsUbiquitinProbe	VIC	TCAATGGTGTCTGGAGCT TTCCACTTCC

En las FIG. 3a y FIG. 4 se muestra un gráfico de cambio de la coloración visual versus las combinaciones de gen x punto de tiempo con un $r > 0,7$. La PPO11 se expresó débilmente o no se expresó en el momento de la cosecha, pero se indujo fuertemente después del procesamiento y almacenamiento. Se observó que la inducción de la PPO11 tenía el mayor intervalo de expresión, como se demuestra en la FIG. 5.

La correlación de la expresión de la PPO11 y el cambio de la coloración visual en un experimento a gran escala en un ambiente diferente se muestra en la FIG. 3B. Nuevamente, los niveles de expresión de la PPO11 9 días después del procesamiento y almacenamiento a baja temperatura con calificaciones de cambio de la coloración visual para dos cultivares de lechuga cruzada romana-crujiente, tres de iceberg y cinco de romana fueron significativos. Cada punto representa la media de cuadrados mínimos para un cultivar único con seis replicados biológicos tanto para la expresión génica como para las calificaciones visuales.

En suma, la correlación de la expresión de la PPO11 con un fenotipo de pardeamiento visual se demostró en las FIGS. 3A-B, y se proporcionó un gráfico de cambio de la coloración visual en la FIG. 4, lo que demuestra que el pardeamiento se correlacionó fuertemente con la expresión de la PPO11.

Ejemplo 5: La selección del marcador se puede usar para rastrear el locus de la PPO11

Las secuencias marcadoras genéticas asociadas con un locus de la PPO11 con expresión genética reducida se pueden usar para rastrear ese locus en un programa de reproducción. Un gen de la PPO11 u ortólogo del mismo con expresión reducida se puede identificar, por ejemplo, mediante la detección de líneas de baja expresión que se producen naturalmente o mediante una de las metodologías descritas en la presente memoria. Una vez que se

identifica u obtiene un locus de la PPO11 de expresión reducida, las secuencias marcadoras asociadas con el locus de la PPO11 se pueden usar para rastrear el locus de expresión reducida en la segregación de la progenie de un cruzamiento de plantas. Por ejemplo, la secuencia se puede amplificar por PCR a partir de secuencias que flanquean la PPO11, tal como SEQ ID NÚM.: 10 y SEQ ID NÚM.: 11 y a través de la región genética de la PPO11 en ambos progenitores del cruzamiento. Los polimorfismos de un nucleótido único o las diferencias de secuencia entre los dos progenitores se pueden comparar para identificar alelos específicos de cada progenitor asociado con el gen de la PPO11 de expresión normal o de expresión reducida. El ensayo basado en la secuencia (por ejemplo, TaqMan) de estos polimorfismos de nucleótido único o diferencias de secuencia en la progenie segregante de un cruzamiento permite la selección del alelo marcador unido al gen de la PPO11 de expresión reducida deseable.

10 **Ejemplo 6: Identificación de dianas de la PPO en patata y manzana**

La secuencia de la PPO11 incluida en la presente memoria se puede usar para buscar datos de la secuencia genómica de la patata y manzana en busca de homólogos de la PPO. Usando los procedimientos detallados en la presente memoria, los datos de expresión de estos genes de la PPO se pueden correlacionar con la incidencia del pardeamiento para identificar dianas homólogas de la PPO para aumentar la vida útil. Una vez que se identifican las dianas adecuadas, su expresión reducida se puede identificar o provocar y rastrear a través de las metodologías descritas en la presente memoria.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Seminis Vegetable Seeds, Inc.

20 <120> PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES PARA PROLONGAR LA VIDA ÚTIL DE LOS PRODUCTOS VEGETALES

<130> SEMB:014WO

25 <140> Desconocido

<141> 2013-09-24

<150> 61/704,602

<151> 2012-09-24

30

<160> 32

<170> PatentIn versión 3.5

35 <210> 1

<211> 189

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 1

gataggagaa acgtcttatt aggtctcgga ggtctttacg gcgcgcgcgc cacttttggg	60
tcaaactcat tggcgtatgc agctccgatt atggcaccgg acctcacaaa atgtggtccg	120
gctgacttac cccaaggggc tgtacctaca aactgttgcc ctccatacac cacaaagatt	180
cacgatttc	189

<210> 2

5 <211> 225

<212> **ADN**

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 2

gagaaaattt gtggcaaatt aatcgatgat ccaaatttcg caatcccttt ttggaactgg	60
gatgcacctg atggcatgaa gatccctgat atttacacga ataagaaatc tccgttgtac	120
gatgctcttc gtgatgcgaa gcatcaacca ccgtctctga ttgatcttga ctacaatggg	180
gacgatgaaa atcttagccg atcgaaacaa acctccacaa atctc	225

<210> 3

15 <211> 225

<212> **ADN**

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 3

ggagatagga accagcaaaa tggatgaagac atgggtaact tttattctgc agccagagac	60
cctattttct atgcacatca tgcgaatac gacagaatgt ggtcagtttg gaaaactcta	120
ggaggaagaa ggaatgattt tacagataaa gactggcttg attcttcgtt cttgttctac	180
gatgagaacg ctgaaatggg tcgagtcaag gtgagggtt gtctc	225

<210> 4

<211> 226

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 4

gagagatgag	tttgcgaagt	ttgatgtgtt	tgtgaacgat	gaagatgacg	ggatgagggc	60
cacggctgat	aagacggagt	tcgccggaag	ttttgttaat	gtccctcata	agcataagca	120
tgggaagaat	gtgaagacaa	gattgagggt	aggaataagt	gagcttttgg	aggatttggg	180
agctgaagat	gatgacaacg	tggttggtgac	attggtgccg	aaaaac		226

<210> 5

10 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 5

atcgcacca	ttgtagtaa	gatca	25
-----------	-----------	-------	----

20 <210> 6

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 6

atatcaggga	tctcatgcc	atcag	25
------------	-----------	-------	----

30 <210> 7

<211> 25

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

5

<400> 7

aucgucacca uuguagucaa gauca 25

<210> 8

10

<211> 25

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 8

auaucaggga ucucaugcc aucag 25

<210> 9

20

<211> 1922 55 <212> ADN

<213> Lactuca sativa

<400> 9

25

ES 2 763 413 T3

atggcatctc ttgcacaatc accaaccacc accaccacca ccggtggacg gtgcttctcc	60
tcctcctcca cgtactcttc ttctttctct ttcaaatcat ctcaagttcc catagcacga	120
atcacgaacc atcgccatgc agtttcatgc aaaggcgccc tagatgatga tgaccatcac	180
catgaaaact caggcaaatt tgataggaga aacgtcttat taggtctcgg aggtctttac	240
ggcgccgccc ccacttttgg gtcaaactca ttggcgtatg cagctccgat tatggcaccg	300
gacctcacia aatgtggtcc ggctgactta cccaaggggg ctgtacctac aaactgttgc	360
cctccataca ccacaaagat tcacgatttc aaacttccac caccgtcaac caccttccga	420
gtccgtccgg cagctcattt ggctaataaa gattacatag ccaagttcaa taaagccatc	480
gagctcatga aagctctccc agatgacgat cctcgtagtt tcaagcaaca agctgctgtt	540
cattgtgcgt attgcatggg ggcatacgat caagtcggtt tcctgatct cgagcttcaa	600
gtccatggct catggttggt cttaccttcc caccgctatt acttatactt cttcgagaaa	660
atgtgtggca aattaatcga tgatccaaat ttcgcaatcc ctttttgga ctgggatgca	720
cctgatggca tgaagatccc tgatatctac acgaataaga aatctccgtt gtacgatgct	780
cttcgtgatg cgaagcatca accaccgtct ctgattgatc ttgactacaa tggtgacgat	840
gaaaatctta gccgatcgaa acaaacctcc acaaatctca caattatgta cagacaaatg	900
gtgtctagtt ccaagactgc tagtcttttc atgggtagtc cttatcgtgc aggtgatgag	960
gctagccctg gctctggctc gctcgagagc ataccacatg gcccggttca tatctggacc	1020
ggagatagga accagcaaaa tggatgaagc atgggtaact tttattctgc agccagagac	1080
cctattttct atgcacatca tgcgaatata gacagaatgt ggtcagtttg gaaaactcta	1140
ggaggaagaa ggaatgattt tacagataaa gactggcttg attcttcgtt cttgttctac	1200
gatgagaacg ctgaaatggt tcgagtcaag gtgagggatt gtctcgactc caagaagctt	1260
gggtacgttt atcaggatgt agagatacca tggctaaaaa gcaaaccgga accacgtctg	1320

ES 2 763 413 T3

aaaagggctt tgagcaagat caagaagctc gctgtagctc gagccgatga acacataccc	1380
tttgcaaaag atgtttttcc ggcgagtcct gataaggtga taaaagtgtt ggtccaagg	1440
ccgaagaaat caaggagcaa gaaacagaaa gaggatgaag aagaaatctt ggtgatagaa	1500
ggaattgaac tgaagagaga tgagtttgct aagtttgatg tgtttgtgaa cgatgaagat	1560
gacgggatga gggccacggc tgataagacg gagttcgccg gaagttttgt taatgtccct	1620
cataagcata agcatgggaa gaatgtgaag acaagattga ggtaggaat aagtgaagctt	1680
ttggaggatt tgggagctga agatgatgac aacgtgttgg tgacatttgt gccgaaaaac	1740
aaaggtggtg aagtttccat taaagggtt aaaatcgagc atgaggattg ataaaaataa	1800
cttttcattt tcttgaaaaa taaaaaacta tgattttgag ttgtttcggt aaatatgttg	1860
tcgcttggtt aatgtatcat caataaaaat aaatttcgaa atcaaagttg gatttgaacc	1920
cc	1922

<210> 10

<211> 1001

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

10 <400> 10

aaaagtaaaa ataagttttt aaagtattcg tatttatatt ttaagaaata ttagtcaa	60
ataatgaatt tttttttatc caaattcaaa aaaacaaatg atatagtttt tcgta	120
attttaatga gtttttaaaa gaaatctttc aaaagtatta ttgttaagga tactc	180
ttgtttaagt gattataagt ttttattaaa aaataaataa aacgtgaaaa ttttc	240
ttaaatgaaa aaccttttta atggtttact aaatattata tattatgagc ttttt	300
ttaataaggt tatttagata caaaatttta ttttaaaaga ttacaagctt tgaaa	360
aataaatatg atattattca aaatgattca aaatatttat gattaaaaaa attat	420
aacatattta tgatttttta ttgtttatga tctaaaaata tcataatcta aat	480
tccttaatta cataatttat gattcaaaat taaatgtttt tataatgatc taaa	540
tattaacaaa aaatttattt aagtgaatat attattatcc aaaattatat gat	600
tattataatc taaaatacta caattgattg tttaatgctc caaaattata tcat	660
atagtaaata gtatgatatg aaaacataat gattccta atcttatgat tcaaa	720
tataaatttt aaacatcaaa acctcaaaca aatatttagt ttaaaaaaac aaa	780
ctaaataata aaacaaaaac aaaaaacaca aataacttca aagatatact aa	840
atgaagtgg atgagtttct taccogtg atgacatgga atgtaagtca tgcgtc	900
aggaggaaca atcagtggcg gagctagaag ttttcatttg gggcgccgaa aa	960
gtataaaaat tgaagaacag aggggccaaa gtcaaacttt a	1001

<210> 11

5 <211> 1001

<212> ADN

<213> Lactuca sativa

<400> 11

10

```

aaaacccaaaa ttcacaaaaat catttatcac attcgaatac aaaaactacc aacactaaat      60
atztatatattt aatttcaaaag tatcgaaaat caaatgacat gttaaaagta tcaaaagtcg      120
gtggcttggt aaaagtgtca atgtcttagg taggtgggtt gcttttttgg caaactttcc      180
gtattttggt atacatctta tcctttcttg tcttttggcc tcagtttctt tacaataaac      240
tgcagatatg aaaacaaaag aataaacaaa ttacaaatgt caaacgctat aatattaata      300
ataaggtaaa ttttttgaag tttgatgctt aaagaggaga aacgttgga gtaaaacttg      360
taatacagag aaatgaaagt tggtataaaa atgaaagtat gatgctataa tagaactata      420
tttacaccaa gttcaaagta cgacactgta attagaaaaa ggtaaaaatg tacacaaaat      480
aaacaaatgg aagtgcacat atcaaatcaa cttgagttct accttatgta cacatatcaa      540
atgacagttt atggtgcaa tctacagcta attagcaccg gatgcacaag tgactaagaa      600
aattttggta ttaatggttt taatcctatg tatgttgtaa gaaagattta tatgaaaaca      660
tattgcattt tttaaaaggt agaaatatgt aacaccggga ttttcaacta ccgattaaat      720
gacaaataat cgttccaaca tctcccatga tcaattctaa acttacgtat agactacact      780
acaacggaag caaaattaaa taaaataaaa tcttcaattg aagaacttta ggtgttacat      840
ctttacggaa ctcttttata gtcttggtat acaatccctc tccttgccct cttactgcca      900
cttgctaaat agtttcctgg gttgcgcaca tataaagttt ctatatgggt aagcctaagg      960
cctagtgagt tcgtgttgca catacatgtc catcagttaa c                                1001

```

<210> 12

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

10 <400> 12

cgtcgagatt ctgcgagaaa g 21

<210> 13

<211> 21

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 13

gcaaacgtcg tcgatgtaag c 21

5 <210> 14

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 14

5 ctcctccgtg ttgtgatcg tgaatacgtc 30

<210> 15

<211> 22

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

15 <400> 15

gcaagttcaa taaagccatc ga 22

<210> 16

<211> 22

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

25

<400> 16

cgcaataggc acaatgaaca tt 22

<210> 17

30 <211 > 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 17

cccagatgac gatcctcgta gctttaagc 29

<210> 18

5 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 18

aaggctcca gaaacatcaa gaa 23

15 <210> 19

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 19

agactcgccg gaaaaacatc t 21

<210> 20

5 <211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 20

catgcccatg aacacatacc cttgca 27

15 <210> 21

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 21

gcaagatcaa gaagctcgct gta23

25

<210> 22

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 22

actcgccgga aaaacatott t 21

35

<210> 23

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 23

cgagccgatg aacacatacc ctttgc 26

10

<210> 24

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 24

20 gacgtacat ggctaaaag caa 23

<210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 25
 10 cgatggattt cctcgcaact 20

 <210> 26
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 20 <400> 26
 ccagtccac gtgcaccag g 21

 <210> 27
 <211> 19
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 30
 <400> 27
 gctgcaacag acccggtta 19

 <210> 28
 35 <211> 19
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

5

<400> 28

ctggcgggtc cttctgatt 19

<210> 29

10

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 29

ccgaagagga acaacacaaa ggactccc 29

20

<210> 30

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

5

<400> 30

ttgtcttgaa ttttagcttt gacgtt 26

<210> 31

10

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 31

ccttgaccgg aaaaacaatc a 21

20

<210> 32

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 32

tcaatggtgt cggagcttc cacttc 27

30

REIVINDICACIONES

1. Una composición para aplicación tópica a una planta o parte de la misma, que comprende una cantidad de un compuesto inhibidor de la Polifenol Oxidasa 11 (PPO11) eficaz para suprimir la expresión de un gen de la PPO11, que codifica el polipéptido codificado por la SEQ ID NÚM.: 9, en la que la expresión del gen de la PPO11 en ausencia del compuesto inhibidor se correlaciona positivamente con el pardeamiento de la planta o parte de la misma, en la que el compuesto inhibidor de la PPO11 comprende un polinucleótido antisentido o ARNds que suprime dicha expresión de un gen de la PPO11 y comprende al menos 130 nucleótidos contiguos de un polinucleótido seleccionado de las SEQ ID NÚM.: 1-4 y 9, o un complemento de los mismos.
2. La composición de la reivindicación 1, que
 - (i) además comprende un agente de transferencia o un tampón; o
 - (ii) además comprende una preparación de organosilicona como agente de transferencia.
3. La composición de la reivindicación 1, en la que
 - (i) el compuesto inhibidor de la PPO11 comprende una molécula de polinucleótido que tiene al menos 300, 301 a 500, o al menos 500 o más nucleótidos de longitud; o
 - (ii) la planta es lechuga y el gen de la PPO11 está codificado por una secuencia que comprende la SEQ ID NÚM.: 9; o
 - (iii) la cantidad del compuesto inhibidor de la PPO11 es eficaz para aumentar la vida útil de un producto vegetal procesado.
4. Un procedimiento para reducir el pardeamiento o aumentar la vida útil de una planta, o parte de la misma, que comprende aplicar tópicamente a una superficie de la planta o una parte de la misma, una cantidad de la composición de la reivindicación 1 eficaz para suprimir la expresión de un gen de la PPO11, que codifica el polipéptido codificado por la SEQ ID NÚM.: 9, y en el que la planta es una planta de lechuga.
5. Un casete de expresión que comprende un ADN seleccionado unido operativamente a un promotor heterólogo, en el que el ADN seleccionado codifica un ARN antisentido, un ARNi, o un ARNsi eficaz para suprimir la expresión de un gen de la PPO11, que codifica el polipéptido codificado por la SEQ ID NÚM.: 9, en el que la expresión del gen de la PPO11 se correlaciona positivamente con el pardeamiento de la planta, o parte de la misma, o vida útil reducida de la planta o parte o producto de la misma, en el que el ADN seleccionado comprende al menos 130 nucleótidos contiguos de un polinucleótido seleccionado de las SEQ ID NÚM.: 1-4 y 9, o un complemento de los mismos.
6. El casete de expresión de la reivindicación 5, en el que
 - (i) el promotor es un promotor específico de hoja; o
 - (ii) el ADN seleccionado está operativamente unido al promotor en orientación antisentido,
 y en el que la transcripción del ADN seleccionado suprime la expresión del gen de la PPO11 que se correlaciona positivamente con el pardeamiento de la planta, o parte de la misma o vida útil reducida de la planta, o porción o producto de la misma.
7. El casete de expresión de la reivindicación 5, en el que la expresión del ADN seleccionado induce el silenciamiento génico, escisión de ARNm, o traducción reprimida de ARNm del gen de la PPO11, y en el que la transcripción del ADN seleccionado suprime la expresión del gen de la PPO11 que se correlaciona positivamente con el pardeamiento de la planta, o parte de la misma o vida útil reducida de la planta, o porción o producto de la misma.
8. Un vector o una planta transgénica o una parte de la misma, que comprende el casete de expresión de la reivindicación 5, en el que la planta transgénica es una planta de lechuga.
9. La planta transgénica de la reivindicación 8, en la que la planta transgénica también se define como una planta transgénica R0.
10. La planta transgénica de la reivindicación 8, en la que la planta transgénica también se define como una planta de progenie de cualquier generación de una planta transgénica R0, en la que la planta de progenie comprende el casete de expresión de la reivindicación 5 y en la que la planta transgénica ha heredado el ADN seleccionado de la planta transgénica R0.
11. Una semilla o una célula transgénica de la planta transgénica de la reivindicación 8, en la que la semilla o la

célula transgénica comprende el casete de expresión de la reivindicación 5.

12. Una semilla de la planta transgénica de la reivindicación 8 o de una progenie de la misma, semilla que comprende el casete de expresión de la reivindicación 5, en la que la semilla produce una planta que exhibe una vida útil mejorada y pérdidas poscosecha reducidas.
- 5 13. Un procedimiento de regulación por disminución de la actividad de un gen de la PPO11, que codifica el polipéptido codificado por la SEQ ID NÚM.: 9, en una planta de lechuga, comprendiendo el procedimiento
 - a) transformar en la planta de lechuga el casete de expresión de la reivindicación 5; y
 - b) seleccionar una planta de lechuga con actividad de la PPO disminuida en comparación con una planta de lechuga en la que no se ha introducido el casete de expresión.
- 10 14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el gen de la PPO11 codifica ARNm que comprende la SEQ ID NÚM.: 9.
- 15 15. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el ADN seleccionado se une operativamente al promotor en la orientación antisentido.
16. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el ADN seleccionado está en orientación sentido y antisentido.
17. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el polinucleótido es una construcción antisentido o ARNi.
18. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el ADN seleccionado codifica una ribozima o proteína de dedos de cinc que inhibe la expresión de la PPO11.
19. Un procedimiento para fabricar alimentos para seres humanos que comprende
 - a) cultivar la planta de lechuga de la reivindicación 8 en condiciones de crecimiento de plantas para producir el tejido vegetal a partir de la planta de lechuga; y
 - b) preparar alimentos para consumo humano o animal a partir del tejido vegetal.

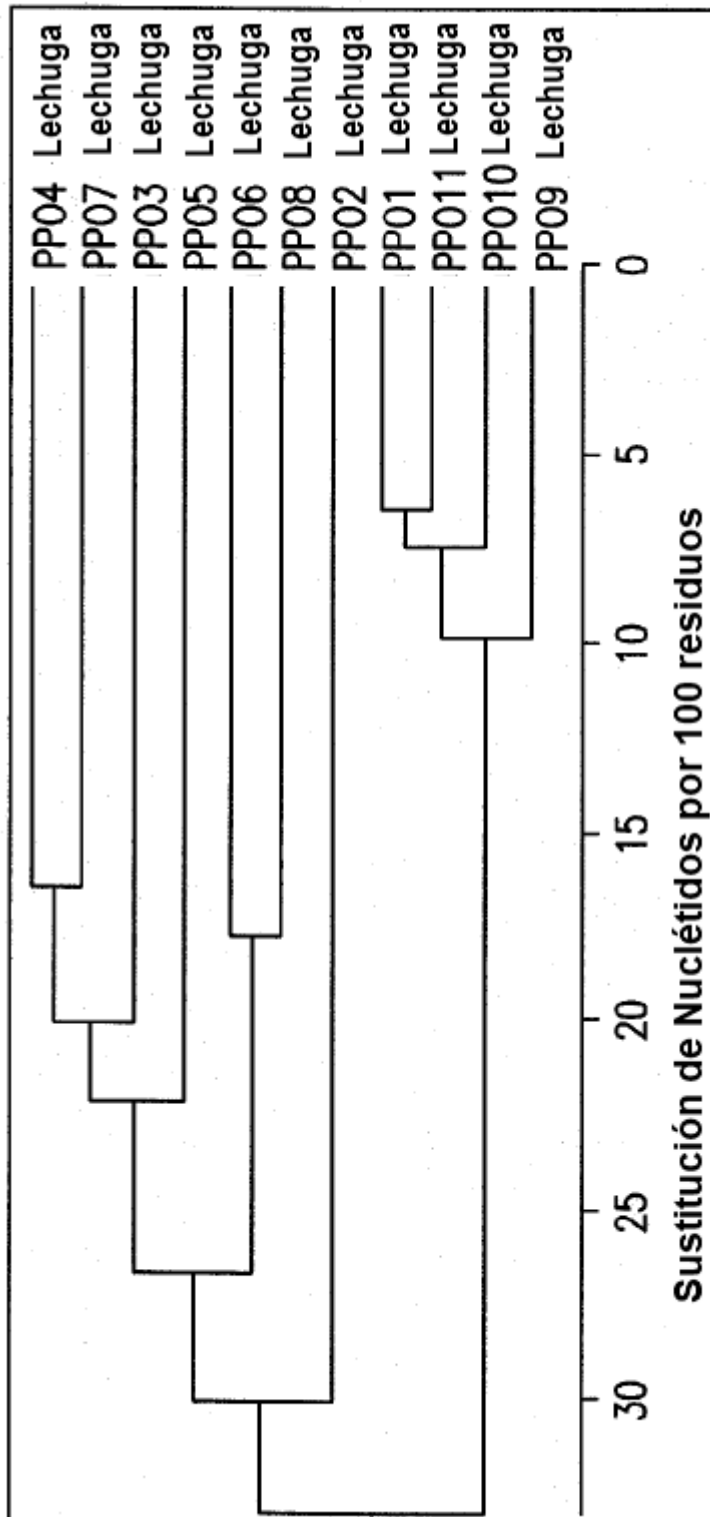


FIG.1

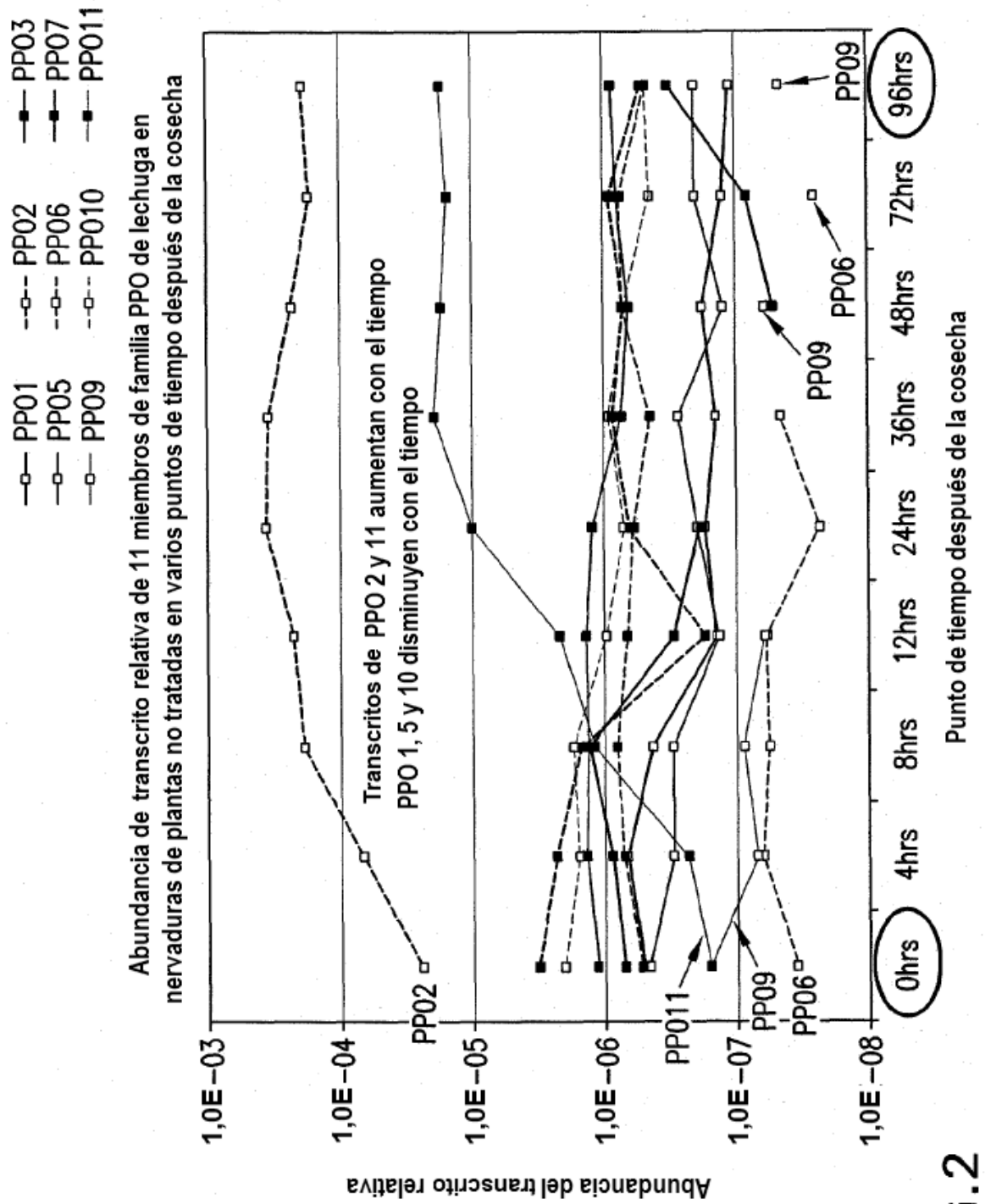


FIG.2

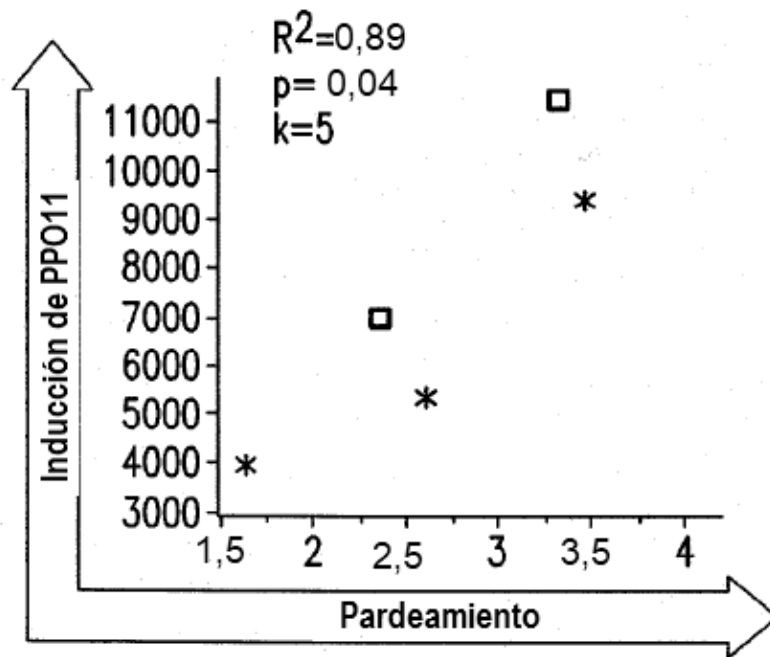


FIG.3A

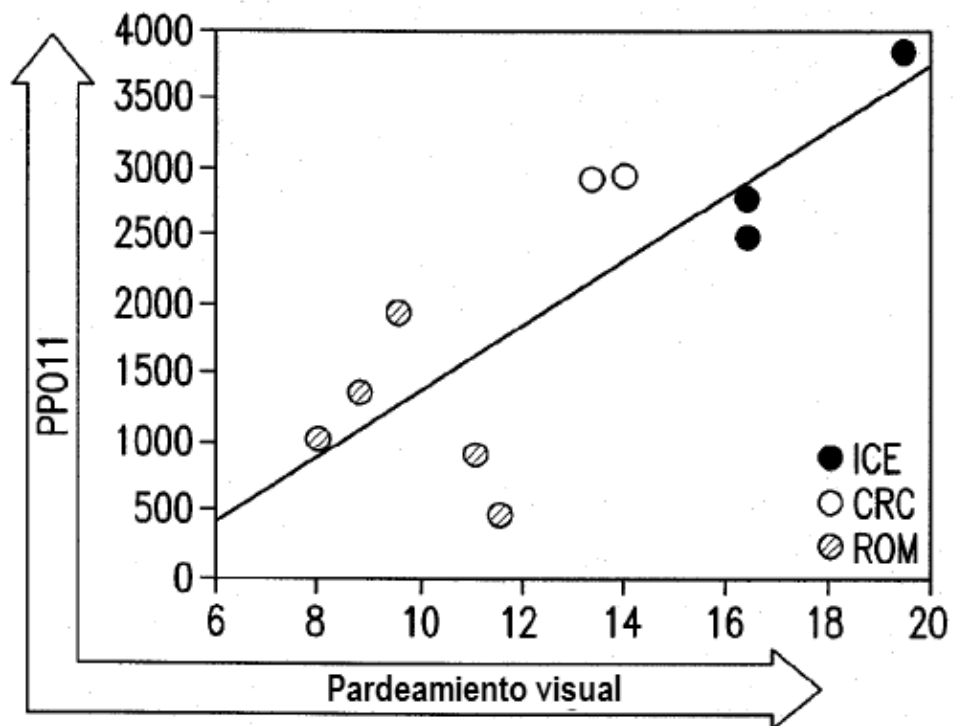


FIG.3B

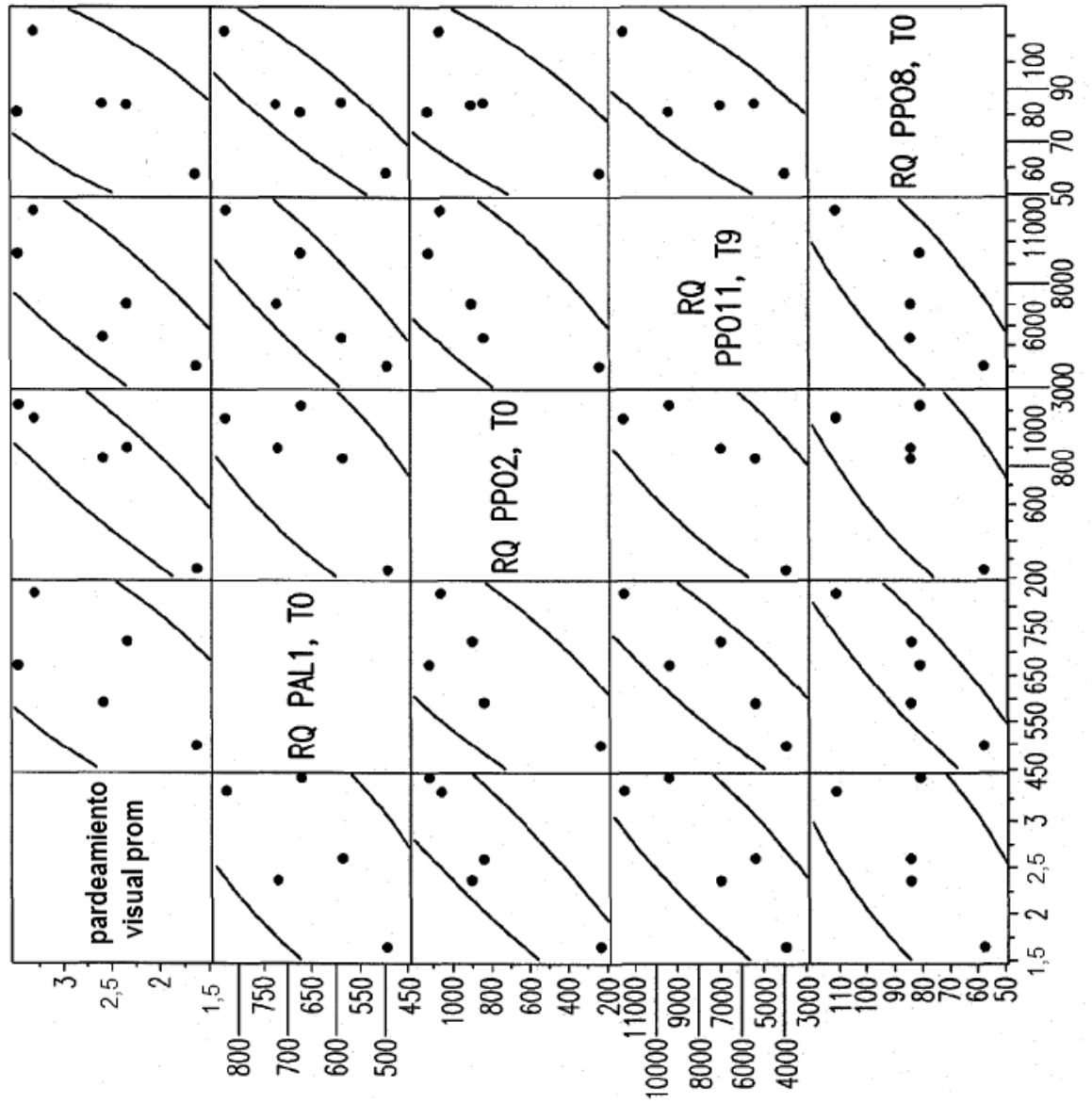


FIG.4

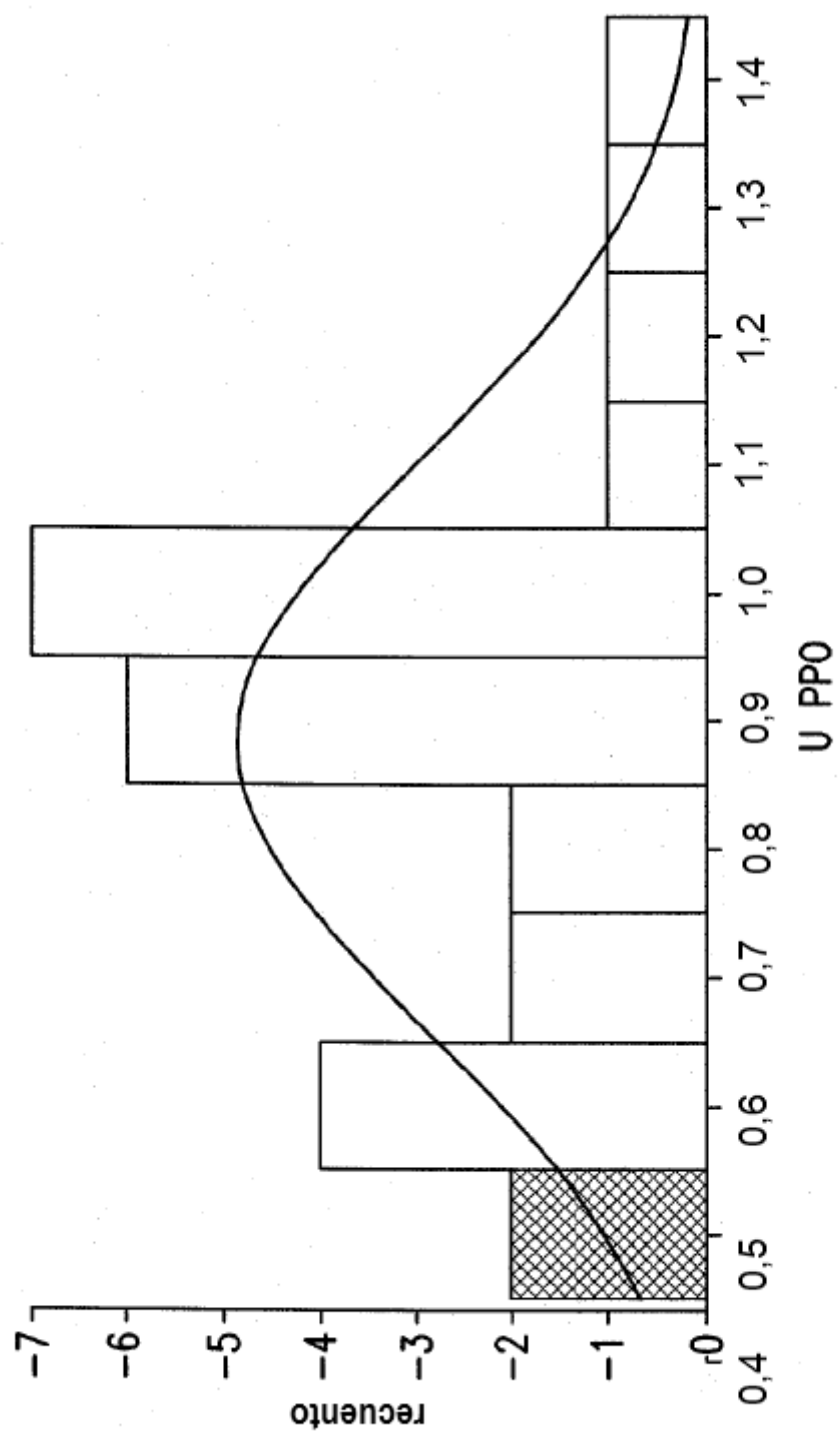


FIG.5

Predicción de la actividad enzimática PPO del cambio de coloración visual

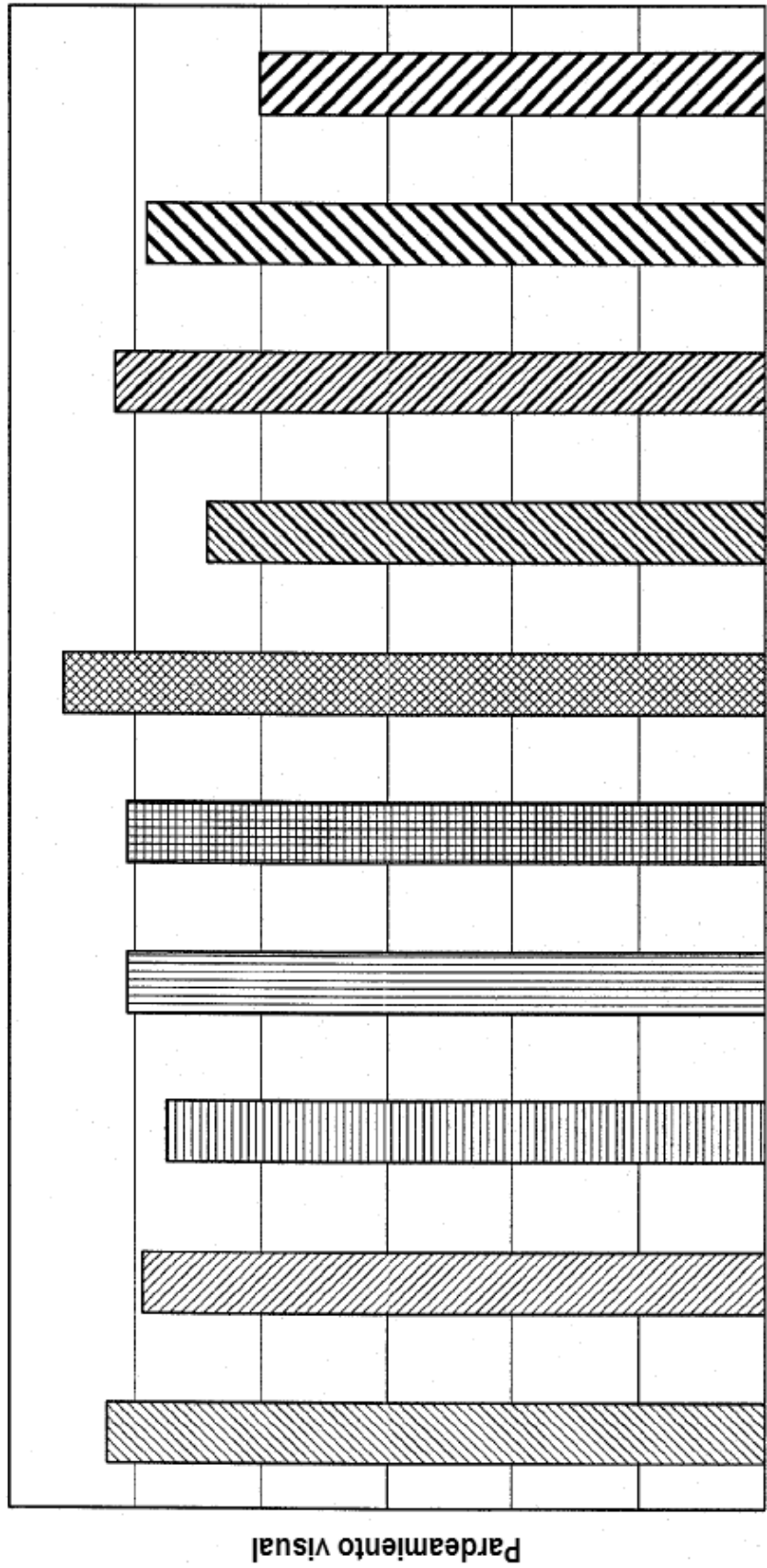


FIG.6