



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 224 773**

⑫ Número de solicitud: 200102896

⑮ Int. Cl.7: **C12N 15/82**

C12N 15/53

C12N 9/04

C12P 17/04

A01H 5/00

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **27.12.2001**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2005**

Fecha de la concesión: **14.11.2005**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.12.2005**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.12.2005

⑰ Titular/es: **Universidad de Málaga**
Plaza de El Ejido, s/n
29071 Málaga, ES

⑰ Inventor/es: **Agius Guadalupe, María Fernanda;**
Botella Mesa, Miguel Ángel y
Valpuesta Fernández, Victoriano

⑰ Agente: **No consta**

⑰ Título: **Construcción de ADN y método para incrementar la producción de vitamina C en una planta.**

⑰ Resumen:

Construcción de ADN y método para incrementar la producción de vitamina C en una planta.

La construcción de ADN comprende una secuencia de ADN que codifica una proteína con actividad D-galacturonato reductasa implicada en la síntesis de vitamina C en células vegetales. Dicha construcción de ADN puede ser utilizada para obtener plantas con un contenido aumentado en vitamina C. De aplicación en Agricultura y Alimentación.

ES 2 224 773 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Construcción de ADN y método para incrementar la producción de vitamina C en una planta.

5 **Campo de la invención**

La invención se relaciona con una construcción de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica una proteína implicada en la síntesis de vitamina C en células vegetales y al empleo de dicha construcción de ADN para aumentar el contenido en vitamina C en plantas.

10 **Antecedentes de la invención**

Uno de los objetivos de la ingeniería genética es el de obtener plantas con características mejoradas sobre las que existen en la naturaleza, bien como especies silvestres o bien como consecuencia de la mejora agrícola introducida por los seres humanos. Respecto a las plantas que producen frutos se consideran de interés primordial aquellas propiedades que aumentan la calidad nutritiva de los mismos. Entre los componentes que mejoran las cualidades nutritivas de los frutos están las vitaminas, en tanto que son compuestos que desempeñan funciones esenciales en el metabolismo de los humanos y que se necesitan tomar en la dieta, al no tener éstos la capacidad de sintetizarlos.

Para manipular y controlar de forma estable una determinada característica de una planta se requiere identificar y aislar el gen, o genes, que codifican la proteína cuya actividad modifica dicha característica particular. La introducción de la secuencia codificante de dicho gen, bajo el control del promotor adecuado, modificará las actividades enzimáticas de la planta transgénica, lo que se reflejará en el cambio de composición correspondiente en el tejido vegetal transformado.

La vitamina C (ácido L-ascórbico) es esencial para el ser humano, quien es incapaz de sintetizarla o almacenarla en cantidades significativas en el cuerpo, por lo que es necesario que la dieta proporcione un suministro regular y adecuado de dicha vitamina. La vitamina C procedente de las plantas es la principal fuente de vitamina C en la dieta humana.

Estudios sobre la biosíntesis de vitamina C en plantas han mostrado desde hace tiempo que la ruta biosintética en plantas es diferente de la de los animales. Recientemente se ha descrito una ruta de biosíntesis de vitamina C específica de plantas (Wheeler *et al.*, Nature 393:365-369, 1998). Esta ruta, definida como de "no inversión", se ha denominado de Wheeler-Smirnoff y está basada en evidencias bioquímicas y genéticas. Aunque esta ruta es mayoritaria en plantas, también pueden existir en las plantas otras vías metabólicas que produzcan ácido ascórbico (Smirnoff *et al.*, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 52:437-467, 2001). En efecto, estudios con radiomarcaje han demostrado que tanto el ácido D-galacturónico como el éster metílico del ácido D-galacturónico son directamente convertidos a ácido L-ascórbico *in vivo* por una ruta que implica inversión de la configuración (Davey *et al.*, J. Sci. Food Agric. 80:825-860, 2000). Precisamente esta conversión fue detectada hace años en frutos de fresa (Finkle *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 38:332-339, 1960). El éster metílico del ácido galacturónico podría ser reducido por una aldo-ceto reductasa no específica que generaría L-galactono-1,4-lactona, que sería el sustrato de la enzima L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (EC 1.3.2.3) como último paso en la síntesis del ácido L-ascórbico. Recientemente se ha demostrado que esta ruta de producción de ácido L-ascórbico a partir del éster metílico del ácido D-galacturónico también tiene lugar en las células de plantas de *Arabidopsis* (Davey *et al.*, Plant Physiol. 121:535-543, 1999).

Aunque se han identificado y aislado genes responsables de la síntesis de las proteínas que catalizan algunos de los pasos de las diferentes rutas metabólicas que conducen a la biosíntesis de ácido L-ascórbico en plantas, siguen existiendo genes que codifican proteínas implicadas en la síntesis de vitamina C que todavía no han sido identificados o caracterizados, entre los que se encuentra el gen que codifica una proteína con actividad aldo-ceto reductasa que cataliza la reducción del ácido D-galacturónico a ácido L-galactónico, lo que podría explicar la síntesis de ácido ascórbico en determinados tejidos vegetales a partir del éster metílico del ácido D-galacturónico (Davey *et al.*, J. Sci. Food Agric. 80:825-860, 2000). La identificación y caracterización de dicho gen permitiría obtener plantas con un contenido aumentado en vitamina C.

Existe, por tanto, la necesidad de proporcionar plantas con un contenido aumentado en vitamina C y, consecuentemente, existe la necesidad de modificar plantas para aumentar la producción de vitamina C *in vivo*, incrementado de este modo su valor nutricional.

60 **Compendio de la invención**

La invención se enfrenta, en general, con el problema de aumentar el contenido de vitamina C en plantas o productos derivados de las mismas, por ejemplo, frutos, y, en particular, en plantas y frutos consumibles por seres vivos incapaces de sintetizar vitamina C, aumentándose de esta manera el valor nutritivo de dichas plantas y frutos.

La solución proporcionada por esta invención se basa en la identificación, aislamiento y caracterización de una molécula de ADN que codifica una proteína que interviene en la síntesis de vitamina C en plantas, concretamente, una proteína cuya actividad incrementa la síntesis de vitamina C en las células vegetales en las que es activa. La efectividad de la actividad codificada por dicha molécula de ADN se ha puesto de manifiesto en plantas transgénicas de *Arabidop-*

sis que, al producir la proteína codificada por dicha molécula de ADN, han aumentado notable y significativamente el contenido de vitamina C en dichas plantas transgénicas frente a las plantas tipo salvaje no transformadas. Por otra parte, el estudio de una serie de especies del género *Fragaria* ha mostrado una fuerte correlación positiva entre la presencia de la proteína codificada por el gen *FaGalUR*, concretamente, una proteína con actividad D-galacturonato reductasa, y el contenido en ácido L-ascórbico.

Por consiguiente, un objeto de esta invención lo constituye una construcción de ADN que comprende una molécula de ADN que codifica una proteína implicada en la síntesis de vitamina C en plantas y una secuencia de ADN promotora que regule la expresión de dicha molécula de ADN codificante.

Un objeto adicional de esta invención lo constituye el empleo de dicha molécula de ADN codificante o dicha construcción de ADN para aumentar la producción de vitamina C en una planta o en un producto derivado de la misma.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye un vector que contiene dicha molécula de ADN codificante o dicha construcción de ADN. Las células transformadas con dicho vector constituyen un objeto adicional de esta invención.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye el empleo de dicha molécula de ADN codificante o dicha construcción de ADN en la producción de plantas transgénicas que expresan específicamente la proteína codificada. Las plantas transgénicas resultantes, que presentan un contenido aumentado en vitamina C, constituyen otro objeto adicional de esta invención.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye una proteína con actividad aldoseo reductasa que reduce al ácido D-galacturónico, o proteína con actividad D-galacturonato reductasa, obtenida por expresión y traducción de dicha molécula de ADN.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una representación esquemática del vector binario con el que se transformaron plantas de *Arabidopsis thaliana*.

La Figura 2 muestra la correlación entre la expresión del gen *FaGalUR*, proteína FaGalUR y contenido de ácido L-ascórbico (AA) de los distintos estadios de maduración de frutos de fresa (F1-F7) y de las hojas (L, del inglés "leaves"). Las Figuras 2A y 2B muestran los resultados de los análisis por Northern-blot y Western-blot, respectivamente, de los distintos estadios de maduración de frutos de fresa. La Figura 2C es un diagrama de barras que muestra el contenido de AA total, expresado en μg de AA/g peso fresco, de los distintos estadios de maduración de frutos de fresa.

La Figura 3A es un diagrama de barras que muestra el contenido de ácido L-ascórbico (AA), expresado en μg de AA/g peso fresco, en las siguientes especies del género *Fragaria*: *Fragaria x ananassa* (cv. *Chandler*) (CH), *Fragaria chiloensis* (Chi), *Fragaria virginiana* (Vir) y *Fragaria moschata* (Mo). La Figura 3B muestra la detección de la proteína codificada por el gen *FaGalUR* mediante un análisis por Western-blot.

La Figura 4A muestra los resultados de un análisis por Western-blot de todas las líneas de plantas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas obtenidas. Los números 1 a 17 indican líneas transgénicas independientes de plantas de *A. thaliana* y WT es la planta de *A. thaliana* silvestre (tipo salvaje). La banda inmunoreactiva frente al anticuerpo anti-FaGalUR tiene un tamaño de 39 kDa. La Figura 4B muestra el contenido de ácido L-ascórbico (AA) en las plantas transgénicas que expresan el producto del gen *FaGalUR*, identificadas como 10 y 17, y en plantas tipo salvaje (WT). La determinación cuantitativa del contenido de AA de las plantas transgénicas y WT se realizó mediante medida espectrofotométrica de plantas crecidas en condiciones normales. La concentración de AA se expresa en mol de AA/g peso fresco y sus desvíos estándar correspondientes.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a una construcción de ADN, en adelante construcción de ADN de la invención, que comprende una molécula de ADN que codifica una proteína con actividad D-galacturonato reductasa (FaGalUR EC 1.1.1.19) que interviene en la síntesis de ácido L-ascórbico en células vegetales y una región iniciadora de la transcripción funcional en plantas.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término "planta" incluye tanto a la planta *per se* como a sus partes, por ejemplo, hojas, tallos, raíces y material de propagación, tal como semillas, flores, frutos y tubérculos.

La molécula de ADN que codifica una proteína con actividad D-galacturonato reductasa que interviene en la síntesis de ácido L-ascórbico en células vegetales, en adelante molécula de ADN de la invención, es una molécula de ADN seleccionada entre:

- a) una molécula de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1; y

b) una molécula de ADN análoga a la secuencia definida en a) que

i) es sustancialmente homóloga a la secuencia de ADN definida en a); y

ii) codifica para un polipéptido que es sustancialmente homólogo a la proteína codificada por la secuencia de ADN definida en a).

La molécula de ADN de la invención codifica una proteína con actividad D-galacturonato reductasa que interviene en la síntesis de ácido L-ascórbico en células vegetales. Dicha proteína con actividad D-galacturonato reductasa interviene en la síntesis de vitamina C catalizando la reducción del ácido D-galacturónico a ácido L-galactónico, lo que permite explicar la síntesis de vitamina C en determinados tejidos vegetales a partir del ácido galacturónico o del éster metílico del ácido D-galacturónico (Davey *et al.*, J. Sci. Food Agric. 80: 825-860, 2000). Por tanto, el empleo de dicha molécula de ADN o de una construcción de ADN de la invención permite obtener plantas con un contenido aumentado en vitamina C.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análogo/a” pretende incluir a cualquier molécula de ADN que presente la misma funcionalidad que la molécula de ADN definida en a), es decir, que codifica una proteína con actividad D-galacturonato reductasa que interviene en la síntesis de ácido L-ascórbico en células vegetales. Dicha molécula de ADN análoga puede contener sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, o bien puede contener uno o más nucleótidos adicionales en cualquiera de sus extremos, o bien puede presentar una o más deleciones.

En general, la molécula de ADN análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos identificada como SEC. ID. N°: 1. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga”, aplicada a secuencias de nucleótidos, significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen una homología o grado de identidad de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos un 80%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.

La molécula de ADN de la invención puede proceder de cualquier organismo que la contenga de forma natural, por ejemplo, de fresa (*Fragaria x ananassa*) o bien de un organismo hospedador transformado con dicha molécula de ADN. Alternativamente, la molécula de ADN de la invención, puede ser aislada, mediante técnicas convencionales, a partir del ADN de cualquier organismo mediante el empleo de sondas u oligonucleótidos preparados a partir de la información sobre la secuencia de la molécula de ADN de la invención proporcionada en esta descripción.

En una realización particular, la molécula de ADN de la invención comprende, o está constituida por, la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1. La secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1 es una secuencia conocida, depositada por el grupo de investigación al que pertenecen los inventores en GeneBank con el número de acceso AF039182, indicándose que dicha secuencia de ADN codificaba una proteína con actividad chalcona reductasa, no contemplándose, sin embargo, la posibilidad de que dicha proteína estuviera implicada en la síntesis *in vivo* de vitamina C en células vegetales. Ahora se ha podido determinar que dicha secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1 corresponde a un ADN copia (ADNc) del gen *FaGalUR* de fresa (*Fragaria x ananassa*) y codifica para una D-galacturonato reductasa (FaGalUR) implicada en la síntesis de vitamina C en células vegetales catalizando la reducción del ácido D-galacturónico a ácido L-galactónico.

La molécula de ADN de la invención puede obtenerse utilizando métodos convencionales, por ejemplo, mediante técnicas de aislamiento e identificación de ácidos nucleicos a partir de cualquier organismo que la contenga o de un organismo hospedador transformado con dicha molécula de ADN. Alternativamente, la molécula de ADN de la invención puede ser aislada, mediante técnicas convencionales, a partir del ADN de cualquier otro organismo mediante el empleo de sondas u oligonucleótidos preparados a partir de la información sobre la secuencia de ADN proporcionada por esta invención. En el Ejemplo 1 se describe la obtención de un ADNc que contiene la secuencia completa de nucleótidos que codifica la proteína FaGalUR de fresa y su amplificación mediante PCR.

La construcción de ADN de la invención comprende, además de la molécula de ADN de la invención, una región iniciadora de la transcripción funcional en plantas, es decir, una secuencia de ADN promotora que regula la expresión de dicha molécula de ADN codificante de la invención. En dicha construcción de ADN de la invención, cualquiera de los extremos (3' o 5') de dicha molécula de ADN de la invención puede estar unido al extremo 3' de dicha región iniciadora de la transcripción. La construcción de ADN de la invención también puede contener, operativamente enlazada, una secuencia de terminación de la transcripción. En una realización particular, dicha región iniciadora de la transcripción funcional en plantas es el promotor 35SCaMV.

La molécula de ADN de la invención, o la construcción de ADN de la invención, puede ser insertada en un vector apropiado. Por tanto, la invención también se refiere a un vector, tal como un vector de expresión, que comprende dicha molécula o construcción de ADN de la invención. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir posteriormente. A modo de ejemplo, el vector donde se introduce dicha secuencia de ADN puede ser un plásmido o un vector que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de dicha célula y se replica junto con el cromosoma (o cromosomas) en el que (o en los que) se ha integrado.

En el vector proporcionado por esta invención, la molécula de ADN de la invención estará conectada operativamente a un promotor y a una secuencia terminadora. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestra

una actividad transcripcional en la célula hospedadora elegida y puede derivar bien de genes que codifican para proteínas homólogas o heterólogas de la célula hospedadora. Los procedimientos utilizados para ligar la secuencia de ADN de la invención al promotor y a la secuencia terminadora, respectivamente, y para insertar dicha construcción en un vector son bien conocidos por los técnicos en la materia y han sido descritos, por ejemplo, por Sambrook *et al.*, (1989).

5 Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY.

La invención también proporciona una célula, por ejemplo, una célula vegetal, que comprende una secuencia de ADN de la invención, o una construcción de ADN de la invención, o dicho vector mencionado más arriba. Las células hospedadoras que se pueden transformar con la molécula de ADN de la invención o con la construcción de ADN de la invención pueden ser células procarióticas o, preferentemente, eucarióticas, tales como células vegetales. La transformación de células vegetales también puede realizarse por métodos convencionales. Para una revisión de la transferencia génica a plantas, incluyendo vectores, métodos de transferencia de ADN, etc., véase, por ejemplo, el libro titulado "Ingeniería genética y transferencia génica", de Marta Izquierdo, Ed. Pirámide (1999), en particular, el capítulo 9, titulado "Transferencia génica a plantas", páginas 283-316.

15 La invención también proporciona una proteína con actividad D-galacturonato reductasa, implicada en la síntesis *in vivo* de ácido L-ascórbico en células vegetales, en adelante proteína de la invención, que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

- 20 a) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. M. ID. N°: 2, y
- b) una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga y funcionalmente equivalente a las secuencias de aminoácidos definidas en a).

25 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "sustancialmente homóloga" significa que las secuencias de aminoácidos en cuestión tienen un grado de identidad, a nivel de aminoácidos, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos, un 80%, y, más preferentemente de, al menos, un 95%.

30 Asimismo, en el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "funcionalmente equivalente" significa que la proteína en cuestión es una D-galacturonato reductasa implicada en la producción de ácido L-ascórbico en células vegetales catalizando la reducción del ácido D-galacturónico a ácido L-galactónico. La actividad D-galacturonato reductasa puede determinarse mediante un procedimiento como el descrito en el Ejemplo 1.5.

35 En una realización particular, la proteína de la invención tiene una secuencia de aminoácidos que comprende, o está constituida por, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID. N°: 2. Dicha SEC. ID. N°: 2 corresponde a la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N°: 1 e incluye al producto de expresión del gen FaGal1UR de fresa, concretamente, la D-galacturonato reductasa *FaGalUR*. Esta proteína tiene un peso molecular teórico de 35,7 kDa y un punto isoelectrico (pI) de 5,3. El ácido D-galacturónico es un sustrato de dicha enzima inmunopurificada.

40 La proteína de la invención puede obtenerse mediante un método que comprende cultivar una célula hospedadora adecuada que contiene la molécula de ADN de la invención, o una construcción de ADN de la invención, bajo condiciones que permiten la producción de la proteína y recuperarla del medio de cultivo. Alternativamente, la proteína de la invención puede obtenerse a partir de un organismo productor de la misma mediante un procedimiento que comprende el cultivo del organismo productor, por ejemplo, frutos de fresa, bajo condiciones apropiadas para la expresión de dicha proteína, y, posteriormente, recuperar dicha proteína.

50 La invención también se refiere al empleo de dicha molécula de ADN de la invención o de dicha construcción de ADN de la invención en la producción de plantas transgénicas que expresan específicamente la proteína codificada por dicha molécula de ADN de la invención y presentan un contenido aumentado en vitamina C.

55 La molécula de ADN de la invención o la construcción de ADN de la invención puede ser utilizada en procesos de mejora de plantas consumibles por seres vivos incapaces de sintetizar vitamina C, por ejemplo, plantas consumibles por los seres humanos o por los animales, o plantas productoras de frutos consumibles por los seres humanos o por los animales. Estas plantas transgénicas pueden obtenerse por las técnicas convencionales a las que se ha hecho referencia previamente y presentan un mayor valor nutricional como consecuencia de su contenido aumentado en vitamina C.

60 Por tanto, la invención proporciona una célula transgénica, tal como una célula vegetal transgénica, que comprende una construcción de ADN de la invención.

Una planta transgénica que comprende, al menos, una de dichas células vegetales transgénicas, constituye un objeto adicional de esta invención. En una realización particular, dicha planta transgénica es una planta consumible por seres vivos incapaces de sintetizar vitamina C, por ejemplo, una planta consumible por los seres humanos o por los animales, o una planta productora de frutos consumibles por los seres humanos o por los animales, por ejemplo, fresa, tomate, maíz, trigo, arroz, patata, lechuga, etc.

La invención también se refiere a un método para aumentar la producción de vitamina C en una planta productora

in vivo de vitamina C que comprende introducir en dicha planta una construcción de ADN de la invención que tiene un promotor, funcional en dicha planta, operativamente enlazado a la molécula de ADN de la invención. A modo ilustrativo dicha planta es cualquier planta productora *in vivo* de vitamina C, preferentemente, cualquier planta productora *in vivo* de vitamina C consumible por seres vivos incapaces de sintetizar vitamina C, por ejemplo, una planta consumible por los seres humanos o por los animales, o una planta productora de frutos consumibles por los seres humanos o por los animales, por ejemplo, fresa, tomate, maíz, trigo, arroz, patata, lechuga, etc. En un ejemplo particular, la invención proporciona un método para aumentar la producción de ácido L-ascórbico en frutos de fresa que comprende introducir en una planta de fresa una construcción de ADN de la invención.

El empleo de la construcción de ADN de la invención que comprende una molécula de ADN que codifica una proteína implicada en la síntesis de vitamina C en células vegetales permite aumentar el flujo a través de la vía metabólica que conduce a la síntesis de vitamina C a partir del ácido D-galacturónico o del éster metílico del ácido D-galacturónico en aquellos tejidos vegetales donde el precursor esté presente. El hecho de no observar diferencias fenotípicas entre las plantas de *A. thaliana* transformadas y sin transformar (véase el Ejemplo 1.1) permite deducir que no se dará un efecto deletéreo en las plantas transgénicas que sobreexpresen dicha molécula de ADN de la invención. Es más, en la medida en que el contenido de vitamina C en plantas es un indicador del poder reducido almacenado en las mismas, su elevado nivel en las plantas transgénicas puede suponer una ventaja de éstas frente al estrés oxidativo al que pudieran estar sometidas durante su crecimiento y desarrollo.

Por otra parte, el estudio de la expresión del gen *FaGalUR* en los distintos estadios de maduración de frutos de fresa ha puesto de manifiesto la existencia de una fuerte correlación positiva entre la expresión del gen *FaGalUR*, la proteína FaGalUR y el contenido de ácido L-ascórbico de los distintos estadios de maduración de dichos frutos de fresa (véase la Figura 2, ilustrativa de la inducción que muestra la correlación de los niveles de ARNm, proteína FaGalUR y contenido de ácido L-ascórbico en los distintos estadios de maduración de frutos de fresa durante su proceso de maduración). Asimismo, el estudio de la expresión del gen *FaGalUR* en diversas especies del género *Fragaria* ha mostrado una fuerte correlación positiva entre la presencia de la proteína codificada por el gen *FaGalUR* y el contenido en ácido L-ascórbico (véase la Figura 3).

La utilización de una construcción de ADN de la invención, en particular, de una construcción de ADN que contiene una molécula de ADN que codifica la proteína FaGalUR de fresa puede generar plantas transgénicas que rindan frutos con mayor valor nutritivo por su contenido aumentado en vitamina C, sin pérdida de sus características organolépticas restantes, lo que redundará en un valor económico añadido a los mismos.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Obtención de plantas transgénicas que expresan el producto del gen FaGalUR

1.1 Obtención de plantas transgénicas que expresan el producto del gen FaGalUR

ADNc de frutos de fresa (*Fragaria x ananassa*) conteniendo la secuencia codificante para la proteína FaGalUR fue aislado por cribado, con una sonda específica de 750 pares de bases (pb) de la región más 5' del gen *FaGalUR*, de una genoteca de ADNc de frutos de fresa con los cebadores específicos AKR1 y AKR2

AKR1: ACTGCAGTCTAGACATGGCAAAGGTTTCCT [SEC. ID. N°: 3]; y

AKR2: AAAGCTTTTCATAATTCTTCGTC [SEC. ID. N°: 4]

que tienen en sus extremos 5' unos sitios de reconocimiento para las endonucleasas *PstI* y *HindIII* respectivamente. El producto amplificado, de aproximadamente 950 pb se clonó en el vector pBSKII digerido previamente con la enzima de restricción *EcoRV*. La construcción intermedia pBSKII-FaGalUR se digirió con las enzimas de restricción *PstI* y *HindIII* y el fragmento de ADN resultante de la digestión, que representa todo el marco abierto de lectura del gen *FaGalUR*, se clonó en el sitio de clonación múltiple del vector binario pSOV2 (Myle & Botella, 1998 Plant. Mol. Biol. Rep. 00: 1-6) que tiene como sistema de selección de plantas transgénicas el gen de resistencia al herbicida fosfotricina (ppt) (Thompson *et al.*, 1987 EMBO J. 6: 2519-2524) denominado comercialmente BASTA, bajo el control del promotor constitutivo 35SCaMV. La construcción pSOV2-FaGalUR (Figura 1) fue transferida por conjugación triparental a la cepa *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* mediante infiltración *in planta* con cultivos de *A. tumefaciens* GV3101-FaGalUR.

Las plantas transgénicas fueron analizadas mediante dos métodos: (i) ensayo de resistencia al herbicida ppt (BASTA) y (ii) por transferencia e inmunodetección de proteínas usando suero anti-FaGalUR.

La mayoría de las plantas obtenidas al transformarlas con el ADNc del gen *FaGalUR* de fresa presentan un fenotipo aparentemente normal al compararlas con las plantas control transformadas con el vector pSOV2 y con las plantas sin transformar.

1.2 Análisis por Northern-blot

Los análisis por Northern-blot, con el fin de identificar ARNm correspondiente al gen *FaGalUR*, se realizaron por métodos convencionales (Sambrook *et al.* 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Ed Cold Spring Harbor Laboratory). La Figura 2A muestra la expresión del gen *FaGalUR* en los distintos estadios de maduración de frutos de fresa.

1.3 Análisis por Northern-blot

Los análisis por Western-blot, con el fin de identificar la proteína FaGalUR, se realizaron por métodos convencionales (Harlow and Lane, 1988. Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Cold Spring Harbor Laboratory). La Figura 2B muestra la detección de la proteína FaGalUR codificada por el gen *FaGalUR* en los distintos estadios de maduración de frutos de fresa, mientras que la Figura 3B muestra la detección de la proteína FaGalUR en distintas especies del género *Fragaria*.

1.4 Determinación cuantitativa de ácido L-ascórbico

La determinación cuantitativa del ácido L-ascórbico (AA) se realizó siguiendo el protocolo descrito por Rao y Ormrod (Rao & Ormrod, 1995. Photochem. Photobiol. 61:71-78). Para ello, a 100 mg de plantas de *A. thaliana* maceradas con nitrógeno líquido se les adicionó una solución de ácido metafosfórico (2% de ácido metafosfórico, EDTA 2 mM), se homogeneizó y posteriormente se centrifugó a 17.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante resultante se neutralizó a pH 5,6 mediante la adición de una solución de citrato sódico al 10%. Tras la neutralización, a los extractos de las plantas tipo salvaje (WT) y de 2 líneas transgénicas denominadas 10 y 17 se les determinó el contenido de AA por el decremento de absorbancia a 265 nm después de haber adicionado la enzima ascorbato oxidasa (4 U) en una mezcla de reacción que contenía tampón fosfato pH 5,6 100 mM y 100 mL de extracto vegetal en un volumen final de 1 mL.

El contenido de AA total se determinó en toda la planta y se tomó como valor estándar el contenido de AA de las plantas WT que concuerda con los valores obtenidos por otros autores (Rao & Ormrod, 1995, citado *supra*).

Los resultados del contenido de AA obtenidos se muestran en la Figura 2C, donde se recoge el contenido de AA total de los distintos estadios de maduración de frutos de fresa, en la Figura 3A, donde se recoge el contenido de AA total en distintas especies del género *Fragaria*, y en la Figura 4B donde se recoge el contenido de AA en las plantas transgénicas 10 y 17 que expresan el producto del gen *FaGalUR* de fresa y en las plantas WT, determinado cuantitativamente mediante la medida espectrofotométrica de plantas crecidas en condiciones normales.

1.5 Determinación de la actividad D-galacturonato reductasa

La actividad D-galacturonato reductasa en extractos crudos de plantas de *A. thaliana* transformadas y sin transformar se midió mediante el procedimiento que se describe a continuación. Brevemente, se homogeneizó 1 g de tejido macerado con nitrógeno líquido en 2 mL de tampón de extracción [tampón fosfato de sodio pH 7,2 50 mM, EDTA-Na₂ 2 mM, DTT (ditiotreitól) 2 mM, PVPP (polivinilpolipirrolidona) 0,1 g/g tejido y glicerol 20% (v/v)] en un homogenizador Turrax. A continuación, el tejido homogeneizado se filtró a través de un papel Miracloth, se centrifugó a 6.000 g durante 30 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. La concentración de proteínas se cuantificó por el método Bradford (BIO-RAD).

El ensayo de actividad fue llevado a cabo en el mismo tampón de extracción al que se le añadió una concentración final de 30 mM de los sustratos empleados, 100 mL de extracto de proteínas de plantas de *Arabidopsis* WT o de plantas transgénicas que sobreexpresaban el gen *FaGalUR* (10 y 17) y 1 mM de NADPH+H⁺. El volumen final de cada ensayo fue de 1 mL y la reacción se siguió midiendo el decremento de la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Shimadzu 1600. Los sustratos empleados en cada reacción fueron los siguientes: L-galactosa, D-glucónico y D-galacturónico. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1, donde se recoge la actividad enzimática de la proteína FaGalUR. Se definió 1 unidad enzimática (U), como la cantidad de enzima capaz de disminuir la absorbancia en 0,001 a 340 nm durante 1 minuto. La actividad se expresó en U/mg de proteína.

TABLA 1

Actividad enzimática de la proteína FaGalUR en distintos extractos frente a distintos sustratos

Extracto	Ácido D-glucónico	Ácido D-galactourónico	L-galactosa
WT	0	0	0
10	28±4	0	0
17	72±6	0	0

Además, se realizaron estudios de actividad enzimática con la proteína FaGalUR inmunopurificada de plantas de *Arabidopsis* transgénicas que sobreexpresaban el gen FaGalUR (concretamente, las identificadas como 10 y 17). El protocolo empleado fue el mismo que el empleado con los extractos de plantas de *Arabidopsis*. Los primeros resultados obtenidos con la enzima inmunopurificada ponen de manifiesto que la proteína FaGalUR es capaz de reducir el sustrato ácido D-galacturónico con una actividad de 220 U/mg de proteína.

1.6 Discusión

El contenido en vitamina C (ácido L-ascórbico) de dos líneas transgénicas independientes de *A. thaliana* que sobreexpresaban el gen *FaGalUR* de fresa (comprobado mediante análisis por Northern-blot y Western-blot) era significativamente superior al de las plantas no transgénicas. Puesto que, mediante estudios con precursores marcados se ha comprobado que la ruta de biosíntesis de vitamina C en *Arabidopsis* a partir de ácido D-galacturónico (y a partir de su éster metílico) es funcional, la sobreexpresión de FaGalUR en las plantas de *A. thaliana* transgénicas tendría el efecto de incrementar el contenido de vitamina C al reforzar dicha ruta metabólica. En *Arabidopsis* también se ha mostrado la principal ruta metabólica de biosíntesis de vitamina C (a partir de L-galactosa). La activación de la ruta a partir de ácido D-galacturónico al introducir FaGalUR permitió obtener incrementos muy importantes en el contenido de vitamina C.

Por otra parte, al medir la actividad D-galacturonato reductasa (dependiente de NADP) en extractos crudos de plantas de *A. thaliana* transformadas y sin transformar, se ha comprobado que la actividad enzimática medida es significativamente superior en las plantas de *A. thaliana* transgénicas. Ésta es una prueba adicional de la actividad reductora de ácido D-galacturónico del producto de expresión del gen *FaGalUR* de fresa, lo que explicaría el mayor contenido en vitamina C de las plantas transgénicas, cuya única diferencia en relación con las no transgénicas es la presencia de una copia del gen *FaGalUR* en su genoma.

REIVINDICACIONES

1. Una construcción de ADN que comprende una molécula de ADN que codifica una proteína con actividad D-galacturonato reductasa que interviene en la síntesis de ácido L-ascórbico en células vegetales y una región iniciadora de la transcripción funcional en plantas.

2. Construcción de ADN según la reivindicación 1, en la que dicha molécula de ADN que codifica una proteína con actividad D-galacturonato reductasa que interviene en la síntesis de ácido L-ascórbico en células vegetales, es una molécula de ADN seleccionada entre:

a) una molécula de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. Nº: 1; y

b) una molécula de ADN análoga a la secuencia definida en a) que

i) es sustancialmente homóloga a la secuencia de ADN definida en a); y

ii) codifica para un polipéptido que es sustancialmente homólogo a la proteína codificada por la secuencia de ADN definida en a) y además tiene una actividad D-galacturonato reductasa.

3. Construcción de ADN según la reivindicación 1, que comprende, además, operativamente enlazada, una secuencia de terminación de la transcripción.

4. Un vector recombinante que comprende una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5. Una célula que comprende una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o un vector según la reivindicación 4.

6. Una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

a) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID. Nº: 2, y

b) una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga y funcionalmente equivalente a las secuencias de aminoácidos definidas en a).

7. Proteína según la reivindicación 6, que comprende, o está constituida por, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID. Nº: 2.

8. Un método para la producción de una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, que comprende cultivar una célula según la reivindicación 5 bajo condiciones que permiten la producción de dicha proteína y recuperarla del medio de cultivo.

9. Una célula vegetal transgénica que comprende una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

10. Una planta transgénica que comprende, al menos, una célula vegetal transgénica según la reivindicación 9.

11. Planta transgénica según la reivindicación 10, en la que dicha planta es una planta productora *in vivo* de vitamina C consumible por seres vivos incapaces de sintetizar vitamina C.

12. Planta transgénica según la reivindicación 10, en la que dicha planta es una planta productora *in vivo* de vitamina C consumible por los seres humanos o por los animales, o una planta productora de frutos consumibles por los seres humanos o por los animales.

13. Planta transgénica según la reivindicación 12, en la que dicha planta se selecciona del grupo formado por fresa, tomate, maíz, trigo, arroz, patata y lechuga.

14. Empleo de una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la producción de plantas transgénicas que expresan específicamente la proteína codificada por la molécula de ADN comprendida en dicha construcción de ADN y presentan un contenido aumentado en vitamina C.

15. Un método para aumentar la producción de vitamina C en una planta productora *in vivo* de vitamina C que comprende introducir en dicha planta una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

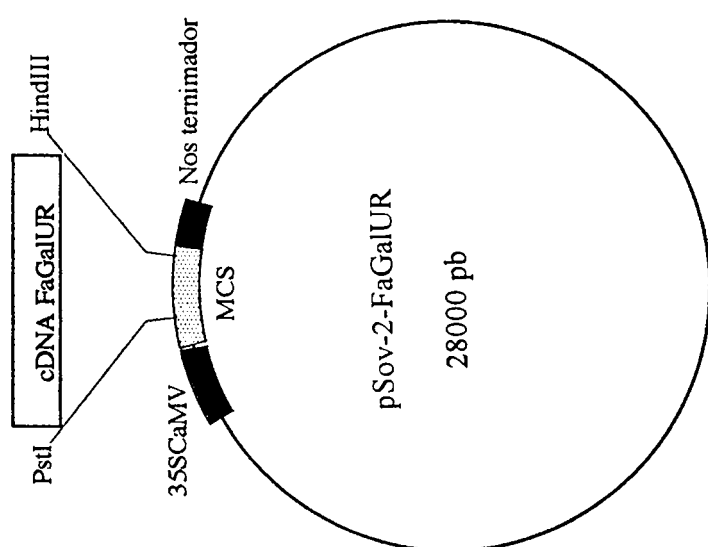


Figura 1

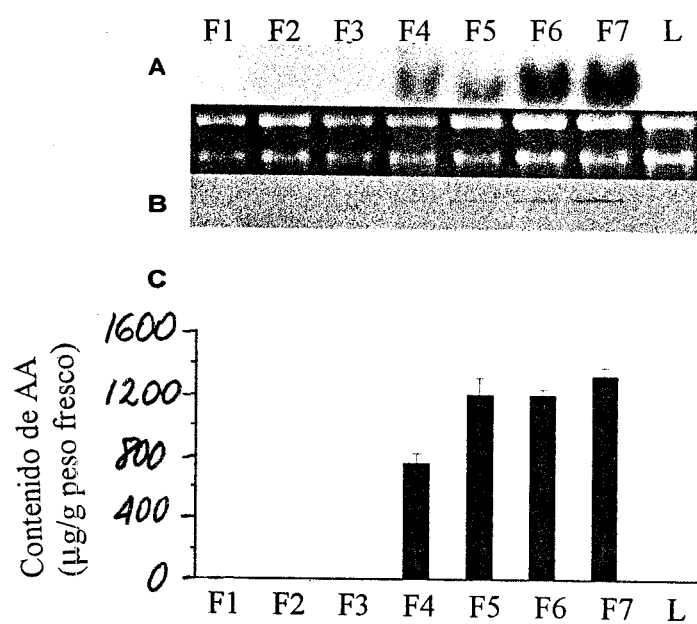


Figura 2

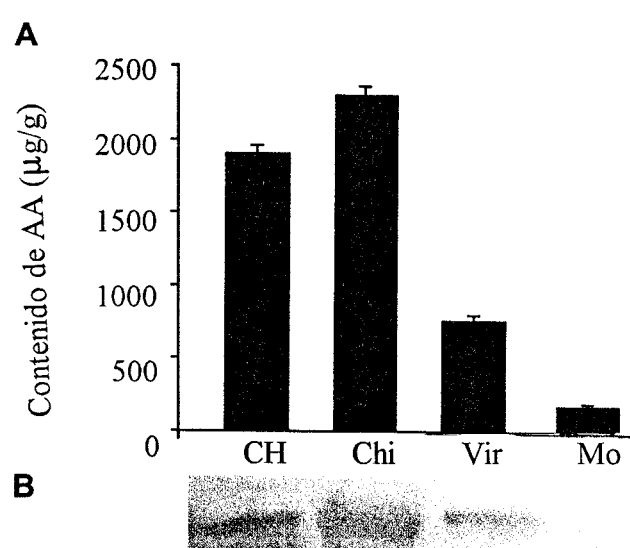


Figura 3

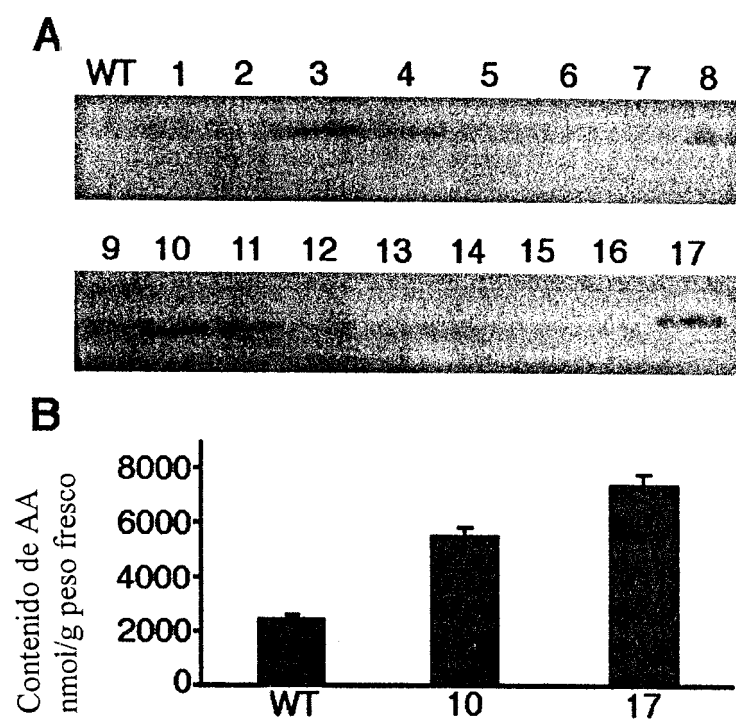


Figura 4

ES 2 224 773 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Málaga
 <120> Construcción de ADN y método para incrementar la producción de vitamina C en una planta
 <160> 4

 <170> PatentIn versión 2.0

 <210> 1
 <211> 1.346
 <212> ADNc
 <213> Fresa

 <400> 1

 CGGCACGAGC ATCTATCTAT CTATCCATCT CTGAATCTGA ACGTTGTTCT CTAAACCAA 60
 GGTATTTAGC CAGAGACATA TATCCCACAT TCGATCCATT CATTTCAATT GTAAACTAGC 120
 TCAATGGCAA AGGTTCCCTC AGTAACCCCTC AGCTCCTGCG GTGATGACAT CCAGACCATG 180
 CCTGTAATCG GCATGGGAAC TTCATCGTAC CCTCGGGCCG ACCCTGAAAC CGCCAAGGCT 240
 GCTATTCTCG AAGCAATTAG AGCTGGTTAC CGACATTTTCG ACACCGCCGC TGCTTACGGC 300
 TCGGAGAAAG ATCTCGGTGA AGCCATAGCC GAGGCTCTCC GTCTCCAACCT CATCAAGTCT 360
 AGGGACGAGC TCTTCATCAC AACCAAACCTT TGGGCCAGTT TCGCCGAGAA AGACCTTGTG 400
 CTGCCCTCCA TCAAAGCCAG TTTAAGCAAT CTTCAAGTAG AATACATTGA CATGTACATC 460
 ATACACTGGC CATTCAAATT GGGAAAAGAG GTGAGAACCA TGCCTGTTGA GAGAGATCTG 520
 GTGCAGCCCC TTGATATCAA ATCTGTTTGG GAAGCCATGG AAGAGTGCAA GAACTTGGG 580
 CTTGCTAGAG GTATTGGTGT CAGTAACTTC ACTAGCAGCA TGCTTGAGGA GCTTCTTTCC 640
 TTCGCCGAAA TCCCTCCGGC CGTAAACCAA TTGGAGATGA ACCCAGCTTG GCAGCTGAAG 700
 AAATTGAGGG ACTTCTGCAA GGCAAAGGGA ATTCATGTCA CGGCTTACTC TCCGCTCGGA 760
 GCAGCTAGGA CTAAATGGGG TGACGATAGG GTTTTGGGAT CAGATATCAT CGAAGAGATT 820
 GCCCAAGCCA AAGGAAAATC AACTGCTCAG ATATCATTGA GATGGGTGTA CGAACAAGGT 880
 GTGAGCATAG TAACAAAAAG TTACAACAAA GAAAGAATGA GGCAGAACCT TGACATCTTC 940
 GACTTCTGCT TGACCGAGGA GGAAGTGGAG AAGATGAGTC ATCTTCCACA GCGGAAAGGG 1000
 GTTACCTTTG CTTCAATTCT AGGACCCCAT GATATTGTTT TGGAAGTTGA CGAAGAATTA 1060
 TGAGCTGCAA GACTTGGTCA TTTATTATTA TTAGATGTTT CTCCCAATTT TACCGCCGGG 1120
 ATATACTAGC TGATGTAGTC AAGTCTATTA GGGAAACATG TGATATCGTT TTTGTATTAC 1180
 TTATAGTCGA TGATATACGT ACCGTTTGCA GCATATACAA TTTGCAGCAC CTTTCCTTTG 1240
 TTCTGTAGAG ATCGATGTAT GGTACGTATC ACGTTTCGGA AACGTAGATA CATACTACT 1300
 TCTTCCCCTT CTCGTCAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA 1346

 <210> 2
 <211> 319
 <212> PRT
 <213> Fresa

ES 2 224 773 B1

<400> 2

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

ES 2 224 773 B1

[illegible]

ES 2 224 773 B1

<400> 3

ACTGCAGTCT AGACATGGCA AAGGTTTCCT

29

5 <210> 4

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <223> Oligonucleótido iniciador AKR2

<400> 4

AAAGCTTTCA TAATTCTTCG TC

22

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 224 773

⑫ Nº de solicitud: 200102896

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 27.12.2001

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.7: C12N 15/82, 15/53, 9/04, C12P 17/04, A01H 5/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	DAVEY, M.W. et al. "Ascorbate Biosynthesis in Arabidopsis Cell Suspension Culture". PLANT PHYSIOLOGY. Vol. 121 (2), Octubre 1999, páginas 535-543.	1-15
A	MAPSON L.W. & ISHERWOOD, F.A. "Biological Synthesis of Ascorbic Acid: The Conversion of Derivatives of D-Galacturonic Acid into L-Ascorbic Acid in Plant Extracts". BIOCHEMICAL JOURNAL, Vol. 64, 1956, páginas 13-22.	1-15
A	BASE DE DATOS EMBL, Hinxton, UK; On line! 20.01.1998. GONZALEZ LAMOTHE, R. et al.: "Fragaria x ananassa probable aldo-keto reductase superfamily member mRNA, complete cds". Nº de acceso AF039182. Todo el documento.	1-15
A	BASE DE DATOS EMBL, Hinxton, UK; 01.06.1998 On line!. GONZALEZ LAMOTHE, R. et al.: "Hypothetical Protein". Nº de acceso 049133. Todo el documento.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

28.01.2005

Examinador

A. Collados Martín Posadillo

Página

1/1