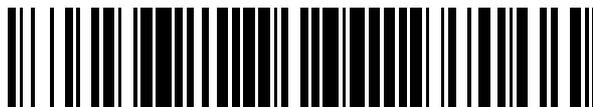


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 354 897**

21 Número de solicitud: 200930009

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **24.03.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **21.03.2011**

Fecha de la concesión: **16.01.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **26.01.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
26.01.2012

73 Titular/es:
**IDEN BIOTECHNOLOGY
AVDA. CONDE OLIVETO 2 3 IZDA.
31002 PAMPLONA, NAVARRA, ES**

72 Inventor/es:
**POZUETA ROMERO, JAVIER;
MUÑOZ PEREZ, FRANCISCO JOSÉ;
LI, JUN;
RAYNAUD, SANDY;
RAGEL DE LA TORRE, PAULA y
MÉRIDA BERLANGA, ANGEL**

74 Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS QUE PRESENTAN ALTO CONTENIDO Y RENDIMIENTO EN ALMIDÓN Y BIOMASA.**

57 Resumen:

Procedimiento para la producción de plantas transgénicas que presentan alto contenido y rendimiento en almidón y biomasa. Las SSs en plantas (incluida la SSIV) y la glucógeno sintasa en bacterias catalizan la transferencia de la parte glucosídica de la molécula de ADP-glucosa (el donador activado de glucosa) a un glucano {al}(1-4) preexistente. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con otras SSs, la SSIV es capaz de añadir unidades de glucosa sobre maltotriosas. Además, a diferencia de lo que ocurre con otras SSs solubles, SSIV está unida al gránulo de almidón. En esta invención se describe por primera vez la obtención de plantas que poseen altos niveles y rendimientos de almidón y biomasa, como consecuencia de la expresión de genes que codifican para SSIV.

ES 2 354 897 B1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de plantas transgénicas que presentan alto contenido y rendimiento en almidón y biomasa.

5

Campo de la invención

La presente invención se engloba dentro del campo de la ingeniería genética y de la fisiología vegetal. Concretamente la invención comprende un procedimiento para la producción de plantas transgénicas con alto contenido y rendimiento en almidón y biomasa; así como los vectores utilizados para transformar las células, las propias células transformadas, las plantas transgénicas obtenidas por dicho procedimiento y sus respectivos usos.

10

Estado de la técnica

El glucógeno (en animales y bacterias) y el almidón (en plantas) constituyen las formas principales de almacenamiento de carbohidratos de reserva. En plantas el almidón se acumula en grandes cantidades en órganos tales como semillas y tubérculos, y es un constituyente fundamental de la dieta del ser humano. Por otro lado, el almidón constituye una fuente de material renovable y completamente biodegradable, siendo utilizado frecuentemente en las industrias papelera, cosmética, farmacéutica y alimentaria, además de emplearse como componente fundamental para la fabricación de plásticos biodegradables, pinturas de bajo impacto medioambiental y bioetanol.

20

La biosíntesis de almidón es un proceso complejo que requiere la acción concertada de diferentes actividades enzimáticas tales como la sacarosa sintasa, la fosfoglucomutasa, la ADP-glucosa pirofosforilasa, diferentes tipos de glucosil transferasas comúnmente designadas como almidón sintasas (SS), y las enzimas ramificante y desramificante del almidón (1).

25

La SS en plantas y la glucógeno sintasa (GlgA) en bacterias catalizan la transferencia de la mitad glucosídica de la molécula de ADP-Glucosa (el donador activado de glucosa) a un glucano $\alpha(1-4)$ preexistente. En todos los organismos fotosintéticos que acumulan almidón se han encontrado las mismas SSs denominadas SSI, SSII, SSIII, SSIV y GBSSI. Este alto grado de conservación indica que cada una de estas proteínas desempeña funciones diferentes en el proceso de creación del gránulo de almidón (2). Así por ejemplo, la GBSSI está implicada en la producción de amilosa, mientras que la SSI, la SSII y la SSIII están implicadas en la producción de cadenas de almidón cortas, intermedias y largas de amilopectina, respectivamente (3).

30

La SSIV es la menos conocida de la familia de proteínas comúnmente designadas como SSs solubles. Su secuencia aminoacídica con respecto a SSI, SSII y SSIII varía entre un 30% y un 50% (4, 5). A pesar de su designación, todavía no se ha demostrado su actividad SS. Es más, recientemente se ha instalado la idea de que SSIV no cubre el campo de acción y función de las otras SSs (6). Sin embargo, existen evidencias que sugieren que SSIV puede estar implicada en la determinación del número de gránulos de almidón existentes en el plastidio (7).

35

Son múltiples las referencias que muestran que la reducción de la actividad SSI, SSII y SSIII conlleva una reducción en los niveles de almidón y la alteración de la estructura y composición del gránulo (8, 9). Mutantes de *Arabidopsis* que no poseen SSIV acumulan niveles reducidos de almidón pero (a) el balance amilosa/amilopectina y la estructura molecular de la amilopectina son normales y (b) tan solo producen un gránulo de almidón por cloroplasto (7).

40

Contrariamente a lo esperado, plantas transgénicas que sobre-expresan la GlgA de *Escherichia coli* acumulan bajo contenido en almidón (10). Si bien la expresión ectópica de SSI, SSII y SSIII ha sido utilizada como estrategia para incrementar el contenido en almidón (WO 00/66745) y modificar propiedades del almidón tales como el contenido en fosfato (WO2007/009823) (11-13) o el balance amilosa/amilopectina (WO 2006/084336; WO 2002/018606), no existen evidencias experimentales que indiquen que (a) SSIV tiene actividad SS y (b) la expresión ectópica de SSIV pueda ser utilizada como una estrategia biotecnológica para incrementar la cantidad del almidón, así como el rendimiento y tasa de acumulación de biomasa de las plantas. En la presente invención, tras demostrar que SSIV es una SS que reúne propiedades totalmente diferentes a las SSs solubles SSI, SSII y SSIII, se describe por primera vez que la sobre-expresión de SSIV es una estrategia biotecnológica para la producción de plantas transgénicas con altos niveles de almidón y altos rendimientos de almidón y biomasa.

55

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

60

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de plantas transgénicas que presentan alto contenido y rendimiento en almidón y biomasa, mediante la expresión ectópica de SSIV. Además la presente invención se refiere a las propias plantas transgénicas caracterizadas por dichas propiedades.

65

Los efectos técnicos mostrados en la presente invención son extrapolables a cualquier tipo de órgano de la planta tal como tubérculos, hojas, frutos y semillas; así como a cualquier tipo de planta como por ejemplo: *Arabidopsis*, patata, tabaco, tomate, arroz, cebada, trigo y maíz. Los resultados mostrados en la presente invención fueron conse-

guidos, tanto expresando constitutivamente AtSSIV (el gen que codifica para SSIV en *A. thaliana*) bajo el control del promotor 35S, como expresando AtSSIV bajo el control de un promotor específico de tubérculo utilizado (promotor del gen de la patatina). Cabe decir que la expresión constitutiva fue particularmente preferida. Los resultados mostrados en la presente invención fueron conseguidos tras sobre-expresar cualquier isoforma y secuencia de SSIV (siendo particularmente preferida la SSIV de *Arabidopsis*). Es decir, cualquier promotor expresable en plantas que produzca la sobre-expresión de AtSSIV, así como cualquier isoforma de SSIV, estarían comprendidos en la presente invención.

A efectos de la presente invención, se hacen constar los siguientes términos:

- Planta transgénica: planta cuyo genoma ha sido modificado mediante ingeniería genética con el objetivo de conseguir características biológicas diferentes y/o mejoradas respecto a las de la planta silvestre control (WT).
- Célula vegetal transformada: son células vegetales que presentan una alteración genética resultado de la introducción y expresión de material genético externo en su genoma.
- Sobre-expresión de SSIV: una planta sobre-expresa el enzima SSIV cuando la intensidad de la banda obtenida en un western blot de un extracto de una planta transformada es significativamente superior a la obtenida con un extracto de plantas WT cultivadas en las mismas condiciones y en el mismo momento. A modo ilustrativo, en la Figura 11A se puede observar que la intensidad de las bandas obtenidas a partir de extractos de plantas transgénicas de *Arabidopsis* y de patata que sobre-expresan AtSSIV es significativamente superior a la obtenida a partir de extractos de plantas WT en western blots en los que se utilizó un anticuerpo específico de AtSSIV.
- Alto contenido de almidón: según se utiliza en la presente invención, esta expresión está directamente referida a un valor estadísticamente significativo, superior a los valores observados en las plantas control. A modo ilustrativo, en la Figura 13 se puede observar que el contenido medio de almidón en los tubérculos de las plantas de patata silvestres analizadas es de aproximadamente 525 μ moles de glucosa/g de peso fresco, con un margen de variación del 10%. Por lo tanto podría considerarse como “alto contenido en almidón” aquel que supere, al menos en un 10%, dicho valor de 525 μ moles de glucosa/g de peso fresco. En la presente invención se supera dicho valor consiguiendo tubérculos transgénicos que acumulan cantidades de almidón de 600 μ moles de glucosa/g de peso fresco como mínimo.
- Alta productividad en biomasa: según se utiliza en la presente invención, esta expresión está directamente referida a un valor estadísticamente significativo, superior a los valores observados en las plantas control. A modo ilustrativo, en la Figura 14 se puede observar que el incremento del peso fresco de plantas transgénicas de *Arabidopsis* a lo largo del desarrollo de la planta es más acelerado que en las plantas silvestres.
- Actividad SSIV: la actividad de la enzima SSIV comprende (a) transferir unidades de glucosa desde ADPglucosa a maltotriosa y poliglucanos tales como almidón, amilosa, amilopectina y glucógeno y (b) estar localizada en la superficie del gránulo de almidón.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Mapa de restricción del plásmido pAtSSIV resultante del clonaje de un cDNA completo que codifica para el gen AtSSIV de *Arabidopsis thaliana* en el vector pGEM-T easy (Promega).

Figura 2. (a-h) Comparación de secuencias aminoacídicas deducidas de AtSSI, AtSSII, AtSSIII y AtSSIV. Los aminoácidos conservados en todas las SSs están enmarcados en negro. El fragmento de AtSSIV empleado para obtener anticuerpos específicos contra esta proteína se indica con una línea negra, subrayada.

Figura 3. Mapa de restricción del plásmido pGEX-4T3_FragSSIV utilizado para la síntesis del péptido necesario para la producción del anticuerpo específico de SSIV.

Figura 4. Etapas de construcción del plásmido binario pK2GW7,0-AtSSIV (alternativamente designado pKan-35S-AtSSIV) necesario para la transformación de plantas con *Agrobacterium tumefaciens*.

Figura 5. Mapa de restricción del plásmido pET-AtSSIV necesario para la expresión en *E. coli* de la SSIV madura.

Figura 6. Etapas de construcción del plásmido binario pAtSSIV-GFP necesario para la transformación de plantas en *Agrobacterium tumefaciens*.

Figura 7. Zimograma de actividad SS empleando glucógeno como cebo.

Figura 8. Especificidad de sustrato. Ensayo *in vitro* de SSI, SSII, SSIII y SSIV con diferentes malto-oligosacáridos como sustrato.

Figura 9. SSIV es capaz de complementar el fenotipo “glycogen-less” de las células AglgAP. Patrón de tinción en iodina tras 12, 24 y 36 horas de incubación de (A) AglgAP, (B) AglgAP que expresan GlgA y (C,D) AglgAP que expresan SSIV.

Figura 10. Localización subcelular de AtSSIV. La ilustración muestra la fluorescencia producida en células de plantas de *Arabidopsis* transformadas con AtSSIV-GFP que han sido sometidas a análisis mediante un microscopio confocal D-Eclipse C1 (NIKON) equipado con un láser con excitación Ar 488, un filtro para emisión verde BA515/30, un filtro para emisión roja BA650LP y un detector de luz. En las fotografías puede observarse que SSIV-GFP está localizado en la superficie de gránulos de almidón.

Figura 11. Análisis mediante western blot (A) y cuantificación (B) de los niveles de proteína SSIV en el ecotipo silvestre Col-0 (WT) y en las líneas transgénicas que sobre-expresan el gen AtSSIV (L10, L11, L12 y L13) tras integrar en su genoma la construcción 35S-AtSSIV haciendo uso de la cepa de *A. tumefaciens* DSM 19675. En (C), análisis mediante western blot de SSIV en tubérculos de patata que expresan AtASSIV tras integrar en su genoma la construcción 35S-AtSSIV haciendo uso de la cepa de *A. tumefaciens* DSM 19675. Las plantas transgénicas reciben la designación 2, 6, 7, 8 y 9.

Figura 12. Niveles de almidón en hojas de plantas de *Arabidopsis* a lo largo de un ciclo 16 h luz/8 h oscuridad. Los círculos blancos corresponden a plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Col-0. Los círculos negros corresponden a plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobre-expresan el gen AtSSIV que codifica para la SSIV de *Arabidopsis thaliana*.

Figura 13. Contenido de almidón en tubérculos de plantas de patata silvestres y plantas de patata que expresan AtASSIV tras integrar en su genoma la construcción 35S-AtSSIV haciendo uso de la cepa de *A. tumefaciens* DSM 19675. Los tubérculos silvestres analizados se designan como WT. Las plantas transgénicas reciben la designación 2, 6, 7, 8 y 9. Los valores representados se corresponden a la media y desviación típica de tubérculos de 10 plantas diferentes por línea.

Figura 14. (A) Evolución del peso fresco de plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Col-0 (círculos blancos) y plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobre-expresan el gen AtSSIV (círculos negros) a lo largo del crecimiento. Los datos son la media de tres medidas. Cada medida se realizó pesando conjuntamente la parte aérea de 5 plantas y dividiendo el valor obtenido por cinco. Las barras indican la desviación estándar de las medidas. (B) Comparación visual entre plantas de *Arabidopsis* ecotipo Col-0 (parte izquierda de la fotografía) y plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobre-expresan el gen AtSSIV (parte derecha de la fotografía).

Descripción detallada de la invención

Obtención del cDNA que codifica para SSIV

AtSSIV está codificada por el gen At4g18240 (o AtSSIV). A partir de su secuencia nucleotídica se sintetizaron oligonucleótidos específicos para el gen AtSSIV. Estos oligonucleótidos se emplearon para amplificar mediante RT-PCR a partir de RNA total de hojas de *Arabidopsis* el fragmento completo de cDNA que codifica para AtSSIV. El fragmento amplificado se clonó en el vector pGEM-T easy (Promega) dando lugar al plásmido pAtSSIV (Figura 1) que fue amplificado en la bacteria hospedadora XL1 Blue.

Obtención de anticuerpos policlonales específicos contra la proteína AtSSIV

Para la obtención de un anticuerpo policlonal contra AtSSIV se seleccionó como zona antigénica un fragmento de la región amino terminal de la proteína que no presentaba homología con las otras SSs presentes en *Arabidopsis* (Figura 2). En concreto la región comprendida entre los aminoácidos Glutámico 236 y Glutámico 414 de la secuencia de aminoácidos de AtSSIV. En la clonación de la secuencia de cDNA que codifica para dicho fragmento se emplearon los oligonucleótidos caracterizados por las SEQ ID NO: 5 y 6.

El fragmento de 512 pares de bases se amplificó mediante PCR empleando dichos oligonucleótidos y cDNA (SEQ ID NO: 3) de primera cadena obtenido a partir de mRNA de hojas como molde. Los oligonucleótidos introducen sitios de restricción para las enzimas NdeI y XhoI en los extremos 5' y 3' respectivamente del fragmento amplificado, los cuales fueron usados para clonar el fragmento de cDNA en el vector de expresión pGEX-4T (Amersham Biosciences) dando lugar al plásmido pGEX-4T3_FragSSIV (Figura 3). Este vector de expresión contiene la secuencia codificante para la proteína glutatión S-transferasa (GST). La clonación del fragmento de cDNA de AtSSIV en el vector se llevó a cabo respetando la pauta de lectura marcada por el gen que codifica la GST, permitiendo la fusión traduccional del fragmento de polipéptido de AtSSIV con el extremo carboxi-terminal de la proteína GST. La construcción fue confirmada mediante secuenciación de DNA y con ella se transformó la estirpe de *E. coli* BL21 (DE3).

Se procedió entonces a la expresión y purificación del polipéptido de fusión GST-SSIV con glutatión agarosa, y la posterior purificación del fragmento polipeptídico de AtSSIV de la GST mediante rotura con trombina y unión de la GST a una matriz de glutatión. La expresión de pGEX-4T3_FragSSIV tuvo lugar mediante la adición de 1 mM isopropyl-D-thiogalactopyranoside (IPTG) en 100 ml de cultivo celular cuando la densidad óptica del mismo era de 0.6. Tras 2 horas adicionales de cultivo las células se centrifugaron a 10,000 g durante 5 minutos, se resuspendieron en 50 mM HEPES (pH 7.0) y se sonicaron. El sobrenadante que contiene el fragmento de AtSSIV recombinante fusionado con GST (GST-SSIV) se hizo pasar por una columna de afinidad de Glutacion-Sefarosa (GE Healthcare). Después de lavar la columna para eliminar las proteínas que no se habían unido a ella, el fragmento de SSIV se eluyó mediante tratamiento con trombina, que corta la unión del fragmento SSIV con la proteína GST, la cual permanece unida a

la columna de afinidad. El fragmento de AtSSIV recombinante purificado fue mezclado con adyuvante completo de Freund (en una relación 50/50) y posteriormente fue alicuotado en tres fracciones iguales, que se enviaron al Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla, donde se obtuvieron anticuerpos policlonales de conejo contra dicho polipéptido. Finalmente, el anticuerpo anti-SSIV se purificó mediante FPLC usando una columna de Proteína A Sepharosa (Amersham Bioscience).

Obtención de plantas transgénicas que sobreexpresan AtSSIV

La sobre-expresión constitutiva de AtSSIV requirió la producción de un plásmido binario cuyo proceso de producción se ilustra en la Figura 4. AtSSIV fue amplificado por PCR a partir de pAtSSIV y posteriormente se clonó en pDONR/Zeo, dando lugar al plásmido pDONR/Zeo-AtSSIV. A partir de pDONR/Zeo-AtSSIV y pK2GW7,0 (14) se obtuvo el plásmido pK2GW7,0-AtSSIV (o pKan-35S-AtSSIV), el cual posee el promotor constitutivo 35S, AtSSIV y el terminador 35S. pK2GW7,0-AtSSIV se introdujo por electroporación en *A. tumefaciens*, dando lugar a la cepa DSM 19675, que fue depositada en el “Germán National Resource Centre for Biological Material” el 18 de septiembre de 2007, sita en el DMSZ, Mascheroder Weg 1b D-38124 (Braunschweig, Alemania). Esta cepa se utilizó para transformar plantas de patata y *Arabidopsis* según protocolos descritos en la literatura (15, 16).

Obtención de células de *Escherichia coli* AglgAP y AglgCAP que sobre-expresan AtSSIV

La secuencia de AtSSIV que codifica para la proteína madura AtSSIV fue amplificada por PCR a partir de pAtSSIV y posteriormente se clonó en pET-45b(+) (Novagen) dando lugar al plásmido pET-AtSSIV según se ilustra en la Figura 5. pET-AtSSIV fue introducido por electroporación en las cepas de *E. coli* BL21(DE3) AglgAP y AglgCAP (17). Estas cepas no poseen actividad glucógeno sintasa que pueda interferir con la actividad SS. La sobre-expresión de AtSSIV tuvo lugar mediante la adición de 1 mM isopropyl-D-thiogalactopyranoside (IPTG) en 100 ml de cultivo celular cuando la densidad óptica del mismo era de 0.6. Tras 2 horas adicionales de cultivo las células se centrifugaron a 10,000 g durante 5 minutos, se resuspendieron en 50 mM HEPES (pH 7.0) y se sonicaron.

Identificación de SSIV

Es una SS (EC 2.4.1.21) que transfiere la glucosa desde el ADP-glucosa al extremo de una cadena almidón o glucógeno (u otro tipo de polisacárido de moléculas de glucosa unidas entre sí por enlaces covalentes de tipo α -(1,4)) mediante la creación de un nuevo enlace de tipo α -(1,4). Además, posee la peculiaridad de utilizar maltotriosa como sustrato. La identificación de SSIV podrá realizarse de cualquiera de las maneras siguientes: (a) mediante zimogramas, (b) mediante análisis de la incorporación de radiactividad a partir de ADP-glucosa marcada radiactivamente en polisacáridos de glucosa, (c) mediante complementación del fenotipo “glycogen-less” de la cepa AglgAP de *E. coli*, (d) mediante immunoblots haciendo uso de anticuerpos específicos contra AtSSIV y (e) mediante análisis por microscopía confocal de la localización subcelular de SSIV fusionada con la green fluorescence protein (GFP):

- Por zimogramas: SSIV separado electroforéticamente en un gel nativo (50 mM GlyGly/NaOH pH 9; 100 mM (NH₄)SO₄; 5 mM (3-mercaptoetanol; 5 mM MgCl₂, 0,25 g l BSA) que contenga glucógeno (o cualquier otro tipo de polisacárido de moléculas de glucosa unidas entre sí por enlaces α -(1,4)) y que haya sido incubado en una solución con ADPglucosa dará lugar a una banda oscura en una solución de lugol (0,5% I/1,5% KI). Dicha tinción es debida a la afinidad que presenta el lugol por los polímeros de glucosa de larga cadena.
- Por medida de radiactividad de polímeros de glucosa generados a partir de ADPglucosa marcada radiactivamente: SSIV incubado según se describe en (3) con ADPglucosa marcada radiactivamente en una solución glicina/NaOH 50 mM (pH 9.0), 100 mM (NH₄)₂SO₄, 5 mM (3-mercaptoetanol, 5 mM MgCl₂ que contenga maltotriosa (10 miligramos/mililitro), glucógeno o cualquier otro tipo de polisacárido largo de moléculas de glucosa unidas entre sí por enlaces α -(1,4) (1 miligramo/mililitro) dará lugar a un polímero de glucosa marcado radiactivamente como resultado de la incorporación de la glucosa marcada radiactivamente del ADPglucosa. La radiactividad incorporada en tal polímero puede ser medida haciendo uso de un contador de centelleo.
- Por complementación del fenotipo “glycogen-less” de la cepa AglgAP de *E. coli*: la mutante insercional AglgAP de *E. coli* no acumula glucógeno ya que no posee el gen glgA que codifica para la GlgA. Este enzima es responsable de la síntesis de glucógeno a partir del ADPglucosa existente en la célula. Por lo tanto, la identificación de la actividad SSIV en células AglgAP de *E. coli* se manifiesta mediante la observación de acúmulo de glucógeno en la mutante transformada con pET-AtSSIV.
- Por western blot: En el caso de plantas de patata, la AtSSIV se detectó haciendo uso del anticuerpo específico anti-AtSSIV según la metodología de western blot descrita en (18). En el caso de *Arabidopsis*, el complejo antígeno-anticuerpo se detectó mediante incubación con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa y empleando el Kit de detección ECL Advanced® (Amersham) el cual da lugar a un producto quimioluminiscente. La señal lumínica se detectó y cuantificó mediante el captador de imágenes ChemiDoc de Bio-Rad empleando el software de análisis de imágenes “Quantity One” de la misma casa comercial.
- Por análisis de su localización subcelular mediante microscopía confocal. Plantas de patata y/o *Arabidopsis* fueron transformadas con la construcción quimérica AtSSIV-GFP obtenida según se ilustra en la Figura 6. Las plantas fueron sometidas a observación por microscopía confocal para identificar la localización subcelular de la fluorescencia de GFP.

Determinación del contenido en azúcares solubles y almidón

Para el aislamiento de almidón de hojas, éstas se trituraron en un mortero con nitrógeno líquido. El extracto crudo obtenido se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 1 hora a través de una capa de Percoll (SIGMA) al 90%, constituyendo el precipitado obtenido la fracción purificada de almidón. El almidón purificado se cuantificó mediante un método espectrofotométrico consistente en la degradación total del almidón a residuos de glucosa mediante la acción de la enzima amiloglucosidasa y posterior cuantificación de la glucosa usando un ensayo enzimático acoplado con las enzimas hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenada (7).

10 *Depósito de microorganismos según el tratado de Budapest*

Los microorganismos utilizados en la presente invención fueron depositados en el “Germán National Resource Centre for Biological Material” el 18 de septiembre de 2007, sita en el DMSZ, Mascheroder Weg 1b D-38124 (Braunschweig, Alemania) con nº de depósito DSM 19675.

15 **Ejemplos de realización de la invención**

A continuación se procede a la exposición de los ejemplos en los que se muestra detalladamente el procedimiento para la obtención de las plantas transgénicas de *Arabidopsis* y patata con alto contenido en almidón, alto rendimiento y alta productividad de biomasa como consecuencia del incremento de la actividad SSIV. Los modos de realización, ejemplos y las figuras que siguen se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención.

25 Ejemplo 1

30 *Obtención del cDNA completo que codifica para AtSSIV*

El conocimiento de la secuencia nucleotídica del gen AtSSIV que codifica para AtSSIV permitió la creación de dos cebadores específicos cuyas secuencias son, en sentido 5'-3', SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. Haciendo uso de estos cebadores y de RNA de hojas de *Arabidopsis* se amplificó por métodos convencionales de RT-PCR un cDNA completo de AtSSIV (At4g18240), que se clonó en pGEM-T easy (Promega) (Figura 1).

Las secuencias nucleotídicas del DNA amplificado y la secuencia aminoacídica deducida se representan en SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, respectivamente.

35 Ejemplo 2

40 *Identificación del producto con actividad SSIV*

- Identificación zimográfica: 100 µg de proteína de extractos crudos de células de *E. coli* BL21(DE3) AglgCAP transformadas con pET-45b(+) o con pET-AtSSIV se sometieron a electroforesis en condiciones nativas en un gel de poliacrilamida al 7,5% sin SDS, el cual contenía 0,3% (p/v) de glucógeno de hígado de cerdo (SIGMA). Tras incubar el gel durante una noche a temperatura ambiente en GlyGly/NaOH 50 mM pH 9; (NH₄)SO₄ 100 mM; (3-mercaptopetanol 5 mM; MgCl₂ 5 mM, BSA 0,25 g/l y ADP-glucosa 1 mM, éste fue incubado en una solución yodada (Lugol) compuesta por 0,5% I/1,5% KI. La presencia de nuevas cadenas de glucógeno quedará revelada gracias a la aparición de una banda oscura en el gel. Dicha banda oscura es debida a la afinidad que presenta el Lugol por los polímeros de glucosa de larga cadena, de manera que allí donde una SS haya detenido su migración y hayan elongado cadenas del poliglucano por la adición de glucosas mediante enlaces α-(1,4), se observará una zona más teñida y oscura en el gel. Tal como se puede apreciar en el zimograma de la Figura 7, células BL21(DE3) AglgCAP transformadas con pET-AtSSIV presentan una actividad elongante del glucógeno dependiente de ADP-glucosa. Dicha actividad está ausente en BL21(DE3) transformada con pET-45(+).
- Identificación por incorporación de radiactividad a partir de ADPglucosa radiativa (Figura 8). Las enzimas purificadas se incubaron a 30°C durante 30 min en 100 µl de la siguiente mezcla de reacción: 50 mM Glygly/NaOH pH 9; 100 mM (NH₄)₂SO₄; (3-mercaptopetanol 5 mM; 5 mM MgCl₂; 0,25 g/l BSA; 1 mM ADP-[U-C] Glucosa (3,7 GBq/mol). Por último, se añadió 10 mg/ml de malto-oligosacárido (con grado de polimerización entre 2 y 7) o amilopectina de maíz dependiendo del sustrato analizado. La reacción se paró hirviendo la muestra durante 10 min y los glucanos producidos se elongaron mediante incubación a 30°C durante toda la noche con 7,5 U de fosforilasa a de conejo (Sigma) en presencia de 50 mM de Glucosa-1-P (concentración final). La reacción se detuvo mediante la adición de 3,5 ml de una solución de 75% metano 1 y 1% KCl y posterior centrifugación para precipitar el glucano sintetizado. El pellet obtenido se lavó tres veces con la misma solución de parado y finalmente se cuantificó la radioactividad incorporada al mismo mediante la adición de 5 ml de líquido de centelleo Ready Protein MR (Beckman) y posterior lectura en un contador de centelleo modelo LS 6000 IC (Beckman). La elongación con fosforilasa a se omitió cuando el sustrato empleado era amilopectina. Tal y como se observa en la Figura 8, ensayos de especificidad de sustrato de SSIV muestran que SSIV es capaz de transferir moléculas de glucosa a partir de ADP-glucosa a poliglucanos tales como amilopectina. Malto-oligosacáridos de 4, 5, 6 ó 7 unidades de glucosa no son buenos sustratos para SSIV. Sorprendentemente, la maltotriosa es un excelente

sustrato para la SSIV (tan bueno como la amilopectina). Este patrón de especificidad de sustrato distingue a SSIV de otras SSs ya que, tal y como se ilustra en la Figura 8, SSI, SSII y SSIII no actúan eficientemente sobre la maltotriosa (3).

- 5 • Identificación por complementación del fenotipo “glycogen-less” de la cepa AglgAP de *E. coli*: tal y como se observa en la Figura 9A, las células AglgAP de *E. coli* no acumulan glucógeno ya que no poseen GlgA. El fenotipo “glycogen-less” de esta cepa desaparece al expresar ectópicamente el gen glgA que codifica para la GlgA de *E. coli* (Figura 9B). Al igual que las células AglgAP de *E. coli* transformadas con pET-glgA, células AglgAP de *E. coli* transformadas con pET-AtSSIV acumulan glucógeno (Figura 9C, D).
- 10 • Identificación por localización subcelular: plantas de patata y/o *Arabidopsis* fueron transformadas con la construcción quimérica AtSSIV-GFP obtenida según se ilustra en la Figura 6. Las plantas fueron sometidas a análisis de la localización subcelular de la fluorescencia de GFP mediante un microscopio confocal D-Eclipse C1 (NIKON) equipado con un láser con excitación Ar 488, un filtro para emisión verde BA515/30, un filtro para emisión roja BA650LP y un detector de luz. En las fotografías de la Figura 10 puede observarse que, a diferencia de lo que ocurre con otros miembros de la familia de “almidón cintazas solubles”, SSIV-GFP está unido a gránulos de almidón.

Estos métodos de identificación de SSIV demuestran que la proteína AtSSIV es una SS con actividad glucosil transferasa desde la molécula donadora ADP-glucosa hasta las cadenas de un poliglucano de larga cadena tal como la amilopectina, la amilosa o el glucógeno. Además, a diferencia de lo que ocurre con otras SSs, SSIV es capaz de añadir unidades de glucosa a la maltotriosa. Finalmente, SSIV es el único miembro de la familia de “almidón sintasas solubles” que está asociada al gránulo de almidón.

25 Ejemplo 3

Obtención y caracterización de plantas transgénicas que sobre expresan SSIV

30 Utilizando la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* DSM 19675 (que alberga al plásmido pK2GW7,0-AtSSIV, alternativamente designado como pKan-35S-AtSSIV) se obtuvieron plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* y patata (*Solanum tuberosum*) que sobre-expresan AtSSIV de manera constitutiva. Cuando se compara con plantas no transformadas, las plantas que sobre-expresan AtSSIV acumulan niveles significativamente superiores de una proteína de aproximadamente 112 kDa que es reconocida por el anticuerpo policlonal específico de la AtSSIV (Figura 11). En el caso de la patata, tal proteína sufre recortes internos que dan lugar a fragmentos de aproximadamente 80 y 100 kDa. Las hojas de las plantas de *Arabidopsis* que sobre-expresan AtSSIV, así como los tubérculos de plantas de patata que sobre-expresan AtSSIV, acumulan niveles significativamente superiores de almidón que los correspondientes órganos control (Figura 12 y Figura 13, respectivamente). Además, las plantas de *Arabidopsis* mostraron un rendimiento en la producción de biomasa y crecimiento superior al observado en las plantas control no transformadas (Figura 14). Finalmente, las plantas que sobre-expresan AtSSIV no presentan una morfología externa aberrante, tras ser comparada con la de las plantas no transformadas.

45 Bibliografía

1. Ball, S., and Morell, M. (2003). From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 207-233.
2. Ral, J.P., Derelle, E., Ferraz, C., Wattlebled, F., Farinas, B., Corellou, F., Buléon, A., Slomianny, M.C., Delvalle, D., d’Hulst, C., Rombauts, S., Moreau, H., Ball, S. (2004). Starch division and partitioning. A mechanism for granule propagation and maintenance in the picophytoplanktonic green alga *Ostreococcus tauri*. *Plant Physiol.* 136, 3333-3340.
3. Delvallé, D., Dumez, S., Wattlebled, F., Roldán, I., Planchot, V., Berbezy, P., Colonna, P., Vyas, D., Chatterjee, M., Ball, S., Mérida, A., D’Hulst, C. (2005) Soluble starch synthase I: a major determinant for the sintesis of amylopectin in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant J.* 43, 398-412.
4. Hirose, T., Terao, T. (2004) A comprehensive expression analysis of the starch synthase gene family in rice (*Oriza sativa* L.) *Planta* 220, 9-16.
5. Leterrier, M., Holappa, L.D., Broglie, K.E., Beckles, D.M. (2008) Cloning, characterization and comparative análisis of a starch synthase IV gene in wheat: functional and evolutionary implications. *BMC Plant Biol.* Doi: 10.1186/1471-2229-8-98.
- 65 6. Zhang, X., Szydlowski, N., Delvallé, D., D’Hulst, C., James, M.G., Myers, A.M. (2008) Overlapping functions of the starch synthases SSII and SSIII in amylopectin biosintesis in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* doi: 10.1186/1471-2229-8-96

7. **Roldán, I., Wattebled, F., Lucas, M.M., Delvallé, D., Planchot, V., Jiménez, S., Pérez, R., Ball, S., D'Hulst, C., and Mérida, A. (2007)** The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. *The Plant Journal* 49:492-504.
8. **Edwards, A., Fulton, D.C., Hylton, C.M., Jobling, S.A., Gidley, M., Rössner, U., Martín, C., Smith, A.M.** A combined reduction in activity of starch synthases II and III of potato has novel effects on the starch of tubers. *Plant J.* 17, 251-261.
9. **Jobling, S.A., Westcott, R.J., Tayal, A., Jeffcoat, R., Schwall, G.P. (2002)** Production of a freeze-thaw-stable potato starch by antisense inhibition of three starch synthase genes. *Nat. Biotechnol* 20, 295-299.
10. **Shewmaker, C.K., Boyer, C.D., Wiesenborn, D.P., Thompson, D.B., Boersig, M.R., Oakes, J.V., Stalker, D.M. (1994)** Expression of *Escherichia coli* glycogen synthase in the tubers of transgenic potatoes results in a highly branched starch. *Plant Physiol.* 104, 1159-1166.
11. **Lloyd, J.R., Landschütze, V., Kossmann, J. (1999)** Simultaneous antisense inhibition of two starch-synthase isoforms in potato tubers leads to accumulation of grossly modified amylopectin. *Biochem. J.* 338, 515-521.
12. **Abel, G.J.W., Springer, F., Willmitzer, L., Kossmann, J. (1996)** Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a novel 139 kDa starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* 10, 981-991.
13. **Zhang, X., Myers, A.M., James, M.G. (2005)** Mutations affecting starch synthase III in *Arabidopsis* alter leaf starch structure and increase the rate of starch synthesis. *Plant Physiol.* 138, 663-674.
14. **Karimi, M., Inze, D., Depicker, A (2002)** GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7: 193-195.
15. **Rocha-Sosa, M., Sonnewald, U., Frommer, W., Stratmann, M., Schell, J., Willmitzer, L. (1989)** Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatine gene. *EMBO J.* 8, 23-29.
16. **Clough, S.J., Bent, A.F. (1998)** Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735-43.
17. **Morán-Zorzano, M.T., Alonso-Casajús, N., Muñoz, F.J., Viale, A.M., Baroja-Fernández, Eydallin G., Pozueta-Romero, J. (2007)** Occurrence of more than one important source of ADPglucose linked to glycogen biosynthesis in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *FEBS Lett.* 581, 4423-4429
18. **Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979)** "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la obtención de plantas transgénicas con alto contenido y rendimiento en almidón y biomasa, **caracterizado** por la transformación de la planta silvestre con un vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para una enzima con actividad SSIV y la expresión de dicha secuencia nucleotídica en el interior de la planta transformada.
- 10 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el nivel de expresión de SSIV en el interior de la planta transformada es al menos 2 veces superior al nivel de expresión de SSIV de la planta silvestre.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la secuencia nucleotídica comprendida en el vector de expresión utilizado para transformar la planta silvestre es la SEQ ID NO: 3 que codifica para la SEQ ID NO: 4.
- 15 4. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el vector de expresión utilizado para transformar la planta es *Agrobacterium tumefaciens* DSM 19675 que comprende el plásmido pK2GW7,0.AtSSIV.
- 20 5. Célula transformada con un vector de expresión, preferentemente un plásmido, que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para una proteína o un fragmento proteico con actividad SSIV.
6. Célula, según la reivindicación 5, transformada con un vector de expresión seleccionado entre: *Agrobacterium tumefaciens* DSM 19675, plásmido pET-AtSSIV o plásmido pGEX-4T3_FragSSIV.
- 25 7. Célula vegetal, según la reivindicación 6, **caracterizada** por haber sido transformada con *Agrobacterium tumefaciens* DSM 19675 y pertenecer a cualquiera de las siguientes especies de plantas: patata (*Solanum tuberosum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), cebada (*Hordeum vulgare*), arroz (*Oryza sativa*), maíz (*Zea mays*) o arábido (*Arabidopsis thaliana*).
- 30 8. Célula bacteriana, según la reivindicación 6, **caracterizada** por haber sido transformada con un plásmido bacteriano seleccionado entre: pET-AtSSIV o pGEX-4T3_FragSSIV y pertenecer a una cepa de *E. coli* seleccionada entre: BL21(DE3), BL21(DE3)AglgAP o BL21(DE3)AglgCAP.
- 35 9. Vector de expresión *Agrobacterium tumefaciens* DSM 19675 **caracterizado** por comprender el plásmido pK2GW7,0-AtSSIV que codifica para una enzima con actividad SSIV.
10. Plásmido pET-AtSSIV **caracterizado** por codificar para una enzima con actividad SSIV.
- 40 11. Plásmido pGEX-4T3_FragSSIV **caracterizado** por codificar para un fragmento antigénico de una enzima con actividad SSIV.
12. Uso de las células bacterianas transformadas con el plásmido pET-AtSSIV de la reivindicación 8, para la producción de una enzima con actividad SSIV.
- 45 13. Uso de las células bacterianas transformadas con el plásmido pGEX-4T3_FragSSIV de la reivindicación 8, para la producción de anticuerpos frente a un fragmento específico de una enzima con actividad SSIV.
14. Uso de la célula de la reivindicación 6 para la producción de almidón y/o biomasa.
- 50 15. Planta transgénica vascular **caracterizada** por estar transformada con el vector de la reivindicación 9 y por poseer alto contenido y rendimiento en almidón y biomasa, en comparación con la planta silvestre sin transformar.
16. Planta transgénica, según la reivindicación 15, **caracterizada** por presentar un nivel de expresión de SSIV al menos 2 veces superior al observado en la planta silvestre sin transformar.
- 55 17. Planta transgénica, según la reivindicación 15, **caracterizada** porque su contenido en almidón y/o biomasa es al menos un 10% superior al contenido en almidón y/o biomasa de las plantas silvestres sin transformar.
- 60 18. Planta transgénica, según la reivindicación 15, seleccionada del grupo que comprende: patata (*Solanum tuberosum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), cebada (*Hordeum vulgare*), arroz (*Oryza sativa*), maíz (*Zea mays*) o arábido (*Arabidopsis thaliana*).
19. Uso de las plantas transgénicas de las reivindicaciones 15 a 18, para la producción de almidón y biomasa.

Figura 1

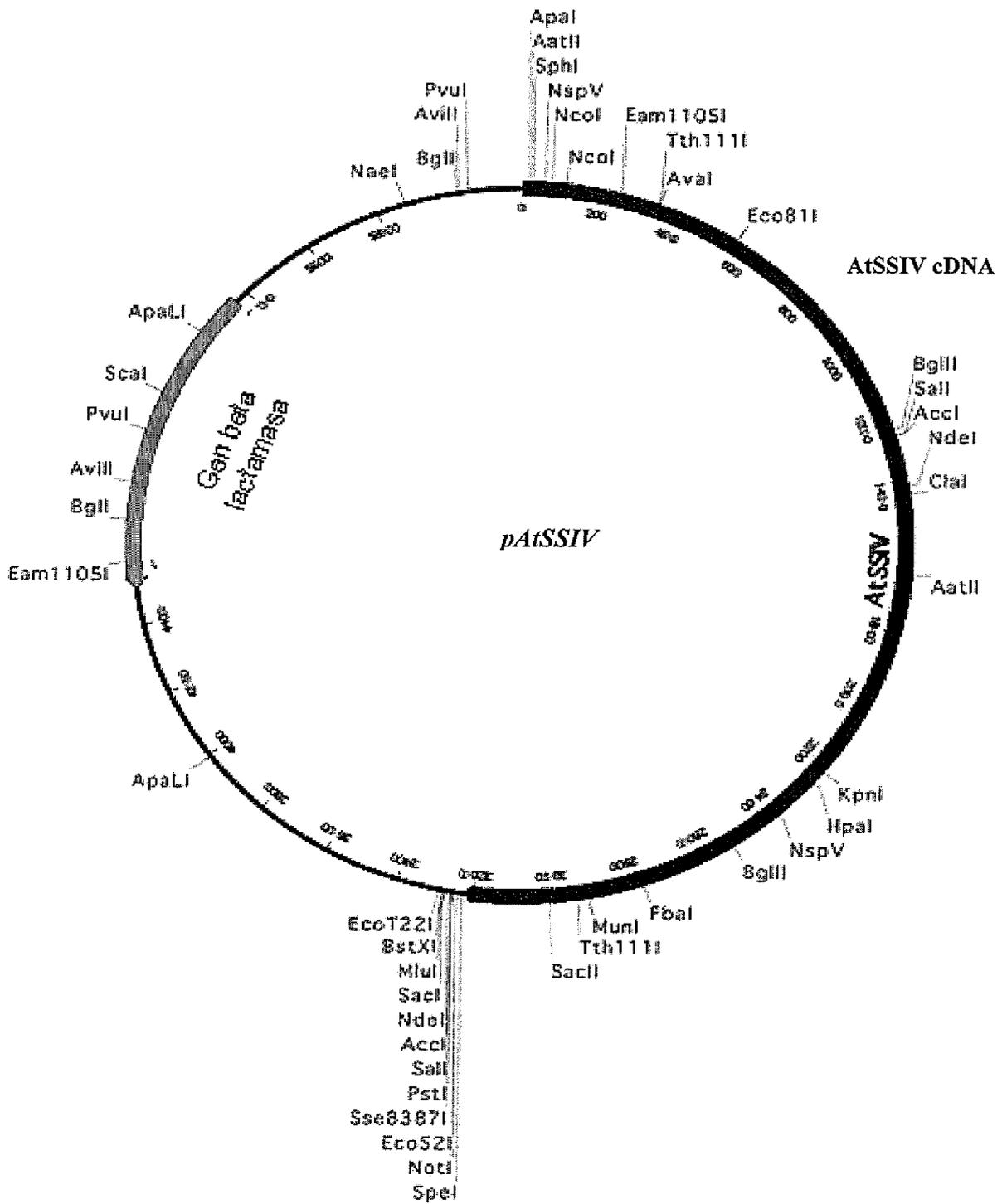


Figura 2b

	60	70	80	90	100
A.thaliana_GBSSI.pep					
A.thaliana_SSI.pep					
A.thaliana_SSIi.pep					
A.thaliana_SSIii.pep	K L P A A K V D V Q K Q S S V V L N E R N V L D R S D I E D G S D R R L D K K T T D D D L L E Q K L				
A.thaliana_SSIv.pep	E H G S S R R F F Y L P S R R L V S T S C K M R Q Q R G F D S S K R Q E V K K G S P K P I L S I N S				
	160	170	180	190	200
A.thaliana_GBSSI.pep					
A.thaliana_SSI.pep					
A.thaliana_SSIi.pep					
A.thaliana_SSIii.pep	N N E P D V L I M G A F N E W R W K S F T R R L E K T W I H E D W L S C L L H I P K E A Y K M D F V				
A.thaliana_SSIv.pep	D I Q T T E V T R R K S K T A K K K G E S I H A T I D I G H D D G K N L D N I T V P E V A K A L S L				
	260	270	280	290	300
A.thaliana_GBSSI.pep					
A.thaliana_SSI.pep					
A.thaliana_SSIi.pep					
A.thaliana_SSIii.pep	R E R Q K E E K R R I E A Q K A A I E A D R A Q A K A E T Q K R R E L L Q P A I K K A V V S A E N V				
A.thaliana_SSIv.pep	L Q G E I N V L E M K L S E T D E R I K T A A Q E K A H V E L L E E Q L E K L R H E M I S P I E S D				

Figura 2d

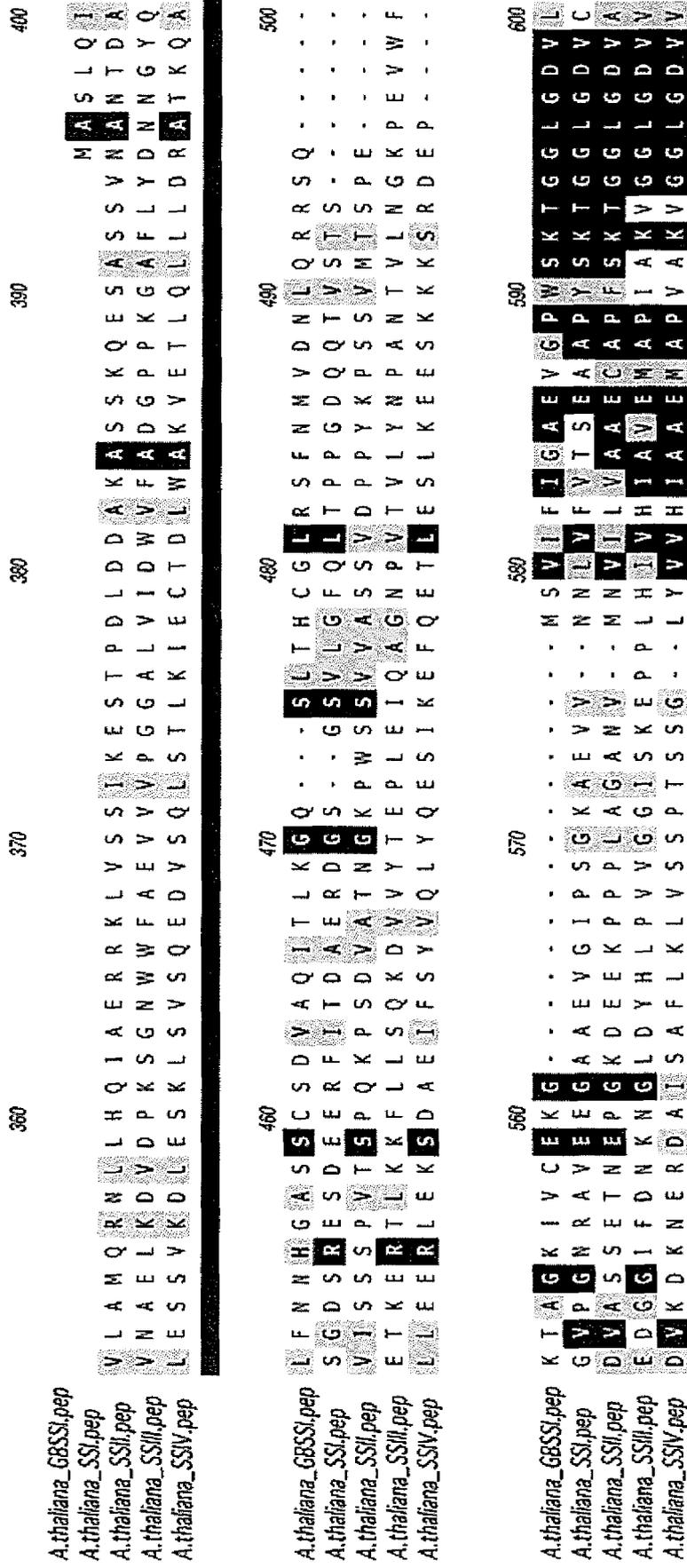


Figura 2e

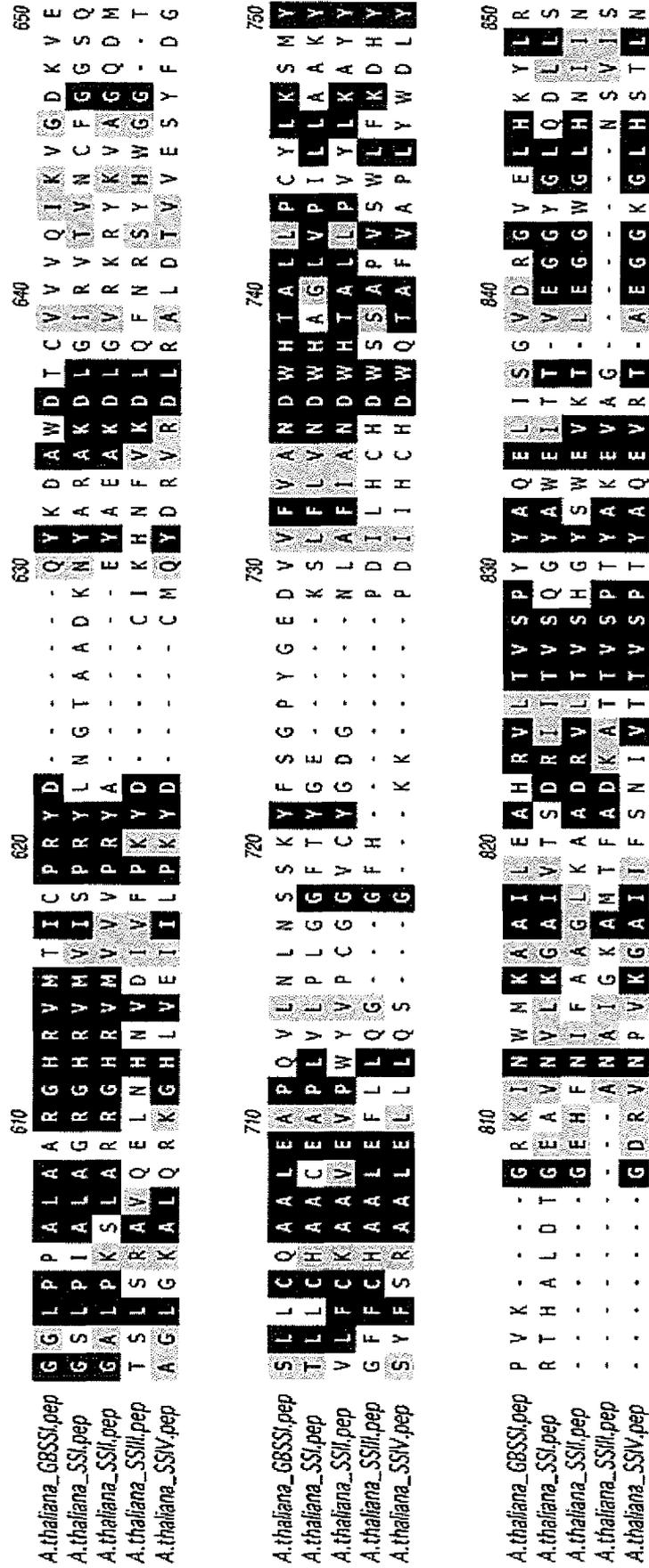


Figura 2f

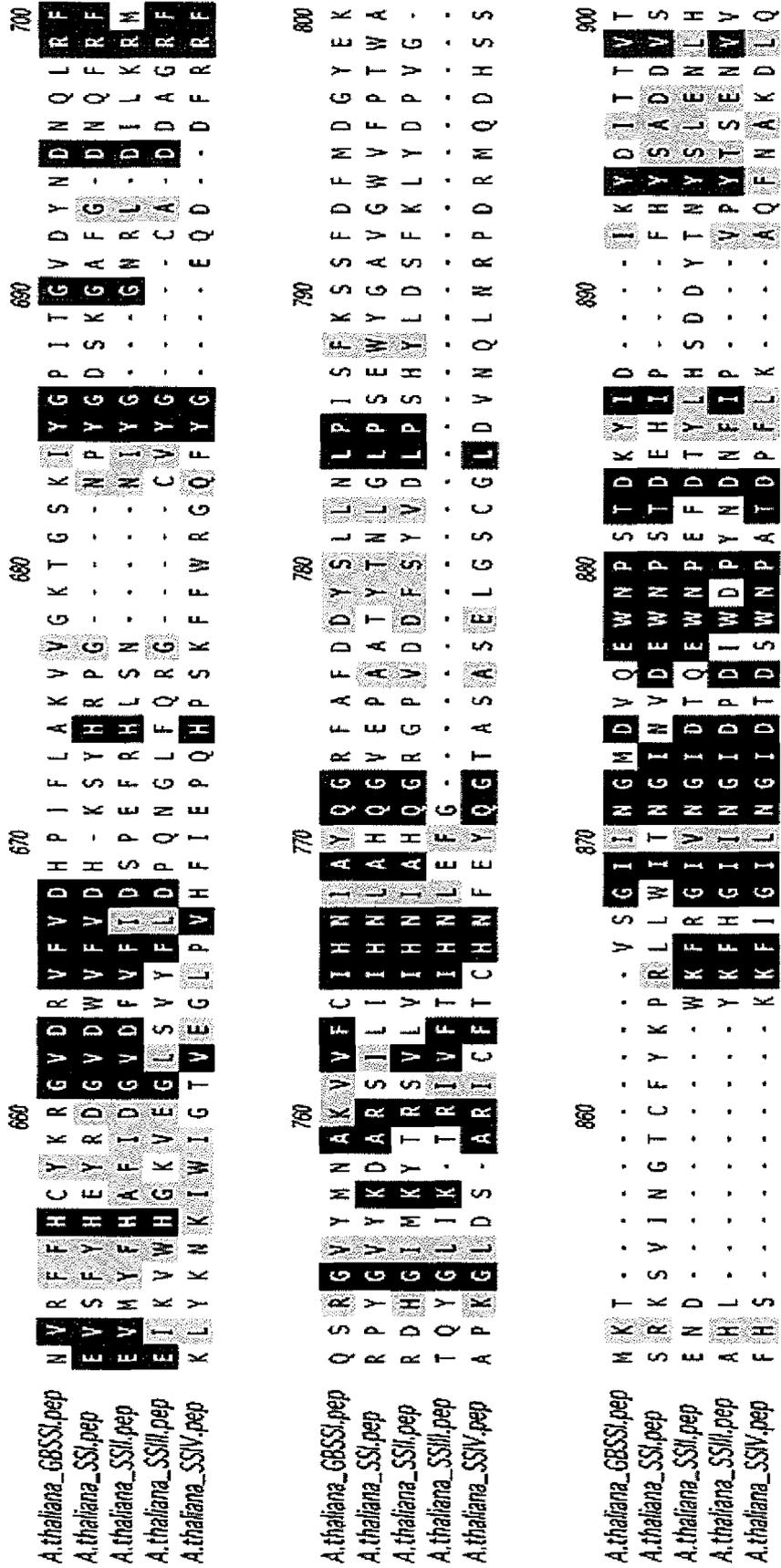


Figura 2g

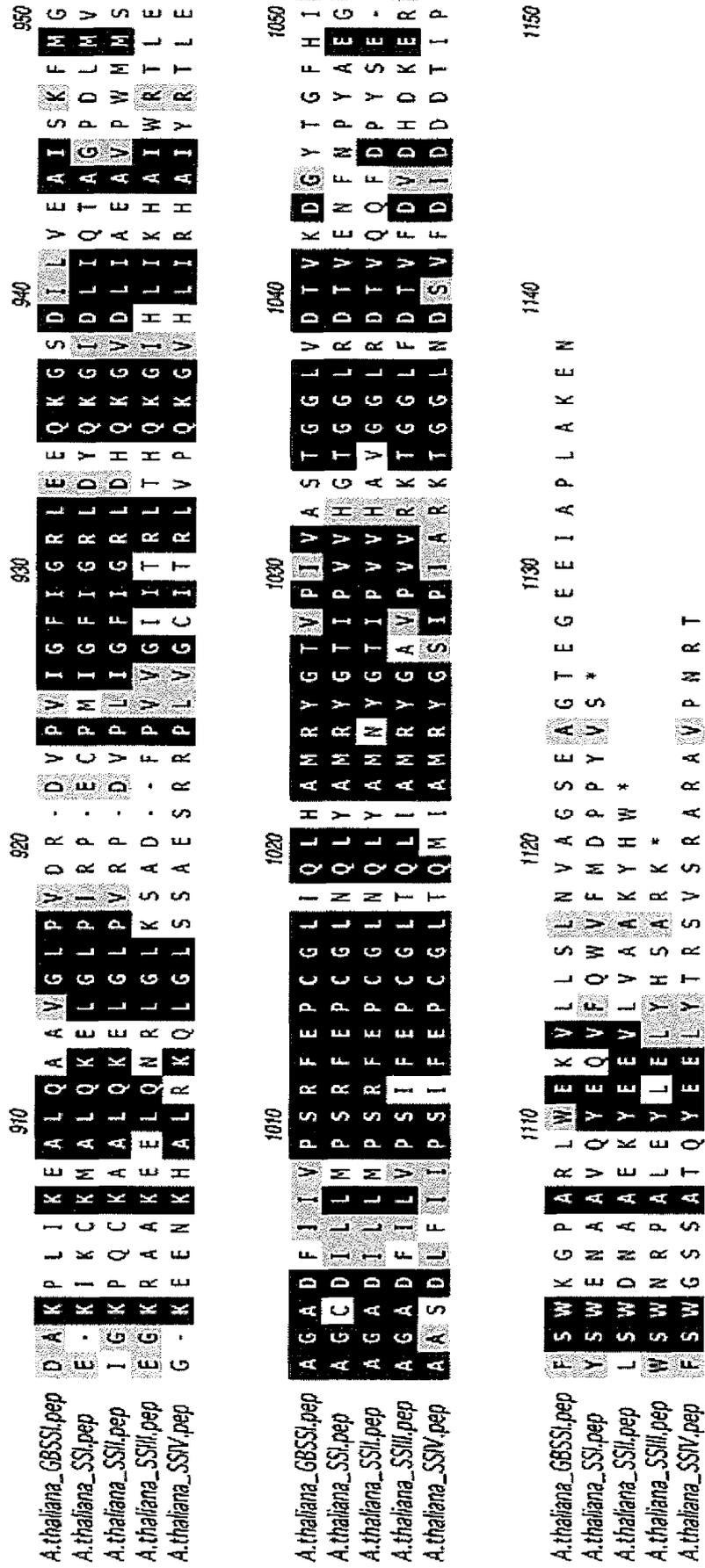


Figura 2h

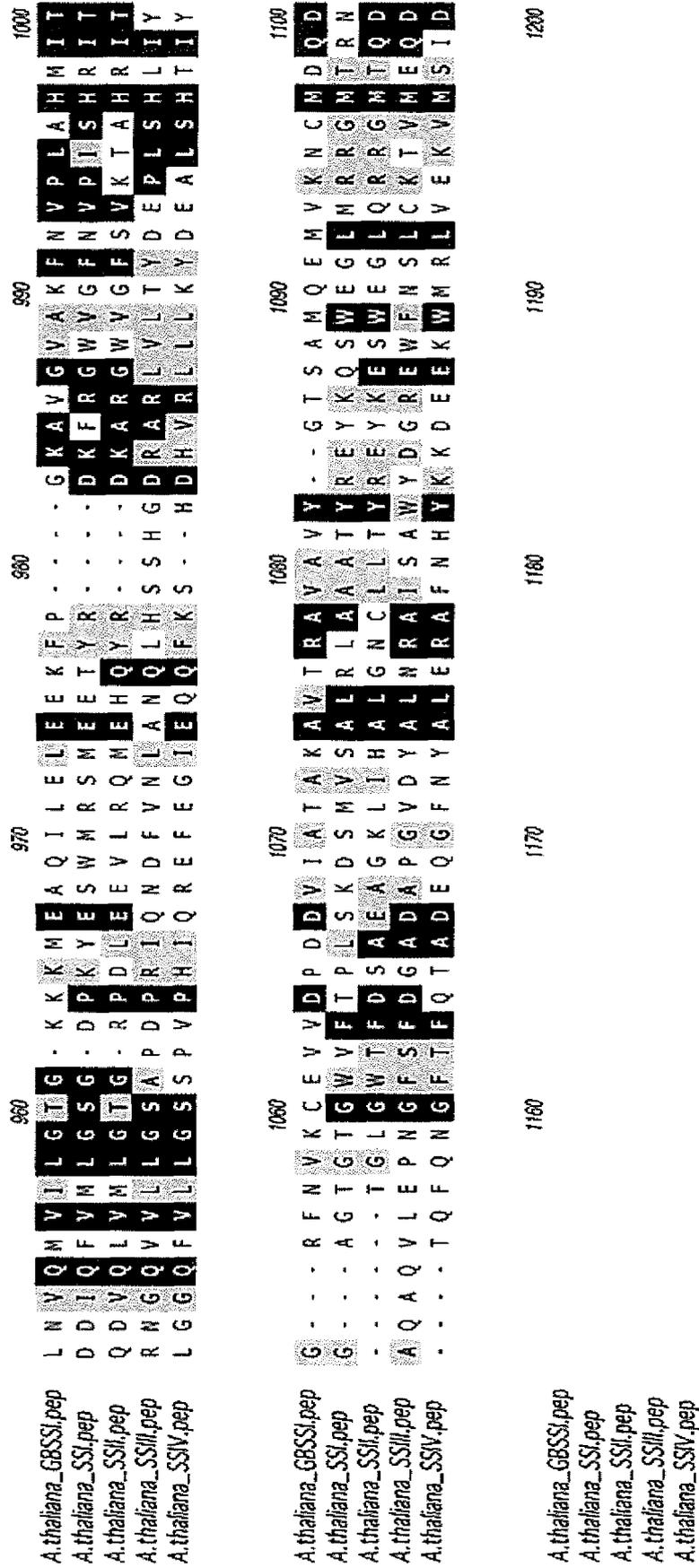


Figura 3

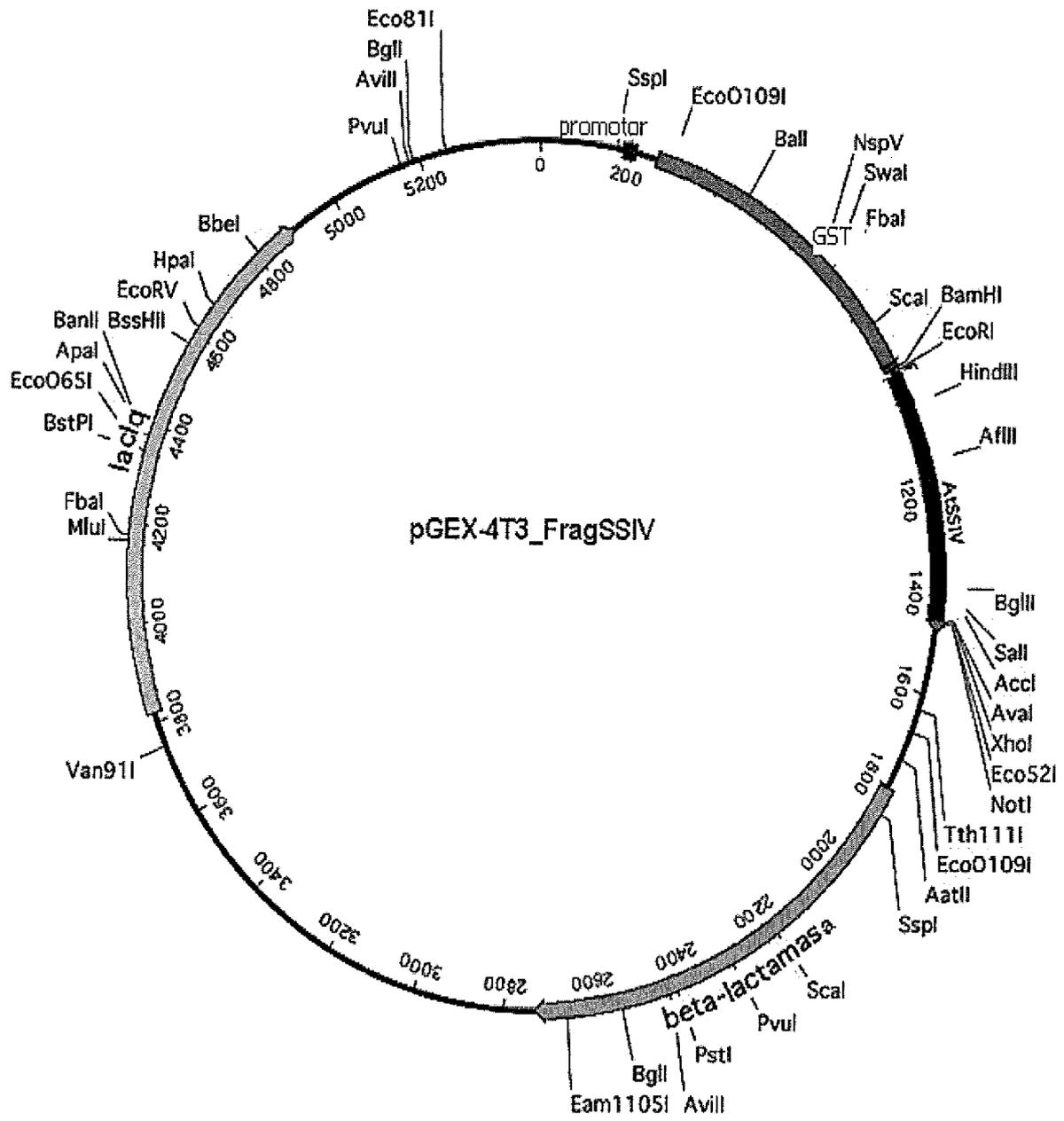


Figure 4

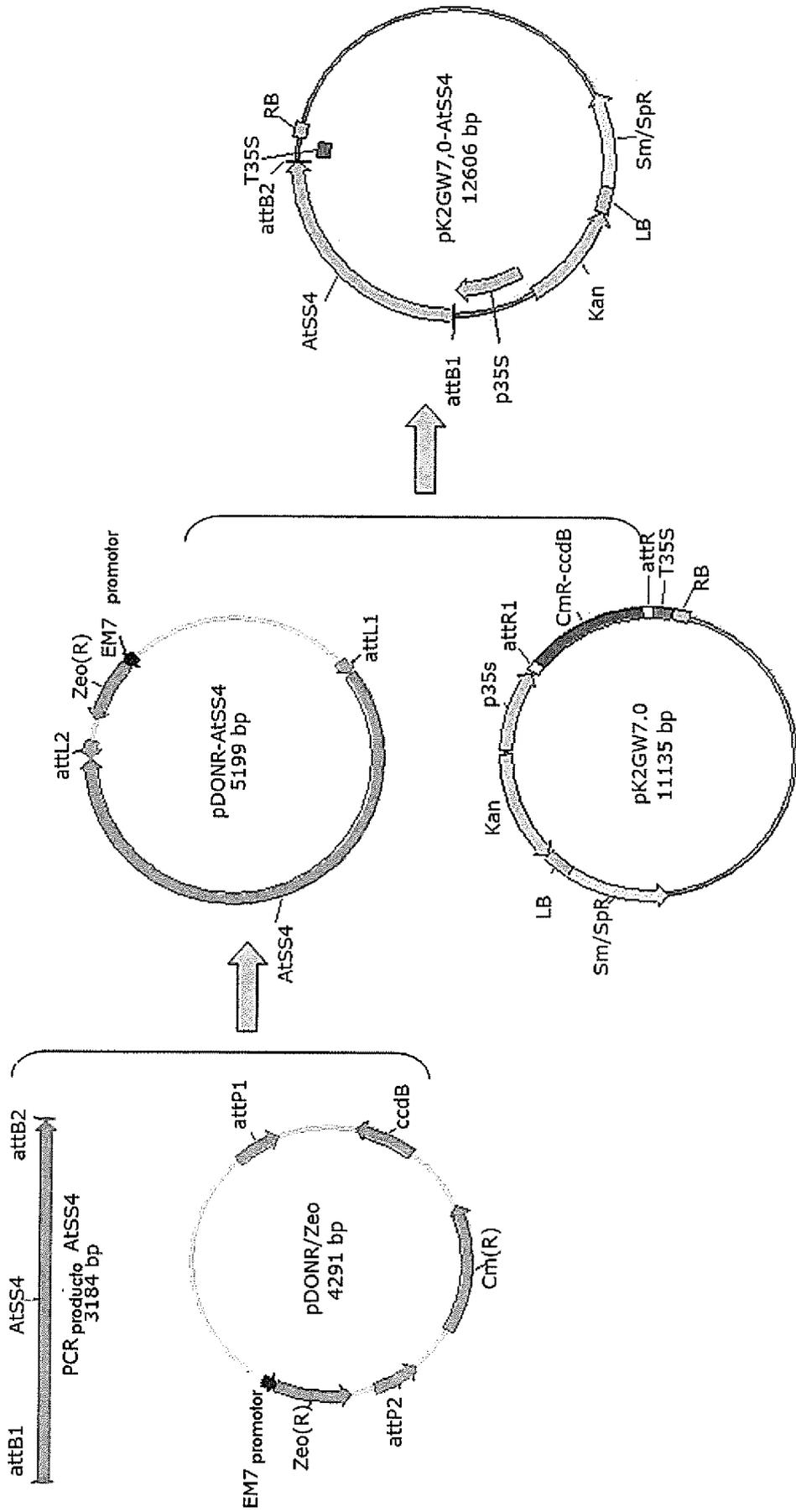


Figura 5

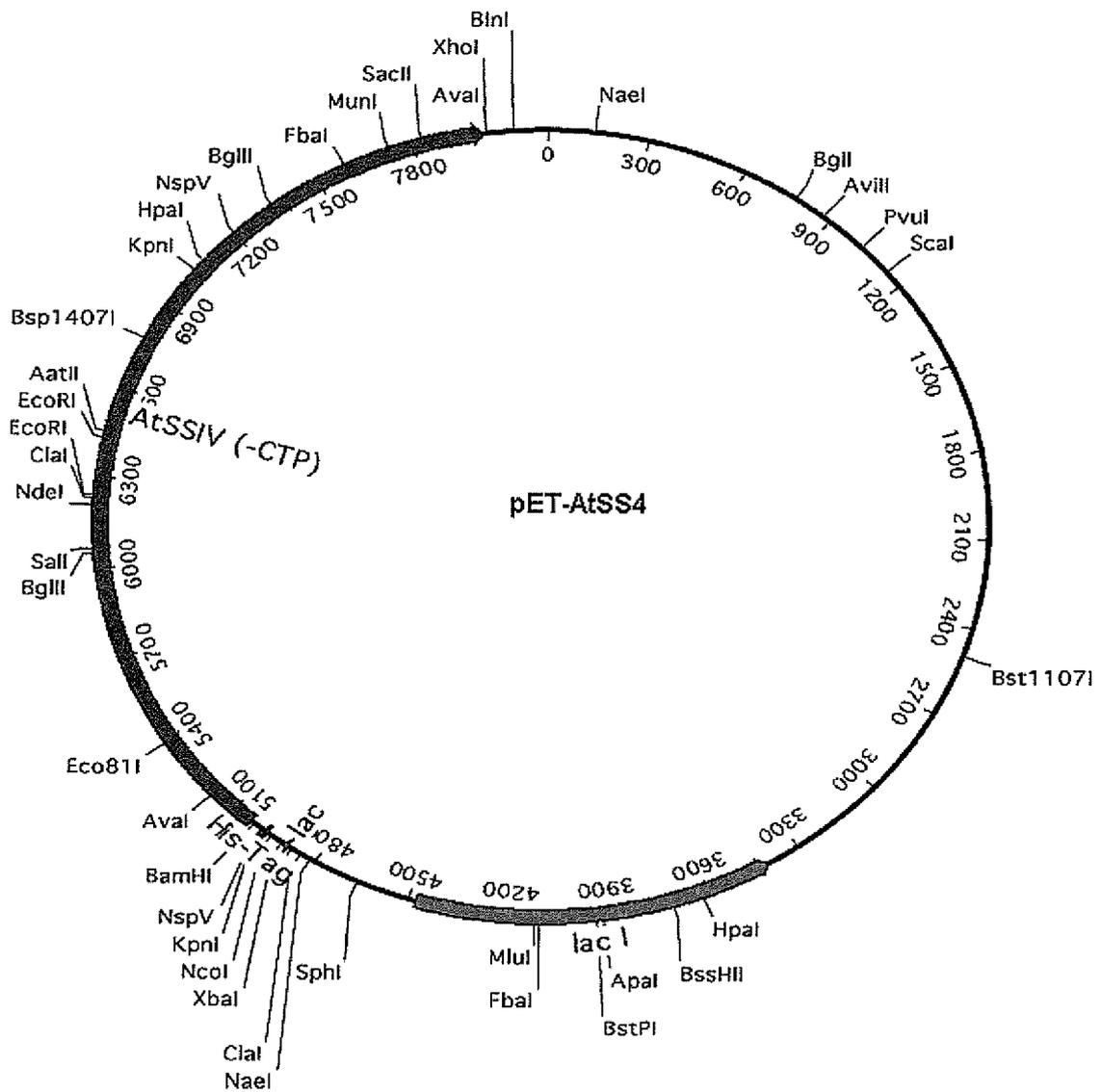


Figura 6

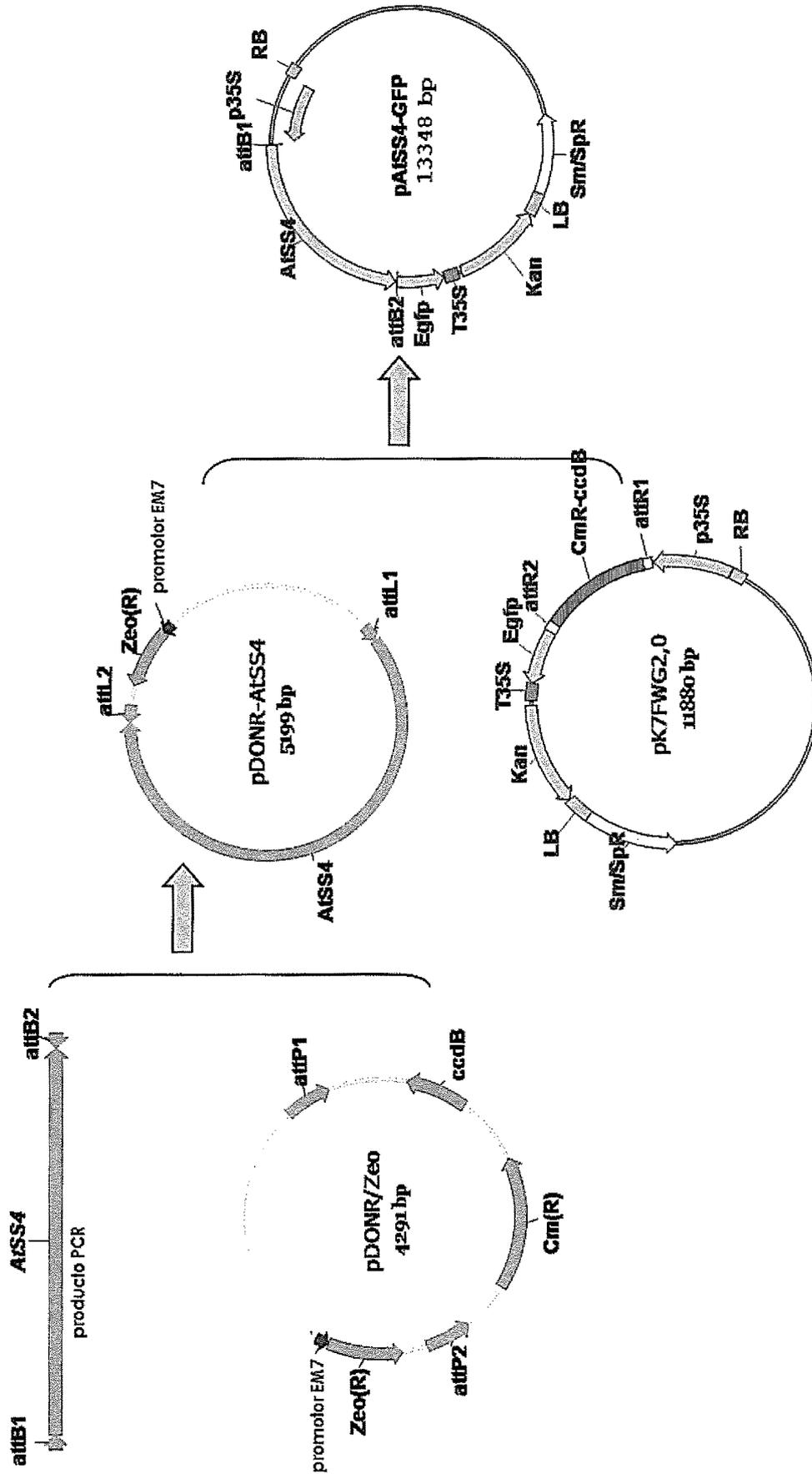


Figura 7

Control AtSS4

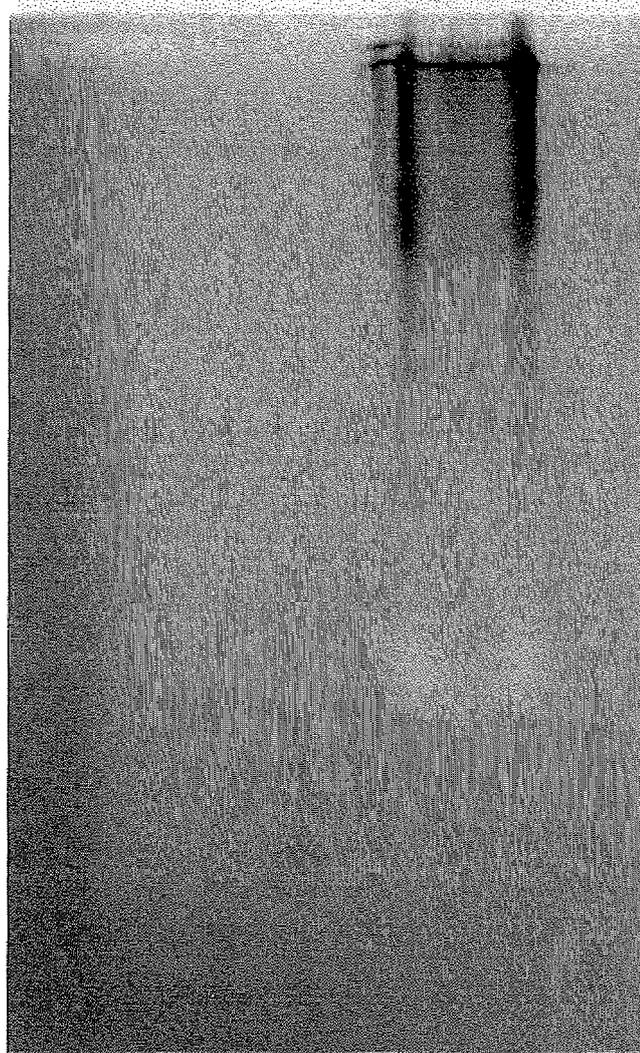


Figura 8

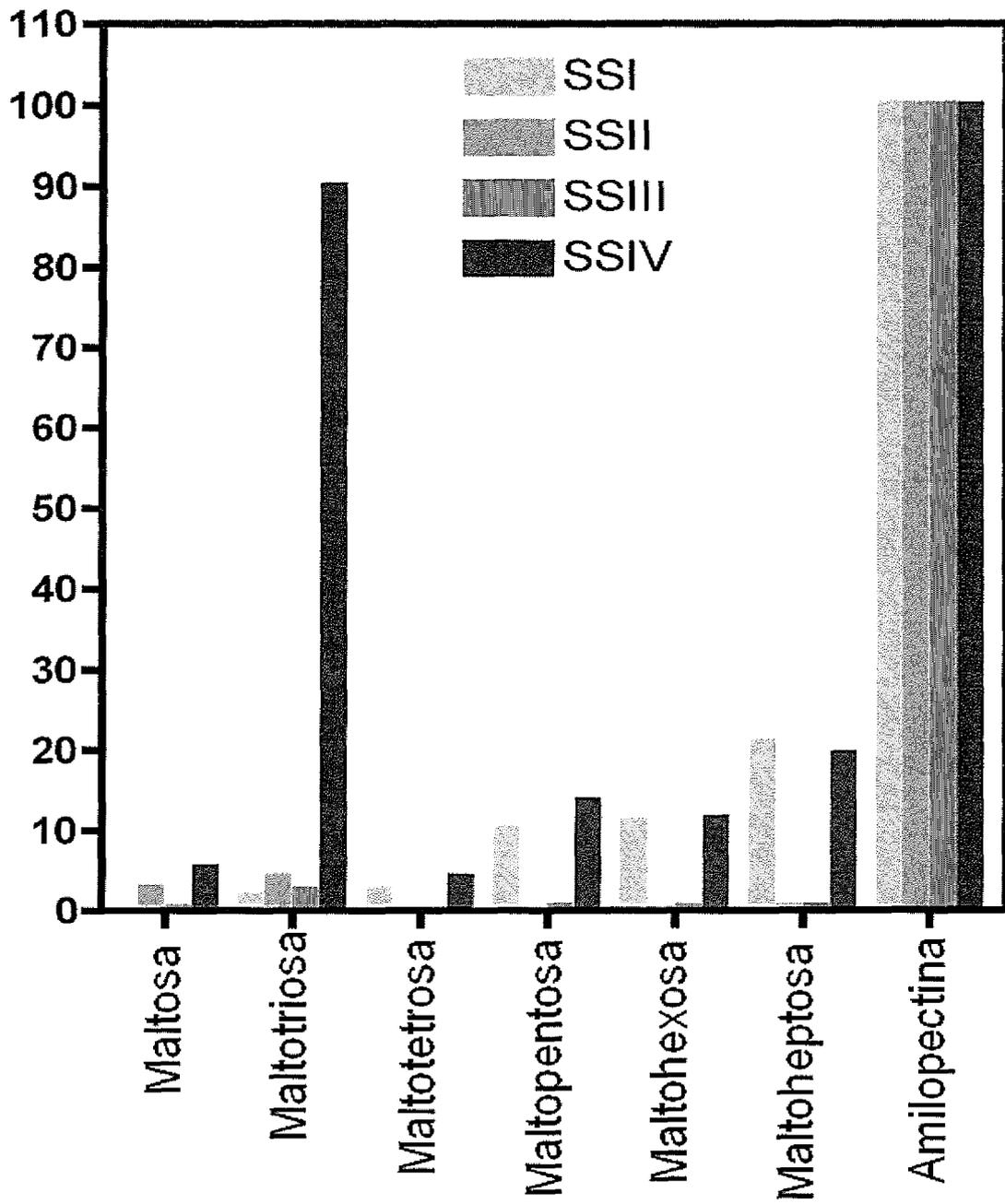


Figura 9

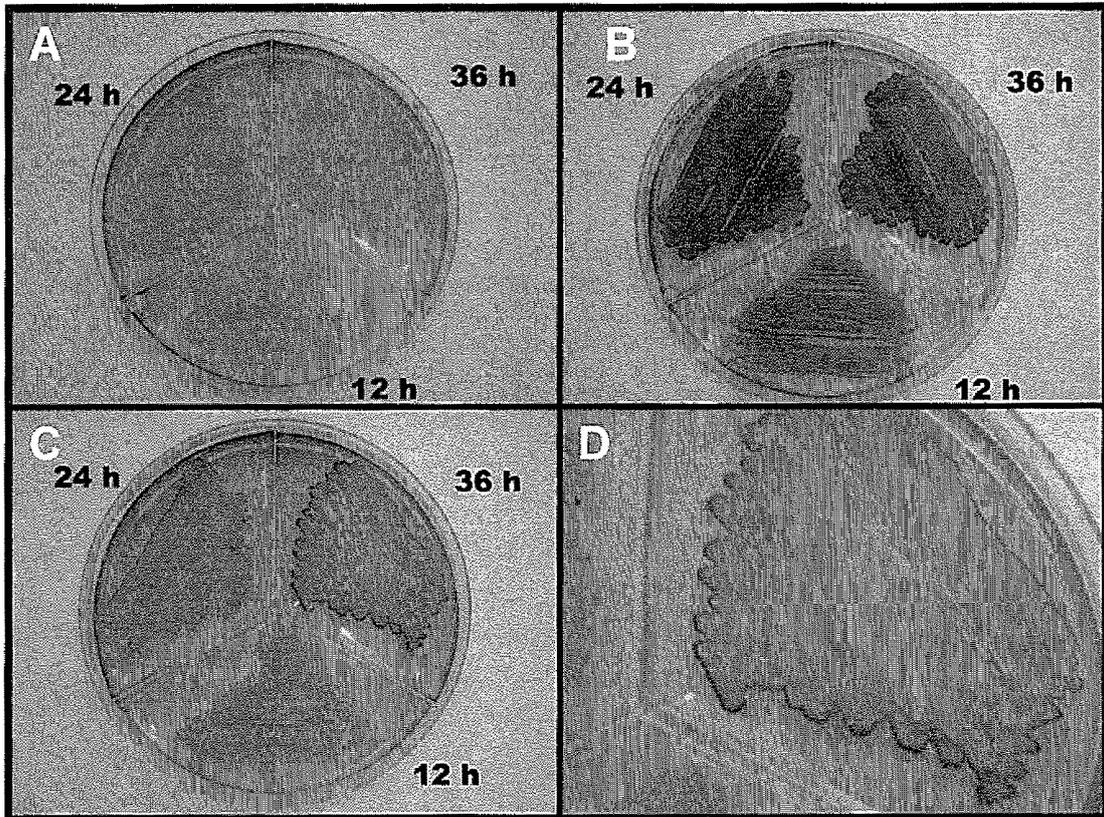


Figura 10

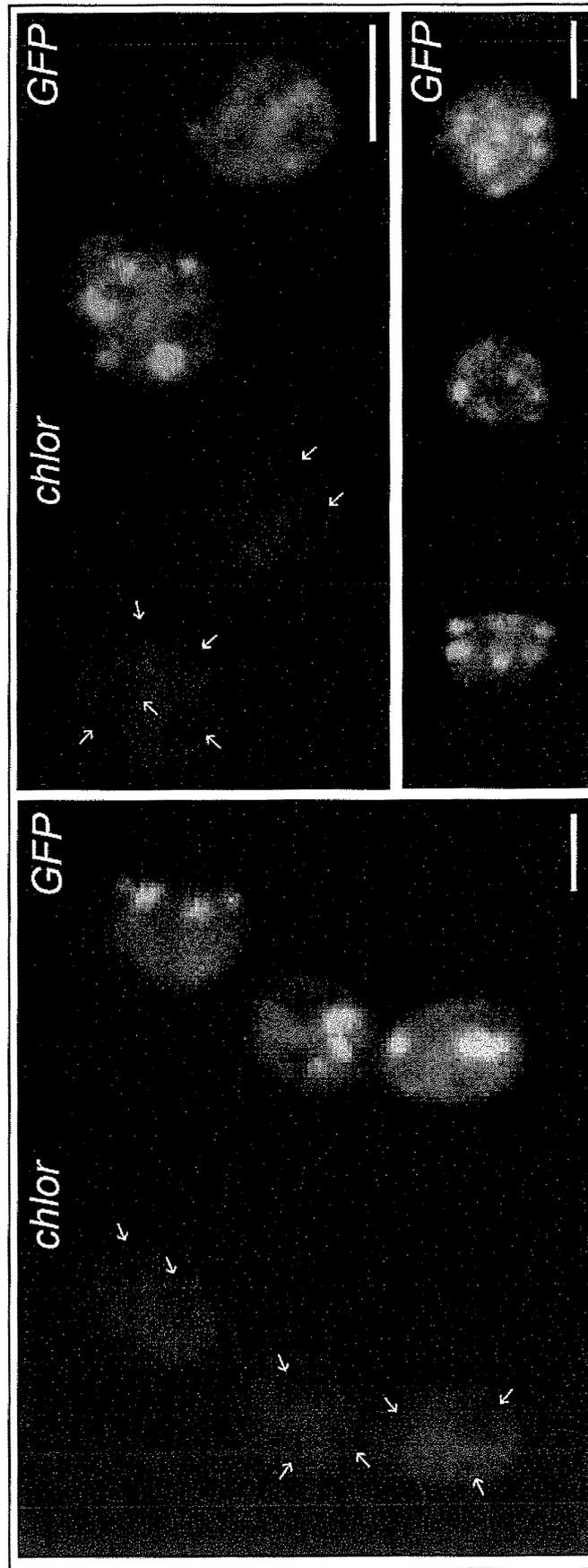
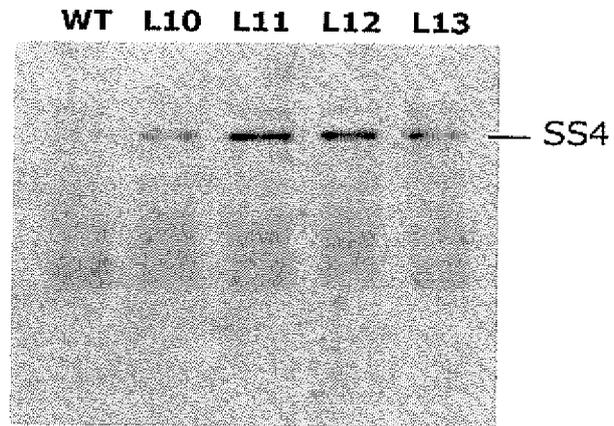
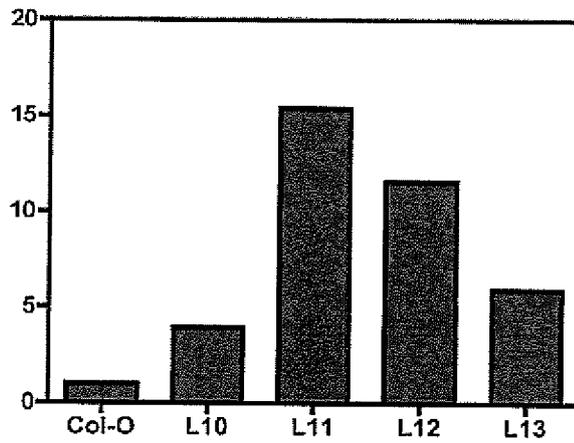


Figura 11

A



B



C

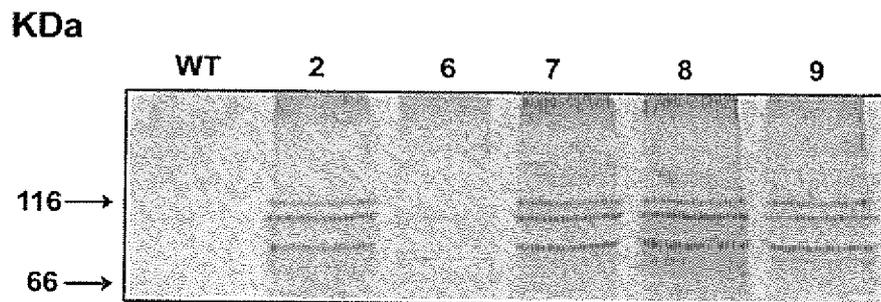


Figura 12

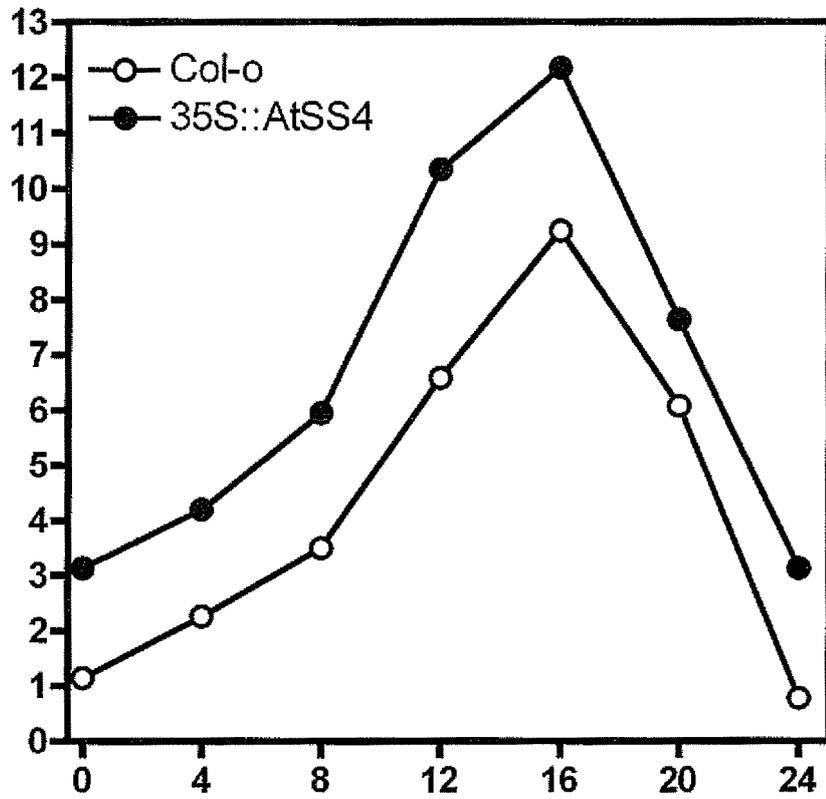


Figura 13

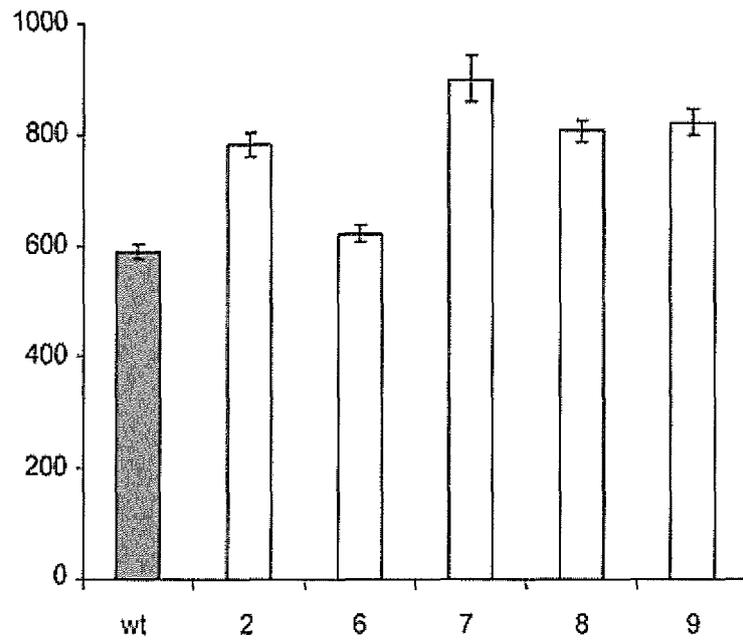
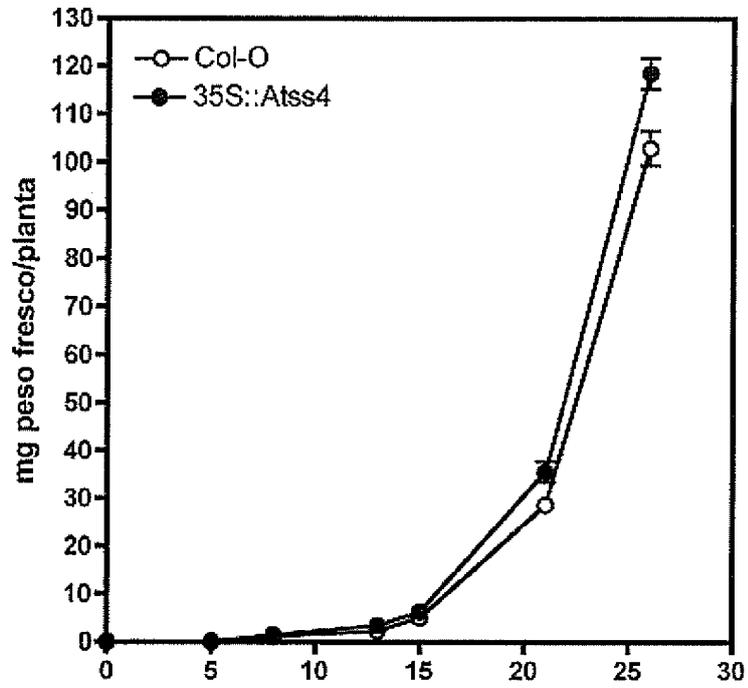


Figura 14

A



B



LISTA DE SECUENCIAS

<110> IDEN BIOTECHNOLOGY

5 <120> PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS QUE PRESENTAN ALTO
CONTENIDO Y RENDIMIENTO EN ALMIDÓN Y BIOMASA

10 <130> P-02874

<160> 6

15 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 69

20 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Cebador ATSSIV_Directo 5'-3'

<400> 1

30 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgaaggagat agaaccatgg cgacgaagct 60

atcgagctt 69

35 <210> 2

<211> 54

<212> DNA

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador ATSSIV_Inverso 5'-3'

45 <400> 2

ggggaccact ttgtacaaga aagctggggtt cacgtgcat taggaacagc tctt 54

50 <210> 3

<211> 3123

<212> DNA

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> AtASS4 5'-3'

60

65

ES 2 354 897 B1

<400> 3

5 atgacgacga agctatcgag cttctgtttc ttaacccatg gattagcagg aatctcctgc 60
gagagagaac atggaagttc tcgtcgatth ttctatctcc cttctcgtcg attagtttct 120
acttcgtgta agatgacgaca acaacgtggt ttcgactcta gtaaaagaca agaggtcaag 180
10 aaaggctccc ctaaaccgat cctatctata aattcaggtc ttcagagcaa caatgatgag 240
gaatctgatc tggagaatgg ttctgcggac agtgtcccga gtcttaagtc agatgctgaa 300
15 aagggtagta gtattcatgg cagcatagat atgaatcatg ctgatgagaa tcttgaaaag 360
aaagatgata taaaacaac tgaagttact cggcgcaaga gtaaaactgc aaagaagaaa 420
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

ES 2 354 897 B1

	ggggagagta ttcatgctac gattgatatt ggacatgatg atgggaagaa tttagataat	480
	attactgtgc ctgaggttgc aaaagctttg tcccttaaca aaagtgaagg cgagcagatt	540
5	tcagatggac agtttgggga actaatgaca atgataagaa gtgcagaaaa aatattctt	600
	cggcttgatg aagcacgggc cactgctctt gacgacctta acaagattct tagtgataag	660
10	gaagcgttgc agggagaaaat caatgtcttg gaaatgaaat tgtctgagac tgatgaaagg	720
	attaaactg ctgctcaaga gaaagcacat gtagagcttc tggaagaaca gttagagaag	780
15	cttcgtcatg aatgatctc ccctatagaa agtgatggtt atgttctagc tcttagcaaa	840
	gagcttgaaa cattgaagct ggagaatcta tctttgagaa acgatataga aatgcttaag	900
20	tcagaacttg acagtgttaa agataccggg gaacgtgtgg ttgtggttga aaaggagtgc	960
	tccggtttgg aatcttctgt aaaggatttg gaatctaagt tatcggtttc tcaggaagat	1020
	gtctcgcagc tttctactct taaaatcgaa tgactgatc tatgggcgaa ggtagagact	1080
25	ctacagctgt tgttagatag agctaccaa caagcagagc aagcagttat agtgttacaa	1140
	cagaaccaag atctaagaaa taaggtcgac aaaattgagg aatcacttaa agaagccaac	1200
30	gtttataaag aatcttcaga gaaaattcaa cagtacaatg agctaatagca acataaggtg	1260
	acattacttg aggagcggct cgaaaagtct gatgcagaga tattctcata tgttcagtta	1320
35	tatcaagaat cgataaaaga attccaggaa aacttgaaa gtttgaagga agaaagcaag	1380
	aaaaaatcaa gagatgaacc ggttgatgat atgccttggg attattggag tcggttactt	1440
40	ttaactgttg atggatggct gcttgaaaag aaaatagcaa gcaacgatgc tgacttactg	1500
	agagacatgg tatggaagaa agatcgaaga attcatgata cctatattga cgtcaaagat	1560
	aagaatgaac gtgatgccat ctctgcattt ctcaagcttg tctcatctcc aacaagttca	1620
45	ggattgtatg tcgttcacat tgcagctgag atggcacctg tagctaaggt gggaggtttg	1680
	ggagatgttg tggcaggtct tggtaaggca ttgcaaagaa aaggtcatct ggtggagatt	1740
50	attcttccca aatatgactg tatgcagtat gatcgcgtgc gtgacttaag ggctttggat	1800
	actgttgtgg agtcatattt tgatgggaag ttatataaaa acaaaatctg gattggcact	1860
55	gttgaagggt tacctgtaca tttcattgaa cctcaacatc caagcaaatt cttctggaga	1920
	ggacagtttt atggagagca agatgatttc agacgcttct cgtatttttag ccgagctgca	1980
60	ctagagttgc ttcttcagtc cggcaaaaaa cccgacatca tacattgtca tgactggcaa	2040
	acagcttttg ttgcgccgct gtattgggat ctgtatgctc caaagggatt agattctgca	2100
	agaatatgct ttacatgtca taattttgag tatcaaggta ccgctctgc ttcagaattg	2160
65	ggatcttgcg ggcttgatgt taaccagtta aatagaccag acagaatgca ggatcactcg	2220

ES 2 354 897 B1

tctggagata gagtcaatcc tgtaagggc gctataatth tctcaaacat tgtaacaacc 2280
 gtgtccccta cttatgcaca agaagttcga acagctgagg gaggaaaagg actccattca 2340
 5 acaactcaatt ttcactccaa gaaattcatt ggaatcctca acggcattga cacagattca 2400
 tggaatcctg ccaccgaccc ctctctcaag gctcagttca acgctaaaga tctacaaggg 2460
 aaagaagaaa acaaacacgc ccttagaaaag cagcttggac tttcttcagc ggagtcaaga 2520
 10 cggcctttgg ttggttgcac aacaagatta gtaccacaga aaggagttca tctaatacaga 2580
 catgccatat acagaacatt agagttaggt ggacaatttg tacttcttgg ttctagcccg 2640
 15 gttccacata ttcagagggg atttgaaggt attgaacaac agtttaaaag ccatgatcat 2700
 gtccggttgt tactgaagta cgatgaagct ctgtctcata cgatttacgc agcctccgat 2760
 ttgttcatca ttccgtcaat ttttgagcct tgtggactta cacagatgat cgctatgaga 2820
 20 tatggctcca ttccaattgc gcgaaaaact ggaggcttaa atgacagtgt cttcgacatt 2880
 gatgatgata caataccaac acagtttcaa aatggattta catttcaaac cgcggacgaa 2940
 25 cagggtttca attatgcggt ggagcgagca tttaatcact acaagaaaga tgaagagaaa 3000
 tggatgagac ttgtagagaa agtgatgagt atagatttca gctggggatc atcagctaca 3060
 caatacgaag aactctacac gagatcagtg tccagagcaa gagctgttcc taatcgcacg 3120
 30 tga 3123

<210> 4

35 <211> 1040

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40 <220>

<223> AtASS4

45 <400> 4

Met Thr Thr Lys Leu Ser Ser Phe Cys Phe Leu Thr His Gly Leu Ala
 1 5 10 15
 Gly Ile Ser Cys Glu Arg Glu His Gly Ser Ser Arg Arg Phe Phe Tyr
 20 25 30
 Leu Pro Ser Arg Arg Leu Val Ser Thr Ser Cys Lys Met Arg Gln Gln
 35 40 45
 Arg Gly Phe Asp Ser Ser Lys Arg Gln Glu Val Lys Lys Gly Ser Pro
 50 55 60
 Lys Pro Ile Leu Ser Ile Asn Ser Gly Leu Gln Ser Asn Asn Asp Glu
 65 70 75 80

65

ES 2 354 897 B1

5 Glu Ser Asp Leu Glu Asn Gly Ser Ala Asp Ser Val Pro Ser Leu Lys
 85 90 95

 10 Ser Asp Ala Glu Lys Gly Ser Ser Ile His Gly Ser Ile Asp Met Asn
 100 105 110

 15 His Ala Asp Glu Asn Leu Glu Lys Lys Asp Asp Ile Gln Thr Thr Glu
 115 120 125

 20 Val Thr Arg Arg Lys Ser Lys Thr Ala Lys Lys Lys Gly Glu Ser Ile
 130 135 140

 25 His Ala Thr Ile Asp Ile Gly His Asp Asp Gly Lys Asn Leu Asp Asn
 145 150 155 160

 30 Ile Thr Val Pro Glu Val Ala Lys Ala Leu Ser Leu Asn Lys Ser Glu
 165 170 175

 35 Gly Glu Gln Ile Ser Asp Gly Gln Phe Gly Glu Leu Met Thr Met Ile
 180 185 190

 40 Arg Ser Ala Glu Lys Asn Ile Leu Arg Leu Asp Glu Ala Arg Ala Thr
 195 200 205

 45 Ala Leu Asp Asp Leu Asn Lys Ile Leu Ser Asp Lys Glu Ala Leu Gln
 210 215 220

 50 Gly Glu Ile Asn Val Leu Glu Met Lys Leu Ser Glu Thr Asp Glu Arg
 225 230 235 240

 55 Ile Lys Thr Ala Ala Gln Glu Lys Ala His Val Glu Leu Leu Glu Glu
 245 250 255

 60 Gln Leu Glu Lys Leu Arg His Glu Met Ile Ser Pro Ile Glu Ser Asp
 260 265 270

 65 Gly Tyr Val Leu Ala Leu Ser Lys Glu Leu Glu Thr Leu Lys Leu Glu
 275 280 285

 70 Asn Leu Ser Leu Arg Asn Asp Ile Glu Met Leu Lys Ser Glu Leu Asp
 290 295 300

 75 Ser Val Lys Asp Thr Gly Glu Arg Val Val Val Leu Glu Lys Glu Cys
 305 310 315 320

ES 2 354 897 B1

Ser Gly Leu Glu Ser Ser Val Lys Asp Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val
 325 330 335
 5
 Ser Gln Glu Asp Val Ser Gln Leu Ser Thr Leu Lys Ile Glu Cys Thr
 340 345 350
 10
 Asp Leu Trp Ala Lys Val Glu Thr Leu Gln Leu Leu Leu Asp Arg Ala
 355 360 365
 15
 Thr Lys Gln Ala Glu Gln Ala Val Ile Val Leu Gln Gln Asn Gln Asp
 370 375 380
 20
 Leu Arg Asn Lys Val Asp Lys Ile Glu Glu Ser Leu Lys Glu Ala Asn
 385 390 395 400
 25
 Val Tyr Lys Glu Ser Ser Glu Lys Ile Gln Gln Tyr Asn Glu Leu Met
 405 410 415
 30
 Gln His Lys Val Thr Leu Leu Glu Glu Arg Leu Glu Lys Ser Asp Ala
 420 425 430
 35
 Glu Ile Phe Ser Tyr Val Gln Leu Tyr Gln Glu Ser Ile Lys Glu Phe
 435 440 445
 40
 Gln Glu Thr Leu Glu Ser Leu Lys Glu Glu Ser Lys Lys Lys Ser Arg
 450 455 460
 45
 Asp Glu Pro Val Asp Asp Met Pro Trp Asp Tyr Trp Ser Arg Leu Leu
 465 470 475 480
 50
 Leu Thr Val Asp Gly Trp Leu Leu Glu Lys Lys Ile Ala Ser Asn Asp
 485 490 495
 55
 Ala Asp Leu Leu Arg Asp Met Val Trp Lys Lys Asp Arg Arg Ile His
 500 505 510
 60
 Asp Thr Tyr Ile Asp Val Lys Asp Lys Asn Glu Arg Asp Ala Ile Ser
 515 520 525
 65
 Ala Phe Leu Lys Leu Val Ser Ser Pro Thr Ser Ser Gly Leu Tyr Val
 530 535 540
 Val His Ile Ala Ala Glu Met Ala Pro Val Ala Lys Val Gly Gly Leu
 545 550 555 560

ES 2 354 897 B1

Gly Asp Val Val Ala Gly Leu Gly Lys Ala Leu Gln Arg Lys Gly His
 565 570 575
 5
 Leu Val Glu Ile Ile Leu Pro Lys Tyr Asp Cys Met Gln Tyr Asp Arg
 580 585 590
 10
 Val Arg Asp Leu Arg Ala Leu Asp Thr Val Val Glu Ser Tyr Phe Asp
 595 600 605
 15
 Gly Lys Leu Tyr Lys Asn Lys Ile Trp Ile Gly Thr Val Glu Gly Leu
 610 615 620
 20
 Pro Val His Phe Ile Glu Pro Gln His Pro Ser Lys Phe Phe Trp Arg
 625 630 635 640
 25
 Gly Gln Phe Tyr Gly Glu Gln Asp Asp Phe Arg Arg Phe Ser Tyr Phe
 645 650 655
 30
 Ser Arg Ala Ala Leu Glu Leu Leu Leu Gln Ser Gly Lys Lys Pro Asp
 660 665 670
 35
 Ile Ile His Cys His Asp Trp Gln Thr Ala Phe Val Ala Pro Leu Tyr
 675 680 685
 40
 Trp Asp Leu Tyr Ala Pro Lys Gly Leu Asp Ser Ala Arg Ile Cys Phe
 690 695 700
 45
 Thr Cys His Asn Phe Glu Tyr Gln Gly Thr Ala Ser Ala Ser Glu Leu
 705 710 715 720
 50
 Gly Ser Cys Gly Leu Asp Val Asn Gln Leu Asn Arg Pro Asp Arg Met
 725 730 735
 55
 Gln Asp His Ser Ser Gly Asp Arg Val Asn Pro Val Lys Gly Ala Ile
 740 745 750
 60
 Ile Phe Ser Asn Ile Val Thr Thr Val Ser Pro Thr Tyr Ala Gln Glu
 755 760 765
 65
 Val Arg Thr Ala Glu Gly Gly Lys Gly Leu His Ser Thr Leu Asn Phe
 770 775 780
 His Ser Lys Lys Phe Ile Gly Ile Leu Asn Gly Ile Asp Thr Asp Ser
 785 790 795 800
 70
 Trp Asn Pro Ala Thr Asp Pro Phe Leu Lys Ala Gln Phe Asn Ala Lys

ES 2 354 897 B1

	805	810	815
5	Asp Leu Gln Gly Lys Glu Glu Asn Lys His Ala Leu Arg Lys Gln Leu 820 825 830		
10	Gly Leu Ser Ser Ala Glu Ser Arg Arg Pro Leu Val Gly Cys Ile Thr 835 840 845		
15	Arg Leu Val Pro Gln Lys Gly Val His Leu Ile Arg His Ala Ile Tyr 850 855 860		
20	Arg Thr Leu Glu Leu Gly Gly Gln Phe Val Leu Leu Gly Ser Ser Pro 865 870 875 880		
25	Val Pro His Ile Gln Arg Glu Phe Glu Gly Ile Glu Gln Gln Phe Lys 885 890 895		
30	Ser His Asp His Val Arg Leu Leu Leu Lys Tyr Asp Glu Ala Leu Ser 900 905 910		
35	His Thr Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Phe Ile Ile Pro Ser Ile Phe 915 920 925		
40	Glu Pro Cys Gly Leu Thr Gln Met Ile Ala Met Arg Tyr Gly Ser Ile 930 935 940		
45	Pro Ile Ala Arg Lys Thr Gly Gly Leu Asn Asp Ser Val Phe Asp Ile 945 950 955 960		
50	Asp Asp Asp Thr Ile Pro Thr Gln Phe Gln Asn Gly Phe Thr Phe Gln 965 970 975		
55	Thr Ala Asp Glu Gln Gly Phe Asn Tyr Ala Leu Glu Arg Ala Phe Asn 980 985 990		
60	His Tyr Lys Lys Asp Glu Glu Lys Trp Met Arg Leu Val Glu Lys Val 995 1000 1005		
65	Met Ser Ile Asp Phe Ser Trp Gly Ser Ser Ala Thr Gln Tyr Glu 1010 1015 1020		
70	Glu Leu Tyr Thr Arg Ser Val Ser Arg Ala Arg Ala Val Pro Asn 1025 1030 1035		
75	Arg Thr 1040		

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido 5'-3'

10

<400> 5

catatggaga actgatgaaa ggatt

25

15

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

20

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido 5'-3'

25

<400> 6

ctcgagtctt tataaacg

18

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930009

②② Fecha de presentación de la solicitud: 24.03.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/82** (01.01.2006)
A01H5/00 (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US 20030097688 A1 (ALLEN STEPHEN M. et al.) 22.05.2003, páginas 14,34.	5-12,14
Y	ROLDAN I, et al. The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of <i>Arabidopsis thaliana</i> suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. 2007. <i>The Plant Journal</i> . Vol. 49 (3), páginas 492-504. Página 493.	5-12,14
A	WO 2008012356 A1 (INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE-INRA.CSIC) 31.01.2008	1-19
A	DIAN WEIMIN, et al. Evolution and expression analysis of starch synthase III and IV in rice. 2005. <i>J. Exp. Bot.</i> Vol. 56 (412), páginas 623-632.	1-19

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
16.02.2011

Examinador
I. Rueda Molins

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A01H

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.02.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-19	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-4, 13, 15-19	SI
	Reivindicaciones 5-12,14	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 20030097688 A1 (ALLEN STEPHEN M. et al.), páginas 14,34.	22.05.2003
D02	ROLDAN I, et al. The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of <i>Arabidopsis thaliana</i> suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. <i>The Plant Journal</i> . Vol. 49 (3), páginas 492-504. Página 493.	2007
D03	WO 2008012356 A1 (INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE-INRA.CSIC).	31.01.2008.
D04	DIAN WEIMIN, et al. Evolution and expression analysis of starch synthase III and IV in rice. <i>J. Exp. Bot.</i> Vol. 56 (412), páginas 623-632.	2005

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud de patente divulga un procedimiento para la obtención de plantas transgénicas con alto contenido en almidón y biomasa.

El documento D01, que es el que refleja el estado de la técnica más cercano, muestra una construcción génica que presenta una secuencia que codifica para una determinada isoforma enzimática de la almidón sintasa (SS).

En el documento D02 se emplea el gen *AtSS4* (At4g18240), que codifica para una proteína con actividad SSIV, para la elaboración de mutantes de *Arabidopsis thaliana*.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículos 6 y 8 LP11/1986)

En la solicitud de patente se reivindica una célula transformada con determinados vectores de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para una proteína con actividad SSIV (reivindicaciones 5-8). Vectores de expresión y plásmidos que codifican para un enzima con actividad SSIV (reivindicaciones 9-11). Así como, diferentes usos de las células transformadas (reivindicaciones 12 y 14).

El documento D01 muestra (en el ejemplo 5 de la página 14 y en las reivindicaciones 1, 6-8 y 13 de la página 34) un método para transformar una célula con una secuencia nucleotídica que codifica para una proteína almidón sintasa, usos de dicha célula transformada y un vector de expresión que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica para dicha almidón sintasa.

Las diferencias entre la solicitud de patente y el documento D01 residen en que por un lado la secuencia nucleotídica para la cual codifica la célula transformada es diferente y por otro lado en que los vectores de expresión reivindicados no coinciden con los que muestra el documento D01. Teniendo en cuenta que la secuencia nucleotídica, para la cual codifica la célula transformada reivindicada en la solicitud de patente, está divulgada en la página 493 del documento D02, y que las diferencias entre los vectores reivindicados en la solicitud de patente y los que refleja el documento D01 no suponen ventajas técnicas, sino que son una alternativa que deriva de manera evidente del estado de la técnica para un experto en la materia, se puede afirmar que las reivindicaciones 5-12 y 14 presentan novedad pero no actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 de la LP11/1986.