



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 053**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05824341 .1**

96 Fecha de presentación : **21.12.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1831378**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.09.2007**

54 Título: **Plantas de caña de azúcar con un mayor contenido de hidratos de carbono de reserva.**

30 Prioridad: **21.12.2004 EP 04090502**  
**21.12.2004 US 637918 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**04.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**04.04.2011**

73 Titular/es: **Bayer CropScience AG.**  
**Alfred-Nobel-Strasse 50**  
**40789 Monheim, DE**

72 Inventor/es: **Hellwege, Elke y**  
**Knuth, Karola**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

**ES 2 356 053 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

La presente invención se refiere a un procedimiento para aumentar el contenido de hidratos de carbono de reserva de plantas de caña de azúcar.

5 Los expertos en los campos de la agricultura y silvicultura hacen un esfuerzo constante para proporcionar plantas con rendimientos más altos, en particular para salvaguardar el suministro de alimentos de la población mundial que crece continuamente y asegurar el suministro de materias primas renovables. Un intento tradicional es mantener plantas de alto rendimiento mediante la cría de plantas. Sin embargo, este procedimiento requiere tiempo y es trabajoso. En algunos casos, también se ha avanzado sometiendo a las plantas a manipulación genética, es decir, mediante la introducción dirigida y la expresión de moléculas de ácido nucleico extrañas (recombinantes) en las plantas.

10 Además de la remolacha azucarera, la caña de azúcar es la planta más importante usada para la producción de azúcar (sacarosa). Para obtener el azúcar de caña, se recolecta la caña de azúcar en un procedimiento de fabricación caro y después se transporta a la fábrica. Antes de extraer el azúcar, la caña de azúcar se limpia. En el procedimiento tradicional, la caña de azúcar posteriormente se muele y después se pasa por 4-6 rodillos compactadores para separar el jugo de la fibra (bagazo). El azúcar (sacarosa) cristalizado y centrifugado se obtiene por clarificación, evaporación, cristalización fraccionada y separación de las aguas madre (melaza) de los cristales por centrifugación. La melaza, actualmente es el subproducto económicamente más importante en la obtención del azúcar a partir de la caña de azúcar, y comprende aproximadamente 50% de azúcares (sacarosa y monosacáridos). Se usa como material de partida para la fermentación de productos, de los cuales el etanol es el más importante, y además como alimento para animales y, en algunos países, también para la nutrición humana ("miel negra" en Egipto).

15 Los procedimientos biotecnológicos actuales permiten la generación de plantas de caña de azúcar que, además de azúcar de caña (sacarosa) y melaza, sintetizan valiosos hidratos de carbono de reserva tales como, por ejemplo fructanos, los cuales posteriormente se pueden usar para propósitos industriales, cosméticos o farmacéuticos y en la industria de alimentos.

20 Así, por ejemplo las solicitudes de patente internacional WO96/01904, WO96/21023, WO98/39460 y WO99/24593 proponen expresar genes 1-SST solos o en combinación con genes 1-FFT en la caña de azúcar con el fin de producir fructanos en caña de azúcar transgénica.

30 La obtención de hidratos de carbono de reserva (sacarosa y fructanos) a partir de plantas de caña de azúcar de una forma eficaz requiere procedimientos que conduzcan al aumento del contenido de hidratos de carbono de reserva en plantas de caña de azúcar.

Por lo tanto, la presente invención se basa en el objetivo de proporcionar procedimientos que conduzcan a un mayor contenido de hidratos de carbono de reserva en plantas de caña de azúcar en comparación con plantas de caña de azúcar convencionales.

35 Este objetivo se logra proporcionando las realizaciones especificadas en las reivindicaciones de la patente.

La presente invención se refiere, por lo tanto, a un procedimiento para aumentar el contenido de hidratos de carbono de reserva de una planta de caña de azúcar, que comprende

40 (a) la modificación genética de una planta de caña de azúcar introduciendo al menos una molécula de ácido nucleico extraña que codifica una sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST)

(b) teniendo la planta de caña de azúcar genéticamente modificada de acuerdo con (a) un contenido de hidratos de carbono de reserva mayor en al menos 5% comparado con las correspondientes plantas silvestres de caña de azúcar no modificadas genéticamente entre los entrenudos 10-18.

45 Para los propósitos de la presente invención, la expresión "contenido de hidratos de carbono de reserva" se entiende que significa el total del contenido de sacarosa y fructano por gramo de peso fresco.

Para los propósitos de la presente invención, las expresiones "aumentar el contenido de hidratos de carbono de reserva" o "mayor contenido de hidratos de carbono de reserva" significa aumentar el contenido total de sacarosa y fructano por gramo de peso fresco en un total de 2-100%, preferiblemente 5-80% y en especial preferiblemente 10-65%.

50 En el contexto de la presente invención, el contenido de sacarosa o fructano se determina preferiblemente por los procedimientos descritos a continuación en la sección de metodología.

En el contexto de la presente invención, el contenido de sacarosa o fructano se determina

preferiblemente por los procedimientos descritos a continuación en la sección de metodología.

En el contexto de la presente invención, el peso fresco de las plantas de caña de azúcar se determina usando balanzas convencionales, midiendo el peso de todo el tallo por encima de la tierra de una planta de caña de azúcar después de haber quitado completamente las hojas.

5 Era sorprendente para el experto en la materia que la expresión de un gen de fructosiltransferasa vegetal en las plantas de caña de azúcar no sólo condujera a la síntesis de fructano, sino que también aumentara simultáneamente el contenido de hidratos de carbono de reserva (sacarosa + fructano).

10 Basándose en los datos relacionados con la expresión de un gen 1-SST en la remolacha azucarera (Severier y col., *Nature Biotechnology* 16, (1998), 843), que muestran que las plantas de remolacha azucarera transgénicas presentan un contenido menor de hidratos de carbono de reserva (sacarosa + fructano), un contenido menor de hidratos de carbono totales (sacarosa + fructano + glucosa + fructosa) y un contenido significativamente menor de sacarosa (<10% del tipo silvestre) comparado con las correspondientes plantas silvestres de remolacha azucarera, el experto en la materia esperaba que el procedimiento correspondiente en la caña de azúcar condujera igualmente a un menor contenido de hidratos de carbono de reserva y de hidratos de carbono totales y a un contenido significativamente menor de sacarosa. Sin embargo, sorprendentemente, estos efectos (menor contenido de hidratos de carbono de reserva y de hidratos de carbono totales) no se observan en la caña de azúcar. En cambio, los contenidos de hidratos de carbono de reserva y de hidratos de carbono totales de las plantas de caña de azúcar transgénica superan incluso los de las correspondientes plantas silvestres. Además, las plantas de caña de azúcar genéticamente modificadas del procedimiento de acuerdo con la invención no presentan un contenido menor de sacarosa de hasta 10% el nivel natural en comparación con las correspondientes plantas silvestres de caña de azúcar no modificadas genéticamente.

25 Este sorprendente efecto tiene una gran importancia comercial, puesto que el procedimiento de acuerdo con la invención permitiría usar las plantas de caña de azúcar en el futuro para obtener dos materias primas, a saber, azúcar de caña y fructano, sin reducir significativamente el rendimiento del azúcar de caña.

30 En una realización adicional del procedimiento de acuerdo con la invención, las plantas de caña de azúcar genéticamente modificadas tienen un mayor contenido de reserva comparado con las correspondientes plantas silvestres de caña de azúcar no modificadas genéticamente, y el contenido de sacarosa de las plantas de caña de azúcar genéticamente modificadas en comparación con el contenido de sacarosa de las correspondientes plantas silvestres de caña de azúcar no modificadas genéticamente aumenta en más de 15% del contenido de sacarosa de las correspondientes plantas silvestres de caña de azúcar no modificadas genéticamente, preferiblemente hasta 20-130% y en especial preferiblemente hasta 30-100%.

35 En una realización adicional, la presente invención se refiere por lo tanto a un procedimiento para aumentar el contenido de hidratos de carbono de reserva de una planta de caña de azúcar, que comprende

(a) la modificación genética de una planta de caña de azúcar introduciendo al menos una molécula de ácido nucleico extraña que codifica una sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST)

40 (b) teniendo la planta de caña de azúcar genéticamente modificada de acuerdo con (a) un contenido de hidratos de carbono de reserva mayor en comparación con las correspondientes plantas silvestres de caña de azúcar no modificadas genéticamente entre los entrenudos 10-18.

45 En el contexto de la presente invención, la expresión "mayor contenido de hidratos de carbono de reserva entre los entrenudos 10-18" significa que el contenido de sacarosa y fructano por gramo de peso fresco en la zona entre los entrenudos 10 y 18 aumenta en total al menos en 5%, en particular en 5-90%, preferiblemente en 10-80% y en especial preferiblemente en 15-75%.

50 En el contexto de la presente invención, los entrenudos del tronco se numeran desde la parte superior (= 1) a la parte inferior (por ejemplo = 36). En el contexto de la presente invención, un "entrenudo" se refiere, en una planta de caña de azúcar, a la parte del eje del vástago entre dos nudos (de los cuales crecen las hojas).

En este contexto, la expresión "contenido de sacarosa y fructano por gramo de peso fresco en la zona entre los entrenudos 10-18" se entiende que significa que el total de los contenidos de sacarosa y de fructano del peso fresco del tallo después de quitar las hojas, se determina en la región del tallo entre el entrenudo 10 y el entrenudo 18.

En el contexto de la presente invención, la expresión “planta de caña de azúcar” se entiende que significa una planta del género *Saccharum*, preferiblemente la especie *Saccharum officinarum*.

5 En el contexto de la presente invención, la expresión “modificación genética” o “genéticamente modificado” significa la introducción de al menos una “molécula de ácido nucleico extraña” que codifica una sacarosa 1-fructosiltransferasa en el genoma de una célula de planta de caña de azúcar o genoma de una planta de caña de azúcar, en la que dicha introducción de al menos una molécula de ácido nucleico extraña da como resultado que la planta de caña de azúcar sintetice fructano. Las plantas de caña de azúcar que no tienen esta modificación genética no almacenan fructano, o al menos en cantidades que son tan pequeñas que el fructano no es detectable, preferiblemente por el procedimiento descrito a continuación en la sección de metodología (“determinación de fructano”).

10 En el contexto de la presente invención, la determinación del contenido de hidratos de carbono de reserva debe llevarse a cabo en plantas de caña de azúcar que tengan al menos 10 entrenudos y que tengan al menos 6, preferiblemente 10-18, en especial preferiblemente 15 meses de edad.

15 En el contexto de la presente invención, la expresión “molécula de ácido nucleico extraña” se entiende que significa una molécula, preferiblemente una molécula heteróloga, que no se encuentra de forma natural en las correspondientes plantas/células de plantas silvestres de caña de azúcar no modificadas genéticamente, o que no se encuentra de forma natural en las plantas/células de plantas silvestres de caña de azúcar en esta disposición espacial específica, o que está ubicada en un lugar en el genoma de las plantas/célula de las plantas silvestres de caña de azúcar donde no se encuentra de forma natural.

20 Además, las plantas/células de plantas de caña de azúcar usadas en el procedimiento de acuerdo con la invención se diferencian de las plantas/células de plantas silvestres de caña de azúcar por el hecho de que comprenden al menos una copia de la molécula de ácido nucleico extraña integrada de forma estable en su genoma, si procede además de las copias de dicha molécula que se encuentran de forma natural en las plantas/células de plantas silvestres de caña de azúcar. En este caso, las plantas/células de plantas de caña de azúcar del procedimiento de acuerdo con la invención se pueden distinguir de las plantas/células de plantas silvestres de caña de azúcar en particular por el hecho de que esta copia adicional, o estas copias adicionales, está/están localizadas en lugares en el genoma donde no se encuentra o encuentran en las plantas/células de plantas silvestres de caña de azúcar. Esto se puede probar, por ejemplo, con ayuda de un análisis de transferencia Southern.

25 Además, las plantas/células de plantas de caña de azúcar usadas en el procedimiento de acuerdo con la invención se pueden distinguir de las plantas/células de plantas silvestres de caña de azúcar preferiblemente por al menos una de las siguientes características: si la molécula de ácido nucleico extraña que se ha introducido es heteróloga con respecto a la célula de la planta o la planta, los transcritos de las moléculas de ácido nucleico que se han introducido están presentes en las plantas/células de plantas de caña de azúcar usadas en el procedimiento de acuerdo con la invención.

30 Estas moléculas de ácido nucleico se pueden detectar por ejemplo, por análisis de transferencia Northern o por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa).

35 Además, las plantas/células de plantas de caña de azúcar usadas en el procedimiento de acuerdo con la invención forman una proteína que es codificada por una molécula de ácido nucleico extraña que se ha introducido. Esta proteína se puede detectar, por ejemplo, por procedimientos inmunológicos, en particular por un análisis de transferencia Western.

40 En el contexto de la presente invención, el término “genoma” debe entenderse que significa la totalidad del material hereditario presente en una célula vegetal. El experto en la materia sabe que no sólo el núcleo, sino también otros compartimentos celulares (por ejemplo plástidos, mitocondrias) comprenden material hereditario.

45 La molécula de ácido nucleico extraña es preferiblemente una molécula recombinante que consiste en una variedad de elementos cuya combinación, o disposición espacial específica, no se encuentra de forma natural en las células de la planta.

50 En principio, la molécula de ácido nucleico extraña puede ser cualquier molécula de ácido nucleico que codifique al menos una fructosiltransferasa y que, en la célula de la planta de caña de azúcar o la planta de caña de azúcar, conduzca a que la planta de caña de azúcar sintetice fructano.

55 En el contexto de la presente invención, la expresión “célula de planta silvestre de caña de azúcar” significa células de plantas de caña de azúcar que han actuado como material de partida para el procedimiento de acuerdo con la invención, es decir, cuyo genoma no está modificado por la introducción

de al menos una molécula de ácido nucleico extraña que codifica al menos una fructosiltransferasa.

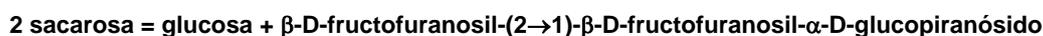
En el contexto de la presente invención, la expresión “planta silvestre de caña de azúcar” significa plantas que han actuado como material de partida para el procedimiento de acuerdo con la invención, es decir, cuyo genoma no está modificado por la introducción de al menos una molécula de ácido nucleico extraña que codifica al menos una fructosiltransferasa.

En el contexto de la presente invención, el término “correspondiente” significa que, cuando se compara una pluralidad de objetos, los objetos en cuestión que se comparan entre sí se mantienen en condiciones idénticas. En el contexto de la presente invención, el término “correspondiente” en el contexto de célula de planta silvestre de caña de azúcar o planta silvestre de caña de azúcar significa que las células de planta de caña de azúcar o plantas de caña de azúcar que se comparan entre sí, se cultivaron en condiciones de cultivo idénticas y tienen la misma edad, o están el mismo tiempo en cultivo.

En el contexto de la presente invención, el grupo de las fructosiltransferasas vegetales incluye:

sacarosa:sacarosa 1-fructosil transferasas (1-SST) (EC 2.4.1.99),

Las 1-SST catalizan la síntesis de oligofruktanos (DP3-DP8) con enlaces beta-2,1-glucosídicos empezando en el sustrato de sacarosa. Las 1-SST catalizan la siguiente reacción:



La 1-SST tiene secuencias codificantes de diferentes organismos conocidos para el experto en la materia y disponibles, por ejemplo, con los siguientes números de referencia en NCBI GenBank:

*Allium cepa* AJ006066.1 (Vijn, I. y col., *Plant Physiol.* 117(4), (1998), 1507-1513); *Triticum aestivum* AB029888.1 (Kawakami, A. y Yoshida, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66 (11), (2002), 2297-2305); *Allium sativum* AY098442.1; *Lolium perenne* AY245431.1 (Chalmers y col., *J Plant Physiol.* 160(11), (2003), 1385-91); *Festuca arundinacea* AJ297369.1, Luescher y col., *Plant Physiol.* 124 (3), (2000), 1217-1228); *Hordeum vulgare* AJ567377.2, Nagaraj y col., *New Phytologist.* 161(3), (2004), 735-748); *Taraxacum officinale* AS250634.1, van den Ende y col., *Plant Physiol.* 123, (2000), 71-80.

Se prefiere en especial en el contexto de la presente invención la 1-SST de *Cynara scolymus* (SEQ ID No. 1) o de *Helianthus tuberosus* (véase el documento WO96/21023, Fig. 4 (A), nº de acceso en GenBank AJ009757.1, van der Meer y col., *Plant J.* 15(4), (1998), 489-500).

Las 1-SST, proteínas que son codificadas por las moléculas de ácido nucleico extrañas, comparten en cada caso determinadas características. Éstas pueden incluir por ejemplo, la actividad biológica, peso molecular, reactividad inmunológica, conformación, la presencia de dominios estructurales y/o funcionales o similares, y propiedades físicas tales como, por ejemplo, el comportamiento de migración cuando se lleva a cabo la electroforesis en gel, el comportamiento cromatográfico, coeficientes de sedimentación, solubilidad, propiedades espectroscópicas, estabilidad, pH óptimo, temperatura óptima o similares.

En una realización adicional del procedimiento de acuerdo con la invención, la proteína 1-SST que es codificada por la molécula de ácido nucleico extraña usada, tiene una identidad de al menos 40%, preferiblemente al menos 60%, en especial preferiblemente al menos 80% y en particular preferiblemente al menos 90%, con la proteína 1-SST mostrada en el SEQ ID No. 1.

Usando la información de la secuencia presentada en el SEQ ID No. 1, el experto en la materia puede ahora aislar secuencias homólogas de otras especies de plantas. Esto se puede hacer por ejemplo, con ayuda de procedimientos convencionales tales como el cribado de bibliotecas de ADNc o bibliotecas genómicas con sondas de hibridación adecuadas. El experto en la materia sabe que también se pueden aislar secuencias homólogas con la ayuda de oligonucleótidos (degenerados) y usando procedimientos basados en la PCR.

También se pueden usar las bases de datos de cribado proporcionadas por ejemplo por EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/index.htm>) o NCBI (National Center for Biotechnology Information (Centro nacional para la información biotecnológica), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para identificar secuencias homólogas. Aquí, se presentan para consultar una o más secuencias. Después, esta secuencia de búsqueda se compara por programas de ordenador frente a secuencias conocidas que se describen en las bases de datos seleccionadas. Dichos buscadores de bases de datos (por ejemplo buscadores Blast o Fasta) son conocidos para el experto en la materia.

Si se lleva a cabo dicha búsqueda en bases de datos, por ejemplo en el NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), National Center for Biotechnology Information

National Library of Medicine, Building 38A, Bethesda, MD 20894, EE.UU.), deben usarse los parámetros estándar que se ajustan para la búsqueda en cuestión en la base de datos.

Para los alineamientos de secuencias de proteínas (blastp), estos parámetros son los siguientes: límite Entrez = no activado; filtro = activada complejidad baja; valor esperado = 10; tamaño de palabra = 3; matriz = BLOSUM62; costes de los huecos: existencia = 11, extensión = 1.

Para alineamientos de secuencias de ácidos nucleicos (blastn), deben ajustarse los siguientes parámetros: límite Entrez = no activado; filtro = activada complejidad baja; valor esperado = 10, tamaño de palabra = 11.

En dicha búsqueda en bases de datos se pueden usar, por ejemplo, las secuencias descritas en el SEQ ID No 1, como secuencia a consultar con el fin de identificar proteínas homólogas que codifican una 1-SST (SEQ ID No 1).

En el contexto de la presente invención, el término "identidad" se pretende que signifique el número de aminoácidos idénticos (identidad) con los aminoácidos de otras proteínas, expresado como porcentaje. La identidad se determina preferiblemente con la ayuda de programas de ordenador. Si las secuencias que se comparan entre sí tienen diferente longitud, la identidad debe determinarse de forma que el número de aminoácidos que la secuencia más corta comparte con la secuencia más larga determine el porcentaje de identidad. Preferiblemente, la identidad se determina mediante los programas de ordenador conocidos y de uso público ClustalW (Thompson y col., *Nucleic Acids Research* 22 (1994), 4673-4680).

ClustalW lo tienen disponible al público en general Julie Thompson (Thompson@EMBL-Heidelberg.DE) y Toby Gibson (Gibson@EMBL-Heidelberg.DE), European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D 69117 Heidelberg, Alemania. Igualmente, ClustalW se puede descargar de diferentes sitios de internet, entre otros en el IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, B.P.163, 67404 Illkirch Cedex, Francia; <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/>) y el EBI (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/gub/software/>), y todos los sitios espejo de internet del EBI (European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, Reino Unido). Preferiblemente se usa la versión 1.8 del programa de ordenador ClustalW para determinar la identidad. Deben ajustarse los siguientes parámetros: KTUPLE = 1, TOPDIAG = 5, WINDOW = 5, PAIRGAP = 3, GAOPEN = 10, GAPEXTEND = 0,05, GAPDIST = 8, MAXDIV = 40, MATRIX = GONNET, ENDGAPS(OFF), NOGAP, NOHGAP.

La identidad significa además que existe equivalencia funcional y/o estructural entre las respectivas proteínas que son codificadas por las moléculas de ácido nucleico extrañas. Las proteínas que son homólogas a las proteínas detalladas en el SEQ ID No. 1, y que por lo tanto constituyen derivados de estas moléculas que catalizan la misma reacción enzimática, pueden tener la forma de variaciones que ocurren naturalmente, por ejemplo, proteínas de otras especies de plantas, o de mutaciones, pudiendo haber surgido estas mutaciones de forma natural o por mutagénesis dirigida. Estos derivados pueden tener además la forma de secuencias sintéticas.

Las moléculas de ácido nucleico extrañas pueden ser cualesquiera moléculas de ácido nucleico, en particular moléculas de ADN o ARN, por ejemplo ADNc, ADN genómico, ARNm y similares. Pueden ser moléculas naturales o moléculas generadas por procedimientos sintéticos químicos o recombinantes. Pueden ser moléculas monocatenarias que comprenden la cadena codificante o la no codificante, o moléculas bicatenarias.

La caña de azúcar se puede transformar mediante la pistola génica (bombardeo de partículas) (Bower y Birch, *Plant Journal* 2(3), (1992), 409-416; Franks y Birch, *Aust. J. Plant Physiol.* 18, (1991), 471-480; Gallo-Meagher e Irvine, *Crop Science* 36(5), (1996), 1367-1374; Bower y col., *Molecular Breeding* 2(3), (1996), 239-249; Snyman y col., *S. Afr. J. Bot.* 62(3), (1996), 151-154) o por transferencia de genes mediada por agrobacterias (Arencibia y col., *Transgenic Research* 7, (1998), An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, 213-222).

La regeneración de las plantas de caña de azúcar también es conocida para los expertos en la materia Bower y Birch, *Plant Journal* 2(3), (1992), 409-416; Gallo-Meagher e Irvine, *Crop Science* 36(5), (1996), 1367-1374; Bower y col., *Molecular Breeding* 2(3), (1996), 239-249; Ho y Vasil, *Ann. Bot.* 51, (1983), 719-726).

Para expresar las moléculas de ácido nucleico extrañas que codifican una fructosiltransferasa en plantas de caña de azúcar, estas moléculas se unen preferiblemente con secuencias de ADN reguladoras que aseguran la transcripción en las células de la planta. Estas incluyen en particular promotores. En principio, cualquier promotor que sea activo en las plantas/células de planta de caña de azúcar es

adecuado para la expresión.

El promotor se puede elegir de forma que la expresión se produzca de forma constitutiva o solo en un tejido particular, un momento particular del desarrollo de la planta o en un momento que está determinado por factores externos. El promotor puede ser homólogo o heterólogo, tanto con respecto a la planta como con respecto a la molécula de ácido nucleico extraña.

Los ejemplos de promotores constitutivos adecuados son los promotores de ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor, conocidos como el promotor 35S (Odell y col., 1985, *Nature*, 313, 810-812) y el promotor ubiquitina del maíz (Christensen y col., *Plant Mol. Biol.* 18, (1992), 675-689) o el promotor ubiquitina del arroz (Liu y col., *Plant Science* 165, (2003), "High transgene expression levels in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) driven by the rice ubiquitin promoter RUBQ2", 743-750).

Además, se pueden usar promotores que pueden mediar la expresión génica en el tallo de la caña de azúcar, tal como, por ejemplo, el promotor del virus del rayado del banano (Schenk y col., *Plant Mol. Biol.* 47, (2001), 399-412).

Además, puede estar presente una secuencia de terminación (señal de poliadenilación), que sirve para añadir una cola de poli-A al transcrito. Se cree que la cola de poli-A tiene una función en la estabilización del transcrito. Dichos elementos se describen en la bibliografía (véase, Gielen y col., *EMBO J.* 8 (1989), 23-29) y se pueden sustituir según se desee.

También pueden estar presentes secuencias de intrones entre el promotor y la región codificante. Dichas secuencias de intrones pueden conducir a la estabilidad de la expresión y a una expresión alta en plantas (Callis y col., 1987, *Genes Devel.* 1, 1183-1200; Luehrsen, y Walbot, 1991, *Mol. Gen. Genet.* 225, 81-93; Rethmeier, y col., 1997, *Plant Journal.* 12(4):895-899; Rose y Beliakoff, 2000, *Plant Physiol.* 122(2), 535-542; Vasil y col., 1989, *Plant Physiol.* 91, 1575-1579; XU y col., 2003, *Science in China Series C Vol.* 46 No. 6, 561-569). Los ejemplos de secuencias de intrones adecuadas son el primer intrón del gen sh-1 del maíz (Werr y col., *EMBO J.* 4, (1985), 1373-1380), el primer intrón del gen 1 de poliubiquitina del maíz (Christensen y col., *Plant Mol. Biol.* 18, (1992), 675-689), el intrón del gen de actina del arroz (McElroy y col., *Plant Cell* 2, (1990), "Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation", 163-172), o uno de los dos primeros intrones del gen PAT1 de *Arabidopsis* (Rose y Last, *Plant J.* 11, (1997), "Introns act post-transcriptionally to increase expression of the *Arabidopsis thaliana* tryptophan pathway gene PAT1", 455-464).

Procedimientos para usar en el contexto de la presente invención:

#### 1. Toma de muestra para la determinación de fructano y azúcares

Se recogen los troncos de las plantas de caña de azúcar que tienen de 12 a 15 meses de edad y tienen más de 10 entrenudos. Después de quitar todas las hojas, se numeran los entrenudos del tronco desde la parte superior (=1) a la parte inferior (por ejemplo = 36). Se corta un disco del tronco de aproximadamente 1-2 g de peso del medio de cada entrenudo. Después se combinan los discos de tronco de 3 entrenudos para dar una muestra y se congela en nitrógeno líquido.

Para la extracción del azúcar y fructano, los discos de tronco primero se muelen en una mezcladora Waring (de Waring, New Hartford, Connecticut, EE.UU.). Los azúcares y el fructano se extraen agitando durante 1 hora a 95°C en tampón de fosfato sódico 10 mM pH 7,0. Después, se separan los sólidos por filtración a través de tamices de 30 µm. La disolución resultante después se usa para la determinación de fructano y azúcar (véase a continuación).

#### 2. Determinación de fructano

El contenido de fructano de la disolución obtenida por extracción de azúcares y fructanos (véase el procedimiento 1) se determinó mediante el kit de "Procedimiento de ensayo de fructanos" de Megazyme. El principio de este ensayo se basa en la hidrólisis del fructano en sus monómeros reductores glucosa y fructosa y la posterior determinación fotométrica (longitud de onda = 410 nm) del contenido de estos azúcares reductores (glucosa, fructosa) después de tinción con el que se conoce como "Procedimiento PAHBAH" (para detalles sobre este procedimiento, véase a continuación).

En una primera etapa, la sacarosa presente en el extracto se hidroliza mediante la enzima sacarasa específica para dar glucosa y fructosa. Además, los almidones y mantodextrinas presentes en el extracto se degradan con una mezcla de enzimas β-amilasa, pululanasa y maltasa altamente purificadas, para dar igualmente glucosa. Después, los azúcares reductores resultantes se reducen a alcoholes de azúcares por tratamiento con disolución de borohidruro alcalino y después se separan de la disolución. La disolución se neutraliza y el exceso de borohidruro se separa por adición de ácido acético diluido.

Después, el fructano se hidroliza con fructanasa (exo-inulinasa) purificada para dar fructosa y glucosa, y se determina el contenido de los monosacáridos resultantes por el procedimiento PAHBAH.

Productos químicos y disoluciones en el kit:

5 1. Están presentes 50 U de sacarasa (levadura), 500 U de  $\beta$ -amilasa (*B. cereus*), 100 U de pululanasa (*K. pneumoniae*) y 1000 U de maltasa (levadura) en forma de un polvo liofilizado; para la medición se disuelven en 22 ml de tampón de maleato sódico 0,1 M pH 6,5 (en lo sucesivo denominado "enzimas 1").

2. Están presentes 8000 U de fructanasa en forma de un polvo liofilizado; para la medición, se disuelven en 22 ml de tampón de acetato sódico 0,1 M pH 4,5 (en lo sucesivo denominado "enzimas 2").

10 3. Disolución estándar de fructosa (1,5 mg de fructosa/ml), disuelta en ácido benzoico al 0,2%.

4. Control de fructano

polvo de tupinambo (*Helianthus tuberosus*) lavado con cloroformo con un contenido de fructano conocido.

Disoluciones que no están presentes en el kit:

15 I. Reactivo PAHBAH

Disolución A: Se añaden 10 g de PAHBAH (hidrazida de ácido p-hidroxibenzoico, Sigma Bestell Nº H-9882) a 60 ml de agua destilada en un vaso de precipitados de vidrio de 250 ml, y se añaden 10 ml de ácido clorhídrico concentrado a la suspensión, con agitación. La disolución se completa hasta 200 ml y se almacena a temperatura ambiente.

20 Disolución B: Primero se disuelven 24,9 g de citrato trisódico, después 2,20 g de cloruro de calcio y finalmente 40 g de hidróxido sódico en 500 ml de agua destilada, con agitación. Después de la adición del hidróxido sódico, la disolución puede ser opaca, pero se vuelve transparente cuando la disolución se completa hasta 2 litros con agua. La disolución se almacena a temperatura ambiente.

25 Poco antes de usarla, se añaden 20 ml de disolución A a 180 ml de disolución B y se mezcla bien (= reactivo PAHBAH). La disolución se debe almacenar en hielo y se puede usar en 4 horas.

II. Disolución de hidróxido sódico 50 mM.

III. Disolución alcalina de borohidruro sódico

Borohidruro sódico 10 mg/ml (Sigma, Bestell Nº S-9125) en hidróxido sódico 50 mM.

IV. Ácido acético 100 mM.

30 Procedimiento de detección:

35 1. Se extraen 20 mg de muestra de control de fructano en 1 ml de agua destilada durante 1 hora en un bloque térmico a 95°C. Después de centrifugación (5 minutos a 13000xg), el líquido sobrenadante se transfiere a un nuevo recipiente de reacción y el precipitado se suspende otra vez en 1 ml de agua destilada y se extrae durante 1 hora en un bloque térmico a 5°C. Después de centrifugación otra vez (véase antes), se separa el líquido sobrenadante y se combina con el primer líquido sobrenadante.

2. Se mezclan 200  $\mu$ l de muestra (extracto, referencia de fructano y control de fructano) con 200  $\mu$ l de enzima 1, y se incuban durante 40 minutos a 40°C (tiempo de incubación 10 minutos más que el establecido en el protocolo de Megazyme).

40 3. Se añaden 200  $\mu$ l de disolución alcalina de borohidruro sódico, y la disolución se mezcla bien y se incuba durante 30 minutos a 40°C para lograr la conversión completa de los azúcares reductores en alcoholes de azúcares.

4. Mediante adición de 500  $\mu$ l de ácido acético 100 mM y mezclamiento completo, se elimina el exceso de borohidruro y la disolución se lleva a pH = 4,5.

45 5. Se mezclan partes alícuotas de 200  $\mu$ l de la disolución con 100  $\mu$ l de enzimas 2 y se incuban durante 60 minutos a 40°C (40 minutos más que el tiempo de incubación establecido en el kit de Megazyme, para lograr la hidrólisis completa del fructano)

6. Se ensaya una referencia de fructosa simultáneamente como muestra adicional. Se tratan 200  $\mu\text{l}$  de la disolución de la referencia de fructosa presente en el kit con 900  $\mu\text{l}$  de tampón de acetato sódico 100 mM pH 4,5 y se mezclan. Se separan 4 x 200  $\mu\text{l}$  de esta mezcla y se tratan con 100  $\mu\text{l}$  adicionales de acetato sódico 100 mM pH 4,5.

5 7. Se mezclaron todas las muestras y una muestra adicional de un blanco (300  $\mu\text{l}$  de acetato sódico 100 mM pH 4,5) con 5 ml de reactivo PAHBAH y la mezcla se incubó durante exactamente 6 minutos en un baño de agua hirviendo.

8. Después, las muestras se enfrían inmediatamente durante aproximadamente 5 minutos en agua fría (10-15°C).

10 9. Se mide la absorción de todas las disoluciones en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm frente a la muestra del blanco.

Se usa la siguiente ecuación para el cálculo:

$$\text{fructano (\% p/p)} = \Delta E \times F \times 5 \times V_{\text{Ex}} \times 1,1/0,2 \times 100/W \times 1/1000 \times 162/180$$

$\Delta E$  = la absorción de PAHBAH de la muestra se mide frente a la muestra del blanco

15 F = factor para convertir la absorción de fructosa en  $\mu\text{g}$  de fructosa (54,5  $\mu\text{g}$  fructosa/absorción)

5 = factor para la conversión de 200  $\mu\text{l}$  a 1 ml de volumen de incubación

$V_{\text{Ex}}$  = volumen del extracto

1,1/0,2 = se usaron para el análisis 0,2 ml del total de 1,1 ml de digestión enzimática

100/W = factor que indica el fructano en % del peso (W)

20 1/1000 = conversión de  $\mu\text{g}$  en mg

162/180 = factor para convertir la fructosa libre medida en fructosa unida en el fructano

### 3. Determinación de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa)

25 Los contenido de glucosa, fructosa y sacarosa en el extracto obtenido de acuerdo con el procedimiento 1, se determinaron por fotometría en un ensayo enzimático por conversión del  $\text{NAD}^+$  (dinucleótido de nicotinamida y adenina) en NADH (dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido). Durante la reducción, se pierde el carácter aromático del anillo de nicotinamida, y por lo tanto cambia el espectro de absorción. Este cambio en el espectro de absorción se puede detectar por fotometría. La glucosa y fructosa presentes en el extracto se convierten en glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato mediante la enzima hexoquinasa y el trifosfato de adenosina (ATP). La glucosa-6-fosfato posteriormente es oxidada por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa para dar el 6-fosfogluconato. En esta reacción, el  $\text{NAD}^+$  se reduce para dar NADH, y se determina por fotometría la cantidad de NADH formada. La relación entre el NADH formado y la glucosa presente en el extracto es 1:1, de modo que se puede calcular el contenido de glucosa a partir del contenido de NADH usando el coeficiente de absorción molar del NADH (6,31  $\text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Después de la oxidación completa de la glucosa-6-fosfato, la fructosa-6-fosfato, que se habían formado igualmente en la disolución, es convertida por la enzima fosfoglucoisomerasa para dar glucosa-6-fosfato que, a su vez, es oxidada a 6-fosfogluconato. Otra vez, la relación entre la fructosa y la cantidad de NADH formado es 1:1. Después, la sacarosa presente en el extracto es escindida por la enzima sacarasa (MEGzyme) para dar glucosa y fructosa. Las moléculas de fructosa y glucosa liberadas después se convierten con las enzimas mencionadas antes en la reacción dependiente de  $\text{NAD}^+$ , para dar 6-fosfogluconato. La conversión es una molécula de sacarosa en 6-fosfogluconato da como resultado 2 moléculas de NADH. La cantidad de NADH formado se determina igualmente por fotometría y se usa para calcular el contenido de sacarosa, usando el coeficiente de absorción molar del NADH.

### 4. Determinación del contenido de hidratos de carbono totales

45 El contenido de hidratos de carbono totales se determina sumando el contenido de glucosa, fructosa, sacarosa y fructano.

### 5. Determinación del contenido de hidratos de carbono de reserva

El contenido de hidratos de carbono de reserva se determina sumando el contenido de sacarosa y fructano.

**Ejemplo 1****Generación de plantas de caña de azúcar transgénicas que expresan el gen 1-sst de alcachofa (*Cynara scolymus*) (plantas pML1)**

5 Usando los cebadores para la PCR P5 (5'-aattcagctgttatccctaggcggacc-3') (SEQ ID No. 5) y P7  
 (5'-agtcagctgggaatttaatttaattaagcg- 3') (SEQ ID No. 6), se amplificó un fragmento de 262 pb en el vector  
 pMCS5 (MoBiTec GmbH, Göttingen, Alemania) (MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 25 ciclos en cada caso de 30 segundos a  
 94°C, 30 segundos a 58°C, 30 segundos a 72°C, 1 U de polimerasa TaqI/50 µl), y el producto de la PCR  
 10 se cortó con PvuII y se clonó en el vector cortado con PvuII pSK(-) (Stratagene). El vector resultante se  
 denominó pSK(-)-MCS. Se combinaron dos productos de la PCR para dar el vector acabado. El primer  
 fragmento se obtuvo por amplificación de un fragmento de 1266 pb en pSK(-)-MCS usando los cebadores  
 P5 (véase antes) y P6 (5'-ggtaactgtcagaccaagtttac-3') (MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 30 ciclos en cada caso de 15  
 segundos a 94°C, 15 segundos a 60°C, 15 segundos a 72°C, 1 U de polimerasa PwoI/50 µl). El segundo  
 producto de la PCR, que comprendía el gen *asd* (Haziza y col. *EMBO J.* 1, 1982, 379-384; n° de acceso  
 15 en GenBank V00262.1), se amplificó en el ADN de *E. coli* usando los cebadores *Asd1* (AAA ATT TAA  
 ACA TAA TCA ggA TCA ATA AAA C) (SEQ ID No. 7) y *Asd2* (AAA ATT TAA ACA TCT gCg CTT ACT  
 CCT) (SEQ ID No. 8) (MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 25 ciclos cada uno de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C, 1  
 minuto a 72°C, 1 U de polimerasa TaqI/50 µl) y se volvió a cortar con *DraI*. Los dos fragmentos se ligaron.  
 El plásmido resultante se denominó pML11. Todos los plásmidos que llevan el gen *asd* como marcador de  
 20 selección se propagaron en células G6MD2 (Schwartz, M., *J. Biol. Chem.* 92, (1966), 1083-1089) y se  
 seleccionaron en medio sin ácido diaminopimélico.

Se ligaron dos fragmentos simultáneamente en el vector pMCS5 abierto con *Bgl*III. El fragmento 1  
 comprendía el terminador nos de *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker y col., 1982, *Journal of Molecular  
 and Applied Genetics* 1, 561-573) y se amplificó en pBinAR usando los cebadores P9 (ACT TCT gCA gCg  
 gCC gCg ATC gTT CAA ACA TTT ggC AAT AAA gTT TC) (SEQ ID No. 9) y P10 (TCT AAg CTT ggC gCC  
 25 gCT AgC AgA TCT gAT CTA gTA ACA TAg ATg ACA CC) (SEQ ID No. 10) (MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 25 ciclos en  
 cada caso de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C, 30 segundos a 72°C, 1 U de polimerasa PwoI/50  
 µl) y se volvió a cortar con *Bgl*III y *Pvu*II. El fragmento 2 se obtuvo del plásmido pBinAR por digestión con  
*Bgl*III y *Pvu*II. El fragmento de 2674 pb comprendía el promotor nos de *Agrobacterium tumefaciens*  
 (Depicker y col., *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1, 1982, 561-573) y el marco de lectura abierto  
 30 del gen *nptII* de *E. coli* (Beck y col. *Gene* 19, 1982, 327-336; n° de acceso en Gen-Bank V00618). Los dos  
 fragmentos se clonaron simultáneamente en pMCS5 cortado con *Bgl*III (MoBiTec), y se seleccionó un  
 plásmido que comprendía en cada caso uno de los dos fragmentos. El plásmido resultante se denominó  
 pML7. Para eliminar el sitio de escisión *NotI* en el vector pMCS5 (MoBiTec GmbH, Göttingen, Alemania),  
 el vector se cortó con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Bgl*III y el vector se religó. El plásmido resultante  
 35 se denominó pML4. El terminador nos de *Agrobacterium tumefaciens* (véase antes en el presente  
 documento) se clonó en el vector resultante entre los sitios de escisión de restricción *Hind*III y *Pst*I. Para  
 este fin, se amplificó un fragmento de ADN correspondiente en pBinAR (véase antes en el presente  
 documento) usando los cebadores P9 (ACT TCT gCA gCg gCC gCg ATC gTT CAA ACA TTT ggC AAT  
 AAA gTT TC) y P10 (TCT AAg CTT ggC gCC gCT AgC AgA TCT gAT CTA gTA ACA TAg ATg ACA CC)  
 40 y se volvió a cortar con *Hind*III y *Pst*I. El vector resultante se denominó pML54-nos. Un fragmento *Pst*I de  
 1986 pb que comprendía el promotor ubiquitina de *Zea mays* (n° de acceso en Gen-Bank 94464,  
 Christensen y col., *Plant Mol. Biol.* 18, 1992, 675) y el primer intrón del mismo gen, cuyo intrón se había  
 truncado por digestión con *Cla*I y religado, se clonó en el sitio de escisión *Pst*I de pML54-nos. El extremo  
 45 3' de este fragmento se orientó en la dirección del terminador nos en el vector resultante. El plásmido  
 resultante se denominó pML8.

Se clonó un fragmento *NotI* del vector pCy21 en pML8, fragmento que comprendía el marco de  
 lectura abierto de la sacarosa-sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST) de *Cynara scolymus* (Hellwege y  
 col., *Plant Journal* 12, 1997, 1057-1065; n° de acceso en Genbank Y09662.1). El plásmido resultante se  
 denominó pML10.

50 El vector pML11 se cortó con *Nar*I y se ligó con un fragmento *Nar*I de 4048 pb de pML10. El  
 plásmido resultante se denomina pML11-SST. Se cortó con *Avr*II y se clonó un fragmento de 2068 pb de  
 pML7, cuyo fragmento se había obtenido por digestión de restricción con *Xba*I y *Spe*I. El vector resultante  
 se denominó pML1.

**Transformación de plantas de caña de azúcar con la construcción de 1-sst (pML1)**

55 La inducción de callo y la transformación de la caña de azúcar se llevaron a cabo por el  
 procedimiento de Snyman y col. (Snyman y col., 1996, *S. Afr. J. Bot.* 62, 151-154). La construcción pML1  
 se cotransformó con el vector pEmuKN, que expresaba el gen *nptII* (Beck y col. *Gene* 19, 1982, 327-336;  
 n° de acceso en Gen-Bank No. V00618) bajo el control del promotor pEmu (Last y col. (1991) *Theor.*

App1. Genet. 81, 581-588). Las plantas se regeneraron por el procedimiento de Snyman y col. 2001 (*Acta Horticulturae* 560, (2001), 105-108).

## Ejemplo 2

### 5 Plantas de caña de azúcar transgénicas transformadas con el gen 1-sst de alcachofa (*Cynara scolymus*) (plantas pML1)

#### 2.1 Materiales y procedimientos

10 Se transformaron plantas de caña de azúcar de la línea NCo310 con el gen sst de alcachofa como se describe en el ejemplo 1, mediante bombardeo con pistola de partículas. Las plantas de caña de azúcar transgénicas de la línea 2-1-5-3 que sintetizan oligofructanos y la línea silvestre NCo310 se cultivaron en invernadero. Se recogieron los troncos de las plantas de aproximadamente 12 meses de edad. Después de quitar las hojas, se numeraron los entrenudos de los troncos desde la parte superior (= 1) a la parte inferior (por ejemplo = 36). Se cortó un disco de tronco de aproximadamente 1-2 g de peso del medio de cada entrenudo. Los discos de tronco de 3 entrenudos se combinaron para dar una muestra y se congeló.

15 Se usó el procedimiento descrito con más detalle en la sección de metodología para la extracción del azúcar y fructano.

#### 2.2 Resultados

20 Las plantas de caña de azúcar cv. NCo310 que se habían transformado con el gen sst de alcachofa y almacenan los oligofructanos kestosa y nistosa además de sacarosa tienen un contenido mayor de hidratos de carbono de reserva y un contenido mayor de hidratos de carbono totales en los troncos en comparación con las plantas de control NCo310 (véase la tabla 1).

25 **Tabla 1:** Determinación del contenido de hidratos de carbono totales (glucosa + fructosa + sacarosa + fructano) en los troncos de las plantas de caña de azúcar; NCo310 = control silvestre; 2-1-5-3 = planta de caña de azúcar NCo310 transformada con el gen sst de alcachofa (*Cynara scolymus*); la numeración "1", "2", "3" y "4" se refiere a muestras tomadas de cuatro troncos diferentes del caso transgénico 2-1-5-3

Muestra		Peso fresco (PF) [g]	Sac. + fructano [mg/g de PF]	Hidratos de carbono totales [mg/g de PF]
NCo310		1008	105	109
2-1-5-3	1	1134	170	175
	2	945	116	124
	3	1069	170	175
	4	920	173	180

Contenido de hidratos de carbono de reserva (sacarosa + fructano) en troncos  
de plantas de caña de azúcar transgénicas

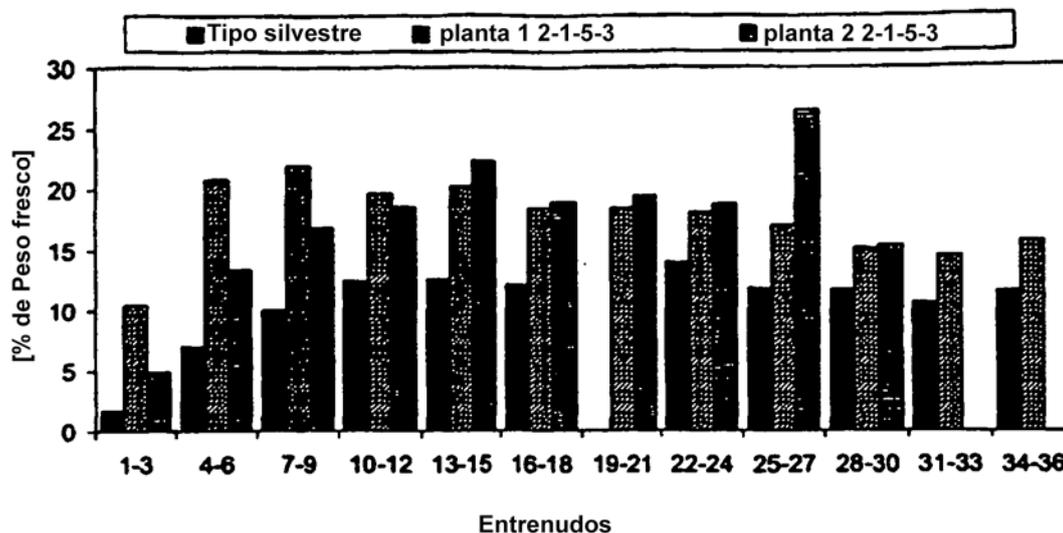


Figura 1: Contenido de hidratos de carbono de reserva (sacarosa y fructano) en troncos de caña de azúcar silvestre NCo310 y de la línea 2-1-5-3 transgénica que sintetiza oligofruktanos. Se combinó el material de 3 entrenudos adyacentes para dar una muestra. Los entrenudos se numeraron desde la parte superior (= 1) a la parte inferior (= 36).

Se puede observar un aumento del contenido de sacarosa de los entrenudos 1-3 a 10-12 en los entrenudos más superiores del tronco de la planta silvestre NCo310. El almacenamiento de sacarosa es máximo en los siguientes entrenudos (>12). En estos segmentos del tronco el contenido de sacarosa varía entre 10-14% del peso fresco. Los fructanos no se pueden detectar en las plantas silvestres de caña de azúcar.

En los troncos de las plantas 2-1-5-3 transgénicas, el contenido de hidratos de carbono de reserva (sacarosa y fructano) también aumenta desde los entrenudos 1-3 a los entrenudos 7-9 y después alcanza la saturación. Sorprendentemente, se obtiene un contenido de hidratos de carbono de reserva notablemente superior que en las correspondientes plantas silvestres, en concreto 15-26% del peso fresco, en los segmentos inferiores de los troncos transgénicos.

Por lo tanto, la expresión de gen *sst* de alcachofa en la caña de azúcar conduce en total a un aumento significativo de los hidratos de carbono de reserva en las plantas de caña de azúcar. Si el contenido de sacarosa de las plantas silvestres (NCo310) se compara con el de las plantas de caña de azúcar transgénicas (2-1-5-3) que expresan 1-SST, se obtienen los siguientes resultados:

**Tabla 2.** Contenido de sacarosa en troncos de caña de azúcar de tipo silvestre NCo310 y de la línea 2-1-5-3 transgénica que sintetiza oligofruktanos; la numeración "1", "2", "3" y "4" se refiere a muestras tomadas de cuatro troncos diferentes del caso transgénico 2-1-5-3. Se determinó la media del contenido de sacarosa determinado para las secciones entrenudos individuales. El contenido de sacarosa en el tipo silvestre se ajustó como 100% y el contenido de sacarosa en la línea transgénica está en relación con el tipo silvestre.

Muestra		Contenido de sacarosa [mg/g de PF]	Sacarosa [% del tipo silvestre]
NCo310		105	100
2-1-5-3	1	126	120
	2	86	82
	3	122	116
	4	123	113

**LISTA DE SECUENCIAS**

<110> Bayer CropScience GmbH

<120> Plantas de caña de azúcar con un mayor contenido de hidratos de carbono de reserva

5 <130> BCS 04-5013 PCT

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 637

10 <212> PRT

<213> Cynara scolymus

<300>

<308> CAA70855

<309> 1997-10-09

15 <313> (1)..(637)

<400> 1

Met Ala Ser Ser Thr Thr Thr Pro Leu Leu Pro His His His Leu Gln  
1 5 10 15

Asn Pro Gln Gln Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ala His Arg Leu Ser Arg  
20 25 30

Pro Thr Leu Leu Ser Gly Ile Leu Val Ser Val Leu Val Ile Cys Ala  
35 40 45

Leu Val Ala Val Ile His Asn Gln Ser Gln Gln Pro Tyr His Asp Gly  
50 55 60

Gly Ala Lys Pro Ser Ser Ser Ala Ala Thr Thr Thr Phe Pro Thr Ala  
65 70 75 80

Ser Pro Glu Ala Gly Leu Lys Arg Phe Pro Ile Glu Leu Lys Thr Asn  
85 90 95

Ala Glu Val Glu Trp Gln Arg Ser Ala Tyr His Phe Gln Pro Asp Lys  
100 105 110

Asn Tyr Ile Ser Asp Pro Asp Gly Pro Met Tyr His Met Gly Trp Tyr  
115 120 125

His Leu Phe Tyr Gln Tyr Asn Pro Glu Ser Ala Ile Trp Gly Asn Ile  
130 135 140

Thr Trp Gly His Ser Val Ser Lys Asp Met Ile Asn Trp Phe His Leu  
145 150 155 160

Pro Phe Ala Met Val Pro Asp Gln Trp Tyr Asp Ile Glu Gly Val Met  
165 170 175

Thr Gly Ser Ala Thr Val Leu Pro Asp Gly Gln Ile Ile Met Leu Tyr  
180 185 190

Thr Gly Asn Ala Tyr Asp Leu Ser Gln Leu Gln Cys Leu Ala Tyr Ala  
195 200 205

Val Asn Ser Ser Asp Pro Leu Leu Leu Asp Trp Lys Lys Tyr Glu Gly  
210 215 220

Asn Pro Ile Leu Phe Pro Pro Pro Gly Val Gly Tyr Lys Asp Phe Arg  
225 230 235 240

Asp Pro Ser Thr Leu Trp Leu Gly Pro Asp Gly Glu Tyr Arg Met Val  
245 250 255

Met Gly Ser Lys His Asn Glu Thr Ile Gly Cys Ala Leu Ile Tyr His  
260 265 270

Thr Thr Asn Phe Thr His Phe Glu Leu Lys Glu Glu Val Leu His Ala  
275 280 285

Val Pro His Thr Gly Met Trp Glu Cys Val Asp Leu Tyr Pro Val Ser  
290 295 300

Thr Thr His Thr Asn Gly Leu Asp Met Val Asp Asn Gly Pro Asn Val  
305 310 315 320

Lys His Val Leu Lys Gln Ser Gly Asp Glu Asp Arg His Asp Trp Tyr  
325 330 335

Ala Leu Gly Thr Tyr Asp Val Val Asn Asp Lys Trp Tyr Pro Asp Asp  
340 345 350

Pro Glu Asn Asp Val Gly Ile Gly Leu Arg Tyr Asp Phe Gly Lys Phe  
355 360 365

Tyr Ala Ser Lys Thr Phe Tyr Asp Gln His Lys Lys Arg Arg Val Leu  
 370 375 380

Trp Gly Tyr Val Gly Glu Thr Asp Pro Pro Lys Tyr Asp Val Tyr Lys  
 385 390 395 400

Gly Trp Ala Asn Ile Leu Asn Ile Pro Arg Thr Ile Val Leu Asp Thr  
 405 410 415

Lys Thr Asn Thr Asn Leu Ile Gln Trp Pro Ile Ala Glu Val Glu Asn  
 420 425 430

Leu Arg Ser Asn Lys Tyr Asn Glu Phe Lys Asp Val Glu Leu Lys Pro  
 435 440 445

Gly Ser Leu Ile Pro Leu Glu Ile Gly Thr Ala Thr Gln Leu Asp Ile  
 450 455 460

Thr Ala Thr Phe Glu Val Asp Gln Thr Met Leu Glu Ser Thr Leu Glu  
 465 470 475 480

Ala Asp Val Leu Phe Asn Cys Thr Thr Ser Glu Gly Ser Ala Gly Arg  
 485 490 495

Gly Val Leu Gly Pro Phe Gly Leu Val Val Leu Ala Asp Ala Glu Arg  
 500 505 510

Ser Glu Gln Leu Pro Val Tyr Phe Tyr Ile Ala Lys Asp Thr Asp Gly  
 515 520 525

Ser Ser Lys Thr Tyr Phe Cys Ala Asp Glu Ser Arg Ser Ser Asn Asp  
 530 535 540

Val Asp Ile Gly Lys Trp Val Tyr Gly Ser Ser Val Pro Val Leu Glu  
 545 550 555 560

Gly Glu Lys Phe Asn Met Arg Leu Leu Val Asp His Ser Ile Val Glu  
 565 570 575

Gly Phe Ala Gln Gly Gly Arg Thr Val Val Thr Ser Arg Val Tyr Pro  
 580 585 590

Ala Lys Ala Ile Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Phe Leu Phe Asn Asn Ala  
 595 600 605

Thr Gly Ile Ser Val Lys Ala Ser Leu Lys Ile Trp Lys Met Lys Glu  
 610 615 620

Ala Gln Leu Asp Pro Phe Pro Leu Ser Gly Trp Ser Ser  
 625 630 635

<210> 2

<211> 617

ES 2 356 053 T3

<212> PRT

<213> Cynara scolymus

<300>

<308> CAA04120

5 <309> 2002-11-13

<313> (1)..(617)

<400> 2

Met Arg Thr Thr Glu Pro Gln Thr Asp Leu Glu His Ala Pro Asn His  
 1 5 10 15

Thr Pro Leu Leu Asp His Pro Glu Pro Pro Pro Ala Ala Val Arg Asn  
 20 25 30

Arg Leu Leu Ile Arg Val Ser Ser Ser Ile Thr Leu Val Ser Leu Phe  
 35 40 45

Phe Val Ser Ala Phe Leu Leu Ile Leu Leu Tyr Gln His Asp Ser Thr  
 50 55 60

Tyr Thr Asp Asp Asn Ser Ala Pro Ser Glu Ser Ser Ser Gln Gln Pro  
 65 70 75 80

Ser Ala Ala Asp Arg Leu Arg Trp Glu Arg Thr Ala Phe His Phe Gln  
 85 90 95

Pro Ala Lys Asn Phe Ile Tyr Asp Pro Asn Gly Pro Leu Phe His Met  
 100 105 110

Gly Trp Tyr His Leu Phe Tyr Gln Tyr Asn Pro Tyr Ala Pro Phe Trp  
 115 120 125

Gly Asn Met Thr Trp Gly His Ala Val Ser Lys Asp Met Ile Asn Trp  
 130 135 140

Phe Glu Leu Pro Ile Ala Leu Ala Pro Thr Glu Trp Tyr Asp Ile Glu  
 145 150 155 160

Gly Val Leu Ser Gly Ser Thr Thr Ile Leu Pro Asp Gly Arg Ile Phe  
 165 170 175

ES 2 356 053 T3

Ala Leu Tyr Thr Gly Asn Thr Asn Asp Leu Glu Gln Leu Gln Cys Lys  
180 185 190

Ala Val Pro Val Asn Ala Ser Asp Pro Leu Leu Val Glu Trp Val Arg  
195 200 205

Tyr Asp Ala Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Pro Ser Gly Ile Gly Leu Thr  
210 215 220

Asp Tyr Arg Asp Pro Ser Thr Val Trp Thr Gly Pro Asp Gly Lys His  
225 230 235 240

Arg Met Ile Ile Gly Thr Lys Arg Asn Thr Thr Gly Leu Val Leu Val  
245 250 255

Tyr His Thr Thr Asp Phe Thr Asn Tyr Val Met Leu Asp Glu Pro Leu  
260 265 270

His Ser Val Pro Asn Thr Asp Met Trp Glu Cys Val Asp Leu Tyr Pro  
275 280 285

Val Ser Thr Thr Asn Asp Ser Ala Leu Asp Val Ala Ala Tyr Gly Pro  
290 295 300

Gly Ile Lys His Val Leu Lys Glu Ser Trp Glu Gly His Ala Met Asp  
305 310 315 320

Phe Tyr Ser Ile Gly Thr Tyr Asp Ala Phe Asn Asp Lys Trp Thr Pro  
325 330 335

Asp Asn Pro Glu Leu Asp Val Gly Ile Gly Leu Arg Cys Asp Tyr Gly  
340 345 350

Arg Phe Phe Ala Ser Lys Ser Leu Tyr Asp Pro Leu Lys Lys Arg Arg  
355 360 365

Val Thr Trp Gly Tyr Val Ala Glu Ser Asp Ser Tyr Asp Gln Asp Val  
370 375 380

Ser Arg Gly Trp Ala Thr Ile Tyr Asn Val Ala Arg Thr Ile Val Leu  
385 390 395 400

Asp Arg Lys Thr Gly Thr His Leu Leu Gln Trp Pro Val Glu Glu Ile  
405 410 415

Glu Ser Leu Arg Ser Asn Gly His Glu Phe Lys Asn Ile Thr Leu Glu  
420 425 430

Pro Gly Ser Ile Ile Pro Leu Asp Val Gly Ser Ala Thr Gln Leu Asp  
435 440 445

Ile Val Ala Thr Phe Glu Val Asp Gln Glu Ala Leu Lys Ala Thr Ser  
 450 455 460

Asp Thr Asn Asp Glu Tyr Gly Cys Thr Thr Ser Ser Gly Ala Ala Gln  
 465 470 475 480

Arg Gly Ser Phe Gly Pro Phe Gly Ile Ala Val Leu Ala His Gly Thr  
 485 490 495

Leu Ser Glu Leu Thr Pro Val Tyr Phe Tyr Ile Ala Lys Asn Thr Lys  
 500 505 510

Gly Gly Val Asp Thr His Phe Cys Thr Asp Lys Leu Arg Ser Ser Tyr  
 515 520 525

Asp Tyr Asp Gly Glu Lys Val Val Tyr Gly Ser Thr Val Pro Val Leu  
 530 535 540

Asp Gly Glu Glu Phe Thr Met Arg Ile Leu Val Asp His Ser Val Val  
 545 550 555 560

Glu Gly Phe Ala Gln Gly Gly Arg Thr Val Ile Thr Ser Arg Val Tyr  
 565 570 575

Pro Thr Lys Ala Ile Tyr Glu Ala Ala Lys Leu Phe Val Phe Asn Asn  
 580 585 590

Ala Thr Thr Thr Ser Val Lys Ala Thr Leu Lys Val Trp Gln Met Ser  
 595 600 605

Gln Ala Phe Val Lys Ala Tyr Pro Phe  
 610 615

<210> 3

<211> 612

<212> PRT

5 <213> Allium cepa

<300>

<308> CAA69170

<309> 2004-09-09

<313> (1)..(612)

10 <400> 3

Met Asp Ala Gln Asp Ile Glu Ser Arg His Pro Leu Ile Gly Ala Arg  
 1 5 10 15

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

ES 2 356 053 T3

Asp Val Asp Arg Val Leu Asp Arg Ser Thr Val Lys His Val Leu Lys  
 290 295 300  
 Ala Ser Met Asn Asp Glu Trp His Asp Tyr Tyr Ala Ile Gly Thr Phe  
 305 310 315 320  
 Asp Pro Ile Gly Asn Lys Trp Thr Pro Asp Asp Glu Thr Val Asp Val  
 325 330 335  
 Gly Ile Gly Leu Arg Tyr Asp Trp Gly Lys Phe Tyr Ala Ser Arg Thr  
 340 345 350  
 Phe Phe Asp Pro Leu Lys Gln Arg Arg Ile Ile Trp Gly Tyr Ile Gly  
 355 360 365  
 Glu Val Asp Ser Gln Lys Ala Asp Ile Ala Lys Gly Trp Ala Ser Leu  
 370 375 380  
 Gln Gly Ile Pro Arg Ser Val Leu Tyr Asp Val Lys Thr Gly Thr Asn  
 385 390 395 400  
 Val Leu Thr Trp Pro Ile Glu Glu Met Glu Gly Leu Arg Met Ala Arg  
 405 410 415  
 Lys Asp Phe Ser Gly Ile Lys Ile Lys Lys Gly Ser Thr Val Glu Leu  
 420 425 430  
 Ser Asp Phe Gly Asp Ala Phe Gln Ile Asp Ile Glu Ala Glu Phe Thr  
 435 440 445  
 Ile Ser Lys Glu Ala Leu Glu Ala Thr Ile Glu Ala Asp Val Gly Tyr  
 450 455 460  
 Asn Cys Ser Ser Ser Gly Gly Ala Ala Ile Arg Gly Thr Leu Gly Pro  
 465 470 475 480  
 Phe Gly Leu Leu Val Leu Ala Asn Gln Asp Leu Thr Glu Asn Thr Ala  
 485 490 495  
 Thr Tyr Phe Tyr Val Ser Lys Gly Ile Asp Gly Ser Leu Ile Thr His  
 500 505 510  
 Phe Cys Gln Asp Glu Thr Arg Ser Ser Lys Ala Asn Asp Ile Val Lys  
 515 520 525  
 Arg Val Val Gly Gly Thr Val Pro Val Leu Asp Gly Glu Thr Phe Ala  
 530 535 540  
 Val Arg Ile Leu Val Asp His Ser Val Ile Glu Ser Phe Ala Met Gly  
 545 550 555 560

Gly Arg Thr Ser Ala Thr Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Glu Ala Ile Asn  
 565 570 575  
 Ser Ala Ala Arg Val Phe Leu Phe Asn Asn Ala Thr Gly Val Asp Val  
 580 585 590  
 Ile Ala Glu Ser Val Lys Ile Trp Gln Met Asn Ser Thr Tyr Asn Asp  
 595 600 605  
 Phe Tyr His Phe  
 610

<210> 4

<211> 625

<212> PRT

5 <213> Hordeum vulgare

<300>

<308> T06184

<309> 2000-07-21

<313> (1)..(625)

10 <400> 4

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

ES 2 356 053 T3

Tyr Asn Pro Val Gly Thr Asp Trp Asp Asp Gly Met Glu Trp Gly His  
 115 120 125  
 Ala Val Ser Arg Asn Leu Val Gln Trp Arg Thr Leu Pro Ile Ala Met  
 130 135 140  
 Val Ala Asp Gln Trp Tyr Asp Ile Leu Gly Val Leu Ser Gly Ser Met  
 145 150 155 160  
 Thr Val Leu Pro Asn Gly Thr Val Ile Met Ile Tyr Thr Gly Ala Thr  
 165 170 175  
 Asn Ala Ser Ala Val Glu Val Gln Cys Ile Ala Thr Pro Ala Asp Pro  
 180 185 190  
 Asn Asp Pro Leu Leu Arg Arg Trp Thr Lys His Pro Ala Asn Pro Val  
 195 200 205  
 Ile Trp Ser Pro Pro Gly Val Gly Thr Lys Asp Phe Arg Asp Pro Met  
 210 215 220  
 Thr Ala Trp Tyr Asp Glu Ser Asp Glu Thr Trp Arg Thr Leu Leu Gly  
 225 230 235 240  
 Ser Lys Asp Asp His Asp Gly His His Asp Gly Ile Ala Met Met Tyr  
 245 250 255  
 Lys Thr Lys Asp Phe Leu Asn Tyr Glu Leu Ile Pro Gly Ile Leu His  
 260 265 270  
 Arg Val Val Arg Thr Gly Glu Trp Glu Cys Ile Asp Phe Tyr Pro Val  
 275 280 285  
 Gly Arg Arg Ser Ser Asp Asn Ser Ser Glu Met Leu His Val Leu Lys  
 290 295 300  
 Ala Ser Met Asp Asp Glu Arg His Asp Tyr Tyr Ser Leu Gly Thr Tyr  
 305 310 315 320  
 Asp Ser Ala Ala Asn Thr Trp Thr Pro Ile Asp Pro Glu Leu Asp Leu  
 325 330 335  
 Gly Ile Gly Leu Arg Tyr Asp Trp Gly Lys Phe Tyr Ala Ser Thr Ser  
 340 345 350  
 Phe Tyr Asp Pro Ala Lys Asn Arg Arg Val Leu Met Gly Tyr Val Gly  
 355 360 365  
 Glu Val Asp Ser Lys Arg Ala Asp Val Val Lys Gly Trp Ala Ser Ile  
 370 375 380

Gln Ser Val Pro Arg Thr Val Ala Leu Asp Glu Lys Thr Arg Thr Asn  
 385 390 395 400  
 Leu Leu Leu Trp Pro Val Glu Glu Ile Glu Thr Leu Arg Leu Asn Ala  
 405 410 415  
 Thr Glu Leu Thr Asp Val Thr Ile Asn Thr Gly Ser Val Ile His Ile  
 420 425 430  
 Pro Leu Arg Gln Gly Thr Gln Leu Asp Ile Glu Ala Ser Phe His Leu  
 435 440 445  
 Asp Ala Ser Ala Val Ala Ala Leu Asn Glu Ala Asp Val Gly Tyr Asn  
 450 455 460  
 Cys Ser Ser Ser Gly Gly Ala Val Asn Arg Gly Ala Leu Gly Pro Phe  
 465 470 475 480  
 Gly Leu Leu Val Leu Ala Ala Gly Asp Arg Arg Gly Glu Gln Thr Ala  
 485 490 495  
 Val Tyr Phe Tyr Val Ser Arg Gly Leu Asp Gly Gly Leu His Thr Ser  
 500 505 510  
 Phe Cys Gln Asp Glu Leu Arg Ser Ser Arg Ala Lys Asp Val Thr Lys  
 515 520 525  
 Arg Val Ile Gly Ser Thr Val Pro Val Leu Asp Gly Glu Ala Leu Ser  
 530 535 540  
 Met Arg Val Leu Val Asp His Ser Ile Val Gln Gly Phe Asp Met Gly  
 545 550 555  
 Gly Arg Thr Thr Met Thr Ser Arg Val Tyr Pro Met Glu Ser Tyr Gln  
 565 570 575  
 Glu Ala Arg Val Tyr Leu Phe Asn Asn Ala Thr Gly Ala Ser Val Thr  
 580 585 590  
 Ala Glu Arg Leu Val Val His Glu Met Asp Ser Ala His Asn Gln Leu  
 595 600 605  
 Ser Asn Glu Asp Asp Gly Met Tyr Leu His Gln Val Leu Glu Ser Arg  
 610 615 620  
 His  
 625

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 27

<212> ADN  
 <213> Cebador de PCR  
 <400> 5  
 aattcagctg ttatccctag gcggacc 27  
 5 <210> 6  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Cebador de PCR  
 <400> 6  
 10 agtcagctgg gaatttaat ttaattaagg cg 32  
 <210> 7  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Cebador de PCR  
 15 <400> 7  
 aaaatttaaa cataatcagg atcaataaaa c 31  
 <210> 8  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 20 <213> Cebador de PCR  
 <400> 8  
 aaaatttaaa catctgcgct tactcct 27  
 <210> 9  
 <211> 47  
 25 <212> ADN  
 <213> Cebador de PCR  
 <400> 9  
 acttctgcag cggcccgat cgtcaaaca ttggcaata aagttc 47  
 <210> 10  
 30 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Cebador de PCR  
 <400> 10  
 tctaagcttg ggcgctag cagatctgat ctagtaacat agatgacacc 50  
 35

**REIVINDICACIONES**

1.- Un procedimiento para aumentar el contenido de hidratos de carbono de reserva de una planta de caña de azúcar, que comprende:

5 (a) la modificación genética de una planta de caña de azúcar introduciendo al menos una molécula de ácido nucleico extraña que codifica una sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST)

(b) teniendo la planta de caña de azúcar genéticamente modificada de acuerdo con (a) un contenido de hidratos de carbono de reserva mayor en al menos 5% comparado con las correspondientes plantas silvestres de caña de azúcar no modificadas genéticamente entre los entrenudos 10-18.

10 2.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la molécula de ácido nucleico extraña que codifica una 1-SST codifica una 1-SST de *Allium cepa*, *Triticum aestivum*, *Allium sativum*, *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea*, *Hordeum vulgare*, *Taraxacum officinale*, *Cynara scolymus* o de *Helianthus tuberosus*.

15 3.- El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la molécula de ácido nucleico extraña que codifica una 1-SST codifica una 1-SST que tiene una identidad de al menos 80% con la proteína 1-SST mostrada en la SEC ID No. 1.

4.- El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la molécula de ácido nucleico extraña que codifica una 1-SST codifica una 1-SST que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID No. 1.