

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 408**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
C12N 15/60 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07713932 .7**
96 Fecha de presentación: **08.02.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1992219**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.11.2008**

54 Título: **PLANTA QUE TIENE UNA MEJOR CAPACIDAD DE CRECIMIENTO Y DE RESISTENCIA A LAS ENFERMEDADES Y MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE LA MISMA.**

30 Prioridad:
09.02.2006 JP 2006032895

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.02.2012

73 Titular/es:
**JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY
1-8, HONCHO 4-CHOME
KAWAGUCHI-SHI, SAITAMA 332-0012, JP**

72 Inventor/es:
**OGAWA, Kenichi;
MATSUMOTO, Masayoshi y
SHIRAIISHI, Tomonori**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

ES 2 373 408 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

Planta que tiene una mejor capacidad de crecimiento y de resistencia a las enfermedades y método para la producción de la misma

Campo de la técnica

- 5 La presente invención se relaciona con el uso de un ADN que codifica una fructosa -1,6-bisfosfato aldolasa del tipo plástido que se une a glutatión para mejorar las características de crecimiento de la planta y, al mismo tiempo, reducir una incidencia provocada por plagas incluidos insectos y enfermedades, y con el respectivo método. (En adelante, la capacidad de crecimiento se denominará como “características de crecimiento de la planta”, y la resistencia a la enfermedad se denominará como “características de control de plagas” que el traductor considera que son traducciones más apropiadas de los términos).
- 10

Estado del arte

- 15 Convencionalmente, la productividad de los cultivos ha sido mejorada llevando a cabo una mejora en la progenie respaldada por la experiencia, por medio del exterminio de insectos utilizando agroquímicos, y otros métodos. Sin embargo, con el rápido desarrollo de la biología molecular en los últimos años, un método de fitomejoramiento molecular (tal como la producción de una planta transformada) hace posible desarrollar cultivos que tienen alta productividad. Ejemplos específicos de técnicas para mejorar la productividad de los cultivos abarcan: la promoción de cultivos (mejora en las características de crecimiento de las plantas); adición de características (por ejemplo, características de control de plagas) para controlar la incidencia causada por las plagas incluidos insectos y enfermedades; adición de resistencia al estrés; adición de un carácter de enanismo; control del momento de la floración; y similares. Además de los ejemplos precedentes, existen diferentes clases de técnicas que llevan al mejoramiento de la productividad ya sea en forma directa o indirecta.
- 20

- 25 Las técnicas que conducen directamente al mejoramiento en la productividad incluyen la promoción del crecimiento de la planta (la mejora en las características de crecimiento de la planta). Por ejemplo, el Documento 1 que no es de patente indica que el tabaco que tiene sobreexpresada la fructosa-1,6/sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa cianobacteriana mejora sus características de crecimiento. El Documento 2 que no es de patente divulga que la introducción del factor de transcripción Dof1 en *Arabidopsis thaliana* mejora las características de crecimiento de la planta bajo condiciones de bajo contenido de nitrógeno.

- 30 También, la adición de características de control de plagas a los cultivos mejoran la productividad, comparado con los cultivos dañados por plagas incluidos insectos y enfermedades. Las técnicas para producir una planta que tenga las características de control de plagas por medio de la introducción de un gen específico en una planta ya han sido descritas. Por ejemplo, el Documento de patente 1 divulga un método de transformación que es llevado a cabo con un gen que codifica una forma constitutivamente activa de la subunidad α de la proteína G para producir arroz con mayor tolerancia contra roya bacteriana de la hoja. También, el Documento de patente 2 divulga que el arroz transformado con un gen que codifica una proteína defensina es resistente contra el añublo del arroz y la roya bacteriana de la hoja.
- 35

- 40 En algunos casos, sin embargo, la adición de características para controlar las plagas no conduce a un mejoramiento en productividad. Por ejemplo, se sabe que las características de crecimiento de una planta disminuyen cuando un gen relacionado con resistencia al estrés (incluidas las características de control de plagas) se expresa constitutivamente en la planta (ver los Documentos que no son de patente 3 a 5), y se describe que se requieren algunos esfuerzos con el propósito de garantizar las características de crecimiento de las plantas.

[Documento de patente 1]

Publicación de solicitud de patente Japonesa sin examinar, Tokukai, No. 2005 - 192496 (publicado el 21 de Julio, 2005)

[Documento de patente 2]

- 45 Publicación solicitud de patente Japonesa sin examinar, Tokukai, No. 2003 - 88379 (publicado el 25 de Marzo, 2003)

[Documento que no es de patente 1]

Miyagawa Y, Tamoi M, Shigeoka S. Overexpression of a cyanobacterial fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase in tobacco enhances photosynthesis and growth. Nat Biotechnol. 2001 Oct; 19(10): 965 - 9.

- 50 [Documento que no es de patente 2]

Yanagisawa S, Akiyama A, Kisaka H, Uchimiya H, Miwa T. Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants: Improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions. Proc Natl Acad Sci USA. 2004 May 18; 101(20): 7833 - 8. Epub 2004 May 10.

[Documento que no es de patente 3]

Berrocal-Lobo M, Molina A, Solano R. (2002) Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in Arabidopsis confers resistance to several necrotrophic fungi. Plant J. 29: 23 - 32.

[Documento que no es de patente 4]

- 5 Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. Nat Biotechnol. 17: 287 - 291.

[Documento que no es de patente 5]

Tang X, Xie M, Kim YJ, Zhou J, Klessig DF, Martin GB. (1999) Overexpression of Pto activates defense responses and confers broad resistance. Plant Cell. 11: 15 - 29.

10 Descripción de la invención

Como se describió anteriormente, las técnicas para promover el crecimiento de la planta (mejorando las características de crecimiento de la planta) y las técnicas para añadir las características de control de plagas a una planta han sido investigadas separadamente hasta el momento. Por esta razón, se requiere aplicar dos tipos diferentes de técnicas con el propósito de mejorar las características de crecimiento de la planta y añadir las características de control de plagas a una planta. Específicamente, por ejemplo, se deben introducir dos genes diferentes a una planta con el propósito de obtener una planta transformada en la cual se mejoran las características de crecimiento de la planta y se controlan las incidencias causadas por las plagas, incluidos insectos y enfermedades. Sin embargo, existe la posibilidad de que la planta transformada así obtenida no pueda expresar los mismos fenotipos que aquella obtenida por medio de la introducción de cada uno de los dos genes únicamente.

- 20 Si se desarrolla una técnica tal que con una sola técnica se pueda mejorar las características de crecimiento de la planta y añada la característica de control de plagas a una planta simultáneamente, no se presentará el problema anterior. Por lo tanto, se espera que la técnica contribuya en gran medida al mejoramiento en productividad de los cultivos. Sin embargo, tal técnica nunca ha sido descrita hasta el momento.

- 25 La presente invención se hace en vista de los anteriores problemas, y tiene el objetivo de proporcionar: el uso de un ADN para mejorar las características de crecimiento de la planta y, al mismo tiempo, reducir una incidencia causada por plagas incluidos insectos y enfermedades, y un método para mejorar las características de crecimiento de la planta y, al mismo tiempo, reducir una incidencia causada por plagas incluidos insectos y enfermedades.

- 30 A lo largo de la investigación de un mecanismo de control de oxígeno activo en el crecimiento de la planta, los inventores de la presente invención identificaron fructosa-1,6-bisfosfato aldolasas del tipo plástido que se unen a glutatión en células cultivadas de *Arabidopsis thaliana* y cloroplastos aislados de *Arabidopsis thaliana* y *Spinacia oleracea*. Se clonó un gen que codifica la proteína a partir de *Arabidopsis thaliana* de tipo silvestre, se expresó una proteína recombinante en *Escherichia coli* a partir del gen clonado, y se analizó la proteína por su función. En el proceso de investigación, se transformó *Arabidopsis thaliana* con la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa del tipo plástido que se une a glutatión, y se encontró que la planta transformada tenía características mejoradas de crecimiento de la planta comparada con la planta de tipo silvestre. Además, se encontró que las incidencias causadas por las plagas incluidos insectos y enfermedades también estaban controladas en la planta transformada. La presente invención se realizó en base a estos hallazgos.

- 40 Es decir, se utiliza un ADN que codifica una fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa del tipo plástido que se une a glutatión para mejorar las características de crecimiento de la planta y al mismo tiempo, reducir la incidencia causada por plagas incluidos insectos y enfermedades.

Un método de acuerdo con la presente invención en el cual las características de crecimiento de la planta se mejoran y al mismo tiempo la incidencia causada por plagas incluidos insectos y enfermedades se reduce incluye la etapa de: introducir en una planta por medio de la transformación, un ADN que codifica una fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa del tipo plástido que se une a glutatión.

- 45 En el uso de acuerdo con la presente invención y en un método de acuerdo con la presente invención en la cual las características de crecimiento de la planta se mejoran y la incidencia causada por plagas incluidos insectos y enfermedades se reduce, es preferible que un ADN que codifica una fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa del tipo plástido para enlazamiento de glutatión se seleccione del grupo que consiste de los siguientes (a) hasta (d):

(a) un ADN que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1;

- 50 (b) un ADN que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con delección, sustitución, o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1;

(c) un ADN que tiene la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 2; y

(d) un ADN que hibrida bajo condiciones rigurosas con un ADN que tiene la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 2.

5 La presente invención hace posible producir, por medio de la introducción de un solo gen en una planta, una planta en la cual las características de crecimiento de la planta se mejoran y se controla la incidencia causada por plagas incluidos insectos y enfermedades. Por lo tanto, la presente invención puede contribuir en gran medida al mejoramiento en productividad de los cultivos y en productividad de biomasa. También, la presente invención puede reducir significativamente la cantidad de fertilizantes químicos y de agroquímicos a utilizar.

10 Además, si la presente invención se aplica a una planta que sea adecuada como materia prima, se espera que la planta producida por medio de los usos y métodos de la presente invención pueda ser utilizada como una alternativa a diferentes clases de materias primas industriales o fuentes de energía, aunque ahora dependemos principalmente de petróleo crudo para las materias primas industriales o de las fuentes de energía debido a su costo.

Objetivos, características y fortalezas adicionales de la presente invención serán claros por medio de la siguiente descripción. Además, las ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente explicación en referencia a los dibujos.

15 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una vista que ilustra cebadores y sitios de restricción de las enzimas utilizados para la clonación de un gen FBA1.

La Fig. 2 muestra electroforetogramas que ilustran el resultado de la electroforesis llevada a cabo para productos de la RT-PCR del ARNm de FBA1 obtenido a partir de una planta transformada en la cual se introdujo un gen FBA1.

20 La Fig. 3 es una vista que ilustra una posición en la cual se insertó T-ADN en un mutante de inserción de T-ADN (049B07) de un gen FBA1.

La Fig. 4 muestra: fotografías de hojas de cinco tipos de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, 35S-FBA1/Col-0, cad2-1, 35SFBA1/cad2-1, y 049B07) inoculadas con esporas de *Colletotrichum higginsianum* (en la parte superior); y fotografías de las hojas teñidas con azul tripán (en la parte inferior).

25 La Fig. 5 es un gráfico que ilustra el número de hifas que penetran en hojas de cinco tipos de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, 35S-FBA1/Col-0, cad2-1, 35S-FBA1/cad2-1, y 049B07) inoculadas con esporas de *Colletotrichum higginsianum*.

30 La Fig. 6 muestra micrografías para observar la penetración de las hifas llevando a cabo la coloración con azul tripán en hojas de cinco tipos de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, 35S-FBA1/Col-0, cad2-1, 35S-FBA1/cad2-1, y 049B07) inoculadas con esporas de *Colletotrichum higginsianum*.

La Fig. 7 muestra una fotografía de cinco tipos de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, 35S-FBA1/Col-0, cad2-1, 35S-FBA1/cad2-1, y 049B07) inoculadas con esporas de *Colletotrichum higginsianum*, habiendo sido tomada la fotografía 24 días después de la inoculación.

35 La Fig. 8 muestra una fotografía de cinco tipos de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, 35S-FBA1/Col-0 cad2-1, 35S-FBA1/cad2-1, y 049B07) inoculadas con esporas de la cepa DC3000de *Pseudomonas syringae pv. tomato*, habiendo sido tomada la fotografía 5 días después de la inoculación.

La Fig. 9 (a) muestra electroforetogramas que ilustran el resultado de la electroforesis llevada a cabo para productos de RT-PCR del ARNm de PR1 obtenido de cinco tipos de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, 35S-FBA1/Col-0, cad2-1, 35S-FBA1/cad2-1, y 049B07) sometido a tratamiento con salicilato.

40 La Fig. 9 (b) es un gráfico que ilustra la cantidad relativa de ARNm de PR1 obtenido de cinco tipos de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, 35S-FBA1/Col-0 cad2-1, 35S-FBA1/cad2-1, y 049B07) sometido a tratamiento con salicilato.

La Fig. 10 (a) muestra electroforetogramas que ilustran el resultado de la electroforesis llevada a cabo para productos de RT-PCR del ARNm de PDF1.2 obtenido de cinco tipos de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, 35S-FBA1/Col-0, cad2-1, 35SFBA1/cad2-1, y 049B07) sometido a tratamiento con jasmonato.

45 La Fig. 10 (b) es un gráfico que ilustra la cantidad relativa de ARNm de PDF1.2 obtenido de cinco tipos de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, 35S-FBA1/Col-0, cad2-1, 35S-FBA1/cad2-1, y 049B07) sometido a tratamiento con jasmonato.

50 La Fig. 11 muestra una fotografía de *Arabidopsis thaliana* de tipo silvestre (Col-1) y *Arabidopsis thaliana* transformada (35SFBA1/Col-0) dentro de la cual se introdujo un gen FBA1, habiendo sido tomada la fotografía 42 días después de la siembra.

La Fig. 12 muestra una fotografía de: *Arabidopsis thaliana* de tipo silvestre (Col-1); un mutante de inserción de T-

ADN de un gen FBA1 (049B07); *Arabidopsis thaliana* transformada en la cual se introdujo un gen FBA1 (35S-FBA1/Col-0); y cuatro tipos de *Arabidopsis thaliana* transformada en la cual se introdujeron respectivamente cuatro tipos de genes FBA1 mutados para codificar las FBA1 con diferentes residuos de cisteína sustituidos con un residuo de alanina, habiendo sido tomada la fotografía 30 días después de la siembra.

- 5 La Fig. 13 muestra gráficos que comparan, los siguientes tipos de *Arabidopsis thaliana* en (i) peso fresco de la parte aérea de una planta y en (ii) el número total de hojas en rosetón de una planta, entre: *Arabidopsis thaliana* de tipo silvestre (Col-1); un mutante de inserción T-ADN de un gen FBA1 (049B07); *Arabidopsis thaliana* transformada en la cual se introdujo un gen FBA1 (35S-FBA1/Col-0); y cuatro tipos de *Arabidopsis thaliana* transformadas en cada una de las cuales se introdujeron respectivamente un tipo de gen FBA1 mutado para codificar las FBA1 con diferentes
10 residuos de cisteína sustituidos con un residuo de alanina.

La Fig. 14 muestra una fotografía de: *Arabidopsis thaliana* de tipo silvestre (Col-1); y *Arabidopsis thaliana* transformada (35SFBA1) dentro de la cual se introdujo un gen FBA1, cada una de las cuales había crecido (a) bajo las mismas condiciones de CO₂ que las atmosféricas y (b) bajo una condición alta de CO₂, habiendo sido tomada la fotografía 25 días después de la siembra.

- 15 La Fig. 15 muestra gráficos que comparan, en (i) peso fresco de la parte aérea de una planta y en (ii) el número total de hojas en rosetón de una planta, entre: *Arabidopsis thaliana* de tipo silvestre (Col-1); y *Arabidopsis thaliana* transformada (35S-FBA1) en las cuales se introdujo un gen FBA1, cada una de las cuales había crecido (a) bajo las mismas condiciones de CO₂ que las atmosféricas y (b) bajo una condición alta de CO₂.

Mejor forma de llevar a cabo la invención

- 20 En primer lugar, a continuación se describe brevemente los antecedentes de los procesos a través de los cuales se realizó la presente invención.

- Los inventores de la presente invención demostraron (i) que fue necesaria una concentración apropiada de oxígeno activo para una planta no solamente como sustrato en biosíntesis, sino también como un factor de control en el crecimiento de la planta; y (ii) que el crecimiento de la planta puede ser mejorado tratando una semilla, el cuerpo de
25 una planta, una hoja, o una raíz con una concentración apropiada de oxígeno activo. También, los inventores mostraron que el efecto de mejoramiento del crecimiento por parte del oxígeno activo estaba asociado con glutatión en una célula. A través de la investigación, los inventores seleccionaron proteínas que se unen a glutatión en células cultivadas de *Arabidopsis thaliana*, identificando así una proteína que se dedujo que era una fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de tipo plástido (Ito, H., Iwabuchi, M. y Ogawa, K. (2003) Plant Cell Physiol. 44, 655 - 660).

- 30 Después de eso, los inventores clonaron un ADNc que codifica la proteína de *Arabidopsis thaliana* de tipo silvestre, expresaron una proteína recombinante en *Escherichia coli* a partir del gen clonado, y purificaron la proteína recombinante para analizar su función.

- Se predice que *Arabidopsis thaliana* tiene al menos siete genes deducidos para codificar una fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (en adelante, denominada como "FBA") y que tres genes de los siete están dirigidos a un plástido. De las
35 tres FBA, los inventores llamaron a la FBA que se une a glutatión "FBA1" y las otras dos FBA como "FBA2" y "FBA3", respectivamente. Luego, FBA1 hasta FBA3 fueron sometidas a un experimento. Como resultado, se revelaron los siguientes hechos:

- 1) una FBA1 recombinante tiene actividad FBA;
- 2) la FBA1 recombinante está controlada por la glutatión; y
- 40 3) todas las FBA1, FBA2, y FBA3 se suprimen por medio de ditio-treitol o tioredoxina reducida (Trx), pero únicamente FBA1 es activada nuevamente por glutatión.

- Además, se indicó que FBA1 está presente en el cloroplasto debido a que la actividad de FBA se perdió en el cloroplasto aislado de un mutante de inserción de T-ADN de un gen FBA1 ("Ogawa, K., Matsumoto, M. y Ito, H.,
45 (2005) Vol.1, Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives, edited by Van der Est A and Bruce D. Lawrence, Allen Press, Inc., 468-469", "Matsumoto, M. y Ogawa, K., Abstracts of the 23rd Japanese society for plant cell and molecular biology symposium (Dai 23 kai nihon shokubutsu saibou bunshi seibutsu gakkai taikai simpo-jiumu youshi shu), publicado el 4 de agosto del 2005").

- Con el fin de proseguir con la investigación, los inventores introdujeron un gen FBA1 en *Arabidopsis thaliana* de tipo silvestre, y produjeron así una planta transformada. Como resultado, se encontró que se mejoraron las características de crecimiento de la planta y se controlaron las incidencias causadas por plagas incluidos insectos y enfermedades en la *Arabidopsis thaliana* transformada con FBA1.
50

A continuación se describe en forma detallada el método y uso de la presente invención.

La presente invención proporciona: el uso de un ADN que codifica una fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de tipo plástido que se une a glutatión para mejorar las características de crecimiento de la planta y, al mismo tiempo,

reducir una incidencia causada por plagas incluidos insectos y enfermedades, y un método para mejorar las características de crecimiento de la planta y, al mismo tiempo, reducir una incidencia causada por plagas incluidos insectos y enfermedades.

5 En la presente invención, la frase "las características de crecimiento de la planta se mejoran" significa que una planta a la cual se le introduce un ADN que codifica FBA1 tiene un mayor grado de crecimiento o tiene una mayor velocidad de crecimiento, comparada con una planta a la cual no se le introduce el ADN que codifica FBA1. Más específicamente, la frase "las características de crecimiento de la planta se mejoran" significa que la planta a la cual se le introduce el ADN que codifica FBA1 tiene un mayor peso bruto o peso seco, tiene una mayor producción de semilla o de fruto o un mayor peso seco, o tiene un mayor número de hojas, comparado con la planta a la cual no se le introduce el ADN que codifica FBA1.

10 También, en la presente invención, la frase "la incidencia causada por plagas incluidos insectos y enfermedades es controlada" significa que la planta a la cual se le introduce el ADN que codifica FBA1 tiene las siguientes características más sobresalientes, comparada con la planta a la cual no se le introduce el ADN que codifica FBA1: (i) el progreso de una enfermedad causada por hongos o bacterias patógenas puede ser retrasado o la enfermedad puede ser aliviada; (ii) el progreso de daños verminosos provocados por un insecto puede ser retrasado o el daño verminoso puede ser reducido. El control de la incidencia causada por insectos aquí se refiere a: (i) un efecto repelente logrado por la producción de una sustancia repelente contra el insecto; y (ii) un efecto exterminador o un efecto de prevención de crecimiento del insecto logrados por la producción de una sustancia para atraer a su enemigo natural o la producción de una sustancia tóxica contra el insecto.

15 20 La fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa del tipo plástido que se une a glutatión (en adelante, denominada como "FBA1") codificada por el ADN para ser utilizada en la presente invención únicamente necesita tener actividad FBA, existir en un plástido tal como el cloroplasto, y controlar su actividad por medio de glutatión. También, el tipo de planta a partir de la cual se deriva el ADN no está particularmente limitado. Se ha sugerido que FBA1 existe en muchos tipos de plantas. Esto está apoyado por los siguientes hechos: (i) se sabe que una actividad de FBA en el cloroplasto medida convencionalmente por medio del uso de un método bioquímico exhibe dependencia del pH del mismo modo que la FBA1 de *Arabidopsis thaliana*; y (ii) es fácil esperar que el pH óptimo para que una enzima actúe dentro del estroma del cloroplasto durante la fotosíntesis sea de alrededor de 8, en el cual tiene lugar la fotosíntesis. La actividad de FBA se refiere a la actividad para catalizar en forma reversible una reacción en la cual una fructosa-1,6-bisfosfato es convertida en una dihidroxiacetona fosfato y un gliceraldehído-3-fosfato.

25 30 El ADN que codifica FBA1 utilizado en la presente invención puede ser un gen FBA1 derivado de *Arabidopsis thaliana*. La FBA1 derivada de *Arabidopsis thaliana* tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y un gen (ADNc de longitud completa) que codifica FBA1 tiene la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 3. De la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 3, de la posición 145 a la posición 147 son un codón de iniciación; y de la posición 1318 a la posición 1320 son un codón de stop. Es decir, el gen FBA1 de *Arabidopsis thaliana* tiene un marco de lectura abierto (ORF) que consiste en la región entre la posición 145 y la posición 1320 de la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 3. La secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 2 es la secuencia de bases del ORF del gen FBA1 de *Arabidopsis thaliana*. Los genes que son homólogos con la secuencia de bases del gen FBA1 de *Arabidopsis thaliana* abarcan un gen (dbj) BAB55475.1) presente en un genoma de arroz.

35 40 En la presente invención, es preferible utilizar un ADN que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con delección, sustitución, o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y que tiene actividad FBA1. Como se muestra en el Ejemplo descrito más adelante, los inventores ejemplificaron que se mejoraron las características de crecimiento de la planta, tanto en *Arabidopsis thaliana* dentro de la cual se introdujo un ADN que codifica FBA1 que no tiene mutación, como en *Arabidopsis thaliana* en la cual se introdujo cualquiera de los siguientes tipos de ADN: (i) un ADN que codifica FBA1 mutado para sustituir la cisteína de la posición 72 en la secuencia de aminoácidos de FBA1 de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 1) con otro aminoácido (alanina, en el Ejemplo); (ii) un ADN que codifica FBA1 para sustituir la cisteína de la posición 187 en la secuencia de aminoácidos de FBA1 de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 1) con otro aminoácido (alanina, en el Ejemplo).

45 50 La frase "delección, sustitución, o adición de uno o varios aminoácidos" aquí significa que un cierto número (preferiblemente 10 o menos, más preferiblemente 7 o menos, aun más preferiblemente 5 o menos) de los aminoácidos son suprimidos, sustituidos, o añadidos. El cierto número de aminoácidos debe estar dentro del rango en el cual los aminoácidos pueden ser suprimidos, sustituidos, o añadidos por medio del uso de un método bien conocido de producción de péptidos mutados como las técnicas de mutagénesis dirigida. La proteína mutada no está limitada a una proteína que tenga una mutación introducida artificialmente por medio un método bien conocido para la producción de un polipéptido mutado, sino que puede ser una proteína obtenida por medio del aislamiento y purificación de una proteína de origen natural.

55 60 Es bien conocido en este campo que algunos aminoácidos pueden ser alterados en una secuencia de aminoácidos de una proteína sin que se vea significativamente afectada la estructura o función de la proteína. También, se sabe bien que, además de los mutantes artificiales, existen mutantes de origen natural en los cuales la estructura o función no están significativamente alteradas con respecto a su proteína natural debido a su mutación.

Un mutante preferido tiene una sustitución, delección o adición conservativa o no conservativa de un aminoácido. Se prefiere una sustitución, adición, o delección silenciosa. Especialmente, se prefiere la sustitución conservativa. Estas no alteran la actividad del polipéptido relacionada con la presente invención.

5 La sustitución conservativa típica incluye: la sustitución, una por otra, entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu, y Ile; el intercambio de los residuos hidroxilo Ser y Thr; el intercambio de los residuos ácidos Asp y Glu; la sustitución entre los residuos amida Asn y Gln; el intercambio de los residuos básicos Lys y Arg; y la sustitución entre los residuos aromáticos Phe y Tyr.

10 En la presente invención, se puede utilizar un ADN (un primer ADN) que hibrida bajo condiciones rigurosas con un ADN (un segundo ADN) que tiene la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 2, a condición de que el primer ADN codifique una proteína que tenga una actividad de FBA1. El primer ADN puede ser, por ejemplo, un ADN que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con delección, sustitución, o adición de uno o de varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

15 Las "condiciones rigurosas" en la presente invención significan que la hibridación se presente únicamente cuando existe al menos 90% de identidad, preferiblemente al menos 95% de identidad, o más preferiblemente al menos 97% de identidad entre las secuencias. Específicamente, la siguiente condición es un ejemplo de las condiciones rigurosas: (i) se incubaba un filtro de hibridación durante la noche a 42°C en una solución de hibridación (que incluye 50% de formamida, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5 x, 10% de sulfato de dextrano, y 20 mg/ml de ADN desnaturalizado de esperma de salmón); y luego (ii) se lava el filtro en 0,1 x SSC aproximadamente a 65°C.

20 La hibridación puede ser llevada a cabo por medio del uso de un método bien conocido como se describe en "Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory (2001)". Normalmente, una mayor temperatura y una menor concentración de sal aumentan la rigurosidad (es decir, hacen más difícil la hibridación), permitiendo así obtener un ADN que tenga mayor homología.

25 La identidad en una secuencia de aminoácidos o una secuencia base puede ser determinada por medio del uso de un algoritmo BLAST de Karlin y Altschul (Karlin S, Altschul S. F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 2264 - 2268 (1990); Karlin S, Altschul S. F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873 - 5877 (1993)). Con base en el algoritmo BLAST, se han desarrollado los programas llamados BLASTN o BLASTX (Altschul S. F., et al., J. Mol. Biol., 215: 403 (1990)).

El ADN que codifica FBA1 utilizado en la presente invención puede derivarse ya sea de un ADN genómico o un ADNc, o puede ser un ADN sintetizado químicamente.

30 El ADN que codifica FBA1 utilizado en la presente invención puede ser obtenido por medio del aislamiento y clonación de fragmentos de ADN que codifican FBA1 utilizando técnicas conocidas. Por ejemplo, se prepara una sonda que específicamente hibrida con una porción de un ADN que codifica FBA1 de *Arabidopsis thaliana*, y se selecciona una biblioteca de ADN genómico o una biblioteca de ADNc con la sonda.

35 Alternativamente, el ADN que codifica FBA1 utilizado en la presente invención puede ser obtenido por medio de un medio de amplificación tal como PCR. Por ejemplo, se preparan iniciadores para PCR basados en los extremos 5' y 3' de la secuencia (o su secuencia complementaria) del ADNc que codifica la FBA1 de *Arabidopsis thaliana*; y, por medio del uso de los iniciadores, se lleva a cabo la PCR u otro medio con un ADN genómico (o un ADNc) como molde para amplificar la región de ADN entre los iniciadores. De este modo, se pueden obtener fragmentos de ADN que codifican FBA1 utilizados en la presente invención en cantidades masivas.

40 El ADN utilizado en la presente invención puede ser obtenido a partir de un tejido o una célula de una planta apropiada como fuente. El tipo de planta puede ser, pero sin limitarse a, por ejemplo, otras plantas crucíferas que estén estrechamente relacionadas con *Arabidopsis thaliana*, tales como arroz, tabaco, palma aceitera, álamo, y similares. Como se describió anteriormente, se sugiere que muchas clases de plantas tienen una proteína que tiene una actividad FBA1, y por lo tanto, un experto en la materia puede esperar fácilmente que plantas diferentes a *Arabidopsis thaliana* también tengan un ADN que codifica FBA1.

En la presente invención, como método para introducir un ADN que codifica FBA1 en una planta, se utiliza preferiblemente un método en el que se construye un vector de expresión recombinante de forma que tenga un promotor que actúe en una célula de la planta conectado aguas arriba de un ADN que codifica FBA1 y un terminador que actúe en una célula de una planta conectado aguas abajo del ADN, y se introduce en una planta.

50 En la modalidad descrita más adelante, el promotor que actúa en una célula de una planta puede ser, pero no se limita a un promotor 35S del virus mosaico de la coliflor que es expresado constitutivamente. Un promotor que es capaz de ser expresado constitutivamente que no sea el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor puede ser un promotor de actina de arroz, un promotor de ubiquitina de maíz, o similar. Estos promotores también pueden ser utilizados preferiblemente en la presente invención.

55 Un promotor capaz de ser expresado constitutivamente que no sean los promotores anteriores puede ser, pero no se limita a: un promotor específico del tejido de la hoja verde tal como un promotor rbcS y un promotor Cab; y un

promotor inducible tal como un promotor HSP70. Un promotor que puede ser directamente insertado en un genoma de cloroplasto puede ser, pero no se limita a, un promotor *rbcl* o similar, y puede ser cualquier promotor que pueda funcionar en el cloroplasto.

5 El terminador que actúa en una célula de una planta puede ser un terminador derivado de un gen de la enzima sintética nopalina (NOS), un terminador derivado de un virus del mosaico de la coliflor, o similar.

10 Un vector de expresión recombinante usado para la transformación de una planta no está particularmente limitado a una clase específica, siempre y cuando el gen insertado en el vector de expresión recombinante puede ser expresado en una célula de una planta. Es preferible utilizar vectores binarios (tal como el sistema pBI) cuando se utiliza *Agrobacterium* para introducir un vector en una planta. Ejemplos de vectores binarios pueden incluir pBIG, pBIN19, pBI101, pBI121, pBI221, y similares.

15 Las plantas que son transformadas en la presente invención pueden ser cualquiera de las siguientes: plantas enteras; órganos de plantas (tales como una hoja, un pétalo, un tallo, una raíz, una semilla, y similares); tejidos de la planta (tales como epidermis, floema, parénquima, xilema, un haz fibrovascular, un tejido en empalizada, un tejido esponjoso, y similares); células en cultivo de la planta; y diferentes formas de células de la planta (tales como células suspendidas en cultivo); protoplastos; cortes de la hoja; callos, y similares. El tipo de planta utilizada para la transformación no está particularmente limitada, y puede ser una planta capaz de expresar el ADN que codifica FBA1 utilizado.

20 Cuando se utiliza el ADN que codifica la FBA1 de *Arabidopsis thaliana*, se prefieren para transformar plantas crucíferas, que están estrechamente relacionadas con *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, las plantas utilizadas en la presente invención no se limitan a éstas. Se reporta que una planta transformada puede ser producida a partir de plantas tales como tabaco, álamo, y cítricos por medio del uso de un gen de *Arabidopsis thaliana* (Franke R, McMichael C. M., Meyer K, Shirley A. M., Cusumano J. C., Chapple C. (2000) Modified lignin in tobacco y poplar plants over-expressing the Arabidopsis gene encoding ferulate 5-hydroxylase. *Plant J.* 22: 223 - 234; Pena L, Martín-Trillo M, Juárez J, Pina J. A., Navarro L, Martínez-Zapater J. M. (2001) Constitutive expression of Arabidopsis LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. *Nat Biotechnol.* 19: 263 - 267). Por lo tanto, se considera que diferentes clases de plantas transformadas en las cuales se mejoran las características de crecimiento de la planta y se controla la incidencia causada por plagas incluidos insectos y enfermedades pueden ser producidas por medio de la introducción del ADN que codifica la FBA1 de *Arabidopsis thaliana* en las plantas anteriores.

30 Se puede introducir un vector de expresión recombinante en una célula de una planta por medio de un método de transformación conocido en el arte, por ejemplo, un método de *Agrobacterium*, un método de pistola de partículas, un método de polietilén glicol, un método de electroporación, y similares. Por ejemplo, cuando se utiliza el método de *Agrobacterium*, se puede obtener una planta transformada por medio de la (i) introducción de un vector de expresión construido para plantas en un *Agrobacterium* adecuado (tal como *Agrobacterium tumefaciens*), y (ii) la infección, con las cepas resultantes, de pequeñas hojas cultivadas bajo condiciones asépticas, de acuerdo con técnicas tales como un método de disco de hoja (Uchimiya, H., *Plant gene manipulation manual* (Shokubutsu idenshi souse manyuaru), 1990, páginas 27 - 31, Kodansha Scientific, Tokio, Japón).

40 Cuando se utiliza el método de pistola de partículas, es posible utilizar una planta, un órgano de una planta, o un tejido de una planta ya sea directamente o en la forma de una porción o un protoplasto. Las muestras así preparadas pueden ser procesadas utilizando un dispositivo para introducción de un gen (tal como PDS-1000 de BIO-RAD). Generalmente, el método de la pistola de partículas se lleva a cabo bajo una presión de aproximadamente 450 psi a 2000 psi, y a una distancia de aproximadamente 4 cm a 12 cm, y tales condiciones pueden variar dependiendo del tipo de planta o de muestra.

45 Las células o los tejidos de la planta dentro de los cuales se introduce un ADN de interés se seleccionan primero en base a un marcador de resistencia a un fármaco tal como resistencia a kanamicina o resistencia a higromicina y luego se regeneran en plantas por medio del uso de métodos ordinarios. La regeneración de plantas a partir de células transformadas se puede llevar a cabo usando métodos conocidos en el arte de acuerdo con el tipo de las células de la planta.

50 Que el DNA de interés se haya introducido satisfactoriamente o no en la planta se puede determinar, por ejemplo, por medio del uso de un método de PCR, un método de hibridación tipo southern, un método de hibridación tipo northern, o similar. Por ejemplo, que la transformación haya sido llevada a cabo exitosamente o no se puede confirmar de acuerdo con las siguientes etapas: preparación de una biblioteca de ADN de una planta transformada; diseño de iniciadores específicos para el ADN de interés; realización de una PCR con la biblioteca de ADN y los iniciadores; someter los productos amplificados a electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de acrilamida, electroforesis capilar o similar; coloración con bromuro de etidio o similar; y detección de un producto amplificado de interés.

55 Una vez se obtiene una planta transformada en la cual se ha introducido un ADN que codifica FBA1 en el genoma, se puede obtener la descendencia de la planta por medio de la reproducción de la planta ya sea en forma sexual o asexual. Además, es posible producir la planta deseada en cantidad masiva a partir de los materiales de

reproducción (tales como una semilla, un protoplasto, y similares), siendo obtenidos los materiales a partir de la planta, de su progenie, o de su clon.

La planta transformada obtenida en la forma anterior se espera que tenga mejores características de crecimiento de la planta y características de control de plagas, comparada con una planta de tipo silvestre. Es posible confirmar si se mejoran o no las características de crecimiento de la planta por medio de la comparación, de tamaños, pesos, y similares, entre una planta transformada y una planta de tipo silvestre cada una de las cuales es sembrada al mismo tiempo. También, es posible confirmar si la incidencia causada por plagas incluidos insectos y enfermedades puede ser controlada adicionalmente o no, comparando entre una planta transformada y una planta de tipo silvestre en estados de enfermedad después de que han sido inoculadas, por ejemplo, con *Colletotrichum higginsianum* (como en el Ejemplo descrito más adelante).

Las características de crecimiento de la planta que pueden ser obtenidas de acuerdo con los usos y el método de la presente invención se mejoran de la siguiente manera. En *Arabidopsis thaliana* transformada, las características de crecimiento de la planta se mejoran en un 10% a 15% o más incluso bajo una intensidad de luz extremadamente baja (aproximadamente 1/50 de la luz solar). Además, se espera que las características de crecimiento de la planta se mejoren aproximadamente de un 30% a un 40% o más cuando se duplique la intensidad de la luz, y se mejoren aproximadamente de un 70% a un 80% o más cuando se incremente la intensidad de la luz hasta aproximadamente 3/20 de la luz solar. Cuando se incrementa la concentración de CO₂, la planta transformada exhibe de dos a tres veces o incluso más las características de crecimiento de una planta exhibidas por una planta normal. Además, bajo condiciones preferibles, la planta transformada exhibe de 10 a 20 veces o más las características de crecimiento de la planta que exhibe una planta normal con concentración aumentada de CO₂. Las plantas así producidas pueden crecer incluso en un lugar que tenga una intensidad de luz limitada (tal como en un suelo de un bosque). Esto incrementa el área donde las plantas pueden crecer. Además, las características de crecimiento de la planta se mejoran mucho bajo condiciones de luminosidad alta. Por lo tanto, se espera que la productividad de los cultivos se mejore significativamente en un área abierta tal como un campo cultivado. Además, se espera que la aplicación de la presente invención a plantas que llamen la atención como material industrial o como material energético pueda reducir significativamente el costo de producción de las plantas, para hacer que las plantas se conviertan en una alternativa para el petróleo. También, se espera que la aplicación de la presente invención a árboles para pulpa (tales como el álamo) pueda lograr una forestación efectiva y el cultivo de un bosque, para contener una posible deforestación en el futuro. Se espera que la aplicación de la presente invención a plantas en una región árida pueda mejorar la productividad de las plantas en la región árida, para contribuir a la aceleración del reverdecimiento o la prevención de la desertificación.

En vista del control de la incidencia causada por plagas incluidos insectos y enfermedades, una planta transformada que puede ser obtenida por el método de acuerdo con la presente invención posee un amplio espectro no solamente sobre hongos sino también sobre plagas incluidas bacterias e insectos. Salicilato y jasmonato, cada uno de los cuales es producido cuando una planta es infectada con bacterias patógenas, son sustancias de señalización importantes para controlar la incidencia causada por plagas incluidos insectos y enfermedades. Una planta transformada que puede ser obtenida por medio del método de acuerdo con la presente invención tiene una característica sobresaliente de tal manera que se mejora tanto las respuestas al salicilato como al jasmonato para controlar la incidencia causada por plagas incluidos insectos y enfermedades. Esta característica no puede ser encontrada en plantas convencionales. También, el jasmonato es conocido como una sustancia relacionada con las características para controlar la incidencia causada por insectos ("Ozawa, R., Arimura, G., Takabayashi, J., Shimoda, T., y Nishioka, T. (2000) Involvement of jasmonate- and salicylate-related signaling pathways for the production of specific herbivore-induced volatiles in plants, *Plant Cell Physiol.* 41, 391 - 398", "Takabayashi, J. ed. (2003) Protein, nucleic acid and enzyme (Tampakushitsu, kakusan, kouso), vol. 48 (13), October, 2003"). Por lo tanto, una persona capacitada en el arte puede comprender muy fácilmente que una planta transformada que puede ser obtenida por medio del método de acuerdo con la presente invención puede controlar además la incidencia causada por insectos.

[Ejemplos]

La presente invención será descrita en detalle en los Ejemplos. Debe observarse que la presente invención no se limita a los Ejemplos.

(1) Una planta que se utiliza

Para *Arabidopsis thaliana* de tipo silvestre, se utilizó Columbia (Col-0). Se proporcionó una cad2-1 mutante en la cual la cantidad de glutatión endógeno se redujo (Howden, R., Anderson, C. R., Goldsbrough, P. B. y Cobbett, C. S. (1995) A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 107: 1067 - 1073.) por parte del Dr. Christopher S. Cobbett (The University of Melbourne, Parkville, Australia).

Las plantas fueron sembradas en una maceta plástica cuadrada (6,5 x 6,5 x 5 cm) llena con tres capas de suelo que tienen capas de vermiculita (Asahi-Kogyo, Okayama, Japón), suelo de cultivo Kureha (suelo para cultivo de jardines Kureha, Kureha Co., Tokyo, Japón), y vermiculita, empezando en el fondo. Se elaboraron las capas en una proporción de 2:2:1 (en el orden listado anteriormente). Luego, se cultivaron las plantas bajo una condición de un día

largo (16 h de luz/8 h de oscuridad) a 22°C de temperatura de crecimiento, o bajo una condición de día corto (10 h de luz/ 14 h de oscuridad) a 22°C de temperatura de crecimiento.

(2) Clonación de un gen FBA1, producción de un gen FBA1 mutado, y producción de una planta transformada que sobreexpresa FBA1

- 5 Se aisló el ARN total de Columbia (Col-0) de *Arabidopsis thaliana* de tipo silvestre de 4 semanas de edad. Luego, se llevó a cabo una RT-PCR (la cantidad de molde de ARN: 5,0 µg) utilizando un kit Prostar first strand RT-PCR (Stratagene, La Jolla, CA, E. U. A.), de modo que se produjo un ADNc.

10 Como se ilustra en la Fig. 1, se utilizaron los siguientes iniciadores específicos que fueron diseñados con base en una secuencia de ADNc (SEQ ID NO: 3) de FBA1 de modo que se amplificaron dos fragmentos de ADNc de longitud completa por medio de PCR. Luego, cada uno de los fragmentos fue clonado por clonaje-TA aun vector pGEM-T (Promega, Madison, WI, E. U. A.).

1F-1: 5'-GGATCCTATGGCGTCTGCTAG-3' (SEQ ID NO: 4)

1R-1: 5'-ATCTGCAACGGTCTCGGGAGA-3' (SEQ ID NO: 5)

1F-2: 5'-GTGTGGTCCGAGGTGTTCTTCT-3' (SEQ ID NO: 6)

- 15 1R-2: 5'-GAGCTCGAGTAGGTGTAACCCTTG-3' (SEQ ID NO: 7)

Se fusionaron los dos fragmentos a un sitio Bstpl, de modo que se construyó un vector (pGEM-FBA1) que incluía ADNc de longitud completa. Para el propósito de producir una planta transformada, se procesó el pGEM-FBA1 por medio de las enzimas de restricción BamHI y SacI, y luego se introdujeron los fragmentos en un vector pBI121.

20 Además, se produjeron cuatro construcciones para expresar proteínas FBA1 mutadas (*fba1C72A*, *fba1C128A*, *fba1C156A*, y *fba1C187A*, respectivamente). En cada una de las cuatro construcciones, uno de los cuatro diferentes residuos de cisteína en una proteína FBA1 fue sustituido con un residuo de alanina. Todos los cuatro residuos de cisteína fueron codificados en una construcción que incluye un fragmento de BamHI-Bstpl fuera de los dos fragmentos del ADNc que fueron utilizados para producir el pGEM-FBA1. En vista de esto, se llevó a cabo primero una PCR utilizando una combinación de un iniciador pGEM-del-Apal y un iniciador SP6, con el fin de amplificar un fragmento en el cual se suprimió un sitio de clonación múltiple del vector pGEM. Luego, se llevó a cabo primero una PCR por medio del uso de una combinación de un iniciador T7 y cualquiera de los iniciadores Ald-C72A, Ald-C128A, Ald-C156A, o Ald-C187A, para obtener un fragmento en el cual se introdujo una mutagénesis dirigida. La PCR anterior se realizó en un ciclo de 95°C durante 5 minutos y en 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante un minuto, y 72°C durante un minuto.

- 30 T7: 5'-CCGCTGAGCAATAACTAGC-3' (SEQ ID NO: 8)

SP6: 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAAT-3' (SEQ ID NO: 9)

pGEM-del-Apal: 5'-TCACTATAGGGCGAATTGGTACCGA-3' (SEQ ID NO: 10)

Ald-C72A: 5'-AATGCAACCGCTGGGAAGAGG-3' (SEQ ID NO: 11)

Ald-C128A: 5'-TTTGTGCGATGCCTTGCGCGATG-3' (SEQ ID NO: 12)

- 35 Ald-C 156A: 5'-GTCTTGGGCCCAAGGCTTGG-3' (SEQ ID NO: 13)

Ald-C187A: 5'-AGTGTTCCTCCGCGGTCCTTCA-3' (SEQ ID NO: 14)

40 Luego, se mezclaron 0,5 µl de cada uno de los dos productos PCR así obtenidos, se desnaturalizaron térmicamente, y se enfriaron lentamente (94°C durante 10 minutos, 37°C durante 15 minutos, y 4°C durante 35 minutos). Después se añadieron 0,5 µl de LA-Taq (TAKARA BIO Inc., Tokyo, Japón) allí, y se llevó a cabo un tratamiento térmico del mismo a 72°C durante 3 minutos. Además, se añadieron el iniciador T7 (10 µM) y el iniciador SP6 (10 µM), y se llevó a cabo una PCR del mismo en 10 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 57°C durante un minuto, y 72°C durante un minuto. Luego, los fragmentos PCR así obtenidos se digirieron utilizando las enzimas de restricción Apal y BamHI, y se subclonaron en un vector pBluscript SK. Después del proceso de subclonación, se fusionaron los fragmentos de la digestión de BamHI y Bstpl con otro fragmento de ADNc (el fragmento Bstpl-SacI), para ser introducidos a un vector de expresión pBI121.

45 Los vectores de expresión pBI121 así preparados de acuerdo con el procedimiento anterior fueron introducidos en Col-0 y *cad2-1* usando *Agrobacterium* (Clough, S. J. y Bent, A. F. (1998) *Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735 - 743.), de modo que se produjo una planta transformada.

- 50 Específicamente, se llevó a cabo repetidamente un proceso de selección sobre un medio de agar (1/2 de la

concentración de un medio Murashige-Skoog) que contiene kanamicina, como marcador de selección. Después de haber alcanzado tal fase que todas las semillas podrían crecer sobre el medio que contenía la kanamicina (es decir, una generación en la cual los caracteres no fueron segregados), se midió el nivel de expresión del gen introducido por medio del uso del análisis de RT-PCR, y por lo tanto se confirmó la producción de una planta transformada.

5 Antes de llevar a cabo la RT-PCR, se extrajo el RNA de tres hojas maduras de *Arabidopsis thaliana* transformadas de 4 semanas de edad por medio del uso del kit RNeasy Plant Mini (QIAGEN, Valencia, CA, E. U. A.), y se preparó un ADNc por medio del uso del Kit Prostar first Strand RT-PCR (Stratagene, La Jolla, CA, E. U. A.). Luego, se llevó a cabo la RT-PCR en 26 ciclos (94°C durante 30 segundos, 58°C durante 60 segundos, y 72°C durante 60 segundos), por medio del uso de la solución de la reacción que incluye 7.5 µl de EX-taq premezcla (TaKaRa, Otsu, Shiga,

10 Japón); 2 µl del iniciador FBA1-F (1,33 µM); 2 µl del iniciador FBA1-R (1,33 µM); 2 µl del molde de ADNc (0,025 µg); y 1,5 µl de H₂O. Un gen de Tubulina, cuya expresión constitutiva fue confirmada, fue utilizado como control. La RT-PCR para Tubulina se llevó a cabo en 22 ciclos (94°C durante 30 segundos, 58°C durante 60 segundos, y 72°C durante 60 segundos), por medio del uso de: un conjunto de iniciadores de Tublina-F y Tublina-R; y la misma solución de la reacción utilizada en la RT-PCR anterior. El producto PCR fue confirmado por medio de electroforesis

15 en gel de agarosa al 1,2%, y medido cuantitativamente por medio del uso del Bioanalizador 2100 de Agilent Technologies (Agilent Technologies, Hachioji, Japón).

FBA1-F: 5'-TCTGCTAGCTTGGTTAAGCCTAAC-3' (SEQ ID NO: 15)

FBA1-R: 5'-GGCATCGCGCAAGCAATCGACAAA-3' (SEQ ID NO: 16)

Tubulina-F: 5'-GTCCAGTGTCTGTGATATTGCAC-3' (SEQ ID NO: 17)

20 Tubulina-R: 5'-GCTTACGAATCCGAGGGTGC-3' (SEQ ID NO: 18)

La figura 2 muestra el resultado de la electroforesis. La Tubulina era un gen de control cuya expresión constitutiva podría ser confirmada bajo las condiciones de crecimiento en los presentes Ejemplos. Como queda claro a partir de la Fig. 2, se confirmó que 35SFBA1, 35S-fba1C72A, 35S-fba1C128A, 35S-fba1C156A, y 35S-fba1C187A tenían una mayor cantidad del ARNm para FBA1, comparado con el tipo silvestre (Col-0). De forma similar, se confirmó que

25 35S-FBA1/cad2-1 tenía una mayor cantidad del ARNm para FBA1, comparado con cad2-1.

En el presente Ejemplo, se construyó un vector de expresión por medio del uso de un ADNc. Aparte de esto, una persona experto en la materia puede entender fácilmente que una planta transformada puede ser obtenida por (i) clonación de un gen FBA1 incluyendo un intrón de un ADN genómico, (ii) construcción de un vector de expresión con el gen, e (iii) introducción del vector de expresión en una planta.

30 (3) Un mutante de inserción de T-ADN de un gen FBA1

A partir de GABI-Kat (Alemania, <http://www.gabi-kat.de/db>), se proveyeron semillas obtenidas en el comercio (en un estado heterogéneo) de un mutante (Línea GK ID 049B07) en las cuales se insertó T-ADN en un gen FBA1 de *Arabidopsis thaliana*. La Fig. 3 muestra una posición en la cual se insertó T-ADN. Como se ilustra en la Fig. 3, se diseñaron los siguientes iniciadores específicos para el T-ADN y el gen FBA1, y se seleccionaron mutantes

35 homogéneos por medio de PCR utilizando un ADN genómico como molde.

T-1: 5'-CTGGTTTGTCCCCAGCAGGCGAAA-3' (SEQ ID NO: 19)

F-1 : 5'-GGGAATAAAATGGTAAAGAGAAGGAGGC-3' (SEQ ID NO: 20)

F-2: 5'-GCAATAATCAGAGAATCTCACTCT-3' (SEQ ID NO: 21)

Específicamente, se llevaron a cabo los siguientes procedimientos.

40 Se sembraron las semillas suministradas por GABI-Kat, y se cortaron dos hojas dos semanas después de la siembra. Luego, las dos hojas fueron colocadas en un tubo de Eppendorf de 1,5 ml y machacadas. Se añadieron allí dentro 100 µl de una solución de extracción de ADN (que incluía Tris/HCl 200 mM a un pH 7,5, NaCl 250 mM, EDTA 2,5 mM a un pH 8,0, y SDS al 0,5%) y se agitó bien la solución así preparada. Luego, se centrifugó la solución así preparada a 10,080 x g durante 10 minutos. Después de eso, se transfirieron 80 µl del sobrenadante resultante a un

45 tubo de Eppendorf nuevo de 1,5 ml, y se añadieron 60 µl de isopropanol y se agitó la solución así preparada. Luego, se centrifugó la solución así obtenida a 10.080 x g durante 10 minutos. Después de eso, se descartó el sobrenadante resultante, y se añadieron 200 µl de etanol al 70% y se agitó bien la mezcla así obtenida. Posteriormente, se centrifugó la mezcla a 10.080 x g durante 5 minutos, y luego se descartó el sobrenadante resultante y se secó al vacío el precipitado (Micro Vac TOMY) durante 15 minutos. Luego, se disolvió el precipitado

50 seco en 20 µl de TE, y se centrifugó la solución resultante a 10.080 x g durante 10 minutos. Se utilizó el sobrenadante resultante como molde para la PCR. Se llevó a cabo la PCR con una solución para reacción PCR que contenía: 2 µl de MgCl₂ 25 mM; 2 µl de amortiguador 10xPCR; 0,5 µl de dNTP 10 mM; 0,15 µl de Taq ADN polimerasa Sigma; 1,0 µl de solución de ADN como molde; 1,0 µl del iniciador 1; 1,0 µl del iniciador 2; y 12,35 µl de H₂O. Se llevó a cabo la PCR en 25 ciclos (94°C durante 30 segundos, 60°C durante 60 segundos, y 72°C durante

55 120 segundos). Se llevó a cabo la PCR con dos combinaciones de los iniciadores: (i) el iniciador F-1 y el iniciador F-

2; y (ii) el iniciador F-1 y el iniciador T-1. Después de la PCR, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1,2%, de modo que se obtuvo un individuo en el cual se observó una banda únicamente para la combinación de (ii) el iniciador F-1 y el iniciador T-1 como un mutante insertado de T-ADN de FBA1. En lo sucesivo, este mutante insertado de T-ADN de FBA1 se denomina como "049B07".

5 (4) Experimento de inoculación 1 con *Colletotrichum higginsianum*

Se utilizó *Colletotrichum higginsianum*, cuya planta huésped era una planta crucífera, como un hongo de la muestra. Se cultivó el *Colletotrichum higginsianum* sobre un medio inclinado PDA a 22°C durante 10 días, y luego se recolectaron las esporas así obtenidas utilizando un lazo de inoculación. Las esporas fueron suspendidas en agua esterilizada, para obtener una suspensión de esporas, que fue luego ajustada a 1×10^5 esporas/ml.

10 10 µl de la suspensión de esporas se situaron en dos puntos sobre una hoja de cada tipo de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, 35S-FBA1/Col-0, cad2-1, 35S-FBA1/cad2-1, y 049B07) de 4 semanas de edad. Las macetas en las cuales se cultivó cada planta fueron colocadas en bandejas, y cubiertas con una cubierta de plástico transparente para retener suficiente humedad allí dentro. Luego, se incubaron estas plantas a 22°C bajo las condiciones de día largo durante 6 días.

15 Las hojas inoculadas con *Colletotrichum higginsianum* fueron fotografiadas 6 días después de la inoculación, y coloreadas con azul tripán para teñir las células necrotizadas debido a la infección, de acuerdo con el método de Koch y Slusarenko (Koch, E. y Slusarenko, A. (1990) *Arabidopsis* is susceptible to infection by a downy mildew fungus. *Plant Cell* 2, 437 - 445). Es decir, se sumergió la hoja inoculada con *Colletotrichum higginsianum* en una solución de Lactofenol-azul tripán (que contenía 10 ml de ácido láctico, 10 ml de glicerol, 10 g de fenol, y 10 mg de azul de tripano en 10 ml de agua) diluida a la mitad con etanol. La hoja fue luego sometida a ebullición durante 3 minutos. Después de eso, se lavó la hoja con 2,5 g/ml de hidrato de cloral (Wako, Tokio, Japón).

25 La Fig. 4 muestra el resultado. Las fotografías en la parte superior en la Fig. 4 son de hojas inoculadas con *Colletotrichum higginsianum*, y las fotografías en la parte inferior en la Fig. 4 son de las hojas inoculadas con *Colletotrichum higginsianum* y coloreadas con azul tripán. Las flechas en la Fig. 4 indican los puntos inoculados. Como es claro a partir de la Fig. 4, los puntos inoculados de Col-0 (tipo silvestre) habían sido necrosados (coloreados de azul oscuro por medio de la coloración de azul de tripano). Sin embargo, en los puntos inoculados de la planta transformada (35S-FBA1/Col-0), las porciones necrosadas fueron difícilmente reconocidas. Por otra parte, en los puntos inoculados de 35S-FBA1/cad2-1 que fue producida por medio de la introducción de FBA1 en cad2-1, la introducción de 35S-FBA1 no fue efectiva y se reconocieron las porciones necrosadas.

30 Después de la coloración con azul tripán, se hizo el recuento del número de esporas y del número de esporas que tienen hifas penetrantes utilizando un microscopio óptico. La Fig. 5 muestra el resultado. El resultado muestra claramente que 35S-FBA1/Col-0 tenía un menor número de hifas penetrantes, comparado con las plantas de otras líneas.

35 Además, después de la coloración con azul de tripano, se tomaron las fotografías de las hifas penetrantes utilizando el microscopio óptico (X 250). La Fig. 6 muestra las fotografías tomadas así. Las fotografías muestran claramente que 35S-FBA1/Col-0 tenía una longitud más corta de las hifas penetrantes y un menor número de hifas penetrantes, comparado con las plantas de otras líneas.

(5) Experimento de inoculación 2 con *Colletotrichum higginsianum*

40 Se preparó una suspensión de esporas (concentración: 1×10^2 esporas/ml) de *Colletotrichum higginsianum* en la misma forma que en (4).

Se roció la suspensión de esporas e inoculó sobre cinco tipos de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, 35S-FBA1/Col-0, cad2-1, 35S-FBA1/cad2-1, y 049B07) a la edad de 4 semanas. Las macetas en las cuales se cultivó cada planta fueron colocadas sobre bandejas, que fueron recubiertas con una cubierta de plástico transparente para retener suficiente humedad. Luego, estas plantas fueron incubadas a 22°C bajo la condición de día largo durante 24 días.

45 La Fig. 7 muestra la fotografía de las plantas de cada línea, habiendo sido tomada la fotografía 24 días después de la inoculación. La Fig. 7 claramente muestra las siguientes: (i) en 35S-FBA1/Col-0, aunque las hojas infectadas con *Colletotrichum higginsianum* por medio del rocío llevado a cabo en una etapa inicial de este experimento habían sido necrosadas, se formaron nuevas hojas y no se produjo infección adicional; (ii) por otro lado, en las plantas de otras líneas, casi todas las hojas habían sido necrosadas, y la infección se había esparcido a nuevas hojas que se formaron.

50 (6) Experimento de inoculación con la cepa DC3000 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Se investigó la resistencia a los hongos patógenos para la planta por medio del uso de la cepa DC3000 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Se sabe que la cepa DC3000 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* es un hongo patógeno de la planta que puede infectar *Arabidopsis thaliana*. La cepa DC3000 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* de un stock de glicerol (-80°C) fue inoculada por medio de la formación de estrias sobre un medio de agar KB (que

contiene 20 g de peptona proteasa No. 3; 1,4 g de K_2HPO_4 ; 0,4 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; y 10 ml/L de glicerol), y fue cultivada a 28°C durante 2 días. Luego, se recolectaron las células utilizando un Raspador de Células (Asahi Techno Glass, Funahashi, Chiba, Japón). Se suspendieron las células en una cantidad apropiada de una solución de $MgCl_2$ 10 mM, para obtener una suspensión, que fue luego ajustada a 10^9 ufc/ml. Se roció la suspensión e inoculó sobre cinco tipos de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, 35S-FBA1/Col-0, cad2-1, 35S-FBA1/cad2-1, y 049B07) de 4 semanas de edad. Luego, estas plantas fueron incubadas a 22°C bajo la condición de día largo.

La Fig. 8 muestra el resultado. Como queda claro a partir de la Fig. 8, 35S-FBA1/Col-0 tenía un número notablemente menor de hojas que fueron necrosadas, comparado con las plantas de otras líneas. Con relación a una planta dentro de la cual se introduce FBA1 (es decir, una planta huésped), debe observarse lo siguiente. Cuando se introduce FBA1 en cad2-1, se redujo la efectividad de la introducción, comparado con un caso donde FBA1 es introducido en Col-0. Por lo tanto, es evidente que se incrementa la efectividad de la introducción de FBA1 cuando se introduce FBA1 en una planta de la línea que tiene una mayor capacidad de síntesis de glutatión.

(7) Tratamiento con salicilato

Se roció salicilato 1 mM sobre cinco tipos de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, 35S-FBA1/Col-0, cad2-1, 35SFBA1/cad2-1, y 049B07) de 4 semanas de edad, y se utilizó una cubierta de plástico transparente para recubrir y retener la humedad. El salicilato es una sustancia que actúa como señal dentro de una planta cuando la planta es infectada con gérmenes (especialmente bacterias patógenas), con el propósito de reaccionar para controlar la incidencia causada por plagas incluidos insectos y enfermedades. PR1 es una proteína antibacteriana cuya expresión se controla por medio de una señal del salicilato.

Después del rociado, se recogieron tres hojas de cada planta. Específicamente, se recogió una hoja 6 horas después del rociado, se recogió otra hoja 12 horas después del rociado, y se recogió la otra hoja 24 horas después del rociado. Luego, se inmovilizaron las hojas por medio del uso de nitrógeno líquido. Se purificó ARN de cada hoja. Luego, se produjo un ADNc a partir de una cantidad igual de ARNr 18S derivado de cada ARN. Con una solución para reacción que contenía: 7,5 μ l de EXtaq premezclado (TaKaRa, Shiga, Japón); 2 μ l del iniciador PR1-F (1,33 μ M); 2 μ l del iniciador PR1-R (1,33 μ M); 2 μ l de ADNc molde (0,025 μ g); y 1,5 μ l de H_2O , se llevó a cabo la RT-PCR en 30 ciclos (94°C durante 30 segundos, 58°C durante 60 segundos, y 72°C durante 60 segundos).

Los iniciadores utilizados son los siguientes:

PR1-F: 5'-CAGCCCCAAGACTACTTCAATGC-3' (SEQ ID NO: 22)

PR1-R: 5'-GGTCGTTCAATAAGAATGACAGACG-3' (SEQ ID NO: 23)

Los productos de la PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,2%, y medidos cuantitativamente utilizando un Bio-Analyzer (Agilent Technologies, Alemania). La Fig. 9 (a) y la Fig. 9 (b) muestran el resultado. La Fig. 9 (a) muestra el resultado de la electroforesis, y la Fig. 9 (b) muestra la cantidad relativa de ARNm de PR1. Como queda claro a partir de la Fig. 9 (a) y la Fig. 9 (b), 35S-FBA1/Col-0 mantuvo un nivel de expresión alto de un gen PR1 incluso después de 24 horas transcurridas desde que se llevó a cabo el tratamiento con el salicilato, comparado con las plantas de otras líneas. En relación a una planta dentro de la cual se introduce FBA1 (es decir, una planta huésped), debe observarse lo siguiente. Cuando se introdujo FBA1 en cad2-1, se redujo la efectividad de la introducción, comparado con un caso donde se introdujo FBA1 en Col-0. Por lo tanto, es evidente que la efectividad de la introducción de FBA1 se incrementa cuando se introduce FBA1 en una planta de la línea que tiene una mayor capacidad de síntesis de glutatión.

(8) Tratamiento con jasmonato

Se roció jasmonato 50 μ M sobre cinco tipos de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, 35S-FBA1/Col-0, cad2-1, 35SFBA1/cad2-1, y 049B07) de 4 semanas de edad, y se utilizó una cubierta plástica transparente para recubrir y retener la humedad. Se sabe que el jasmonato es una sustancia que actúa como señal sintetizada dentro de una planta cuando se infecta la planta con un microorganismo patógeno (especialmente un miceto) o se la somete al daño provocado por la alimentación de los insectos, con el propósito de desencadenar una reacción de defensa contra la incidencia causada por enfermedad o por insectos. PDF1.2 es una proteína contra los hongos cuya expresión es controlada por una señal del jasmonato.

Después del rociado, se recogieron tres hojas de cada planta. Específicamente, se recogió una hoja 6 horas después del rociado, se recogió otra hoja 12 horas después del rociado, y se recogió la otra hoja 24 horas después del rociado. Luego, se inmovilizaron las hojas por medio del uso de nitrógeno líquido. Se purificó ARN de cada hoja. Luego, se produjo un ADNc a partir de una cantidad igual de ARNr 18S derivado de cada ARN. Después de eso, se preparó una solución para reacción que contenía: 7,5 μ l de EXtaq premezclado (TaKaRa, Shiga, Japón); 2 μ l del iniciador PDF1.2 (1,33 μ M); 2 μ l del iniciador PDF1.2 (1,33 μ M); 2 μ l de ADNc molde (0,025 μ g); y 1,5 μ l de H_2O , se llevó a cabo la RT-PCR en 27 ciclos (94°C durante 30 segundos, 58°C durante 60 segundos, y 72°C durante 60 segundos).

Los iniciadores utilizados para amplificar el PDF1.2 son los siguientes:

PDF1.2-F: 5'-TAAGTTTGCTTCCATCATCACCC-3' (SEQ ID NO: 24)

PDF1.2-R: 5'-GTGCTGGGAAGACATAGTTGCAT-3' (SEQ ID NO: 25)

5 Al igual que en (5) anterior, se sometieron los productos PCR a electroforesis en gel de agarosa al 1,2%, y se midió cuantitativamente utilizando el Bio-Analyzer. La Fig. 10 (a) y la Fig. 10 (b) muestran el resultado. La Fig. 10 (a) muestra el resultado de la electroforesis, y la Fig. 10 (b) muestra la cantidad relativa del ARNm de PDF1.2. Como queda claro a partir de la Fig. 10 (a) y la Fig. 10 (b), 35S-FBA1/Col-0 tenía un mayor nivel de expresión de un gen PDF1.2 24 horas después del procesamiento del jasmonato, comparado con las plantas de otras líneas. Con relación a una planta en la cual se introduce FBA1 (es decir, una planta huésped), debe observarse lo siguiente.
10 Cuando se introduce FBA1 en cad2-1, se redujo la efectividad de la introducción, comparado con un caso donde FBA1 fue introducido en Col-0. Por lo tanto, es evidente que la efectividad de la introducción de FBA1 se incrementa cuando se introduce FBA1 en una planta de la línea que tiene una mayor capacidad de síntesis de glutatión.

(9) Características de crecimiento de la planta

[9-1] Comparación entre una planta transformada (35S-FBA1/Col-0) y una planta silvestre (Col-0)

15 Se observó que *Arabidopsis thaliana* transformada (35S-FBA1 Col-0) dentro de la cual se introdujo un gen FBA1 tenía características de crecimiento de la planta significativamente mejoradas, comparado con *Arabidopsis thaliana* (Col-0) de tipo silvestre.

La Fig. 11 muestra una fotografía que compara entre Col-0 y 35S-FBA1/Col-0, siendo cada uno de Col-0 y 35S-FBA1/Col-0 de 6 semanas de edad. Esto muestra claramente que 35S-FBA1/Col-0 es mayor que Col-0.

20 [9-2] Características de crecimiento de la planta de una planta transformada en la cual se introduce una FBA1 con un aminoácido sustituido

25 Con el propósito de aclarar la importancia de un residuo de cisteína contenido en una secuencia de aminoácidos de FBA1 (SEQ ID NO: 1), se produjeron cuatro tipos de *Arabidopsis thaliana* (35S-fba1C72A, 35S-fba1C128A, 35S-fba1C156A, y 35S-fba1C187A) de modo que ellas expresaran enzimas en las cuales diferentes residuos de cisteína fueran sustituidos con un residuo de alanina, de acuerdo con los procedimientos escritos en (2) más arriba (por ejemplo, "C72A" representa la introducción de una construcción que expresa una enzima FBA1 en la cual la cisteína en posición 72 de la SEQ ID NO: 1 ha sido sustituida con alanina).

30 La Fig. 12 muestra una fotografía de las plantas 30 días después de la siembra. La Fig. 13 muestra un gráfico que compara entre las plantas en (i) peso fresco de la parte aérea de una planta y en (ii) el número total de hojas en rosetón de una planta. Como queda claro a partir de la Fig. 12 y la Fig. 13, 35S-fba1C72A y 35S-fba1C187A tenían características de crecimiento de la planta mejoradas así como también 35S-FBA1/Col-0, comparado con una de tipo silvestre (Col-0). Por otro lado, 35S-fba1C128A y 35S-fba1C156A exhibió características de crecimiento de la planta similares a las características de crecimiento de la planta de tipo silvestre (Col-0), aunque la efectividad fue diferente entre las tres dependiendo de la intensidad de la luz durante el crecimiento de la planta. De acuerdo con este resultado, tal posibilidad sugirió que la cisteína que juega un papel importante para la función de FBA1 era la cisteína de la posición 128 y la cisteína de la posición 156 en la SEQ ID NO: 1. Cuando se sustituyeron la cisteína de la posición 72 y la cisteína de la posición 187 con otro aminoácido respectivamente, se mejoraron las características de crecimiento de la planta. En consecuencia, se presenta la siguiente situación: se podrían mejorar las características de crecimiento de la planta incluso en una planta en la cual se introdujo un gen mutado para codificar FBA1 con un aminoácido original sustituido con otro aminoácido en una secuencia de aminoácidos de FBA1.
40

Además, como queda claro a partir de la Fig. 13, la planta en la cual se mejoraron las características de crecimiento de la planta reveló un incremento en el número total de hojas en rosetón de la misma. Esto indica que se podría incrementar la velocidad de crecimiento de la planta por medio de la introducción de un gen FBA1, así como el grado de crecimiento de una planta.

45 [9-3] Confirmación de la mejora en la capacidad de fijación de CO₂

50 Con el propósito de examinar si se mejoró o no la capacidad de fijación potencial de CO₂ de una planta 35S-FBA1, se hizo una comparación entre (i) plantas que crecieron con una concentración controlada de CO₂ de 0,3% y (ii) plantas que crecieron con la presión atmosférica de CO₂. La Fig. 14 y la Fig. 15 muestran el resultado. Como se muestra en la Fig. 14 y en la Fig. 15, en el caso de una planta de tipo silvestre (Col-0), se mejoraron las características de crecimiento de la planta junto con el incremento en la concentración de CO₂; por otro lado, en el caso de la planta 35S-FBA1, se mejoraron las características de crecimiento de la planta significativamente junto con el incremento en la concentración de CO₂. Este resultado indica que la capacidad de fijación de CO₂ de una planta puede ser significativamente mejorada por medio de la introducción de un gen FBA1.

Todos los documentos académicos y los documentos de patente en la presente memoria se presentan como

referencia de la presente invención.

Aplicabilidad industrial

5 La presente invención contempla el uso de un ADN que codifica una fructosa-1,6-bifosfato aldolasa de tipo plástido para el enlazamiento de glutatona para mejorar las características de crecimiento de la planta y, al mismo tiempo, reducir una incidencia causada por plagas incluidos insectos y enfermedades y el respectivo método. Por lo tanto, se espera que la presente invención pueda ser aplicada a la agricultura y a la silvicultura.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AGENCIA JAPONESA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA PREFECTURA DE OKAYAMA

10 <120> Planta con crecimiento y resistencia mejorados a las enfermedades y a los herbívoros, y método para la creación de la misma

<130> A181 - 16PCT

<150> JP 2006-032895

<151> 2006-02-09

<160> 25

15 <170> Patent In Ver. 2.1

<210> 1

<211> 391

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

20 <400> 1

ES 2 373 408 T3

Met 1 Ala Ser Ala Ser 5 Phe Val Lys Pro Asn 10 Thr Leu Ser Ser Pro 15 Trp
 Ile Gly Gln Arg 20 Ser Phe Ala His Thr 25 Ser Ala Ser Ser 30 Pro Pro
 Pro Arg Val 35 Ser Phe Ala Ile Arg 40 Ala Gly Ala Tyr Ser 45 Asp Gu Leu
 Val Lys Thr Ala Lys Ser Ile 55 Ala Ser Pro Gly Arg 60 Gly Ile Leu Ala
 Ile Asp Gu Ser Asn 70 Thr Cys Gly Lys Arg 75 Leu Ala Ser Ile Gly 80
 Leu Asp Asn Thr Gu 85 Asp Asn Arg Gln Ala Tyr Arg Gln Leu Leu 95 Leu
 Thr Thr Pro Gly 100 Leu Gly Asp Tyr Ile 105 Ser Gly Ser Ile Leu Phe Gu
 Gu Thr Leu Tyr Gln Ser Thr Lys 120 Asp Gly Lys Thr Phe Val Asp Cys
 Leu Arg Asp Ala Asn Ile Val 135 Pro Gly Ile Lys Val 140 Asp Lys Gly Leu
 Ser 145 Pro Leu Ala Gly Ser 150 Asn Gu Gu Ser Trp 155 Cys Gln Gly Leu Asp 160
 Gly Leu Ala Ser Arg 165 Ser Ala Gu Tyr Tyr 170 Lys Gln Gly Ala Arg Phe 175
 Ala Lys Trp Arg 180 Thr Val Val Ser Val 185 Pro Cys Gly Pro Ser 190 Ala Leu
 Ala Val Lys Gu Ala Ala Trp Gly 200 Leu Ala Arg Tyr Ala 205 Ala Ile Ser
 Gln Asp Asn Gly Leu Val Pro 215 Ile Val Gu Pro Gu 220 Ile Leu Leu Asp
 Gly Asp His Pro Ile Gu 230 Arg Thr Leu Gu Val 235 Ala Gu Lys Val Trp 240
 Ser Gu Val Phe Phe Tyr Leu Ala Gln Asn Asn Val Met Phe Gu Gly

				245					250					255					
I l e	L e u	L e u	L y s	260	P r o	S e r	M e t	V a l	T h r	265	P r o	G l y	A l a	G l u	H i s	270	L y s	A s n	
L y s	A l a	S e r	275	P r o	G l u	T h r	V a l	A l a	280	A s p	P h e	T h r	L e u	T h r	285	M e t	L e u	L y s	
A r g	A r g	V a l	290	P r o	P r o	A l a	V a l	295	P r o	G l y	I l e	M e t	P h e	300	L e u	S e r	G l y	G l y	
G n	S e r	G u	305	A l a	G u	A l a	310	T h r	L e u	A s n	L e u	A s n	315	A l a	M e t	A s n	G n	S e r	320
P r o	A s n	P r o	T r p	325	H i s	V a l	S e r	P h e	S e r	330	T y r	A l a	A r g	A l a	L e u	G n	A s n	335	
S e r	V a l	L e u	340	A r g	T h r	T r p	G n	G l y	L y s	345	P r o	G u	L y s	I l e	G u	A l a	S e r	350	
G n	L y s	A l a	355	L e u	L e u	V a l	A r g	A l a	360	L y s	A l a	A s n	S e r	L e u	A l a	G n	L e u	365	
G y	L y s	T y r	370	S e r	A l a	G u	G y	375	G u	A s n	G u	A s p	A l a	L y s	L y s	G y	M e t	380	
P h e	V a l	L y s	385	G y	T y r	T h r	T y r	390											

<210> 2

<211> 1176

<212> ADN

5 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 2

```

at ggcgt ct g ct agct t cgt t aagcct aac accct ct ct t ct ccat ggat cggccaacgc 60
t cct t t gct c acacct ct gc t t ct t ct t ct cct cct cct c gagt ct cct t cgcgat ccgc 120
gccggt gct t act ccgacga gct t gt t aaa accgccaaaa gcat t gcat c ccct gggaga 180
ggt at ct t gg cgat cgat ga gt ccaat gca acct gt ggga agaggct t gc t t ct at cggc 240
t t ggat aaca ccgaggacaa ccgt caggcc t acaggcaac t t ct gct t ac cact cct ggc 300
ct cggcgat t acat ct ct gg t t ccat t ct c t t cgaggaga ct ct t t acca gt ccaccaag 360
gacggt aaga cct t t gt cga t t gct t ggcg gat gccaaaca t cgt ccct gg cat caaagt t 420
gacaagggct t gt ct cccct agccgg t t cc aacgaagagt ct t ggt gcca aggct t ggat 480
ggat t ggcct cacgct ct gc t gagt act ac aagcaaggcg ct cgt t t t gc caagt ggagg 540
acagt ggt ga gt gt t ccc t g cggt cct t ca gcact ggct g t gaaggaagc t gcgt ggggg 600
ct ggct cgct at gcagccat ct ct caggat aat ggt ct t g t ccccat t gt ggagccagag 660
at cct t ct gg acggggacca cccaat agag aggact ct gg aggt ggcaga gaaagt gt gg 720
t cagaggt gt t ct t ct act t ggcacagaac aacgt cat gt t t gagggcat t ct gt t gaag 780
ccgagcat gg t caccacagg cgct gagcac aagaacaagg cct ct cccga gaccgt t gca 840
gat t t cacgc t caccat gct gaaaaggagg gt t cct ccgg ct gt cccagg gat cat gt t t 900
ct gt caggag gacaat caga ggcagaggcc acact gaacc t gaacgccat gaaccagagc 960
ccaaacccat ggcat gt gt c ct t ct cat ac gcacgt gcc t gcagaact c cgt gct caga 1020
acat ggcaag gcaagccgga gaagt t gag gcct cgcaga aggcact gt t ggt gagggca 1080
aaggccaact cact ggccca gct cggcaaa t act cagccg agggagagaa cgaggat gcc 1140
aagaaaggaa t gt t t gt caa gggt t acacc t act ga 1176

```

<210> 3

<211> 1515

10 <212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 3

ccaaagt aga cgact act aa t agt agt aaa caaaacct t t ggct t t aaca ct ct cct cca 60
aat cccagat ct ct ct ct gt ct ct gt cccg cggagt cccc gagagat t ga t caccat cac 120
t t t t gt acct t cct t gt act acct at ggcg t ct gct agct t cgt t aagcc t aacacct c 180
t ct t ct ccat ggat cggcca acgct cct t t gct cacacct ct gct t ct t c t t ct cct cct 240
cct cgagt ct cct t cgcgat ccgcccgggt gct t act ccg acgagct t gt t aaaaccgcc 300

aaaagcat t g cat cccct gg gagaggt at c t t ggcgat cg at gagi ccaa t gcaacct gt 360
gggaagaggc t t gct t ct at cggct t ggat aacaccgagg acaaccgt ca ggcct acagg 420
caact t ct gc t t accact cc t ggcct cggc gat t acat ct ct ggt t ccat t ct ct t cgag 480
gagact ct t t accagt ccac caaggacggg aagacct t t g t cgat t gct t gcgcat gcc 540
aacat cgt cc ct ggcat caa agt t gacaag ggct t gt ct c cct agccgg t t ccaacgaa 600
gagt ct t ggt gcccaaggct t ggat ggat t g gcct cacgct ct gct gagi a ct acaagcaa 660
ggcgt cgt t t t gccagt g gaggacagt g gt gagt gt t c cct gcggg cc t t cagcact g 720
gct gt gaagg aagct gcgt g ggggt ggct cgct at gcag ccat ct ct ca ggat aat ggt 780
ct t gt cccca t t gt ggagcc agagat cct t ct ggacgggg accaccaat agagaggact 840
ct ggaggt gg cagagaaagt gt ggt cagag gt gt t ct t ct act t ggcaca gaacaact c 900
at gt t t gagg gcat t ct gt t gaagccgagc at ggt cacc caggcgt ga gcacaagaac 960
aaggcct ct c ccgagaccgt t gcagat t t c acgct cacca t gct gaaaag gagggt t cct 1020
ccggct gt cc cagggat cat gt t t ct gt ca ggaggacaat cagaggcaga ggccacact g 1080
aacct gaacg ccat gaacca gagcccaaac ccat ggcag t gt cct t ct c at acgcact 1140
gccct gcaga act ccgt gct cagaacat gg caaggcaagc cggagaagat t gaggcct cg 1200
cagaaggcac t gt t ggt gag ggcaaaggcc aact cact gg cccagct cgg caaat act ca 1260
gccgagggag agaacgagga t gccaaagaa ggaat gt t t g t caagggt t a cacct act ga 1320
t t t gt t aat t t cagagat cg t aat aaggat t aaggacct t gt t gt ct t t t gt t t t t t 1380
t ccct t t t t t g t t t t gt ct c t gagaaagaa agacagt cac gagt cacgat cat at cat at 1440
at gt at gt ga gcaact gaa aacat cct ct t aat ct at a t t t cct ct ca gaaagact ga 1500
t t act gt t t g act gc 1515

<210> 4

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia del iniciador sintetizada en forma artificial

<400> 4

10 ggat cct at g gcgt ct gct a g 21

<210> 5

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia del iniciador sintetizada en forma artificial

<400> 5

at ct gcaacg gt ct cgggag a 21

<210> 6

20 <211> 22

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia del iniciador sintetizada en forma artificial
 5 <400> 6
 gt gt ggt ccg aggt gt t ct t ct 22
 <210> 7
 <211> 24
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia del iniciador sintetizada en forma artificial
 <400> 7
 gagct cgagt aggt gt aacc ct t g 24
 15 <210> 8
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia del iniciador sintetizada en forma artificial
 <400> 8
 ccgct gagca at aact agc 19
 <210> 9
 <211> 21
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia del iniciador sintetizada en forma artificial
 <400> 9
 30 atttagtgta cactatagaa t 21
 <210> 10
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia del iniciador sintetizada en forma artificial
 <400> 10

t cact at agg gcgaat t ggt accga 25
 <210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia del iniciador sintetizada en forma artificial
 <400> 11
 aatgcaaccg ct gggaagag g 21
 10 <210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia del iniciador sintetizada en forma artificial
 <400> 12
 tttgtcgatg ccttgcgca tg 22
 <210> 13
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia del iniciador sintetizada en forma artificial
 <400> 13
 25 gt ct t gggcc caaggct t gg 20
 <210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia del iniciador sintetizada en forma artificial
 <400> 14
 agt gt t cccg ccggt ccttc a 21
 <210> 15
 35 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia del iniciador sintetizada en forma artificial

<400> 15

t ct gct agct t ggt t aagcc t aac 24

5 <210> 16

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia del iniciador sintetizada en forma artificial

<400> 16

ggcatcgcgc aagcaatcga caaa 24

<210> 17

<211> 23

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia del iniciador sintetizada en forma artificial

<400> 17

20 gt ccagt gt c t gt gat at t g cac 23

<210> 18

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia del iniciador sintetizada en forma artificial

<400> 18

gct t acgaat ccgagggt gc 20

<210> 19

30 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia del iniciador sintetizada en forma artificial

35 <400> 19

ct ggt t t gcc ccagcaggcg aaa 23

<210> 20

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia del iniciador sintetizada en forma artificial

<400> 20

ggggaat aaa at ggt aaaga gaaggagc 29

<210> 21

<211> 24

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia del iniciador sintetizada en forma artificial

<400> 21

15 gcaat aat ca gagaat ct ca ctct 24

<210> 22

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia del iniciador sintetizada en forma artificial

<400> 22

cagccccaag act act t caa t gc 23

<210> 23

25 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia del iniciador sintetizada en forma artificial

30 <400> 23

ggt cgt t caa t aagaat gac agacg 25

<210> 24

<211> 23

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia del iniciador sintetizada en forma artificial

<400> 24

t aagt t t gct t ccat cat ca ccc 23

<210> 25

<211> 23

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia del iniciador sintetizada en forma artificial

<400> 25

10 gt gct gggaa gacat agt t g cat 23

REIVINDICACIONES

1. Uso de un ADN que codifica una fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa del tipo plástido que se une a glutatión para mejorar las características de crecimiento de una planta y, al mismo tiempo, reducir una incidencia causada por plagas incluidos insectos y enfermedades.
- 5 2. El uso como se expone en la reivindicación 1,
- en donde el ADN que codifica la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa del tipo plástido para que se une a glutatión se selecciona de entre el grupo que consiste de los siguientes (a) hasta (d):
- (a) un ADN que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1;
- 10 (b) un ADN que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con delección, sustitución, o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1;
- (c) un ADN que tiene la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 2; y
- (d) un ADN que hibrida bajo condiciones rigurosas con un ADN que tiene la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 2.
- 15 3. Un método para mejorar las características de crecimiento de la planta y, al mismo tiempo, reducir una incidencia causada por plagas incluidos insectos y enfermedades, comprendiendo el método las etapas de:
- Introducir por medio de transformación, a una planta, un ADN que codifica una fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa del tipo plástido que se une a glutatión.
4. El método como el expuesto en la reivindicación 3,
- 20 en donde el ADN que codifica la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa del tipo plástido que se une a glutatiónse selecciona de entre el grupo que consiste de los siguientes (a) hasta (d):
- (a) un ADN que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1;
- (b) un ADN que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con delección, sustitución, o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1;
- (c) un ADN que tiene la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 2; y
- 25 (d) un ADN que hibrida bajo condiciones rigurosas con un ADN que tiene la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 2.

FIG. 1

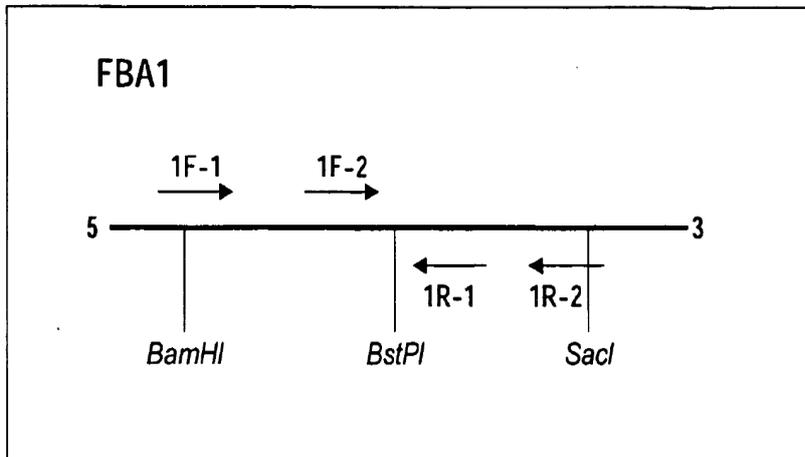


FIG. 2

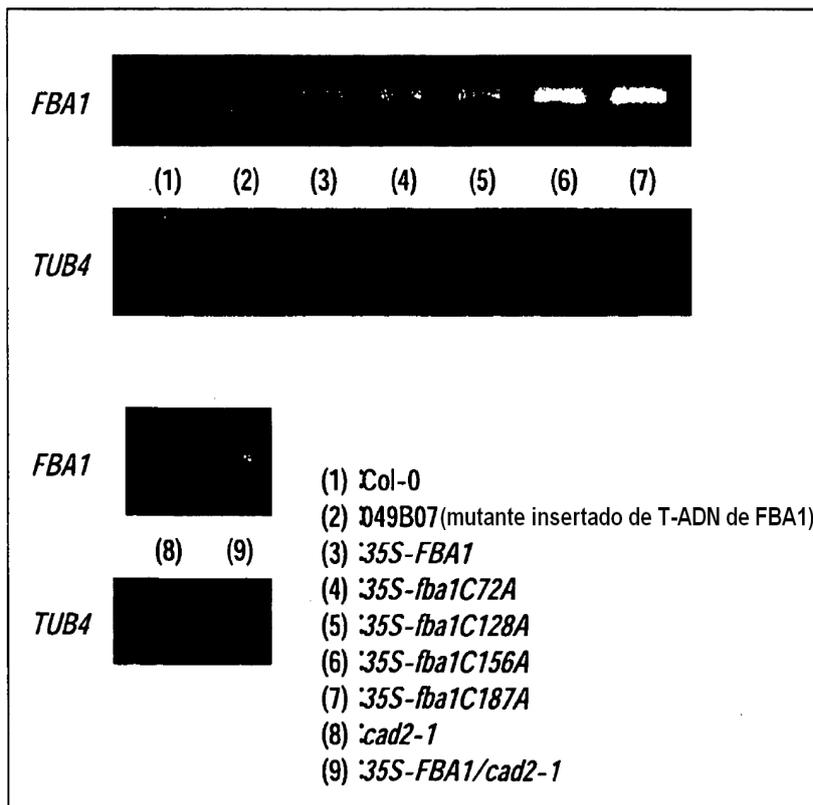


FIG. 3

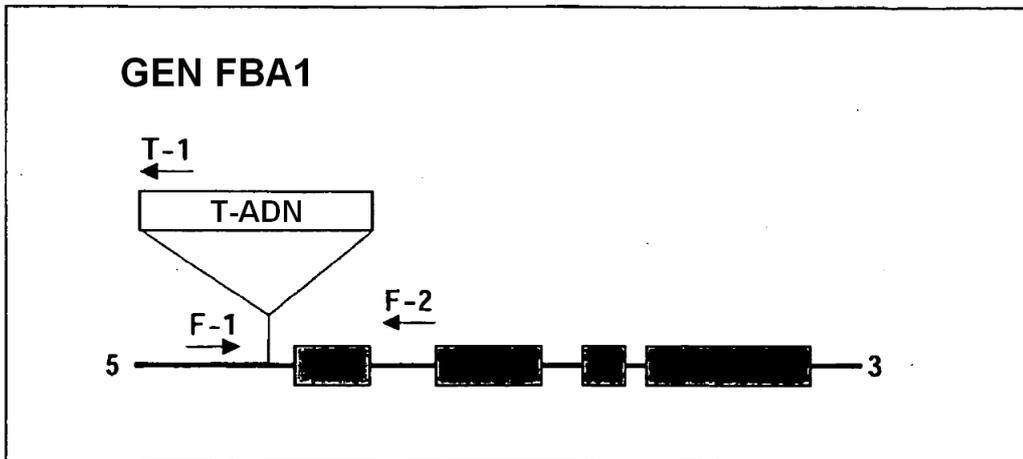


FIG. 4

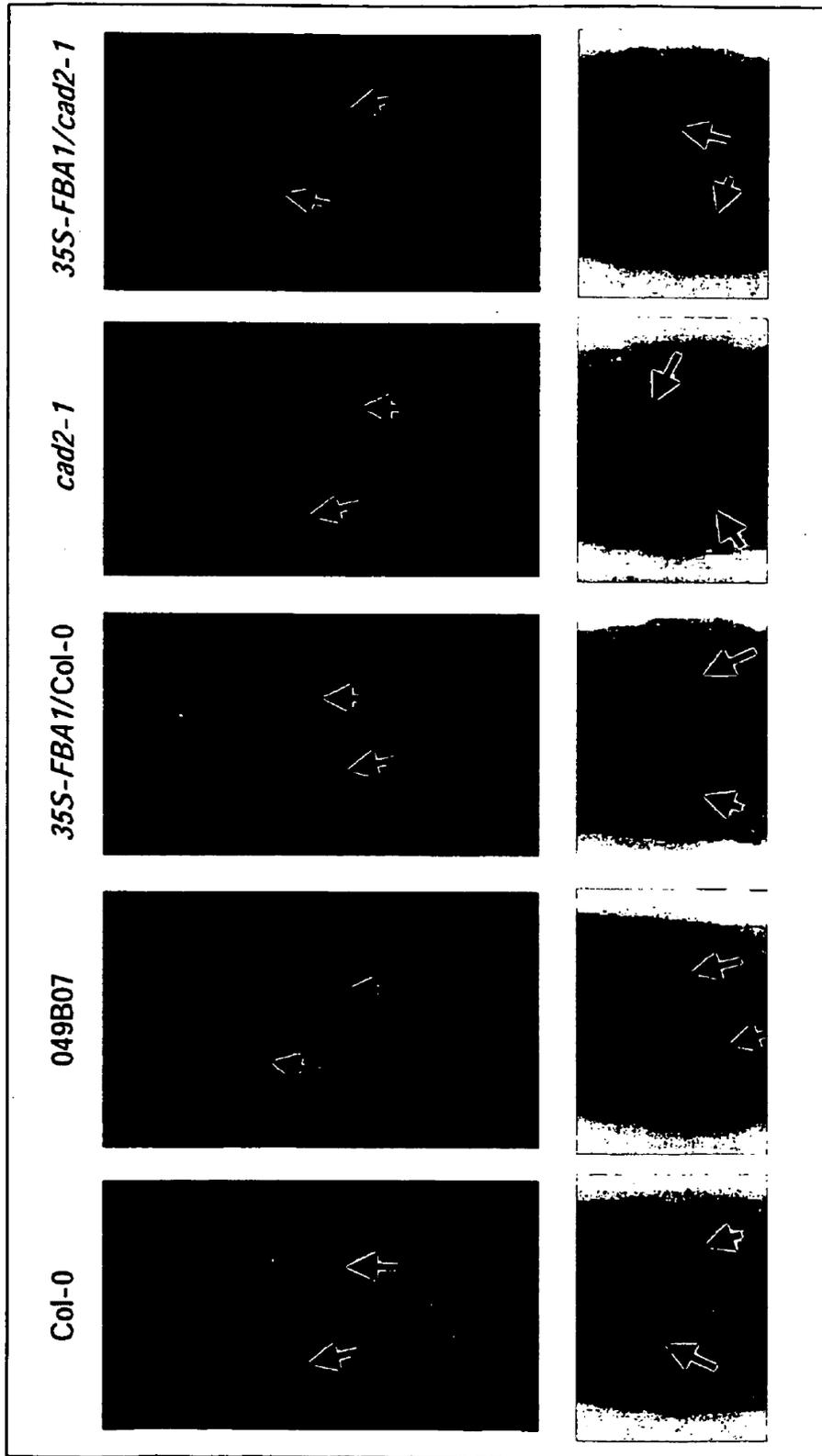


FIG. 5

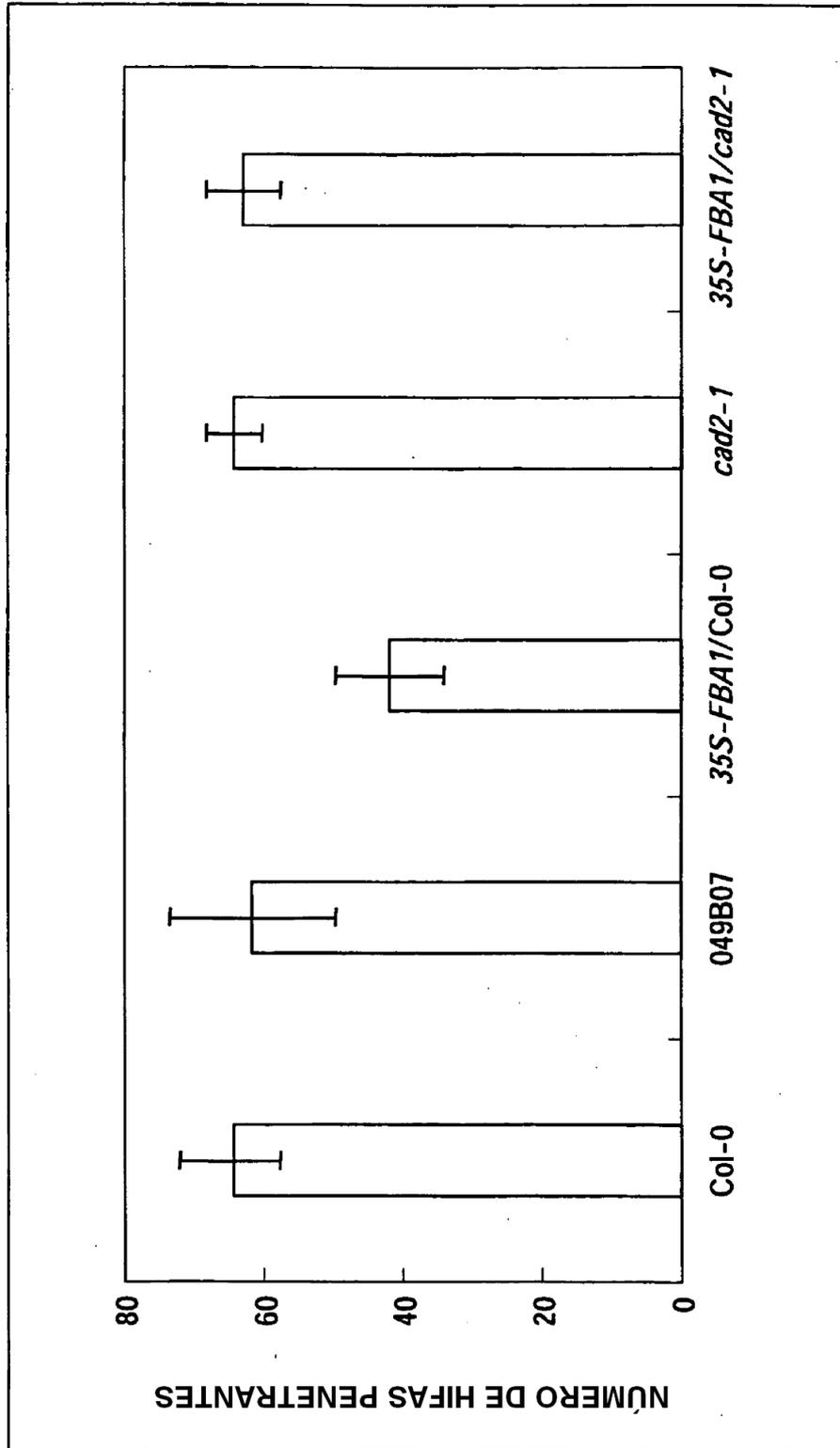


FIG. 6

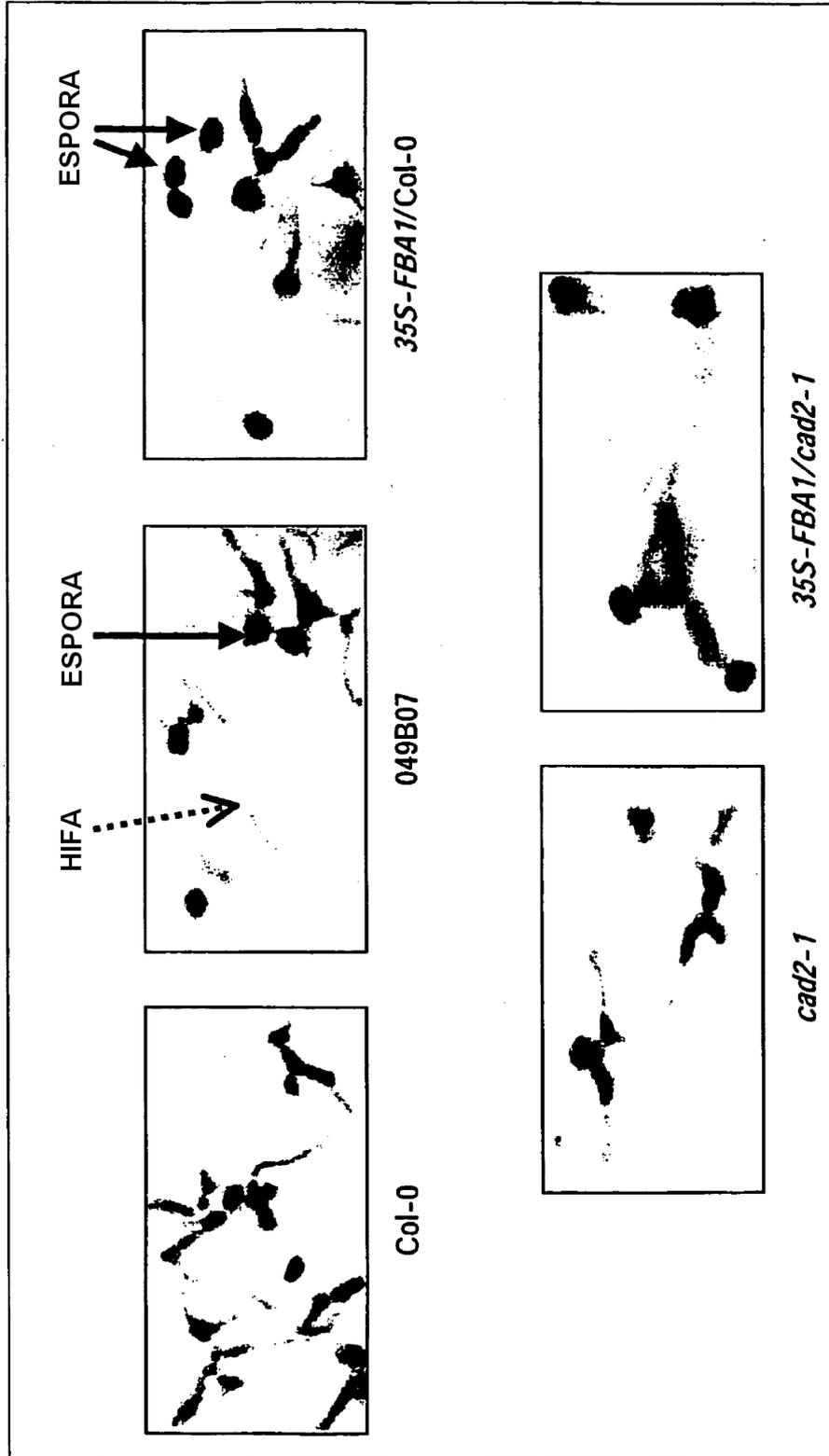


FIG. 7

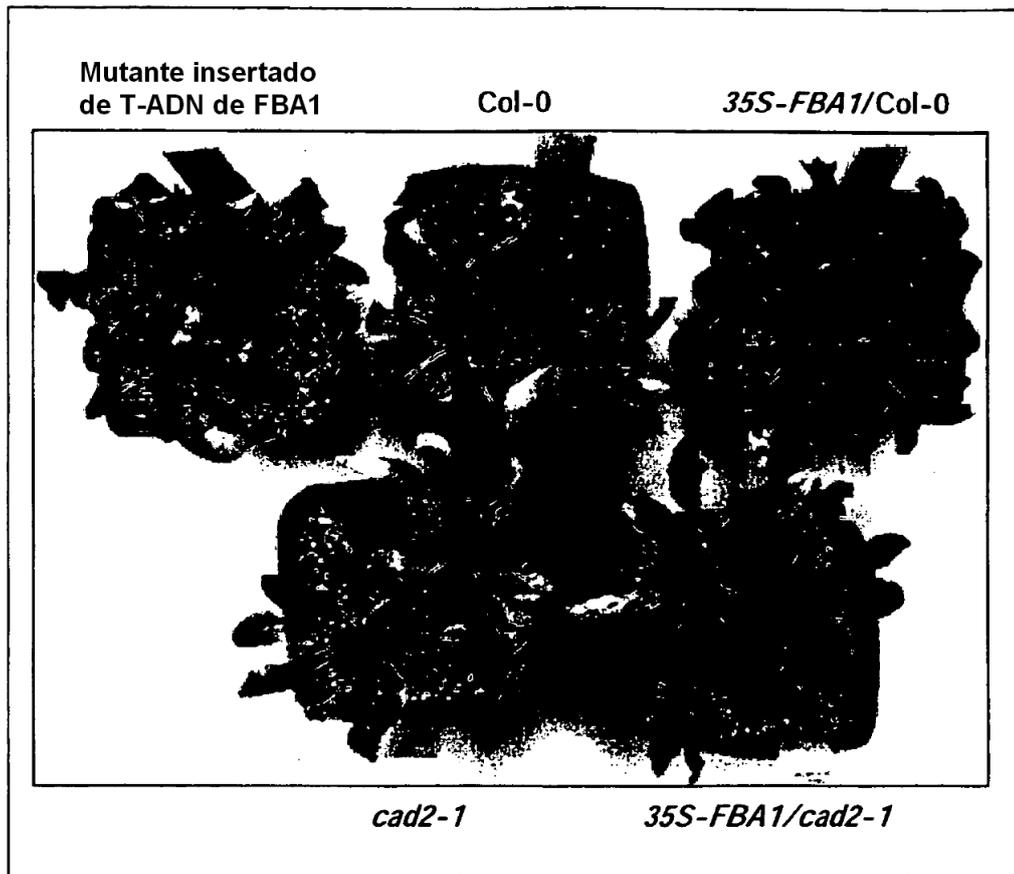


FIG. 8

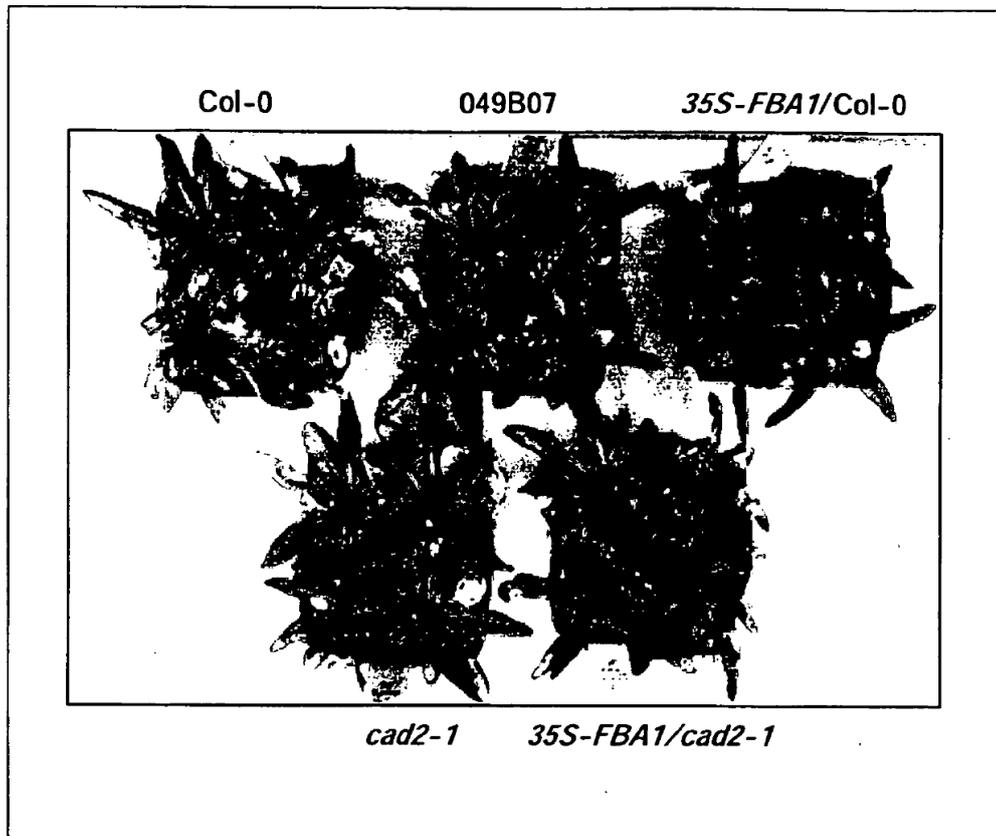


FIG. 9 (a)

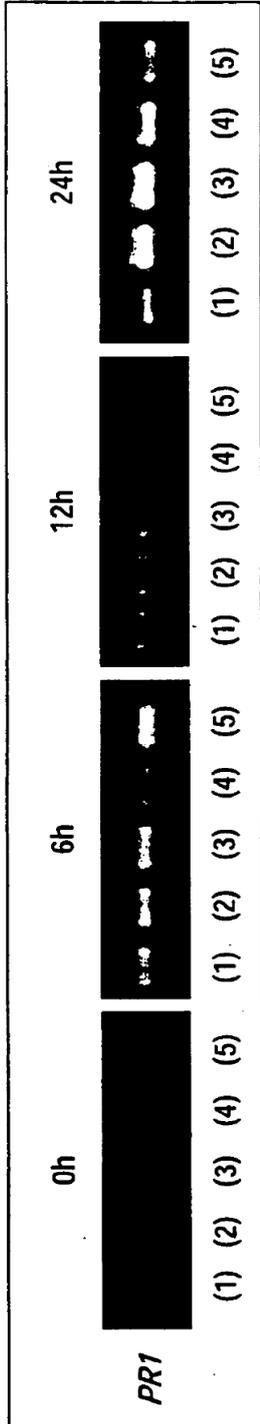


FIG. 9 (b)

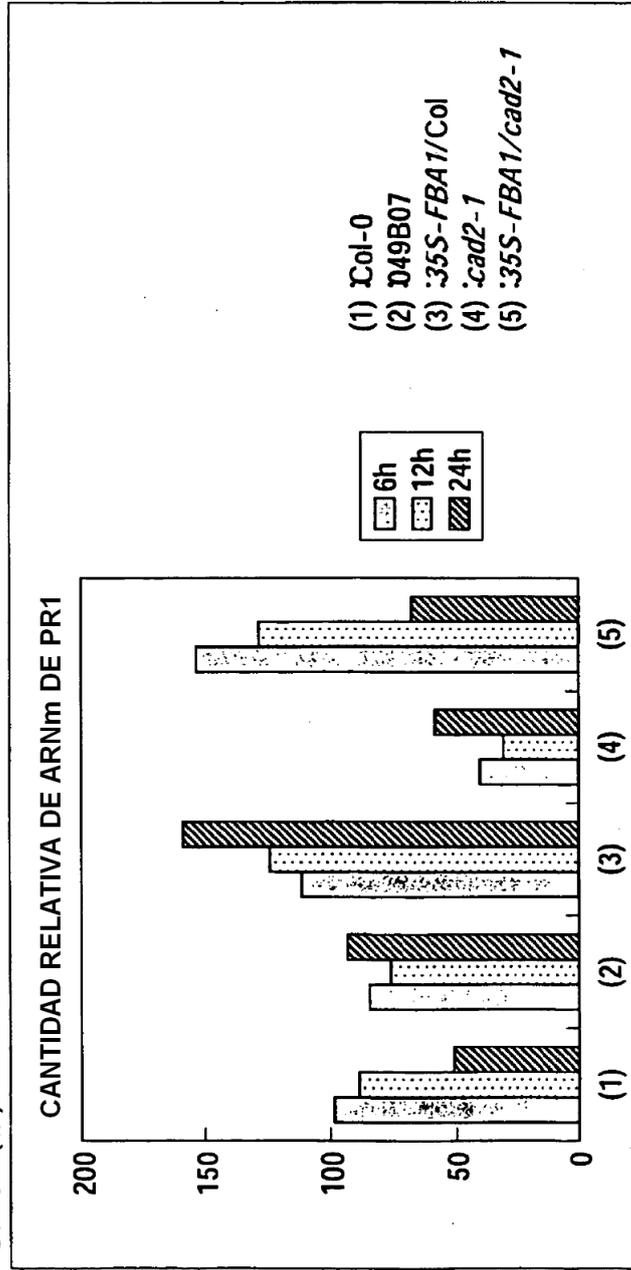


FIG. 10 (a)

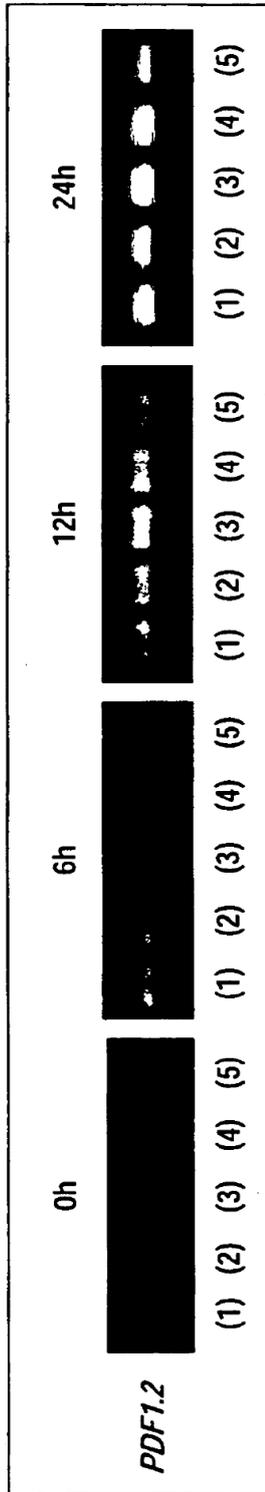


FIG. 10 (b)

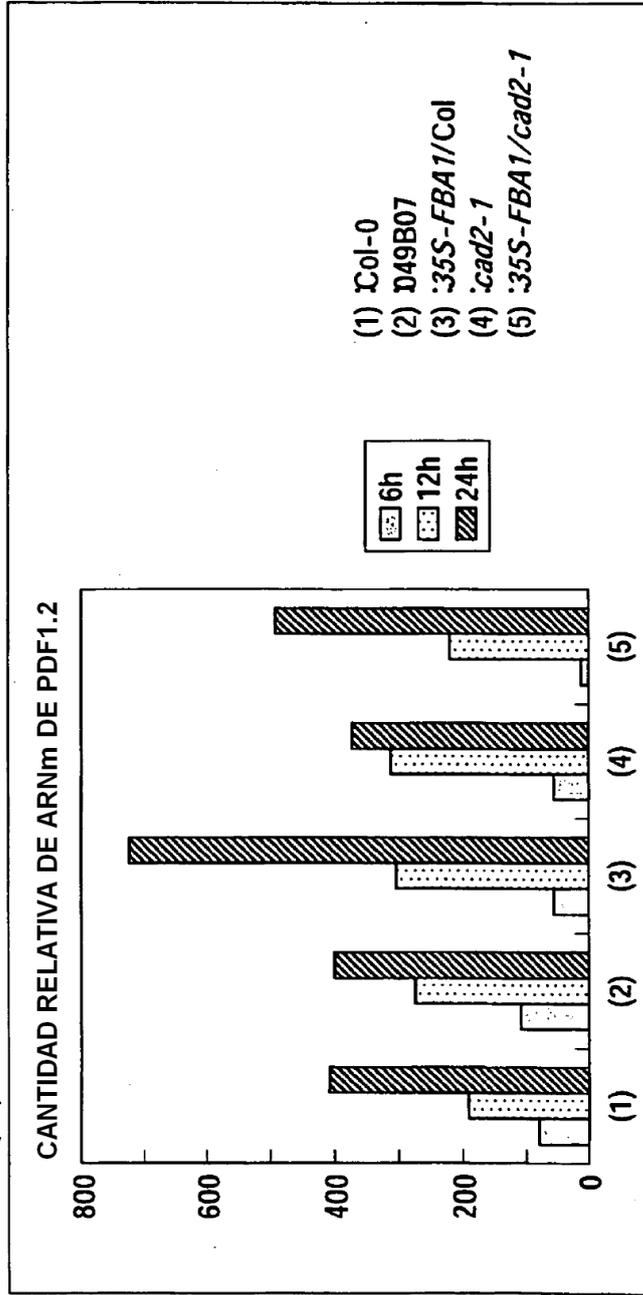


FIG. 11

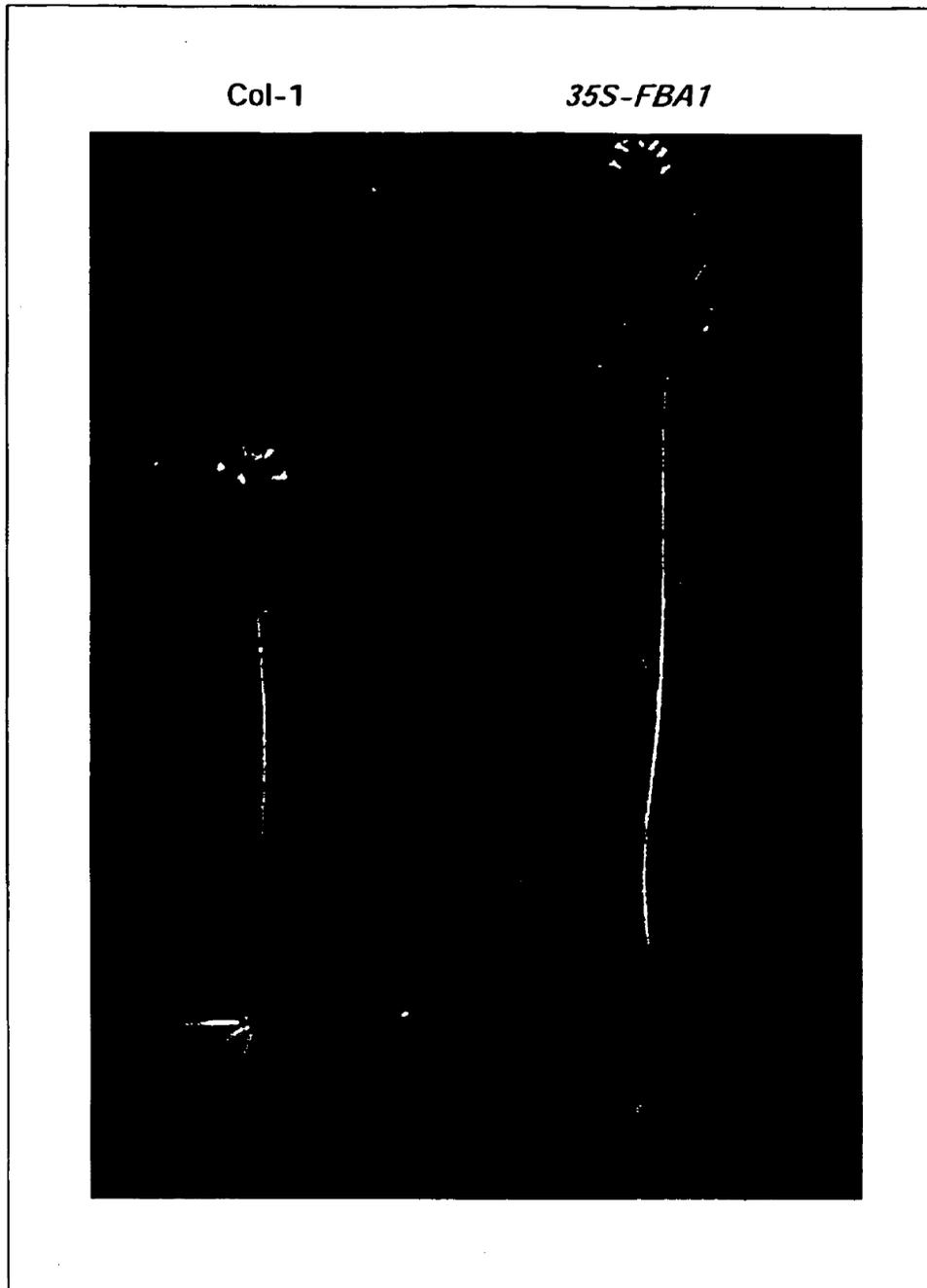
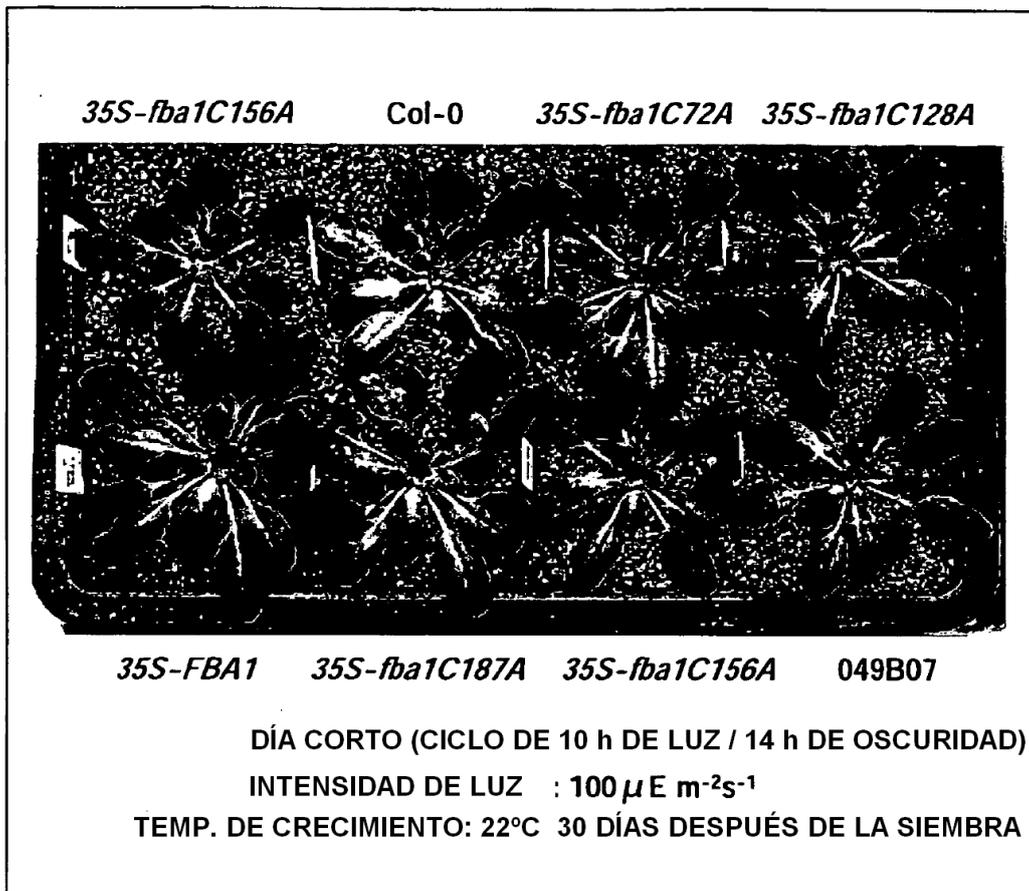


FIG. 12



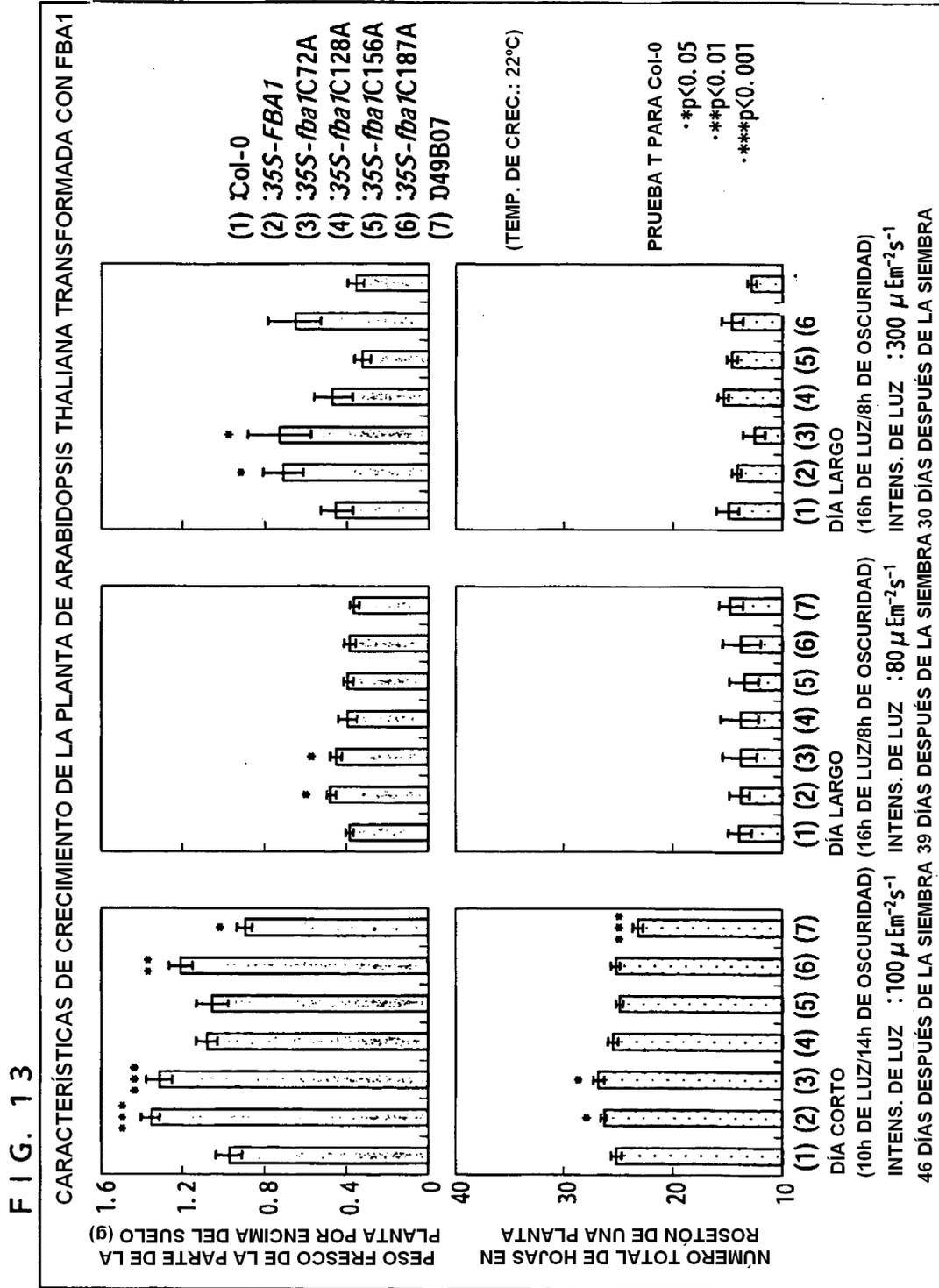


FIG. 14

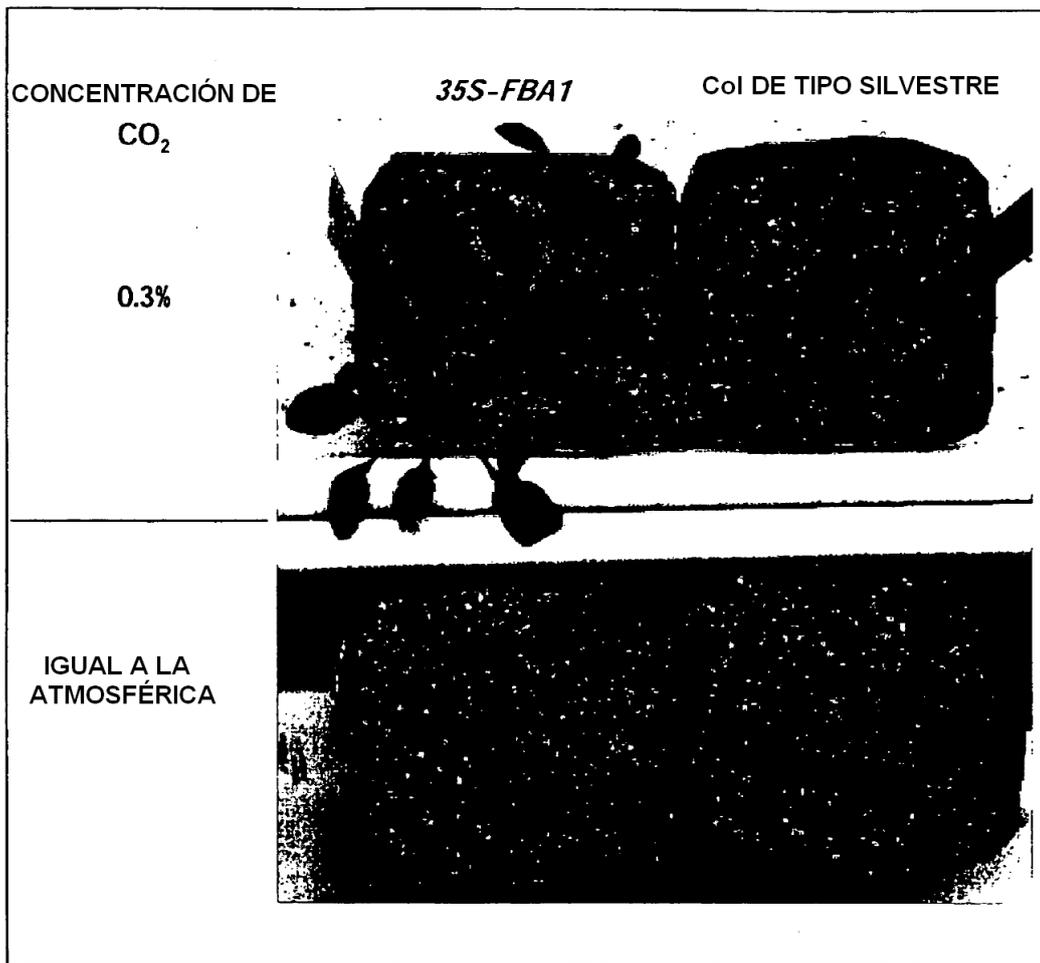


FIG. 15

