

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 982**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 9/10** (2006.01)

**C12N 15/113** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2010 E 10251479 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2292777**

54 Título: **Sorgo dulce transgénico con composición alterada de lignina y proceso de preparación del mismo**

30 Prioridad:

**21.08.2009 US 545699**

**12.03.2010 IN CH06652010**

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

**27.05.2016**

73 Titular/es:

**NAGARJUNA ENERGY PRIVATE LIMITED**  
**(100.0%)**

**Plot No. 61 Nagarjuna Hills Panjagutta**  
**500 082 Hyderabad, IN**

72 Inventor/es:

**BASU, ASITAVA;**  
**MAITI, MRINAL KUMAR;**  
**KAR, SATARUPA;**  
**SEN, SOUMITRA KUMAR y**  
**PANDEY, BANIBRATA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 571 982 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

Sorgo dulce transgénico con composición alterada de lignina y proceso de preparación del mismo

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo de biotecnología y más particularmente al desarrollo de una planta que tiene composición alterada de lignina.

10 **Antecedentes y técnica anterior**

El sorgo dulce, *Sorghum bicolor* (L.) Moench es el único cultivo que proporciona granos y tallos que pueden usarse para la producción de alcohol, azúcar, jarabe, combustible, etc. El sorgo dulce ofrece las siguientes ventajas sobre los otros cultivos:

- 15 • El período de crecimiento (aproximadamente 4 meses) y necesidades de agua (8000 m<sup>3</sup> sobre dos cultivos) son 4 veces inferiores a los de la caña de azúcar (12 a 16 meses y 36000 m<sup>3</sup> respectivamente).
- El coste del cultivo de sorgo dulce es 3 veces inferior que la caña de azúcar.
- Propagación mediante semillas.
- 20 • Adecuado para la producción mecanizada de cultivos.
- El proceso de producción de etanol a partir de sorgo dulce es respetuoso con el medioambiente en comparación con el de las melazas.
- La calidad de quemado del etanol es superior-menos azufre que de la caña de azúcar y alto octanaje.

25 Véase el folleto del International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), "Sweet Sorghum: Food, Feed, Fodder and Fuel Crop," publicado en 2006.

30 Pero la preocupación principal para usar esta planta es la presencia de lignina, que afecta de forma adversa al proceso de extracción de materiales beneficiosos. Más allá del jugo azucarado, el tallo ofrece gran potencial para la producción biocombustible. Sin embargo, debido a la presencia de lignina, como en otras plantas de cultivo, afecta a la separación de los azúcares disponibles tales como xilosa, arabinosa, glucosa, etc.

35 La lignina es un polímero fenilpropanoide complejo. Las plantas comprenden aproximadamente un 25-30 % de lignina basado en el peso seco. La lignina se deposita principalmente en las paredes celulares de tejidos de soporte y conductores, tales como fibras y elementos traqueales. La rigidez mecánica de la lignina fortalece estos tejidos de modo que los elementos traqueales pueden reducir la presión negativa generada por la transpiración sin colapso del tejido.

40 Sin embargo, la lignina es desfavorable en otros diversos aspectos. La lignina disminuye la digestibilidad de cultivos de forraje animal y debe retirarse durante la fabricación de pulpa y papel, que requiere el uso de agentes químicos peligrosos para el medioambiente. La lignina también parece tener un impacto negativo sobre la utilización de biomasa de plantas y árboles.

45 Se considera que la lignina se polimeriza de forma deshidrogenada a partir de monolignoles alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico, y alcohol sinapílico. Estos monolignoles se sintetizan a través de la ruta fenilpropanoide. Estructuralmente, estos monolignoles difieren solamente por el grupo metoxi en las posiciones 3C y 5C del anillo aromático. La proporción variable de los monolignoles determina el tipo de lignina tal como lignina H, G, S. La lignina G ofrece más resistencia que la S durante la sacarificación enzimática. Las ligninas G están más condensadas debido a mayores cantidades de enlaces intermoleculares, mostrando de ese modo más resistencia.

50 Por lo tanto, es deseable desarrollar una planta de sorgo dulce con composición alterada de lignina, comprendiendo dicha composición más de lignina S y menos de lignina G en comparación con el tipo silvestre. Para conseguir esto también es necesario que la planta modificada deba tener mayor contenido de biomasa y su arquitectura bioquímica sea favorable para el procesamiento corriente abajo.

55 Se han adoptado varios enfoques para disminuir o alterar la composición del contenido de lignina para aumentar la relación S/G. Sin embargo, se ha encontrado que los resultados son contradictorios, posiblemente debido a la ausencia de comprensión de la ruta biosintética de lignina y debido a los enfoques adecuados inapropiados para la regulación negativa de la actividad de la enzima biosintética de lignina incluyendo la elección de transgén, promotor usado, construcción de casetes y, por encima de todo, la selección de transformantes. La regulación de las enzimas de las etapas prematuras como la fenilalanina amoníaco liasa, cinamato 4-hidroxilasa, 4-hidroxicinamato CoA ligasa reducen el contenido de lignina. Sin embargo, conduce a efectos pleiotrópicos incluyendo forma alterada de las hojas, lesión fluorescente localizada, retraso en el crecimiento, actividad reducida del polen, morfología y pigmentación alteradas de las flores, nivel reducido de fenilpropanoides solubles, disminución en la relación S/G etc. (Elkind et al, 1990; Bate et al, 1994; Sewalt et al, 1997). Efectos similares por otros trabajadores para alterar o

modificar la relación S/G han producido plantas fenotípicamente defectuosas. Se demostró que la regulación negativa de la actividad ácido cafeico O-metiltransferasa podría provocar una disminución drástica en la biosíntesis de siringil lignina pero con poco efecto sobre la síntesis de guaiacil lignina, que es indeseable ya que la última es más resistente a degradación química. Sin embargo, hasta la fecha no se ha realizado ninguna alteración en la composición de lignina en sorgo dulce principalmente por regulación negativa de gen COMT

Por lo tanto, es de interés desarrollar una planta de sorgo dulce modificada que tenga composición alterada de lignina y bioquímicamente adecuada para procesamiento corriente abajo. Para conseguir la misma, el inventor ha intentado descubrir genes capaces de alterar la composición de lignina en plantas de sorgo dulce y dicha planta es susceptible a fácil degradación enzimática en comparación con plantas de control así como plantas de sorgo reguladas negativamente para COMT generadas en el presente estudio a través de un enfoque similar de silenciamiento génico.

### Sumario de la invención

La presente invención proporciona un proceso para producir una planta transgénica de *Sorghum bicolor* que tiene biomasa aumentada que comprende:

- i) transformar o transfectar una célula de *Sorghum bicolor* con un casete de silenciamiento génico mediado por doble cadena que comprende un ácido nucleico representado por la SEQ ID NO 1, donde dicho ácido nucleico está asociado de forma funcional con un promotor, y donde el ácido nucleico está en orientación sentido-antisentido para generar ARNi *in vivo* para al menos una parte de la SEQ ID NO 1; y
- ii) cultivar una planta de *Sorghum bicolor* a partir de dicha célula.

La presente invención también proporciona el uso de la planta descrita anteriormente que comprende la etapa de recoger el grano y/o los tallos de la planta o el uso de la planta descrita anteriormente en la producción de alcohol, azúcar, jarabe o biocombustible.

Se describe en este documento una secuencia polipeptídica capaz de alterar la composición de lignina en sorgo dulce. La regulación negativa de dicho polinucleótido en plantas de sorgo dulce causa la formación de más S lignina en comparación con G lignina, mayor contenido de azúcar libre y muestra mejores características morfológicas en plantas modificadas en comparación con la planta silvestre. El análisis basado en ordenador de la secuencia aislada revela una similitud con CCoAOMT de plantas ortólogas. Sin embargo, hasta la fecha ningún documento describe la presencia de CCoAOMT y su papel en la modulación de la composición de lignina en sorgo dulce. A partir de ahora en este documento, la secuencia polinucleotídica se menciona como SEQ ID NO 1, que tiene propiedades tipo CCoAOMT, cuya secuencia se ha identificado parcialmente.

Se describe en este documento una secuencia polinucleotídica aislada, donde la secuencia se obtiene de *Sorghum bicolor* que codifica Cafeoil-CoA-O-metiltransferasa (CCoAOMT), y se representa por la SEQ ID NO 1. De acuerdo con algunos aspectos, el ADN puede ser ADNc.

La invención se refiere a un proceso que comprende el uso de una construcción de silenciamiento génico mediado por ARNi que comprende un fragmento adecuado de ácido nucleico representado por la SEQ ID NO 1, donde el ácido nucleico está asociado de forma funcional con un promotor, donde el fragmento de ácido nucleico está en la orientación con sentido-antisentido bicatenaria y facilita la producción *in vivo* de ARNi para al menos una parte de una SEQ ID NO 1. Se describen en este documento vectores que comprenden la construcción, y en algunos aspectos el vector puede ser un vector pUC18.

También se describe en ese documento una planta transgénica, semilla, grano o tallos que comprenden una construcción descrita anteriormente.

Un aspecto adicional se refiere a cebadores directos e inversos representados por la SEQ ID NO 3 y 4 o 5 y 6. Los cebadores son útiles en la amplificación de CCoAOMT.

Sorprendentemente, se ha descubierto que la regulación negativa de la SEQ ID NO 1 en sorgo dulce produce una planta que es superior a las plantas obtenidas por regulación negativa de COMT con respecto al contenido de biomasa, almidón, y azúcar libre y propiedades fenotípicas.

### Breve descripción de las figuras

Fig. 1: Crecimiento potenciado de la planta T0 de sorgo (derecha) transformada tipo anti-CCoAOMT en comparación con la planta de control (izquierda).

Fig. 2: Crecimiento potenciado de sorgo transgénico (planta T1) con el gen tipo CCoAOMT regulado negativamente representado por la SEQ ID NO 1 en campo.

Fig. 3: Panoja de la planta de control (izquierda) y la planta transformada con el gen tipo CCoAOMT (derecha).

Fig. 4: Variación en el tamaño de semillas en plantas anti-CCoAOMT (izquierda) en comparación con plantas de control (derecha).

Fig. 5: Construcción anti-CCoAOMT mediada por doble cadena que facilitará la producción *in vivo* específica de ARNi contra el gen CCoAOMT endógeno. HindIII/SacI: promotor de ubiquitina (U); SacI/SacI: construcción anti-CCoAOMT mediada por doble cadena; SacI/EcoRI: terminador de la nopalina sintasa (T); HindIII/BamHI: 2x promotor de 35S; BamHI/XmaI: gen hptII (H) para selección de plantas y K: gen nptII para selección bacteriana

Fig. 6: Selección de plantas por amplificación por PCR de genes marcadores de líneas transformadas en COMT y CCoAOMT.

Fig. 7: Análisis de Southern de descendientes T<sub>1</sub> de CCoAOMT junto con transformantes T<sub>0</sub> respectivos y una planta de control que muestra herencia de los transgenes integrados.

### Descripción detallada de la presente invención

Por consiguiente, se describe en este documento una planta de sorgo dulce caracterizada por composición alterada de lignina en comparación con una planta silvestre y esto se consigue por regulación negativa de la expresión del polinucleótido representado por la SEQ ID NO 1 en sorgo dulce.

Uno de los aspectos es el silenciamiento génico mediado por ARNi del gen endógeno representado por la SEQ ID NO 1 de modo que cuando se transcribe el ácido nucleico exógeno, se regula negativamente la actividad de la SEQ ID NO 1 endógena.

También se describe en este documento un proceso de producción de una planta de sorgo dulce modificada que tienen composición alterada de lignina. Dicho proceso comprende transfectar una célula vegetal con casetes de silenciamiento génico mediado por ARN bicatenario (ARNbc) usando la secuencia de nucleótidos representada en la SEQ ID NO 1 que facilita la producción *in vivo* de ARNi contra el gen endógeno y asociado con contenido reducido de G lignina en comparación con la planta silvestre.

Se desarrollaron dos líneas transgénicas, una con anti-COMT y otra con anti-SEQ ID NO 1, y la planta transformada anti-SEQ ID NO 1 mostró caracteres fenotípicos deseables, así como beneficiosos como crecimiento potenciado, forma de la panoja, cantidad aumentada de semillas por panoja, tamaño y peso aumentados y de ese modo proporcionan más biomasa como materia prima para uso corriente abajo y mayor contenido de almidón y azúcar libre en comparación con la planta transformada anti-COMT. Las plantas transformadas con la construcción anti-COMT y anti-SEQ ID NO 1 se mencionan a partir de ahora en este documento como "planta C" y "planta T", respectivamente.

La modificación genética de sorgo dulce con la SEQ ID NO 1 tiene una implicación de largo alcance. El uso pretendido de la biomasa de sorgo sería en proceso de fermentación. En proceso de fermentación, es muy importante tener biomasa con alto contenido de azúcar y preferiblemente azúcar soluble. Es relevante mencionar aquí que, tras el análisis morfológico y bioquímico de la planta de sorgo modificada, se observó un aumento sustancial en la biomasa y contenido de celulosa.

### Búsqueda de un nuevo gen en sorgo dulce capaz de alterar la composición de lignina

#### A) Aislamiento de ARN total de tallos maduros de sorgo por el método de fenol caliente:

Se recogió 1 g de tallo de sorgo fresco y se cortó en pequeños trozos y se trituró en mortero con mano de mortero en presencia de nitrógeno líquido hasta quedarse pulverizado. Se añadió una pizca de polivinil pirrolidona (PVP) y 200 µl de β-mercapto etanol (β-ME) con el polvo. Se añadieron 5 ml de tampón de extracción de ARN y 5 ml de fenol saturado mezclado previamente y calentado en baño de agua a 80 °C al polvo, se mezclaron bien y se dejaron descongelar. La muestra descongelada después se transfirió a un tubo de centrífuga y se calentó en baño de agua a 80 °C durante 20 minutos. El tubo se mantuvo a temperatura ambiente durante 5-10 minutos y se añadieron 5 ml de cloroformo al mismo y el tubo se agitó con vórtice muy bien. Después se centrifugó el tubo a 10.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, se recogió el sobrenadante en un tubo córex. Se añadieron 1/10 volúmenes de acetato Na y 2 volúmenes de etanol enfriado al mismo y se dejó que precipitara a -20 °C durante una noche. El siguiente día se centrifugó el tubo córex a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se secó al aire el sedimento. El sedimento se disolvió en 1 ml de agua tratada con DEPC y se distribuyó en dos tubos de microfuga. Se añadió un volumen igual de fenol saturado, se agitó suavemente y se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante. Se repitió la etapa de fenol hasta que el sobrenadante se volvió transparente. Seguido por la etapa de fenol, se añadió una cantidad igual de cloroformo y se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos se recogió el sobrenadante. Se añadieron 1/10 volúmenes de acetato Na y dos volúmenes de etanol enfriado al mismo y se dejó que precipitara a -20 °C durante 1 hora. Después se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante, se lavó el sedimento con etanol al 70 %, se secó bien y finalmente se disolvió en formamida y se mantuvo en -70 °C para su conservación.

Composición del tampón de extracción de ARN (pH 8):

LiCl	- 100 mM
TRIS	- 100 mM
EDTA	- 10 mM
SDS	- 1 %

**Purificación de ARNm por matriz de celulosa con oligo (dT):**

5 Se suspendieron 100 ml de celulosa con oligo (dT) en 1 ml de tampón de elución y se mantuvo a temperatura ambiente durante una noche. Se retiró el tampón de elución por un corto centrifugado. La columna se equilibró con 1 ml de tampón de unión. El tampón de unión se retiró por un corto centrifugado. Se precipitó 1 mg de muestra de ARN en formamida en la noche previa y se lavó con etanol al 70 %, se secó y se disolvió minuciosamente en 1 ml de tampón de unión y se calentó a 65 °C durante 5 minutos, y se enfrió rápidamente en hielo durante 5 minutos. Después se cargó la muestra de ARN en matriz de celulosa con oligo dT. La unión se permitió durante 30 minutos con agitación suave. Esta suspensión se centrifugó por una corta centrifugación. La columna se lavó 3 veces durante 30 minutos cada una con 1 ml de tampón de lavado para retirar el tampón de unión. Se extrajo dos veces el ARNm poli (A<sup>+</sup>) con 200 µl de tampón de elución, se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 segundos. Se reajustó la combinación eluida con NaCl 0,5 M añadiendo NaCl en consecuencia. Se repitió dos veces más el procedimiento completo desde la etapa de adición de tampón de unión hasta la elución. La muestra combinada reunida, relavada, reeluida se precipitó con 1/10 volúmenes de acetato Na y 2,5 volúmenes de etanol durante 1 hora. Se lavó el sedimento con etanol al 70 %, se secó y se resuspendió en agua tratada con DEPC.

20 **Composición de los tampones:**

**a) Tampón de unión de oligo (dT):**

TRIS-HCl (pH 7,5)	- 10 mM
NaCl	- 500 mM
EDTA	- 1 mM
SDS	- 0,5 %

25 **b) Tampón de lavado de oligo (dT):**

TRIS-HCl (pH 7,5)	- 10 mM
NaCl	- 100 mM
EDTA	- 1 mM

**c) Tampón de elución de oligo (dT)**

TRIS-HCl (pH 7,5)	- 10 mM
EDTA	- 1 mM

30 **Síntesis de ADNc a partir de ARNm aislado de tejido de tallo maduro:**

Usando transcripción inversa, se preparó el ADNc a partir de ARNm, que se aisló de sorgo dulce. Se hibridó un cebador al ARNm proporcionando un extremo 3' libre que puede usarse para la extensión por la enzima transcriptasa inversa. La enzima se acopla en la elongación habitual 5' a 3', dirigida por apareamiento de bases complementaria con el molde de ARNm para formar una molécula híbrida, que consiste en una hebra de ARN molde emparejada con la hebra de ADNc complementaria. Después de la degradación de ARNm original, se usó una ADN polimerasa para sintetizar la hebra de ADN complementaria para convertir el ADNc monocatenario en un ADNc dúplex.

40 Se aisló el ADNc completo deseado usando PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con cebadores degenerados diseñados a partir de la secuencia conservada de aminoácidos del gen del sistema vegetal heterólogo seguido por RACE 5' y 3' (amplificación rápida de extremos de ADNc). Se sintetizó el ADNc con cebador de oligo (dT)<sub>18</sub> anclado y cebador de hexámero aleatorio usando el kit de reacción de RT-PCR convencional de Roche. En un tubo estéril de PCR con paredes delgadas libre de nucleasa en hielo, se preparó la mezcla de molde y cebador para una reacción de 20 µl añadiendo los componentes en el orden enumerado a continuación.

**Mezcla de molde-cebador:**

Componente	Volumen	Concentración final
ARNm poli(A) <sup>+</sup>	1 µl	10 ng de ARNm poli(A) <sup>+</sup>

Componente	Volumen	Concentración final
Cebador oligo(dT) <sub>18</sub> anclado, 50 pmol/μl	1 μl	2,5 μM
Cebador de hexámero aleatorio, 600 pmol/μl	2 μl	60 μM
Agua de calidad PCR	9 μl	
<b>Volumen total</b>	<b>13 μl</b>	

La mezcla de molde-cebador se calentó durante 10 minutos a 65 °C en un termociclador de bloques con una tapa calentada para desnaturalizar las estructuras secundarias. Inmediatamente el tubo se colocó en hielo. Los componentes restantes de la mezcla de RT se añadieron en el orden enumerado a continuación.

5

Componente	Volumen	Concentración final
Tampón de reacción de transcriptasa inversa Transcriptor (5X)	4 μl	1X (MgCl <sub>2</sub> 8 nM)
Inhibidor de RNasa Protector, 40 U/μl	0,5 μl	20 U
Mezcla de desoxinucleótidos, 10 mM cada uno	2 μl	1 mM cada uno
Transcriptasa inversa Transcriptor, 20 U/μl	0,5 μl	10 U
<b>Volumen total</b>	<b>20 μl</b>	

Los reactivos se mezclaron cuidadosamente y se centrifugaron brevemente y se mantuvieron en el termociclador de bloques durante 10 minutos a 25 °C, seguido por 30 minutos a 55 °C. Se inactivó la transcriptasa inversa Transcriptor calentándola a 85 °C durante 5 minutos. La reacción se detuvo colocando el tubo en hielo.

10

#### **Diseño y síntesis de cebadores y amplificación por PCR:**

Se diseñaron dos cebadores degenerados 5' y 3'. Se introdujo un sitio BamHI en el cebador 5' y un sitio EcoRI en el cebador 3' para clonación del fragmento amplificado por PCR. El análisis de la secuencia de aminoácidos traducida del fragmento amplificado mostró identidad con el CCoAOMT heterólogo. Las secuencias de los cebadores degenerados son:

15

Cebador directo: 5' gaa ttc gga tcc a(c/t)c a(a/g)g a(a/g)g tng gnc a(c/t)a a 3'(SEQ ID NO 3)

Cebador inverso: 5' gaa ttc (g/a)tt cca nag ngt (g/a)tt (g/a)tc (g/a)ta 3'(SEQ ID NO 4)

Etapas	Ciclo total	Temperatura (°C)	Duración (min)
Desnaturalización primaria	1	94	4
Desnaturalización		94	0,4
Hibridación	30	58	0,4
Extensión		72	1
Extensión final	1	72	7

20

#### **Clonación del fragmento parcial de la SEQ ID NO 1:**

Se digirieron tanto el fragmento amplificado por PCR como el vector pUC18 con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI para su clonación, que se introdujeron en los cebadores. Tanto el vector como el fragmento amplificado digeridos se purificaron por gel del LMP agarosa. Los productos purificados se sometieron a ligamiento con ADN ligasa T4. Una parte de la mezcla de ligamiento después se transformó en células competentes DH10B y se colocaron en ampicilina (100 μg/ml). Se seleccionaron las colonias transformadas. Se aisló el ADN plasmídico recombinante de los clones y se secuenció. El fragmento clonado se amplificó adicionalmente con cebadores específicos (SEQ ID NO 5 y 6) y se digirió con BamHI y SacI y se unieron en orientación con sentido-antisentido con la ayuda de un enlazador arbitrario que tiene sitios BamHI y BglII. Este fragmento con sentido-antisentido después se colocó en un vector binario bajo un promotor adecuado para generar el casete inducido por ARNbc para CCoAOMT para la transformación mediada por *Agrobacterium* en plantas.

25

30

#### **Las secuencias de los cebadores específicos son:**

35

Cebador directo: 5' gaa ttc gga tcc cat cag gaa gta ggg cac aa 3' (SEQ ID NO 5)

Cebador inverso: 5' cc gag ctc gtt cca cag tgt gtt gtc ata 3' (SEQ ID NO 6)

**Aislamiento de la SEQ ID NO 1 de longitud completa:**

5 La SEQ ID NO 1 de longitud completa se aisló a través de la amplificación de los extremos 5' y 3' del ADNc de sorgo usando el kit de RACE 5'/3' de 2ª generación de un modo escalonado. Los fragmentos después se clonaron y caracterizaron. Los cebadores se generaron a partir de la secuencia identificada de nucleótidos de la SEQ ID NO 1 parcial.

**Clonación de la SEQ ID NO 1 en vector TA:**

10 El fragmento amplificado por PCR se purificó por gel en LMP agarosa y se clonó en vectores TA. Una parte de la mezcla de ligamiento después se transformó en células competentes DH10B y se sembraron en ampicilina (100 µg/ml). Se seleccionaron las colonias transformadas y se caracterizaron por secuenciación.

**Caracterización de los clones y análisis basado en software de los clones secuenciados:**

15 Inicialmente se caracterizaron clones blancos seleccionados por aislamiento del ADN plasmídico y digestión con restricción con BamHI y EcoRI para la presencia del inserto. Después se secuenciaron tres de estos clones para cada fragmento por el método de Big Dye Terminator de secuenciación para confirmación adicional usando un sistema analítico basado en software como el análisis blast de NCBI y la alineación Clustal W.

20 **Secuencia de nucleótidos obtenida del resultado de secuenciación:** Se descubrió que la secuencia del gen era de 759 bases. Se descubrió que la secuencia de ADN codificante del gen empezaba desde la base 1 y acababa en la base 759. La secuencia de nucleótidos a partir de ahora en este documento se menciona como la SEQ ID NO 1 y es la siguiente:

25

```

5'-
ATGCCGAAAACGGCGAAGAGCAGCAGGCGAACGGCAACGGCGAGCAGAAGACCCGG
CATCAGGAAGTAGGGCACAAGAGCCTGCTCAAGAGCGACGAGCTCTACCAGTACATCCT
GGACACGAGCGTGTACCCGCGGGAGCCGGAGAGCATGAAGGAGCTCCGCGAGATCACC
GCCAAGCACCCATGGAACCTGATGACGACCTCCGCCGACGAGGGGCAGTTCCTCAACAT
GCTCATCAAGCTCATCGGCGCCAAGAAGACCATGGAGATCCGCGTCTACACCGGCTACTC
CCTCCTTGCTACTGCCATGGCTCTTCCCGATGATGGCAAGATTCTAGCTATGGATATTAAC
CGGGAAAACACTACGAGATTGGTCTTCCAGTGATTGAAAAGGCTGGACTGGCCACAAGAT
CGACTTCCGCGAGGGGCCCGCGCTCCCCGTCCTCGACGACCTCATCGCCGACGAGAAGA
ACCACGGGTTCGTTGACTTCGTCTTCGTGGACGCCGACAAGGACAACACTACCTCAACTACC
ACGACCGGCTGCTCAAGCTGGTGAAGCTGGGGGGCCTCATCGGCTATGACAACACACTG
TGGAACGGGAGCGTCGTGCTGCCCGACGACGCCCGATGCGGAAGTACATTCGCTTCTA
CCGCGATTTCTCCTCGTCTGAACAAGGCGCTCGCGGCGGATGATCGCGTCGAGATCTG
CCAGCTCCCCGTCGGTGACGGTGTGACGCTGTGCCGGCGCGTCAAGTGA – 3' (SEQ ID
NO 1)

```

**Análisis basado en ordenador de la secuencia para caracterización adicional:**

30 Después se tradujo la secuencia de ADN para obtener la secuencia de aminoácidos usando el software Jellyfish. La secuencia traducida es:

```

MAENGEEQQANGNGEQKTRHQEVGHKSLKSDELYQYILDTSVYPREPESMKELREITAKHP
WNLMTTSADEGQFLNMLIKLIGAKKTMEIRVYTGYSLLATAMALPDDGKILAMDINRENYEI
GLPVIEKAGLAHKIDFREGPALPVLDDLIADEKNHGSFDFVVDADKDNLYNHDRLLKLVKLG
GLIGYDNTLWNGSVVLPDDAPMRKYIRFYRDFVLVLNKALAADDRVEICQLPVG DGVTLCRR
VK* (SEQ ID NO 2)

```

35 Esta secuencia de aminoácidos traducida después se somete a análisis blast usando blastP en NCBI y se encontró homología máxima con su pariente cercano CCoAOMT de *Zea mays*. Por tanto, la secuencia se analizó adicionalmente para homología con las isoformas CCoAOMT de maíz, disponibles en la base de datos GenBank usando el software Clustal W (mostrado a continuación) y reveló identidad del 95 % con la isoforma CCoAOMT de maíz.

40



CCoAOMT1 de maíz  
 DGTILAMDINRENYELGLPCIEKAGVAHKIDFREGPALPVLDDLIAEKNHGSFDFVFVD (SEQ ID  
 NO 15)

CCoAOMT de sorgo  
 DGKILAMDINRENYEIGLPVIEKAGLAHKIDFREGPALPVLDDLIADEKNHGSFDFVFVD (SEQ ID  
 NO 16)

CCoAOMT2 de maíz  
 DGTILAMDINRENYELGLPCINKAGVGHKIDFREGPALPVLDDLVDKEQHGSFDFAFVD (SEQ ID  
 NO 17)

CCoAOMT de arroz  
 DGTILAMDINRENYELGLPSIEKAGVAHKIDFREGPALPVLDQLVVEEGNHGSFDFVFVD (SEQ ID  
 NO 18)

\*\*\*\*\*  
 \*\*\*\*\*

CCoAOMT1 de maíz  
 ADKDNLYNYHERLLKLVKLGGLIGYDNTLWNGSVVLPDDAPMRKYIRFYRDFVLVLNKAL (SEQ ID  
 NO 19)

CCoAOMT de sorgo  
 ADKDNLYNYHDRLLKLVKLGGLIGYDNTLWNGSVVLPDDAPMRKYIRFYRDFVLVLNKAL (SEQ ID  
 NO 20)

CCoAOMT2 de maíz  
 ADKDNLYNYHERLLKLVKLGGLIGYDNTLWNGSVVLPDDAPMRKYIRFYRDFVLALNSAL (SEQ ID  
 NO 21)

CCoAOMT de arroz  
 ADKDNLYNYHERLMKLVKVGGLVGYDNTLWNGSVVLPADAPMRKYIRYRDFVLELNKAL (SEQ ID  
 NO 22)

\*\*\*\*\*  
 \*\*\*\*\*

CCoAOMT1 de maíz AADDRVEICQLPVG DGVTLCRRVK (SEQ ID NO 23)  
 CCoAOMT de sorgo AADDRVEICQLPVG DGVTLCRRVK (SEQ ID NO 24)  
 CCoAOMT2 de maíz AADDRVEICQLPVG DGVTLCRRVK (SEQ ID NO 25)

5

CCoAOMT de arroz AADHRVEICQLPVG DGITLCRRVK (SEQ ID NO 26)  
 \*\*\*\*\*

**Evaluación del papel de la SEQ ID NO 1 en sorgo dulce:**

10

La secuencia después se sometió a blast NCBI para la identificación de su parecido con la secuencia disponible en la base de datos y se descubrió que era altamente idéntica (identidad del 97 %) con una proteína hipotética de sorgo. Aunque esta proteína hipotética se ha considerado similar al gen CCoAOMT, su funcionalidad aún no se ha ensayado. Por tanto, hemos emprendido un enfoque para establecer el efecto del gen aislado, ya que la secuencia de nucleótidos de un gen es más importante que su funcionalidad en estrategia antisentido, en regulación negativa

15

de CCoAOMT *in-planta*.

**Preparaciones de construcción que comprende la SEQ ID NO 1:**

5 **Promotor:** En la transcripción de ADN en ARNm está regulada por una región de ADN mencionada como promotor. La región promotora contiene secuencia de bases que señala la ARN polimerasa para asociarse con el ADN, y para iniciar la transcripción de ARNm usando una de las hebras de ADN como molde para preparar una hebra complementaria correspondiente de ARN. Como la región 5' de la hebra de ARN es complementaria a la región 3', generará un ARN bicatenario, que posteriormente se degrada usando la maquinaria responsable de la producción de ARN interferente corto (ARNi). La secuencia promotora incluye la secuencia consenso de caja TATA (TATAAT (SEQ ID NO 27)), que está habitualmente 20-30 pares de bases (pb) cadena arriba (por convención de -30 a -20 pb respecto al sitio de inicio de la transcripción) del sitio de inicio de la transcripción. La caja TATA es el único elemento promotor cadena arriba que tiene una localización relativamente fija con respecto al punto de inicio. La secuencia consenso de caja CAAT está centrada en -75, pero funciona a distancias que varían considerablemente desde el punto de inicio y en cualquier orientación. Otro elemento promotor común es la caja GC en -90 que contiene la secuencia consenso GGGCGG (SEQ ID NO 28). Puede existir en múltiples copias y en cualquier orientación. Otra secuencia que confiere eficacia máxima también puede encontrarse en la región promotora. En combinaciones de promotor y gen estructural, el promotor está preferiblemente posicionado aproximadamente la misma distancia desde el sitio heterólogo de inicio de la transcripción que desde el sitio de inicio de la transcripción en su entorno natural. El promotor puede ser constitutivo o inducible.

El promotor de la ubiquitina del maíz usado en la presente investigación ha demostrado ser altamente activo y expresarse constitutivamente en la mayoría de los tejidos. Contiene el primer intrón del gen de la ubiquitina del maíz para expresión selectiva en plantas. El promotor se clonó en el vector en el sitio HindIII/BamHI bajo el cual se colocó el fragmento inductor de ARNbc de la SEQ ID NO 1. Un gen marcador de selección, higromicina fosfotransferasa, bajo el promotor 35S 2x se incluyó para permitir la selección de células vegetales que albergaban la construcción deseada.

La generación de la construcción de ARNbc se hizo uniendo la región adecuada del fragmento de ADNc deseado en orientación con sentido y antisentido a través de un enlazador. Esta construcción se introduce en un vector de expresión para transformación de plantas de sorgo para descubrir el papel que desempeña en la ruta metabólica. El vector preferiblemente contiene un origen procariota de replicación que tiene un amplio rango de hospedador. Un marcador de selección también debe incluirse para permitir la selección de células bacterianas que albergan la construcción deseada. Marcadores procariotas de selección adecuados incluyen resistencia a antibióticos tales como kanamicina.

Otras secuencias de ADN que codifican funciones adicionales también pueden estar presentes en el vector, como se sabe en la técnica. Por ejemplo, en el caso de transformaciones con *Agrobacterium*, también se incluirán secuencias de ADN-T para posterior transferencia a cromosomas de plantas.

Para la expresión en plantas, se usó un vector binario en que puede introducirse el gen de interés. Los casetes de expresión recombinantes contendrán además de las secuencias deseadas, una región promotora de plantas, un sitio de inicio de la transcripción y una secuencia terminadora de la transcripción. Típicamente se incluyen sitios únicos de enzimas de restricción en los extremos 5' y 3' de los casetes para permitir una fácil inserción en un vector preexistente. Las secuencias que controlan la expresión génica eucariota son bien conocidas en la técnica.

**Generación de plantas transgénicas:**

Se desarrollaron dos líneas transgénicas. Las plantas transformadas con construcción anti-COMT, a partir de ahora en este documento se mencionan como "planta C" y la planta que tiene anti-SEQ ID NO 1 se menciona como "planta T". La planta T mostró caracteres fenotípicos deseables, así como beneficios como crecimiento potenciado, forma de la panoja, cantidad aumentada de semillas por panoja, tamaño aumentado y peso, y de ese modo proporciona más biomasa que la materia prima para uso corriente abajo.

**Transformación de sorgo dulce (*Sorghum bicolor*):**

Se lavaron semillas esterilizadas en superficie con Tween 20 (5 min) y cloruro mercúrico al 0,2 % (7 min) con agua destilada estéril. Después las semillas se incubaron en papel de filtro estéril impregnado con agua destilada estéril en placas Petri. Después de 3 días de incubación en la oscuridad se escindieron las puntas de los brotes generadas y se infectaron con medio de infección que tenía suspensión de *Agrobacterium* en el mismo durante 20 min. Los explantes se inocularon en medio de cocultivo y se mantuvieron en la oscuridad durante 3 días a 25 °C. Los explantes se lavaron ocasionalmente con cefotaxima y agua destilada para evitar la contaminación bacteriana y se transfirieron a MS con 2 mg/l de 2,4-D, 30 g/l de sacarosa y 250 mg/l de cefotaxima y se mantuvieron en la oscuridad durante 12 días para la formación del callo.

La parte de callo en los extremos cortados de las puntas de los brotes se escindieron y transfirieron a medio de regeneración con selección por higromicina (MS con 32 g/l de sacarosa, 2 mg/l de BAP y 2 mg/l de higromicina) y se mantuvieron en condiciones periódicas de luz/oscuridad 2:1 a 28 °C. Después de dos semanas, se transfirieron callos verdes al mismo medio que contenía mayor concentración de marcador de selección (4 mg/l de higromicina). Los brotes obtenidos se transfirieron al mismo medio con mayor concentración de higromicina (5 mg/l) durante 2 meses con subcultivo periódico cada 2 semanas. Se dejaron los brotes elongados en medio de enraizado para la generación de raíces. Las plántulas completamente crecidas se seleccionaron finalmente en medio líquido MS ½ con 6 mg/l de higromicina. Las plántulas generadas a partir de un único callo se describieron como línea individual.

#### **La transformación mediada por *Agrobacterium*:**

El proceso de transformación mediado por *Agrobacterium* de la invención puede descomponerse en varias etapas. Las etapas básicas incluyen una etapa de infección; una etapa de cocultivo; una etapa opcional de reposo; una etapa de selección; y una etapa de regeneración.

En la etapa de infección, las células a transformarse se aíslan y exponen a *Agrobacterium*. Si las células diana son embriones inmaduros, los embriones se aíslan y las células se ponen en contacto con una suspensión de *Agrobacterium*. Como se ha indicado anteriormente, el *Agrobacterium* se ha modificado para que contenga un gen o ácido nucleico de interés. El ácido nucleico se inserta en la región de ADN-T del vector. Se proporcionan técnicas moleculares generales usadas en la invención, por ejemplo, por Sambrook et al. (eds.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

La concentración de *Agrobacterium* usada en la etapa de infección y la etapa de cocultivo puede afectar a la frecuencia de transformación. Asimismo, concentraciones muy altas de *Agrobacterium* pueden dañar el tejido a transformar, tal como los embriones inmaduros, y provocar una respuesta reducida de callo. Por tanto, la concentración de *Agrobacterium* útil en los métodos de la invención puede variar dependiendo de la cepa utilizada de *Agrobacterium*, el tejido que se está transformando, el genotipo de sorgo que se está transformando, y similares. Para optimizar el protocolo de transformación para una línea o tejido de sorgo particular, el tejido a transformar (embriones inmaduros, por ejemplo), puede incubarse con diversas concentraciones de *Agrobacterium*. Asimismo, el nivel de expresión génica del marcador y la eficacia de transformación, puede evaluarse para diversas concentraciones de *Agrobacterium*. Aunque la concentración de *Agrobacterium* puede variar, se usó generalmente densidad óptica de 0,7 a 1,0 a 600 nm en la presente invención.

El tejido a transformar generalmente se añade a la suspensión de *Agrobacterium* en una fase de contacto líquido que contiene una concentración de *Agrobacterium* para optimizar las eficacias de transformación. La fase de contacto facilita el contacto máximo de las células/tejido a transformar con la suspensión de *Agrobacterium*. Las células se ponen en contacto con la suspensión de *Agrobacterium* durante un período de al menos aproximadamente 3 minutos a aproximadamente 15 minutos, preferiblemente de aproximadamente 4 minutos a aproximadamente 10 minutos, más preferiblemente de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 8 minutos.

La fase de contacto líquido de la etapa de infección tiene lugar en un medio MS de solución líquida junto con 68,5 g/l de sacarosa, 36 g/l de glucosa, acetosiringona 100 µM y el pH ajustado a 5,2. Los otros medios usados en esta invención son: Medio de cocultivo (MS con 20 g/l de sacarosa, 10 g/l de glucosa, 2 mg/l de 2,4-D, acetosiringona 100 µM y 8,5 g/l de agar, pH 5,8), medio de cultivo bacteriano (medio YEP - extracto de levadura - 10 g/l, peptona - 10 g/l y cloruro sódico - 5 g/l), medio de infección (MS con 68,5 g/l de sacarosa, 36 g/l de glucosa y acetosiringona 100 µM, pH 5,2), medio de regeneración (MS con 30 g/l de sacarosa, 2 mg/l de BAP y 8,5 g/l de agar) y medio de enraizado (MS ½ con 20 g/l de sacarosa, 0,5 mg/l de IAA y 0,5 mg/l de NAA).

#### **Concentración de *Agrobacterium* durante la infección**

D.O. de *Agrobacterium* - entre 0,7-1,0

Después de la etapa de cocultivo, o después de la etapa de reposo, cuando se usa, las células transformadas se exponen a presión selectiva para seleccionar aquellas células que han recibido y están expresando el polipéptido a partir del ácido nucleico heterólogo introducido por *Agrobacterium*. Cuando las células son embriones, los embriones se transfieren a placas con medio sólido que incluye tanto un antibiótico para inhibir el crecimiento de *Agrobacterium* como un agente de selección. El agente usado para seleccionar los transformantes seleccionará el crecimiento preferente de explantes que contienen al menos un inserto de marcador de selección posicionado dentro del vector binario super y suministrado por el *Agrobacterium*.

En líneas generales, puede usarse cualquiera de los medios conocidos en la técnica adecuados para el cultivo de sorgo en la etapa de selección, tal como medio que contiene sales N6 o sales MS suplementadas con 30 g/l de sacarosa, 2 mg/l de 2,4-D y mantenido en la oscuridad durante 15 días. Durante la selección, se cultivan los embriones hasta que se observa la formación de callo. Típicamente, se permite que los callos que han crecido en medio de selección crezcan hasta un tamaño de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2 cm de diámetro.

Después de que los callos hayan alcanzado el tamaño apropiado, los callos se cultivan en medio de regeneración en la oscuridad durante varias semanas, generalmente aproximadamente 1 a 3 semanas para permitir que los embriones somáticos maduren. El medio preferido de regeneración incluye medio que contiene medio MS suplementado con 30 g/l de sacarosa, 2 mg/l de BAP y 8,5 g/l de agar. Los callos después se cultivan en medio de enraizado en un ciclo de luz/oscuridad hasta que se desarrollan brotes y raíces.

Algunas plántulas después se transfieren a tubos que contienen medio de enraizado y se deja que crezcan y desarrollen más raíces durante aproximadamente otra semana. Las plantas después se trasplantan a mezcla de suelo en macetas en el invernadero.

#### Exploración de las líneas transformadas putativas inducidas por ARNbc:

Los transformantes T<sub>0</sub> putativos para los transgenes inductores de ARNbc recuperados a través de selección con higromicina se exploraron adicionalmente por análisis de PCR para confirmar la presencia del gen de resistencia a higromicina. Por tanto, se hizo un análisis por PCR usando el ADN genómico aislado de los individuos transformados junto con una planta de control no transformada y un conjunto de cebadores específicos de gen ++++ (cebador 5': atg aaa aag cct gaa ctc acc gcg acg tct y cebador 3': gca tca get cat cga gag cct gcg cga cgg). Se observó una amplificación de un producto de aproximadamente 547 pb en todos los transformantes, que indica la presencia del gen de resistencia a higromicina. Se descubrió que la amplificación estaba ausente en plantas de *Sorghum* no transformadas. Por tanto, podría esperarse que el ARNbc que induce los casetes génicos COMT y CCoAOMT pudiera haberse insertado en el genoma de los transformantes T<sub>0</sub> putativos ya que se mantiene unido con el gen de resistencia a higromicina (*hptII*).

**Análisis de Southern de plantas transgénicas:** Se hizo análisis de Southern de plantas transgénicas para comprobar el patrón de integración, así como la cantidad de copias de la construcción génica integrada. Para esto, se aisló ADN de plantas de control, T0 y T1. Se digirieron 10 mg de ADN de cada una de las plantas con HindIII y se ejecutaron en un gel de agarosa al 1 %. El gen después se transfirió a membrana de nylon (GE healthcare), se reticuló y finalmente se hibridó con sondas génicas COMT y CCoAOMT respectivamente (Fig. 6 y 7).

Se produjeron descendientes T1 a partir de semillas de plantas T0 por autopolinización. Las semillas se exploraron permitiéndolas crecer en el medio basal que contenía higromicina. Se encontraron ocho semillas que germinaban en higromicina. Los plantones resistentes después se dejaron crecer hasta una fase madura en contención. Las plantas se analizaron para la presencia del gen de higromicina por PCR usando dos cebadores específicos de gen. Finalmente, se hizo análisis de Southern de las plantas transgénicas T1 para comprobar el patrón de integración así como la cantidad de copias de la construcción génica integrada y se observó una única integración en las plantas transgénicas anti-SEQ ID NO 1 excepto en T1-1. Además, se descubrió que el patrón de integración era similar en todos los casos. Se descubrió que la actividad enzimática en plantas T1 era casi la misma en comparación con la planta T0.

#### Análisis de actividades enzimáticas endógenas en líneas transformadas:

Se analizaron las actividades enzimáticas en el tejido de sorgo dulce transformado para evaluar la alteración de la composición de lignina. Los resultados se han tabulado en la Tabla 1. La Tabla 2 indica claramente que la regulación negativa de la SEQ ID NO 1 provocaba la reducción en el contenido de lignina. El resultado demostró que el contenido de lignina en tejido de tallos se reducía en aproximadamente un 14 % y 27 % en plantas C y plantas T respectivamente. La Tabla 3 describe la relación S/G de las plantas transformadas y de control también. Los resultados demostraron que la relación S/G se aumentaba en ambas plantas. El cambio en la relación S/G fue más prominente en plantas T. De ese modo, podría esperarse que este aumento en la relación SG facilite la capacidad de extracción de los materiales celulósicos desde ambas plantas transgénicas, particularmente desde plantas T.

Tabla 1: Actividad enzimática en tejido de tallo de plantas C y T:

Líneas	Actividad COMT (pmol/s/mg de proteína total)	Actividad CCoAOMT (pmol/s/mg de proteína total)
Control	4,8	14,3
Plantas-C	2,3	15,3
Plantas-T	4,6	4,9

#### Alteración en los parámetros de crecimiento de líneas transgénicas:

Las líneas transgénicas mostraron alteración del crecimiento en comparación con el control. Se descubrió que el incremento en la altura de la planta estaba correlacionado con el aumento de la longitud internodal así como la cantidad de internodos. A parte del crecimiento vegetativo aumentado, también se observó una alteración en los tamaños de las semillas en plantas transgénicas en comparación con plantas de control. Este aumento en los tamaños de semillas se verificó por peso medio de la semilla. Se descubrió que el incremento era de ~ 45 % sobre las semillas de control.

**Análisis bioquímico de plantas de sorgo dulce transformadas:**

Análisis del contenido de lignina y composición en plantas transgénicas por método químico:

- 5 Se determinó la composición de lignina con respecto al tipo G y S por derivatización seguido por escisión reductora (DFRC). Se identificaron productos de degradación de lignina monomérica por análisis GC-FID usando derivado acetilo de alcohol coniferílico y sinapílico como patrón. La reducción del contenido total de lignina en comparación con el control fue ~28 % en el caso de plantas T. Pero la reducción fue a un menor grado (~14 %) en plantas C.

- 10 Tabla 2: Determinación de concentración de lignina de tallos de *Sorghum* transformada usando el método espectrofotométrico de bromuro de acetilo:

Tejido de tallo	Contenido de lignina con <b>Bromuro de Acetilo</b> (g/kg de pared celular seca)
Planta de control	76,14
Planta-C	65,65
Planta-T	54,84

Tabla 3: Composición de lignina de tejido de tallo de plantas C y T.

Planta <i>Sorghum</i>	Tipo S (%)	Tipo G (%)	Relación S/G
Planta de control	22,29	77,71	0,29
Plantas-C	39,99	60,01	0,66
Plantas-T	63,51	36,49	1,74

15 **Estimación de celulosa:**

- Se recogió un segmento de tallo (20 mg por peso fresco) de plantas de sorgo de control y transgénicas, se congelaron en nitrógeno líquido y se trituraron hasta un polvo fino. El polvo se trató con 3 ml de reactivo acético/nítrico (10:1) en baño de agua en ebullición durante 30 minutos, se enfrió y después se centrifugó durante 15-20 min. El sobrenadante se almacenó para estimar el contenido de azúcar soluble. El sedimento se lavó, se trató con ácido sulfúrico al 67 % y se dejó reposar durante 1 h. La muestra tratada después se diluyó 15 veces. Se añadieron 5 ml de reactivo antrona a 1 ml de muestra tratada y no tratada, se mezclaron bien, se mantuvieron en baño de agua en ebullición durante 10 min, se enfriaron rápidamente y se midió la D.O. a 630 nm. Los resultados se expresaron como una media de tres muestras en cada caso.

- El contenido de carbohidrato de tejido de semilla y tallo se estimó siguiendo los protocolos descritos en métodos. Se ha observado que el contenido de celulosa estaba aumentado en un 48 % en plantas C y en un 36 % en plantas T (Tabla 4). Es importante observar que a pesar del mayor contenido de celulosa en plantas C (Tabla 4), se descubrió que el azúcar soluble aumentaba más significativamente en plantas T (Tabla 5). Un mayor contenido de azúcar soluble ayudaría en el proceso de fermentación.

Tabla 4: Determinación del contenido de celulosa en tejido de tallo de sorgo

Muestras	Contenido de celulosa (mg/g de FW)
Control	86
Línea anti-COMT	127
Línea tipo anti-CCoAOMT	117

Tabla 5: Determinación del contenido de azúcar soluble en tejido de tallo de sorgo

Muestras	Contenido de azúcar soluble (mg/g de FW)
Control	10,3
Línea anti-COMT	12,1
Línea tipo anti-CCoAOMT	29,5

35 **Estimación de almidón en semillas:**

- Se homogeneizaron semillas en etanol caliente al 80 % para retirar el azúcar y se centrifugaron. El sedimento se lavó repetidamente con etanol al 80 % y después se secó. Se trató el sedimento con 5 ml de agua y 6,5 ml de ácido perclórico al 52 % durante 20 min. El extracto se centrifugó y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante se diluyó 250 veces. Se añadieron 5 ml de reactivo antrona a 1 ml de la muestra, se mantuvieron en baño de agua en ebullición durante ocho minutos y se midieron a D.O. 630 nm. Los resultados se expresaron como una media de tres muestras en cada caso.

- 45 El contenido de almidón de tejido de semilla y tallo se estimó siguiendo los protocolos descritos en métodos. También se ha observado que el contenido de almidón en semillas estaba aumentado en aproximadamente el 20 y el 30 % en las plantas C y plantas T respectivamente (Tabla 3). Podría sugerirse que la acumulación de almidón a

parte de otros componentes, puede ser responsable del aumento del peso de las semillas.

Tabla 6: Determinación del contenido de almidón en semillas

Contenido de muestras	Peso promedio de semilla (mg)	Almidón promedio (mg/semilla)
Control	29,4	16,6
Línea anti-COMT	38,3	20,2
Línea tipo anti-CCoAOMT	42,3	22,1

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NAGARJUNA ENERGY PRIVATE LIMITED

10 <120> SORGO DULCE TRANSGÉNICO CON COMPOSICIÓN ALTERADA DE LIGNINA Y PROCESO DE PREPARACIÓN DEL MISMO

<130> N.111831

15 <150> US 12/545.699  
<151> 21-08-2009

<150> IN 00665/CHE2010  
<151> 12-03-2010

20 <160> 30

<170> PatentIn versión 3.5

25 <210> 1  
<211> 759  
<212> ADN  
<213> *Sorghum bicolor*

30 <400> 1

```

atggccgaaa acggcggaaga gcagcagggcg aacggcaacg gcgagcagaa gacccgggcat      60
caggaagtag ggcacaagag cctgctcaag agcgacgagc tctaccagta catcctggac      120
acgagcgtgt acccgcgggga gccggagagc atgaaggagc tccgcgagat caccgccaag      180
caccatgga acctgatgac gacctccgcc gacgaggggc agttcctcaa catgctcacc      240
aagctcatcg gcgccaagaa gaccatggag atccgcgtct acaccggcta ctccctcctt      300
gctactgcca tggctcttcc cgatgatggc aagattctag ctatggatat taaccgggaa      360
aactacgaga ttggtcttcc agtgattgaa aaggctggac tggcccacaa gatcgacttc      420
cgcgagggcc ccgcgctccc cgtcctcgac gacctcatcg ccgacgagaa gaaccacggg      480
tcgttcgact tcgtcttcgt ggacgcccgc aaggacaact acctcaacta ccacgaccgg      540
ctgctcaagc tggatgaagc ggggggcctc atcggctatg acaacacact gtggaacggg      600
agcgtcgtgc tgcccagcga cgcgccgatg cggaagtaca ttcgcttcta ccgcatcttc      660
gtcctcgtcc tgaacaaggc gtcgcgggcg gatgatcgcg tcgagatctg ccagctcccc      720
gtcggtgacg gtgtgacgct gtgccggcgc gtcaagtga      759
    
```

<210> 2  
<211> 252



<210> 3  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador degenerado directo  
  
 10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (23)..(23)  
 <223> n es a, c, g o t  
  
 15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (26)..(26)  
 <223> n es a, c, g o t  
  
 20 <400> 3  
 gaattcggat ccaycargar gtnggcaya a 31  
  
 <210> 4  
 <211> 27  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador degenerado inverso  
  
 30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (13)..(13)  
 <223> n es a, c, g o t  
  
 35 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(16)  
 <223> n es a, c, g o t  
  
 40 <400> 4  
 gaattcrttc canagngtrt trtcrt a 27  
  
 <210> 5  
 <211> 32  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador específico directo  
  
 50 <400> 5  
 gaattcggat cccatcagga agtagggcac aa 32  
  
 <210> 6  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 60 <220>  
 <223> cebador específico inverso  
  
 <400> 6  
 65 ccgagctcgt tccacagtgt gttgcata 29  
  
 <210> 7

ES 2 571 982 T3

<211> 54  
 <212> PRT  
 <213> *Zea mays*

5 <400> 7

Met Ala Thr Thr Ala Thr Glu Ala Ala Pro Ala Gln Glu Gln Gln Ala  
 1 5 10 15

Asn Gly Asn Gly Glu Gln Lys Thr Arg His Ser Glu Val Gly His Lys  
 20 25 30

Ser Leu Leu Lys Ser Asp Asp Leu Tyr Gln Tyr Ile Leu Asp Thr Ser  
 35 40 45

Val Tyr Pro Arg Glu Pro  
 50

10 <210> 8  
 <211> 48  
 <212> PRT  
 <213> *Sorghum bicolor*

15 <400> 8

Met Ala Glu Asn Gly Glu Glu Gln Gln Ala Asn Gly Asn Gly Glu Gln  
 1 5 10 15

Lys Thr Arg His Gln Glu Val Gly His Lys Ser Leu Leu Lys Ser Asp  
 20 25 30

Glu Leu Tyr Gln Tyr Ile Leu Asp Thr Ser Val Tyr Pro Arg Glu Pro  
 35 40 45

20 <210> 9  
 <211> 60  
 <212> PRT  
 <213> *Zea mays*

<400> 9

ES 2 571 982 T3

Met Ala Thr Thr Ala Thr Glu Ala Thr Lys Thr Thr Ala Pro Ala Gln  
 1 5 10 15

Glu Gln Gln Ala Asn Gly Asn Gly Asn Gly Glu Gln Lys Thr Arg His  
 20 25 30

Ser Glu Val Gly His Lys Ser Leu Leu Lys Ser Asp Asp Leu Tyr Gln  
 35 40 45

Tyr Ile Leu Asp Thr Ser Val Tyr Pro Arg Glu Pro  
 50 55 60

<210> 10  
 <211> 56  
 <212> PRT  
 <213> *Oryza sativa*

5

<400> 10

Met Ala Glu Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ala Thr Thr Glu Gln Ala  
 1 5 10 15

Asn Gly Ser Ser Gly Gly Glu Gln Lys Thr Arg His Ser Glu Val Gly  
 20 25 30

His Lys Ser Leu Leu Lys Ser Asp Asp Leu Tyr Gln Tyr Ile Leu Glu  
 35 40 45

Thr Ser Val Tyr Pro Arg Glu His  
 50 55

10

<210> 11  
 <211> 60  
 <212> PRT  
 <213> *Zea mays*

15

<400> 11

Glu Ser Met Lys Glu Leu Arg Glu Val Thr Ala Lys His Pro Trp Asn  
 1 5 10 15

Leu Met Thr Thr Ser Ala Asp Glu Gly Gln Phe Leu Asn Met Leu Ile  
 20 25 30

Lys Leu Ile Gly Ala Lys Lys Thr Met Glu Ile Gly Val Tyr Thr Gly  
 35 40 45

Tyr Ser Leu Leu Ala Thr Ala Leu Ala Leu Pro Glu  
 50 55 60

20

ES 2 571 982 T3

<210> 12  
 <211> 60  
 <212> PRT  
 <213> *Sorghum bicolor*

5

<400> 12

Glu Ser Met Lys Glu Leu Arg Glu Ile Thr Ala Lys His Pro Trp Asn  
 1 5 10 15

Leu Met Thr Thr Ser Ala Asp Glu Gly Gln Phe Leu Asn Met Leu Ile  
 20 25 30

Lys Leu Ile Gly Ala Lys Lys Thr Met Glu Ile Arg Val Tyr Thr Gly  
 35 40 45

Tyr Ser Leu Leu Ala Thr Ala Met Ala Leu Pro Asp  
 50 55 60

10 <210> 13  
 <211> 60  
 <212> PRT  
 <213> *Zea mays*

15 <400> 13

Glu Ser Met Lys Glu Leu Arg Glu Ile Thr Ala Lys His Pro Trp Asn  
 1 5 10 15

Leu Met Thr Thr Ser Ala Asp Glu Gly Gln Phe Leu Asn Met Leu Ile  
 20 25 30

Lys Leu Ile Gly Ala Lys Lys Thr Met Glu Ile Gly Val Tyr Thr Gly  
 35 40 45

Tyr Ser Leu Leu Ala Thr Ala Leu Ala Leu Pro Glu  
 50 55 60

20 <210> 14  
 <211> 60  
 <212> PRT  
 <213> *Oryza sativa*

25 <400> 14

Glu Cys Met Lys Glu Leu Arg Glu Val Thr Ala Asn His Pro Trp Asn  
 1 5 10 15

ES 2 571 982 T3

Leu Met Thr Thr Ser Ala Asp Glu Gly Gln Phe Leu Asn Leu Leu Leu  
20 25 30

Lys Leu Ile Gly Ala Lys Lys Thr Met Glu Ile Gly Val Tyr Thr Gly  
35 40 45

Tyr Ser Leu Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ile Pro Asp  
50 55 60

<210> 15  
<211> 60  
<212> PRT  
<213> *Zea mays*

5

<400> 15

Asp Gly Thr Ile Leu Ala Met Asp Ile Asn Arg Glu Asn Tyr Glu Leu  
1 5 10 15

Gly Leu Pro Cys Ile Glu Lys Ala Gly Val Ala His Lys Ile Asp Phe  
20 25 30

Arg Glu Gly Pro Ala Leu Pro Val Leu Asp Asp Leu Ile Ala Glu Glu  
35 40 45

Lys Asn His Gly Ser Phe Asp Phe Val Phe Val Asp  
50 55 60

10

<210> 16  
<211> 60  
<212> PRT  
<213> *Sorghum bicolor*

15

<400> 16

Asp Gly Lys Ile Leu Ala Met Asp Ile Asn Arg Glu Asn Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

Gly Leu Pro Val Ile Glu Lys Ala Gly Leu Ala His Lys Ile Asp Phe  
20 25 30

Arg Glu Gly Pro Ala Leu Pro Val Leu Asp Asp Leu Ile Ala Asp Glu  
35 40 45

Lys Asn His Gly Ser Phe Asp Phe Val Phe Val Asp  
50 55 60

20

<210> 17  
<211> 60  
<212> PRT  
<213> *Zea mays*

25

ES 2 571 982 T3

<400> 17

Asp Gly Thr Ile Leu Ala Met Asp Ile Asn Arg Glu Asn Tyr Glu Leu  
 1 5 10 15

Gly Leu Pro Cys Ile Asn Lys Ala Gly Val Gly His Lys Ile Asp Phe  
 20 25 30

Arg Glu Gly Pro Ala Leu Pro Val Leu Asp Asp Leu Val Ala Asp Lys  
 35 40 45

Glu Gln His Gly Ser Phe Asp Phe Ala Phe Val Asp  
 50 55 60

5 <210> 18  
 <211> 60  
 <212> PRT  
 <213> *Oryza sativa*

10 <400> 18

Asp Gly Thr Ile Leu Ala Met Asp Ile Asn Arg Glu Asn Tyr Glu Leu  
 1 5 10 15

Gly Leu Pro Ser Ile Glu Lys Ala Gly Val Ala His Lys Ile Asp Phe  
 20 25 30

Arg Glu Gly Pro Ala Leu Pro Val Leu Asp Gln Leu Val Glu Glu Glu  
 35 40 45

Gly Asn His Gly Ser Phe Asp Phe Val Phe Val Asp  
 50 55 60

15 <210> 19  
 <211> 60  
 <212> PRT  
 <213> *Zea mays*

20 <400> 19

Ala Asp Lys Asp Asn Tyr Leu Asn Tyr His Glu Arg Leu Leu Lys Leu  
 1 5 10 15

Val Lys Leu Gly Gly Leu Ile Gly Tyr Asp Asn Thr Leu Trp Asn Gly  
 20 25 30

Ser Val Val Leu Pro Asp Asp Ala Pro Met Arg Lys Tyr Ile Arg Phe  
 35 40 45

Tyr Arg Asp Phe Val Leu Val Leu Asn Lys Ala Leu  
 50 55 60

ES 2 571 982 T3

<210> 20  
 <211> 60  
 <212> PRT  
 <213> *Sorghum bicolor*

5

<400> 20

Ala Asp Lys Asp Asn Tyr Leu Asn Tyr His Asp Arg Leu Leu Lys Leu  
 1 5 10 15

Val Lys Leu Gly Gly Leu Ile Gly Tyr Asp Asn Thr Leu Trp Asn Gly  
 20 25 30

Ser Val Val Leu Pro Asp Asp Ala Pro Met Arg Lys Tyr Ile Arg Phe  
 35 40 45

Tyr Arg Asp Phe Val Leu Val Leu Asn Lys Ala Leu  
 50 55 60

10 <210> 21  
 <211> 60  
 <212> PRT  
 <213> *Zea mays*

15 <400> 21

Ala Asp Lys Asp Asn Tyr Leu Asn Tyr His Glu Arg Leu Leu Lys Leu  
 1 5 10 15

Val Arg Pro Gly Gly Leu Ile Gly Tyr Asp Asn Thr Leu Trp Asn Gly  
 20 25 30

Ser Val Val Leu Pro Asp Asp Ala Pro Met Arg Lys Tyr Ile Arg Phe  
 35 40 45

Tyr Arg Asp Phe Val Leu Ala Leu Asn Ser Ala Leu  
 50 55 60

20 <210> 22  
 <211> 60  
 <212> PRT  
 <213> *Oryza sativa*

25 <400> 22

ES 2 571 982 T3

Ala Asp Lys Asp Asn Tyr Leu Asn Tyr His Glu Arg Leu Met Lys Leu  
 1 5 10 15

Val Lys Val Gly Gly Leu Val Gly Tyr Asp Asn Thr Leu Trp Asn Gly  
 20 25 30

Ser Val Val Leu Pro Ala Asp Ala Pro Met Arg Lys Tyr Ile Arg Tyr  
 35 40 45

Tyr Arg Asp Phe Val Leu Glu Leu Asn Lys Ala Leu  
 50 55 60

5 <210> 23  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> *Zea mays*  
 <400> 23

Ala Ala Asp Asp Arg Val Glu Ile Cys Gln Leu Pro Val Gly Asp Gly  
 1 5 10 15

Val Thr Leu Cys Arg Arg Val Lys  
 20

10 <210> 24  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 15 <213> *Sorghum bicolor*  
 <400> 24

Ala Ala Asp Asp Arg Val Glu Ile Cys Gln Leu Pro Val Gly Asp Gly  
 1 5 10 15

Val Thr Leu Cys Arg Arg Val Lys  
 20

20 <210> 25  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 25 <213> *Zea mays*  
 <400> 25

Ala Ala Asp Asp Arg Val Glu Ile Cys Gln Leu Pro Val Gly Asp Gly  
 1 5 10 15

Val Thr Leu Cys Arg Arg Val Lys  
 20

30 <210> 26  
 <211> 24  
 <212> PRT

ES 2 571 982 T3

<213> *Oryza sativa*

<400> 26

**Ala Ala Asp His Arg Val Glu Ile Cys Gln Leu Pro Val Gly Asp Gly**  
**1 5 10 15**

**Ile Thr Leu Cys Arg Arg Val Lys**  
**20**

5

<210> 27

<211> 6

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia consenso de caja TATA

15

<400> 27

tataat 6

<210> 28

<211> 6

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia consenso de caja GC

25

<400> 28

gggcgg 6

<210> 29

<211> 30

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> cebador directo específico de gen

<400> 29

atgaaaaagc ctgaactcac cgcgacgtct 30

40

<210> 30

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> cebador inverso específico de gen

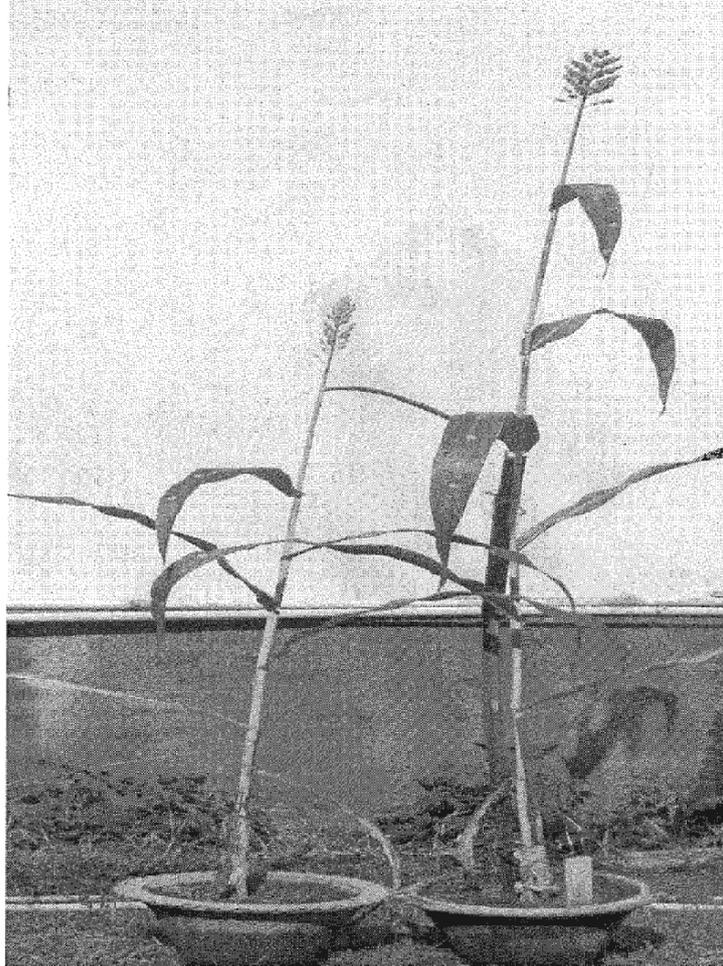
<400> 30

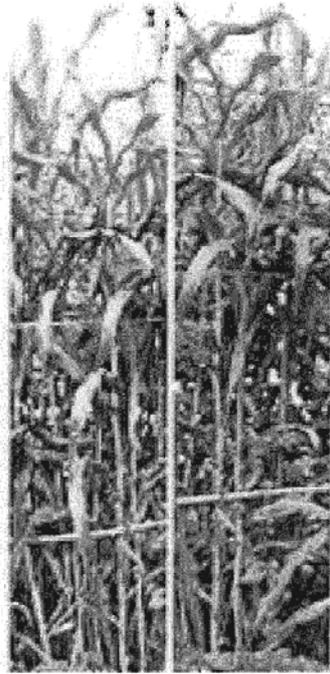
gcatcagctc atcgagagcc tgcgcgacgg 30

50

**REIVINDICACIONES**

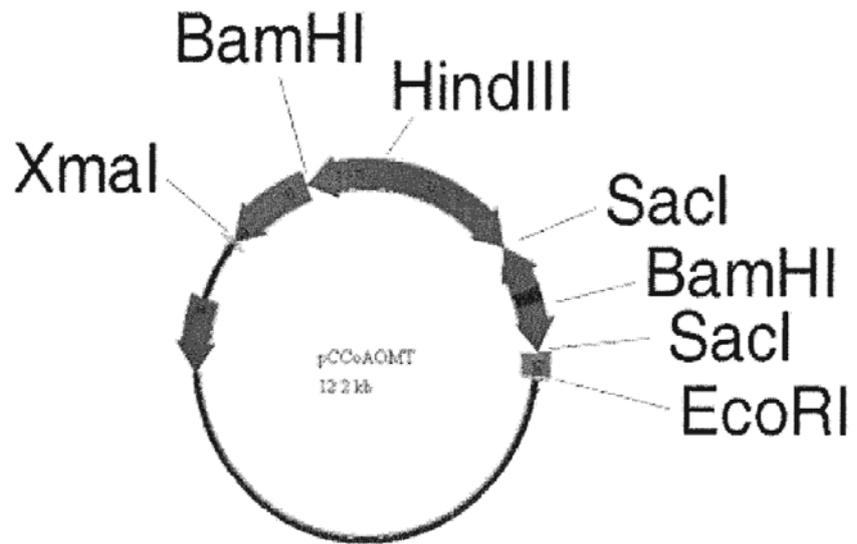
1. Un proceso para producir una planta transgénica de *Sorghum bicolor* que tiene biomasa aumentada, que comprende:
- 5
- i) transformar o transfectar una célula de *Sorghum bicolor* con un casete de silenciamiento génico mediado por doble cadena, que comprende un ácido nucleico representado por la SEQ ID NO 1, en el que dicho ácido nucleico está asociado de forma funcional con un promotor, y en el que el ácido nucleico está en orientación sentido-antisentido para generar ARNi *in vivo* en al menos una parte de la SEQ ID NO 1; y
- 10
- ii) cultivar una planta de *Sorghum bicolor* a partir de dicha célula.
2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la biomasa aumentada se selecciona entre crecimiento potenciado, forma de la panoja, cantidad aumentada de semillas por panoja y/o tamaño y peso aumentados.
- 15
3. Uso de una planta producida por el proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende la etapa de recoger el grano y/o los tallos de la planta.
4. El uso de la reivindicación 4, que comprende adicionalmente obtener alcohol, azúcar, jarabe o biocombustible a partir de dicho grano y/o tallos.
- 20
5. Uso de la planta producida por el proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en la producción de alcohol, azúcar, jarabe o biocombustible.





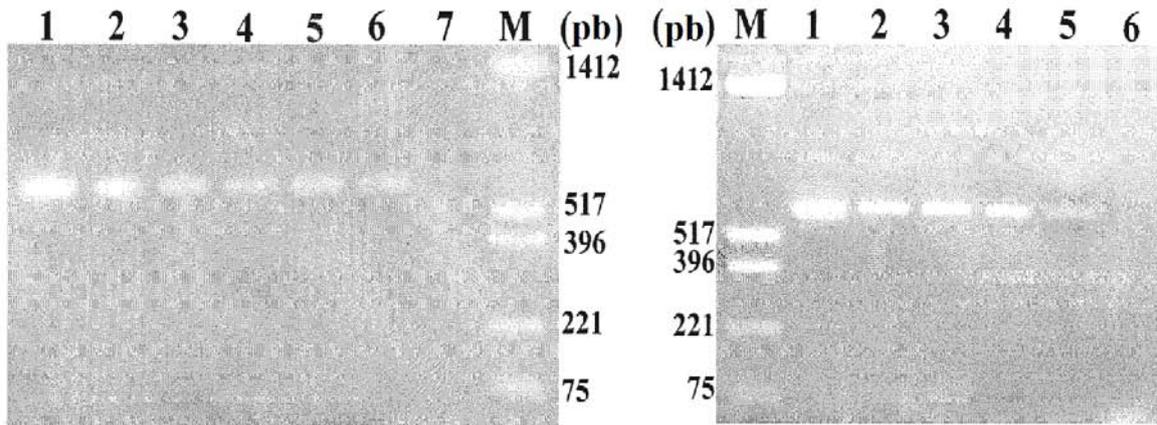






A)

B)



21260 pb

5148 pb

4268 pb

3530 pb

