(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 634 187**

(51) Int. CI.:

C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/14 (2006.01)
A01H 3/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.07.2010 PCT/CN2010/001015**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2011 WO11022930**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2010 E 10811097 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.05.2017 EP 2471808**

(54) Título: **Proteínas relacionadas con la forma del grano y la forma de la hoja de arroz, genes codificadores y utilización de las mismas**

(30) Prioridad:

24.08.2009 CN 200910091728

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.09.2017

(73) Titular/es:

INSTITUTE OF SUBTROPICAL AGRICULTURE, CHINESE ACADADEMY OF SCIENCES (100.0%)
1071 Yuan Da Er Lu Furong District
Changsha, Hunan 410125, CN

(72) Inventor/es:

XIA, XINJIE

(74) Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

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

Proteínas relacionadas con la forma del grano y la forma de la hoja de arroz, genes codificadores y utilización de las mismas

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la biotecnología, más específicamente a un método para aumentar el peso del grano mediante la introducción de un gen en una planta diana.

Descripción del Estado de la Técnica

El arroz es uno de los principales cultivos de cereales de los que depende la vida del ser humano, proporciona alimento básico a casi la mitad de la población mundial. En China, el arroz es el primero de todos los cultivos de cereales en producción y representa un 60% del consumo de raciones de cereales de los residentes chinos; aproximadamente la mitad de los agricultores se dedican a la producción de arroz. Por consiguiente, el arroz desempeña un papel principal en los cultivos alimentarios chinos. Con el crecimiento cada vez mayor de la población mundial (la tasa de crecimiento de la población de países consumidores de arroz es mayor que la tasa de crecimiento media de la población mundial) y el rápido desarrollo de la industrialización y la urbanización, así como los daños causados por desastres naturales y similares, hay una tendencia de decrecimiento de los arrozales que provoca un conflicto apremiante entre la oferta y la demanda de arroz en el mundo. ¿Cómo producir más alimento en menores terrenos arroceros para asegurar la oferta segura de arroz? Este es un problema urgente al que nos estamos enfrentando y que debemos superar. Sin embargo, el rendimiento de arroz en la producción a gran escala generalmente es muy bajo. De acuerdo con una investigación dirigida por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en 1999, la producción de arroz media mundial por unidad de superficie es de solo 3,8 t·ha-1 (6,3 t·ha-1 en China). Con este fin, China ha presentado el proyecto de mejora selectiva del arroz para un rendimiento "superalto" (el proyecto de mejora selectiva de "superarroz") en los últimos 30 años para desarrollar el potencial de rendimiento de variedades de alto rendimiento y así mejorar sustancialmente el rendimiento del arroz. El peso del grano y la cantidad de granos por panícula son factores importantes que influyen en la producción de los cultivos, y un aumento del tamaño del grano, del peso del grano o de la cantidad de granos por panícula es una estrategia eficaz para mejorar el rendimiento del arroz. Además, la longitud del grano es un carácter morfológico importante que determina la calidad del arroz. Para los biólogos y los agrónomos, uno de los objetivos que más merecen la pena es aumentar tanto la producción como la calidad del arroz.

El documento US 2004/0123343 describe polinucleótidos útiles para mejorar plantas. Las plantas transgénicas tienen propiedades mejoradas, como mayor tolerancia al frío de la planta, tasa de crecimiento, tolerancia a la selección de plantas, mayor resistencia a enfermedades, producción de galactomanano, producción de reguladores del crecimiento, mejor tolerancia de las plantas a herbicidas y condiciones osmóticas extremas y mejor uso de nitrógeno y/o absorción de fósforo.

El documento JP 2005/185101 describe clones de ADNc de longitud completa de plantas y su uso. Las plantas de origen preferentes son plantas monocotiledóneas. Las entradas en la base de datos Uniport: Q6Z610, EMBL: AP004799 y EMBL: AP004997 dan a conocer secuencias que se parecen a las SEQ ID NO: 1 y 2 tal como se definen aquí.

Tanto el documento US 2004/0123343 como el documento JP 2005/185101 dan a conocer proteínas idénticas a la SEQ ID NO: 2 tal como se describe aquí.

El documento CN 101161675 da a conocer un gen GW2 de grano largo de arroz y su aplicación. El gen GW2 puede emplearse para controlar el tamaño del grano del cultivo, mejorar su rendimiento o calidad, regular la duración del ciclo de la mitosis celular y, utilizado como marcador molecular, identificar las especies del cultivo como especies de grano largo o de grano corto.

Descripción de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para aumentar el tamaño del grano de una planta mediante una proteína del arroz, denominada OsXCL, en una planta diana transgénica, que es la siguiente proteína:

> una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO 2 en la Lista de Secuencias.

Este objetivo se resuelve mediante el objeto de la reivindicación 1.

La SEQ ID NO 2 es una secuencia de aminoácidos de OsXCL que comprende 255 aminoácidos, donde hay 72 aminoácidos hidrófobos (incluyendo prolina), 183 aminoácidos hidrófilos, 34 aminoácidos ácidos y 38 aminoácidos básicos. La proteína tiene un peso molecular de 26,73 Kda y un punto isoeléctrico de 9,8. Es una nueva proteína que no ha sido descrita.

Una etiqueta como las mostradas en la Tabla 1 se puede unir a un extremo amino o carboxi de la proteína consistente en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO 2 en la Lista de Secuencias para una purificación conveniente de OsXCL en 1.

Tabla 1: Secuencias de Etiquetas

Etiquetas	Residuos	Secuencia
Poli-Arg	5-6 (normalmente 5)	RRRRR
Poli-His	2-10 (normalmente 6)	HHHHHH
FLAG	8	DYKDDDDK
Marca Strep II	8	WSHPQFEK
c-myc	10	EQKLISEEDL

La OsXCL de 2) mostrada más arriba se puede obtener mediante síntesis artificial, o se puede obtener sintetizando el gen codificador de la misma antes de la expresión biológica. El gen codificador de OsXCL de 2) mostrado más arriba se puede obtener sometiendo a deleción de codones de uno o más residuos aminoácidos de la secuencia de ADN tal como se muestra por las bases de las posiciones 106 a 870 a partir del extremo 5' de la SEQ ID NO 1 en la Lista de Secuencias, y/o sometiendo uno o más pares de bases a mutación sin sentido invertida, y/o enlazando la secuencia codificadora de un marcador tal como se muestra en la Tabla 1 en el extremo 5' y/o en el extremo 3' de la misma.

El gen codificador de la proteína arriba indicada, denominada *OsXCL*, se introduce en una planta diana de acuerdo con la presente invención.

El gen codificador arriba indicado es un gen de los siguientes 1) o 2) o 3), 4) o 5):

1) un gen que codifica una proteína consistente en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO 2 en la Lista de Secuencias;

2) un gen que tiene la secuencia codificadora representada por las posiciones 106-870 desde el extremo 5' de la SEQ ID NO 1 en la Lista de Secuencias;

3) un gen que tiene la secuencia codificadora representada por las posiciones 50-873 desde el extremo 5' de la SEQ ID NO 1 en la Lista de Secuencias;

4) un gen que se hibrida con el gen definido en 2) o 3) bajo condiciones muy rigurosas y que codifica dicha proteína;

5) un gen que presenta más de un 80% de homología con el gen definido en 2) o 3) y que codifica dicha proteína.

La SEQ ID NO 1 es un ADNc de longitud completa codificador de OsXCL que consiste en 1.062 bases, donde la región no traducida 5' comprende 105 bases, la región no traducida 3' comprende 192 bases y la región codificadora comprende 765 bases (desde la posición 106 hasta la posición 870), que codifica la proteína OsXCL cuya secuencia de aminoácidos es la SEQ ID NO 2 en la Lista de Secuencias. En la región codificadora, A comprende un 15,16% (116), C comprende un 40,65% (311), G comprende un 32,29% (247), T comprende 11,9% (91), A+T comprende un 27,06% (207) y C+G comprende un 72,94% (558).

Las condiciones muy rigurosas arriba indicadas son: disponer la película híbrida en una solución de prehibridación (0,25 mol/l de solución tampón fosfato de sodio, pH 7,2, 7% SDS) para prehibridar a 65ºC durante 30 minutos; retirar la solución de prehibridación y añadir una solución de hibridación (0,25 mol/l de solución tampón fosfato de sodio, pH 7,2, 7% SDS, fragmento de nucleótido marcado con isótopos) para hibridar a 65ºC durante 12 horas; retirar la solución de hibridación y añadir una solución de limpieza de membrana I (20 mmol/l de solución tampón fosfato de sodio, pH 7,2, 5% SDS), lavar la membrana a 65ºC dos veces, cada vez durante 30 minutos; añadir una solución de limpieza de membrana II (20 mmol/l de solución tampón fosfato de sodio, pH 7,2, 1% SDS), lavar la membrana a 65ºC durante 30 minutos.

Aquí también se describen los pares de cebadores utilizados para amplificar la longitud completa del gen *OsXCL* arriba indicado o cualquier fragmento del mismo.

Aquí también se describe la línea celular transgénica que contiene el gen arriba indicado. Aquí también se describe la cepa recombinante que contiene el gen arriba indicado.

Aquí también se describe el vector recombinante que contiene el gen arriba descrito.

El vector de expresión recombinante que contiene el gen *OsXCL* se puede construir con vectores de expresión de plantas existentes. Los vectores de expresión de plantas incluyen vectores de *Agrobacterium* binarios y vectores que pueden emplearse en el bombardeo con microproyectiles en plantas y similares, tales como pCAMBIA3301, pCAMBIA1300, pBI121, pBin19, pCAMBIA2301, pCAMBIA1301-UbiN, pBY505 u otros vectores de expresión de plantas derivados. Cuando se construye un vector de expresión recombinante con el gen *OsXCL*, se puede añadir cualquier promotor potenciador, promotor constitutivo, promotor específico de

tejido o promotor inducible, que puede utilizarse solo o en combinación con otros promotores de plantas, tal como el promotor del virus del mosaico de la coliflor (CAMV) 35S, promotores del gen de ubiquitina (pUbi), promotor de actina y similares, antes del nucleótido de iniciación del mismo.

Además, cuando se construye un vector de expresión de plantas con el gen, también se puede utilizar un potenciador, incluyendo un potenciador de traducción o un potenciador de transcripción. Estas regiones potenciadoras pueden ser codones de iniciación ATG o codones de iniciación de regiones adyacentes y similares, que deben ser idénticos al marco de lectura de una secuencia codificadora para garantizar la traducción correcta de toda la secuencia. Existen abundantes fuentes para la señal reguladora de traducción y el codón de iniciación, que pueden ser naturales o sintéticas. Una región de iniciación de traducción puede proceder de una región de iniciación de transcripción o de un gen estructural.

El vector de expresión de plantas que se debe utilizar se puede procesar, por ejemplo, introduciendo un gen que es expresado en la planta para producir una enzima de cambio de color o un compuesto luminoso (gen GUS, en GFP, gen de luciferasa, etc.), un marcador antibiótico de resistencia (marcador de gentamicina, marcador de kanamicina, etc.) o un gen marcador para un reactivo antiquímico (por ejemplo gen antiherbicida) y similares, para una identificación y rastreo convenientes de una célula vegetal o de la planta transgénica.

En particular, el vector recombinante arriba indicado puede ser un vector recombinante obtenido insertando el gen arriba indicado en un sitio de clonación múltiple del vector de expresión 163-1300; consistiendo el método de construcción del vector de expresión 163-1300 en: ligar una banda de ADN que contiene un promotor Doble 35S producido dividiendo enzimáticamente pJIT 163 con Kpnl y Xhol con un fragmento grande producido dividiendo enzimáticamente pCAMBIA1300 con KpnI y SalI para obtener el vector de expresión recombinante.

El objeto de la presente invención es proporcionar un método para aumentar el peso del grano de una planta transgénica. El método para aumentar el peso del grano de una planta transgénica es: introducir el gen arriba indicado en una planta diana para obtener una planta transgénica con un peso del grano mayor que el de la planta diana.

Aquí también se describe un método para aumentar la longitud del grano de una planta transgénica. El método para aumentar la longitud del grano de una planta transgénica es: introducir el gen arriba indicado en una planta diana para obtener una planta transgénica con una longitud del grano mayor que la de la planta diana.

Aquí también se describe un método para aumentar la cantidad de granos por panícula de una planta transgénica. El método para aumentar la cantidad de granos por panícula de una planta transgénica es: introducir el gen arriba indicado en una planta diana para obtener una planta transgénica con una cantidad de granos por panícula mayor que la de la planta diana.

Aquí también se describe un método para generar una planta transgénica de hoja enrollada. El método para generar una planta transgénica de hoja enrollada es: introducir el gen arriba indicado en una planta diana para obtener una planta transgénica de hoja enrollada.

El gen arriba indicado se introduce en una planta diana a través del vector recombinante arriba indicado. Un vector de expresión de plantas que porta el gen *OsXCL* se puede transformar en una célula o tejido vegetal mediante un plásmido Ti, plásmido Ri, vector de virus vegetal, métodos biológicos convencionales, tales como pistola genética, vía del tubo de polen, microinyección, transformación eléctrica, mediación por *Agrobacterium*, etc.

La planta arriba indicada puede ser una planta dicotiledónea o una planta monocotiledónea; la planta monocotiledónea es preferiblemente arroz y la planta dicotiledónea puede ser *Arabidopsis thaliana*.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa del ADNc de OsXCL amplificado por PCR, donde la pista 1 es un marcador de ADN; las pistas 2 y 3 son ADNc de OsXCL.

Figura 2: es una figura de confirmación de división enzimática de HindIII y EcoRI después de la ligadura de OsXCL con el vector T, donde la pista 1 es un marcador de ADN; las pistas 2-5 son resultados de la división enzimática doble EcoRI y HindIII del vector de clonación de ADNc de OsXCL.

Figura 3: es una figura de confirmación de la división enzimática de BamHI después de la ligadura de ADNc de OsXCL con el vector T; P1, P2, P3 y P4 son bandas de plásmido de ADNc de OsXCL antes de la división enzimática de BamHI; 1, 2, 3 y 4 son bandas de plásmido de ADNc OsXCL después de la división enzimática de BamHI, M es un marcador de ADN.

Figura 4: es un mapa de pJIT163.

Figura 5: es un mapa de pCAMBIA1300.

Figura 6: es parte de un mapa de un vector de pMD18-T que contiene OsXCL.

Figura 7: es una figura de confirmación de división enzimática de EcoRI después de la ligadura de OsXCL con el vector de expresión; las pistas 1-5 son resultado de la división enzimática del vector de expresión de OsXCL dividido enzimáticamente con EcoRI.

Figura 8: es una figura de confirmación de la división enzimática de HindIII después de la ligadura de OsXCL con el vector de expresión; las psitas 1-5 son vectores de expresión de OsXCL divididos enzimáticamente con HindIII.

Figura 9: es una figura de confirmación de la división enzimática simple con EcoRI y HindIII realizada respectivamente en el plásmido aislado de Agrobacterium; pista 1, un marcador de ADN; pista 2, el resultado del plásmido del vector de expresión de OsXCL después de la división enzimática con EcoRI; pista 3, el resultado del plásmido del vector de expresión de OsXCL después de la división enzimática con HindIII.

Figura 10: es una figura de confirmación de la PCR realizada con los cebadores designados de acuerdo con el gen de resistencia a la higromicina, donde M es un marcador de ADN; las pistas 1-9 y 12-21 son los resultados de la PCR del gen de resistencia a la higromicina realizados con el ADN genómico de planta transgénica de OsXCL como molde; en las pistas 10 y 22, el gen de resistencia a la enzima higromicina amplificado con el plásmido del vector de expresión como molde se utilizó como control positivo; las psitas 11 y 23 son un control negativo sin molde (agua).

Figura 11: es un análisis de la expresión relativa de PCR en tiempo real cuantitativa realizada en una planta T0 93-11 transformada con el gen OsXCL. S1 es un arroz de control no transgénico; S2 es un arroz de control con vector vacío libre del gen OsXCL; S3-S25 son plantas de arroz T0 93-11 transformadas con el gen OsXCL.

Figura 12: son fotografías de arroz transgénico de OsXCL y granos de control.

Figura 13: son fotografías de arroz de generación T0 transgénico de OsXCL con hojas enrolladas y arroz de generación T2 con las bases de la última hoja rizadas en fase tardía.

Figura 14: es una fotografía que muestra el mayor número de granos por panícula de la generación T2 del arroz 9311 transgénico que sobreexpresa el gen OsXCL.

Figura 15: gráfico que muestra el crecimiento de grano del arroz 9311 transgénico que sobreexpresa el gen OsXCL.

Figura 16: una fotografía que muestra el *Arabidopsis thaliana* transgénico que sobreexpresa el gen *OsXCL* con un aumento espectacular de silicuas y hojas rizadas.

La presente divulgación se describirá adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos específicos. Cada uno de los métodos de los siguientes ejemplos es un método convencional, a no ser que se indique otra cosa.

Ejemplo 1: generación de un arroz transgénico que tiene granos largos, grandes y plurales y hoja enrollada

I. Construcción del vector de expresión recombinante

1. Clonación del gen *OsXCL*

Se sintetizó artificialmente un par de cebadores en cuyos extremos 5' se añadieron sitios de división enzimática NcoI y BamHI, respectivamente. Los cebadores en dirección 5' y en dirección 3' son los siguientes:

F: 5-***CCATGG*** GAATCCAATCCACTCCACTCCACC-3 (30);

R: 5-***GGATCC*** CTAATAGGCGGTGTGGTGTTGCG -3 (29).

Un ARN extraído de arroz Pei'ai 64S (Centro Nacional Chino para la Hibridación y Mejora Selectiva del Arroz, Changsha, China) se sometió a transcripción inversa para obtener la primera cadena de ADNc.

Se llevó a cabo una PCR para amplificar el ADNc tal como se muestra en la SEQ ID NO: 1 con el cebador en dirección 5' y el cebador en dirección 3' arriba indicados como cebadores y ADNc de arroz Pei'ai 64S como molde. El programa de PCR comenzó con una predesnaturalización a 94ºC durante 5 minutos bajo una tapa caliente de 105ºC, seguido por 32 ciclos de desnaturalizacion a 94ºC durante 30 s, reasociación a 56ºC durante 30 s, extensión a 72ºC durante 1 min 20 s, terminando con una extensión final a 72ºC durante 10 minutos, y la temperatura se mantuvo a 22ºC.

El sistema PCR era:

ddH_2O	3,25 µl
2 x Tampón I GC	12,5 µl
Cebador-1 (10 µM)	2 µl
Cebador-2 (10 µM)	2 µl
dNTP	4 µl
ADNc molde	1 µl
LA Taq polimerasa	0,25 µl
Volumen total	25 µl

Se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa con tampón de electroforesis TAE y los fragmentos resultantes de aproximadamente 800 bp (Figura 1) se designaron *OsXCL*.

Las bandas de *OsXCL* arriba indicadas se recuperaron mediante un método de recuperación por prensa de taco de gel utilizando el *kit* de TIANGEN. Los fragmentos recuperados se enlazaron en un vector pMD18-T (TA Cloning, Jinan TaiTianHe Biotechnology Limited Company) y el sistema de ligadura era el siguiente:

Inserción	4,5 µl
Vector T	0,5 µl
Solución I	5 µl
Volumen total	10 µl

La ligadura duró 2 horas y se transformó en células competentes de *E. coli* DH5α, que se extendieron sobre placas y se rastrearon con ampicilina. Se eligieron monoclones, de los que se aisló el plásmido y se identificó mediante división enzimática doble con *Hin*dIII y *Eco*RI. Las divisiones enzimáticas indicaban la presencia de bandas de *OsXCL* de aproximadamente 800 bp, tal como se muestra en la Figura 2.

El plásmido se digirió con *Bam*HI para verificar la dirección en la que el fragmento diana *OsXCL* estaba enlazado en un vector T, y el resultado, tal como se muestra en la Figura 3 fue: dado que se añadió un sitio *Bam*HI en el cebador en dirección 3', una inserción inversa en el vector T resultaría en una banda de aproximadamente 840 bp; en la Figura 3, P1, P2, P3 y P4 representan plásmidos no cortados, cuyos tamaños de banda están indicados por el marcador 1kb plus a la derecha, y 1, 2, 3 y 4 representan resultados después de la división, cuyos tamaños de banda están indicados por el marcador 1kb plus a la izquierda. Comparando los resultados se observa que, excepto el plásmido 4, cada uno de los plásmidos 1, 2 y 3 se abrió por corte y los fragmentos diana se enlazaron hacia adelante (es decir, cada uno tiene aproximadamente 800 bp). Las soluciones de bacterias correspondientes a los plásmidos 1, 2 y 3 se secuenciaron y el resultado secuenciado sugería que el fragmento diana *OsXCL* tiene una secuencia de posiciones 50-873 a partir del extremo 5' de la SEQ ID NO: 1, y el ORF (marco de lectura abierta) del gen *OsXCL* tenía una secuencia completamente idéntica a la mostrada en las posiciones 106 a 870 partir del extremo 5' de la SEQ ID NO: 1.

2. Construcción del vector de expresión recombinante

1) Construcción del vector de expresión 163-1300

El pJIT163 (pGreen, http://www.pgreen.ac.uk/) mostrado en la Figura 4 se dividió enzimáticamente con KpnI y XhoI y los resultados de la división enzimática se identificaron por electroforesis en gel de agarosa antes de la recuperación de bandas de ADN que contenían promotores Doble 35S. Tal como se muestra en la Figura 5, pCAMBIA1300 (CambiaLabs, http://www.cambia.org/daisy/bioforge legacy/3725.html) se dividió enzimáticamente con KpnI y SnaII, y se recuperaron fragmentos grandes. XhoI y SalI son isocaudámeros. Los dos fragmentos recuperados se ligaron con ligasa T4 durante la noche para construir un vector complejo 163-1300.

2) Construcción del vector de expresión recombinante

El vector T que contenía *OsXCL*, tal como muestra la Figura 6, se cortó con enzimas *N*col y *Bam*HI (tanto si BamHI actuó sobre el sitio de división enzimático introducido en la posición 872 a través del diseño del cebador como en el sitio de división enzimático en el vector T en la posición 887, los fragmentos recuperados contenían en cada caso el codón de terminación de OsXCL ORF). El vector de expresión 163-1300 se cortó también con estas dos enzimas, se recuperó y después se ligó, es decir, el gen *OsXCL* se enlazó en el vector de expresión 163-1300, para construir un vector de expresión recombinante, diseñado como *OsXCL*-163-1300, lo que se confirmó mediante división enzimática simple con *Hin*dIII y *Eco*RI, respectivamente. Tal como muestran las Figuras 7 y 8 (1, 2, 3, 4 y 5 representan en cada caso bandas de vector de expresión de *OsXCL* después de la división enzimática), los resultados indican que 1, 3, 4 y 5 tienen en cada caso una banda diana correcta o de aproximadamente 1600 bp que contenía *OsXCL*.

II. Generación y detección de un arroz transgénico que tiene grano largo y hoja enrollada

1. Obtención de un arroz transgénico que tiene granos largos, grandes y plurales y hoja enrollada

El vector de expresión recombinante del paso I.2 se utilizó para transformar *Agrobacterium* EHA105 (comercialmente disponible de Tiangen Biotech (Beijing) Co., Ltd.) con el método de congelación-descongelación para la transformación de *Agrobacterium.* Los plásmidos aislados de *Agrobacterium* se sometieron a confirmación por división enzimática simple con *Eco*RI y *Hin*dIII, respectivamente (Figura 9). En este contexto, los pasos del método de congelación-descongelación para la transformación de *Agrobacterium* fueron los siguientes:

Unas células competentes de *Agrobacterium* EHA105 almacenadas a -70ºC se sacaron y se dispusieron en un baño de hielo para descongelarlas; 10-20 µl de ADN plásmido pCAMBIA1300-2XCaMV35S-*OsMsr1* - CaMV35S-Term (aproximadamente 1-2 µg) se añadieron a 200 ml de células competentes en descongelación de *Agrobacterium* agitadas con una punta de pistola esterilizada, y se dejaron reposar durante varios minutos; la mezcla se dispuso en nitrógeno líquido durante 1 minutos, y en un baño de agua a 37ºC durante 5 minutos y después se añadieron 700-800 µl de medio líquido LB, seguido por oscilación a una temperatura de 28ºC a

200 rpm durante 4 horas; se centrifugó a 1.000 g durante 30 segundos, parte del sobrenadante se desechó, dejando 100-150 µl, que se resuspendieron por inhalación y eyección con una punta de pistola, y se esparcieron sobre una placa LB que contenía 50 mg/l de kanamicina, 50 mg/l de rifampicina y 34 mg/l de cloromicetina; las placas se dispusieron invertidas y se cultivaron a 28ºC durante 2 días.

El *Agrobacterium tumefaciens* recombinante arriba confirmado se utilizó para infectar tejido calloso de arroz 93-11 (Centro Nacional Chino para Hibridación y Mejora Selectiva del Arroz, Changsha, China) con el método de infección. Después, los callos infectados se cultivaron en un medio de selección que contenía higromicina (50 mg/l) para obtener plantas regeneradas resistentes a la higromicina.

El ADN genómico se extrajo de hojas de las plantas regeneradas resistentes a la higromicina y se utilizó como un molde para la confirmación por PCR con los siguientes cebadores diseñados en base al gen de resistencia a la higromicina:

pC13-hyg-F: 5'- ACCTGCCTGAAACCGAACTG-3';

pC13-hyg-R: 5'-CTGCTCCATACAAGCCAACC-3'.

La Figura 10 muestra los resultados de la confirmación, se obtuvieron bandas diana en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 13, 15, 16, 18 y 20, 12 líneas de plantas en total, es decir, había en total 12 plantas positivas en generación T0 de las plantas transgénicas (el gen de higromicina estrechamente enlazado con *OsXCL* había sido integrado en el genoma del arroz).

2. Análisis de detección

El arroz transgénico *OsXCL* arriba indicado se trasladó a un invernadero para cultivo, se ensacó y se autocruzó, y se recogieron semillas de arroz transgénico.

Entre tanto, el arroz transgénico del vector de expresión 163-1300 libre del gen *OsXCL* se utilizó como control de vector vacío; y el arroz no transgénico se utilizó también como control.

1) Detección por PCR cuantitativa

La detección por PCR cuantitativa se llevó a cabo en arroz transgénico *OsXCL* y arroz no transgénico con cebadores de secuencia de ADN 108-Fand y 108-R del gen *OsXCL*; los resultados se muestran en la Figura 11, *OsXCL* tenía un nivel de expresión relativamente bajo en arroz no transgénico 93-11 y un nivel de expresión espectacularmente elevado en arroz transgénico de *OsXCL*.

En este contexto, los cebadores para RT-PCR fueron los siguientes:

108-F: 5'-CCGCCATCATCCAAACTGA-3'(Tm 59, PCR 56);

108-R: 5'-GGTGACCACGCCCTTCTTC-3'(Tm 59, PCR 56).

Sistema RT-PCR

Reactivo	Concentración	Volumen (µl)	Volumen (µl)	Conc. final (µM)
		+ RT	-RT	
2 X solución de reacción maestra	2x	5,0	5,0	1x
QuantutyTec RT mix	100x	0,1	0,0	
Cebador 108-F	20,0 µM	0,2	0,2	0,4
Cebador 108-R	20,0 µM	0,2	0,2	0,4
Agua libre de ARN		0,5	0,6	
ARN molde	5 ng/µl	4,0	4,0	20 ng/reacción
Total		10,0	10,0	

Número de ciclos para PCR	Condiciones de curva de fusión
48ºC/30 min, 1 ciclo	95ºC/15 s
95ºC/10 min, 1 ciclo	60ºC/20 s
95ºC/15 s, 56ºC/ 1 min, 40 ciclos	95ºC/15 s

2) Observación de fenotipo y estadística

A. Semillas de plantas T0 del arroz transgénico 93-11 del gen *OsXCL*, control de vector vacío y arroz 93-11 no transgénico se pesaron y se midieron en cuanto al peso de cien granos y la longitud del grano, y las plantas T0 se observaron y se contó el número de plantas que tenían hojas enrolladas.

El experimento se repitió tres veces y los resultados se muestran en la Figura 12 y la Tabla 2. En comparación con el arroz 93-11 no transgénico y el control de vector vacío, el arroz transgénico *OsXCL* había aumentando

de forma significativa su peso de cien granos y la longitud del grano. En comparación con el arroz de tipo silvestre, el peso de cien granos del arroz transgénico *OsXCL* había aumentado en un 25,1% de peso en fresco y un 23% de peso en seco, la longitud del grano había aumentado en 1/4, y la tasa de granos yesosos había disminuido (mejora de la calidad del arroz).

Tabla 2: Peso de cien granos y longitud del grano de semillas de plantas T0

	Arroz transgénico *OsXCL*	Control de vector vacío	Arroz no transgénico
Longitud del grano (mm)	11,3833 ± 0,08868	8,7027 ± 0,08997	8,6167 ± 0,07836
Peso de cien granos (peso en fresco) (g)	4,224 ± 0,11	3,401 ± 0,08	3,377 ± 0,10
Peso de cien granos (peso en seco) (g)	3,36 ± 0,09	2,761 ± 0,07	2,73 ± 0,09
Nota: el peso en seco de semillas se obtuvo disponiendo las semillas a 37 ºC durante 3 días antes de pesarlas.			

En comparación con el arroz no transgénico y el control de vector vacío, las plantas T0 del arroz transgénico *OsXCL* tienen una hoja ligeramente más ancha y una última hoja considerablemente enrollada (Figura 13). Las plantas que incluyen hojas enrolladas comprenden hasta un 90% de las plantas de arroz transgénicas *OsXCL*. Los rizos comienzan desde las bases de las hojas y, en una etapa de desarrollo tardía, las partes superiores de las hojas se expanden.

B. Se contó el número de granos por panícula de líneas de plantas T_2 que sobreexpresan el gen *OsXCL* y las líneas de planta de control transformadas con vector vacío pCAMBIA1300-163, y se observó el número de plantas T_2 que tenían hojas enrolladas.

El experimento se repitió tres veces. La Figura 14 y la Tabla 3 muestran el número de granos por panícula. En comparación con el control de vector vacío, el arroz 9311 transgénico que sobreexpresaba el gen *OsXCL* presentaba un aumento considerable del número de granos por panícula.

Tabla 3: aumento del número de granos por panícula del arroz 9311 transgénico que sobreexpresa el gen *OsXCL*

	Panícula - 1	Panícula - 2	Panícula - 3	Panícula - 4	Panícula - 5	Panícula - 6	Panícula - 7	Panícula - 8	Panícula - 9	Panícula - 10	Número total de granos	Número granos por panícula	% de aumento
Transformado con OsXCL 9311*	213	183	215	268	191	234	188	258	244	261	2255	225,5	11,0
Transformado con vector vacío 9311	190	195	220	187	201	221	204	196	223	195	2032	203,2	
* Línea de plantas transgénicas C3-3													

ES 2 634 187 T3

La Figura 13 muestra los resultados de rizos en las hojas. Las bases de la última hoja del arroz 9311 transgénico que sobreexpresaba el gen *OsXCL* se rizaron en una etapa tardía.

C. Se eligieron treinta granos de líneas de plantas T_3 que sobreexpresaban el gen *OsXCL* y líneas de plantas de control transformadas con el vector vacío pCAMBIA1300-163, respectivamente, y se midió la longitud del grano.

El experimento se repitió tres veces y los resultados se muestran en la Figura 15. Las líneas de plantas de control de vector vacío tenían una longitud de grano media de 8,62 mm; las líneas de plantas que sobreexpresaban el gen *OsXCL* tenían una longitud de grano de 11,38 mm, un 24,30% más larga que la de las semillas de las líneas de plantas de control de vector vacío.

Por consiguiente, todas las líneas de plantas transgénicas que sobreexpresan el gen *OsXCL* presentan un fenotipo de aumento de la longitud del grano y el peso del grano de la generación T0 a la generación T3.

Ejemplo 2: Generación de *Arabidopsis thaliana* transgénica

Se obtuvo un vector de expresión recombinante *OsXCL-163-1300* de acuerdo con el método previsto en el Ejemplo 1 y después se integró en el genoma de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, comercialmente disponible de Arabidopsis Biological Resource Center, ABRC) por el método de inmersión floral mediada por *Agrobacterium*; se llevó a cabo un rastreo sobre un medio MS que contenía higromicina (50 mg/l), las semillas de la generación T2 se rastrearon de forma continua sobre el MS que contenía higromicina y se eligieron líneas de plantas con la proporción de segregación 3:1 para el rastreo continuo en la generación T3; si el 100% de las semillas de la generación T3 podía crecer en un MS que contenía higromicina, dicha línea de plantas se consideró como una línea homocigótica, y se obtuvo una *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresaba el gen *OsXCL*. Entretanto, la *Arabidopsis thaliana* transformada con vector de expresión 163-1300 libre del gen *OsXCL* se utilizó como un control de vector vacío.

Se generaron la generación T3 de *Arabidopsis thaliana* transgénica que sobreexpresaba el gen *OsXCL* y el control de vector vacío, y se contaron el número de silicuas y de rizos de hojas. Los resultados se muestran en la Figura 16, la *Arabidopsis thaliana* transgénica que sobreexpresaba el gen de *OsXCL* presentaba un aumento espectacular de silicuas y sus hojas rizadas.

Aplicación industrial

El arroz transgénico de *OsXCL* generado por el método aquí descrito tiene un peso para cien granos de hasta 4,224 g. En comparación con el control de tipo silvestre presenta un aumento de un 25,1% en peso, un aumento de 1/4 en la longitud de grano y un aumento de un 11% del número de granos por panícula. La *OsXCL* era sobreexpresada en arroz, produciendo rizos en las hojas del arroz y un aumento significativo de la longitud del grano y del peso de mil granos, así como una mejora de la calidad del arroz y el número de granos por panícula. La aplicación de *OsXCL* no solo aumenta la producción, sino que también mejora la calidad del arroz; además, no tiene ningún impacto negativo en el crecimiento y el desarrollo del arroz. Por tanto, el método que emplea este ges es un gen bastante ideal para mejorar cultivos, tales como arroz, etc. mediante biotecnología e ingeniería genética, y desempeñará un papel activo en la producción segura de arroz y otros cultivos.

Listado de secuencias

<110> Xia, xinjie

<120> Proteínas relacionadas con la forma del grano y la forma de la hoja de arroz, genes codificadores y utilización de las mismas

<130> CGGNARL92496

<160> 2

<210> 1

<211> 1062

<212> ADN

<213> Oryza sativa

<400> 1

```
ctcacacacc acaccacacc aacatcgagc gcgtcgagtc gaatccaatc cactccactc     60
cacccgcga tctcctctcc tctcgtctcc ggcgaagacg acgtgatgcc acccagcgcc    120
gccgccgcag ccgcgatggc gcagtcgccg cgcagcctcc acacgctgat cagcttcggc    180
cgcggcgccg acggcgtcga cgacgatgag gccacgcccg cgtcggtcga cgttggtgac    240
gcggagggcg ccgggctcga cctcgacttc gcgttcgcgc cgccggtgtc ggcggccgag    300
ctggcgccgg ccgacgacat cttcgcgcac ggccgcatcg tgccggcgta cccggtgttc    360
gaccgcagcc tcctcgacct ctcgcccggc gacgcctcca cggcggcgcc ctccgccgac    420
acctactgcg cgtggacgcc gcgctcggcg ccgggctcgc ccggccgcga caggttcccc    480
aagagcgcgt ccaccggcgg agagtcgtcg tcgtcatcgc ggcgctggcg cctgcgcgac    540
ctcgtcggcg ccggcggccg ctcccgcagc gacggcaagg acaagttcgc cttcctgcac    600
caccacgccg ccgcgccgcc atcatccaaa ctgaagactc ctcctccccc tcaacaacca    660
cagcagaaga agcagagcgc cgtgaagacg aagccggcgg cgaagaaggg cgtggtcacc    720
gagatggaca tggccaccgc gcacaggctc ttctacagca aggccagcgc cggcggcgac    780
cggcggccgc agcaagcctc gtacctgacg taccgaccgg cgttcagcgg cctcttcgcg    840
ctcggccggt cgcaacacca caccgcctat tagtttaatc acttggtcaa taaccaaacc    900
aactgattac tagtggtagt tgttgttaaa ttaattgttt tgttgtaaaa gtgttcaaaa    960
ttttcggcga aattcgagtc gagatttctc gtttgtacta gaaccttatc atgtacataa   1020
atggaaaaag agaggaatga aatttgagag atgattttgt ct                      1062
```

<210> 2

<211> 255

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 2

```
Met Pro Pro Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Met Ala Gln Ser Pro Arg
1               5                  10                  15
Ser Leu His Thr Leu Ile Ser Phe Gly Arg Gly Ala Asp Gly Val Asp
            20                  25                  30
Asp Asp Glu Ala Thr Pro Ala Ser Val Asp Val Gly Asp Ala Glu Gly
        35                  40                  45
Ala Gly Leu Asp Leu Asp Phe Ala Phe Ala Pro Pro Val Ser Ala Ala
    50                  55                  60
Glu Leu Ala Pro Ala Asp Asp Ile Phe Ala His Gly Arg Ile Val Pro
65                  70                  75                  80
Ala Tyr Pro Val Phe Asp Arg Ser Leu Leu Asp Leu Ser Pro Gly Asp
                85                  90                  95
Ala Ser Thr Ala Ala Pro Ser Ala Asp Thr Tyr Cys Ala Trp Thr Pro
            100                 105                 110
Arg Ser Ala Pro Gly Ser Pro Gly Arg Asp Arg Phe Pro Lys Ser Ala
        115                 120                 125
Ser Thr Gly Gly Glu Ser Ser Ser Ser Ser Arg Arg Trp Arg Leu Arg
    130                 135                 140
Asp Leu Val Gly Ala Gly Gly Arg Ser Arg Ser Asp Gly Lys Asp Lys
145                 150                 155                 160
Phe Ala Phe Leu His His His Ala Ala Ala Pro Pro Ser Ser Lys Leu
                165                 170                 175
Lys Thr Pro Pro Pro Pro Gln Gln Pro Gln Gln Lys Lys Gln Ser Ala
            180                 185                 190
Val Lys Thr Lys Pro Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Thr Glu Met Asp
        195                 200                 205
Met Ala Thr Ala His Arg Leu Phe Tyr Ser Lys Ala Ser Ala Gly Gly
    210                 215                 220
Asp Arg Arg Pro Gln Gln Ala Ser Tyr Leu Thr Tyr Arg Pro Ala Phe
225                 230                 235                 240

Ser Gly Leu Phe Ala Leu Gly Arg Ser Gln His His Thr Ala Tyr
                245                 250                 255
```

Reivindicaciones

1. Método para aumentar el peso del grano de una planta, que incluye introducir un gen en una planta diana para obtener la planta transgénica con un mayor peso de grano en comparación con el de la planta diana, seleccionándose el gen entre cualquiera de los siguientes:

a) un gen que codifica una proteína consistente en una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO 2 de la Lista de Secuencias;
b) un gen que tiene una secuencia codificadora representada por las posiciones 106-870 desde el extremo 5' de la SEQ ID NO 1 de la Lista de Secuencias;
c) un gen que tiene una secuencia codificadora representada por las posiciones 50-873 desde el extremo 5' de la SEQ ID NO 1 de la Lista de Secuencias;
d) un gen que se hibrida con el gen definido en b) o c) bajo condiciones muy rigurosas y que codifica la proteína definida en a);
e) un gen que tiene más de un 80% de identidad con el gen definido en b) o c),
donde el gen codifica la proteína definida en a).

2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el gen se introduce en la planta diana con un vector recombinante que comprende un gen seleccionado entre cualquiera de los siguientes:

a) un gen que codifica una proteína consistente en una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO 2 de la Lista de Secuencias;
b) un gen que tiene una secuencia codificadora representada por las posiciones 106-870 desde el extremo 5' de la SEQ ID NO 1 de la Lista de Secuencias;
c) un gen que tiene una secuencia codificadora representada por las posiciones 50-873 desde el extremo 5' de la SEQ ID NO 1 de la Lista de Secuencias;
d) un gen que se hibrida con el gen definido en b) o c) bajo condiciones muy rigurosas y que codifica la proteína definida en a);
e) un gen que tiene más de un 80% de identidad con el gen definido en b) o c),
donde el gen codifica la proteína definida en a).

3. Método según la reivindicación 2, caracterizado porque el vector recombinante es un vector recombinante obtenido insertando el gen tal como se define en la reivindicación 1 en los puntos (a), (b), (c), (d) o (e), en un sitio de clonación múltiple del vector de expresión 163-1300; consistiendo el método de construcción del vector de expresión 163-1300 en: ligar una banda de ADN que contiene promotor Doble 35S producido mediante división enzimática de pJIT163 con Kpnl y Xhol con un fragmento grande producido mediante división enzimática de pCAMBIA1300 con Kpnl y Sall para obtener el vector de expresión.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque la planta es una planta dicotiledónea o una planta monocotiledónea; la planta es preferiblemente arroz o *Arabidopsis thaliana*.

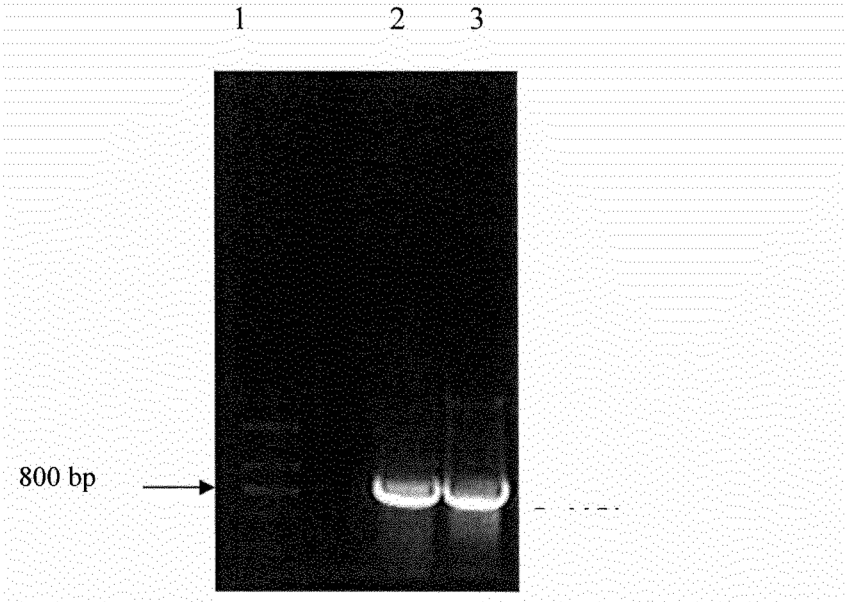


Figura 1

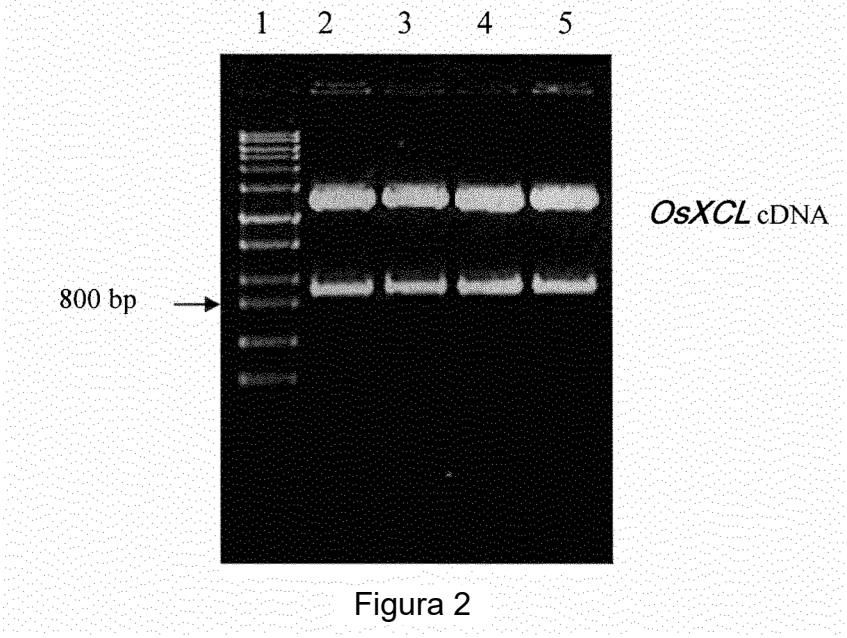


Figura 2

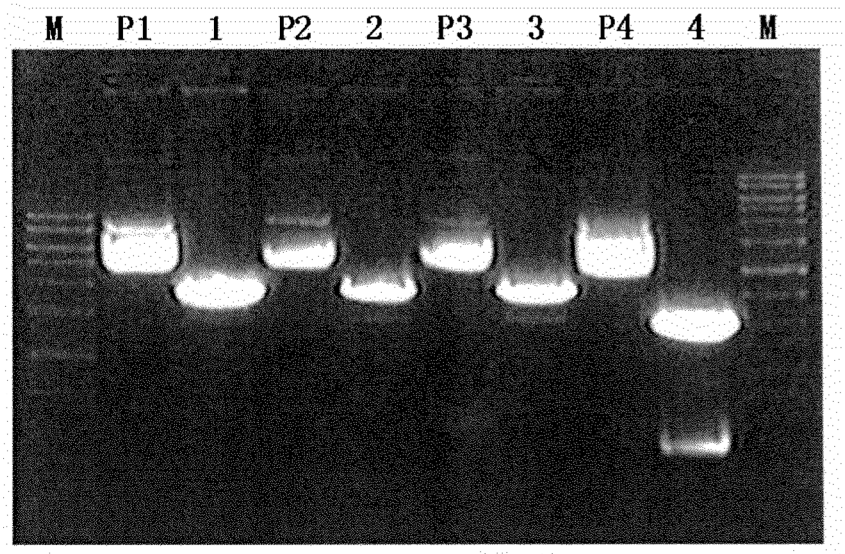


Figura 3

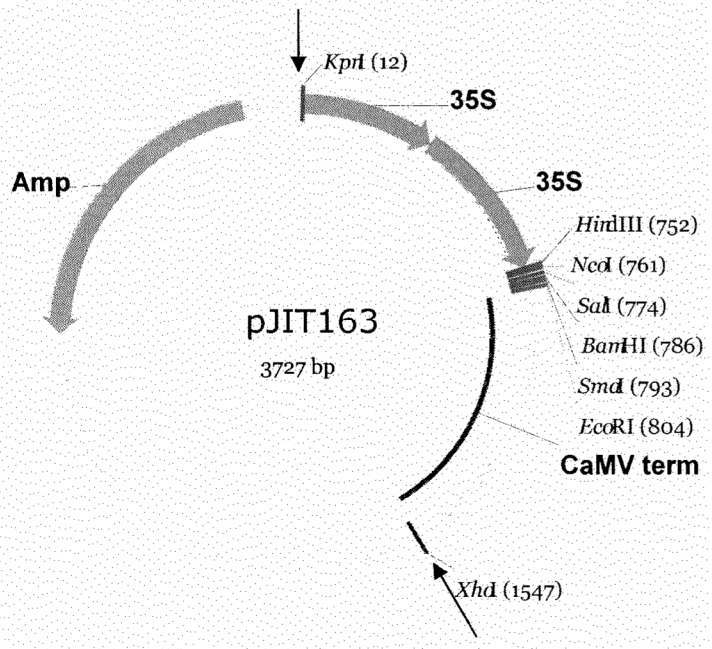


Figura 4

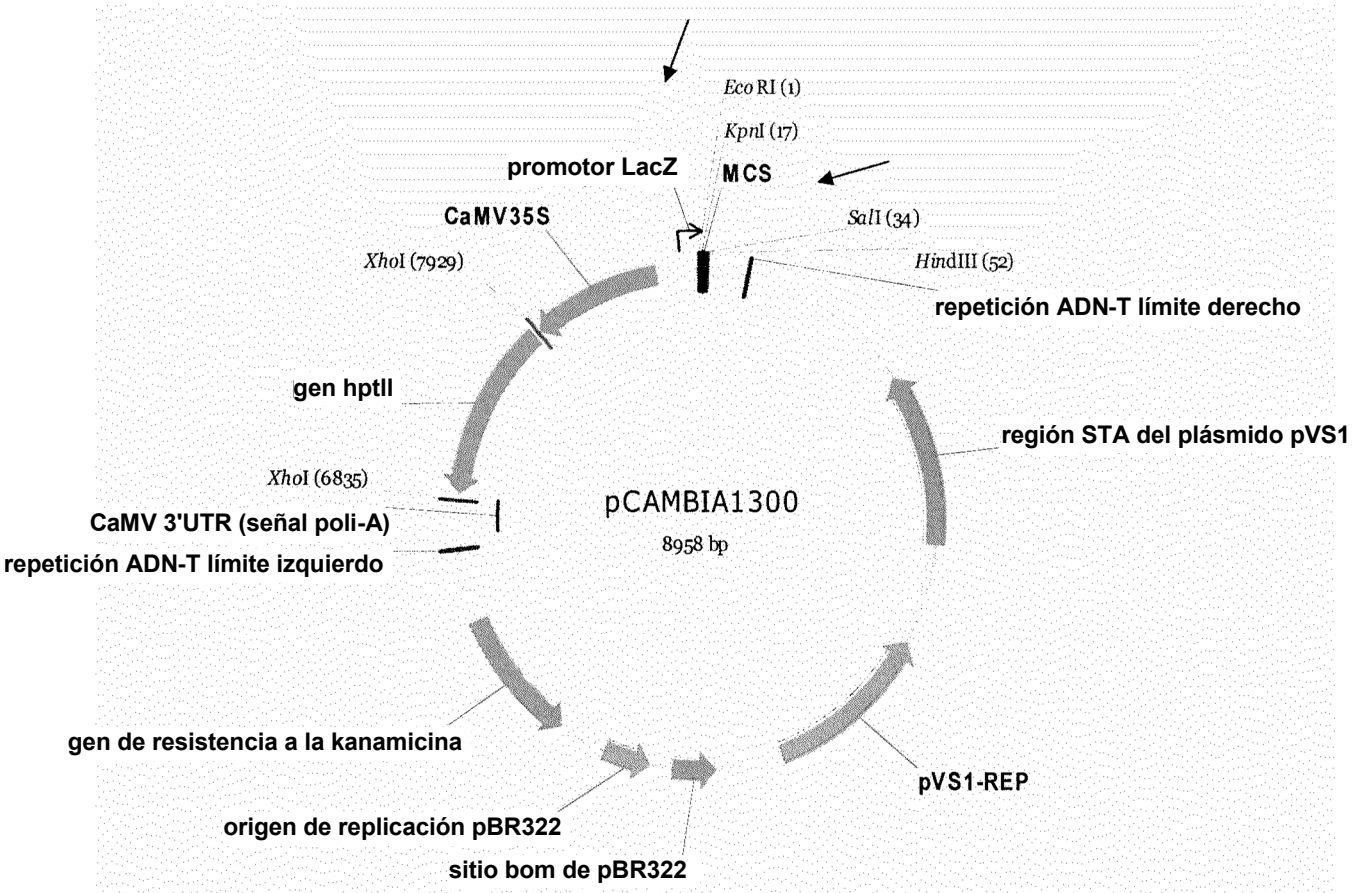


Figura 5

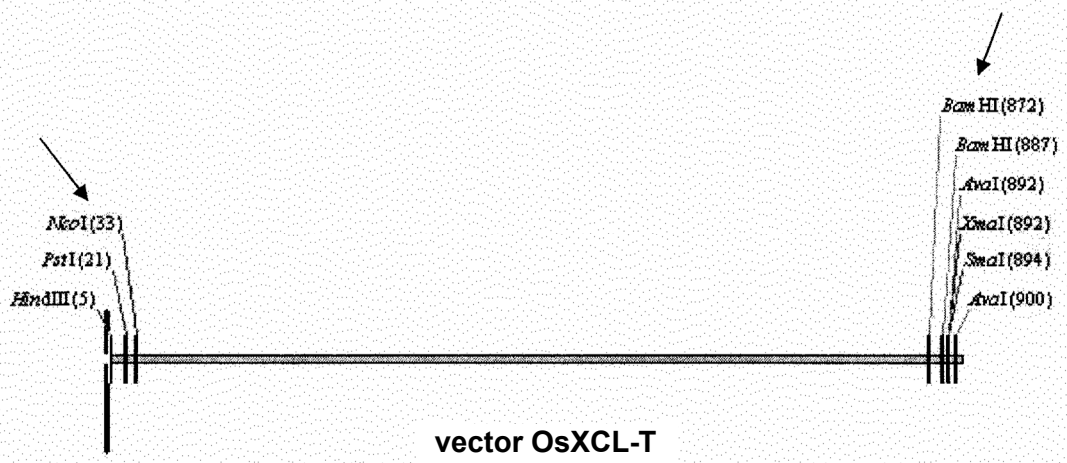


Figura 6

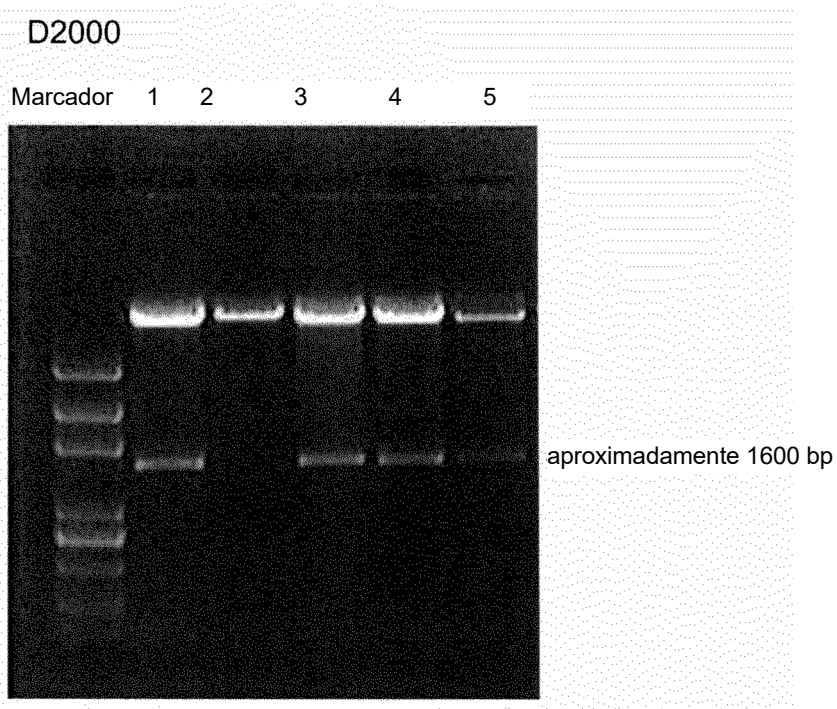


Figura 7

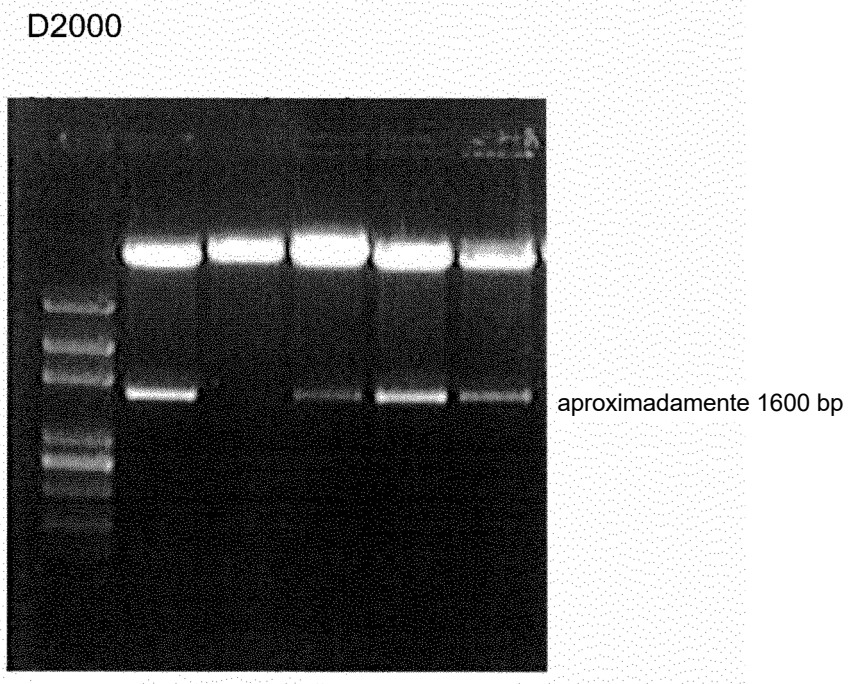


Figura 8

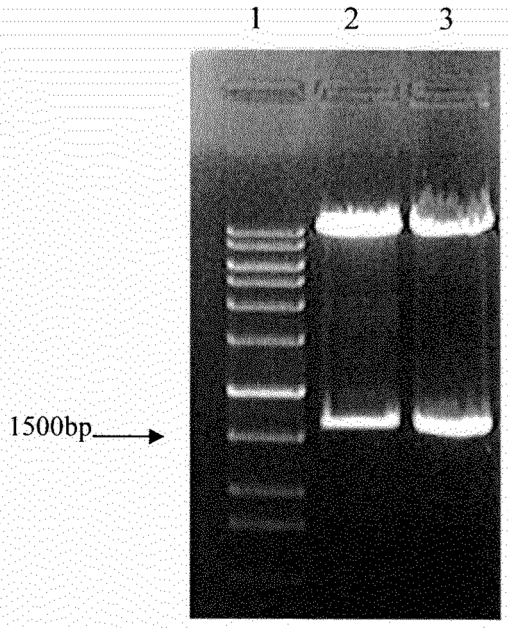


Figura 9

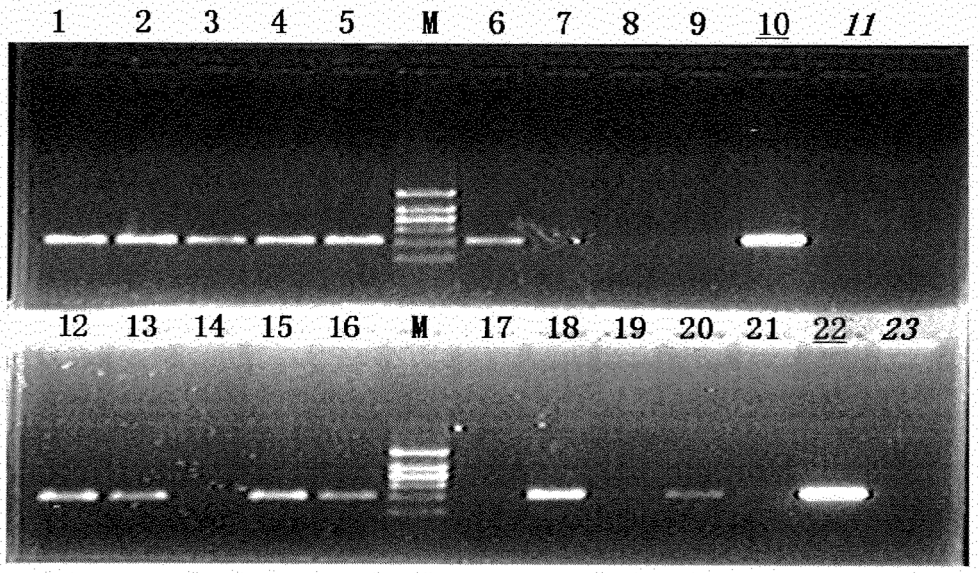


Figura 10

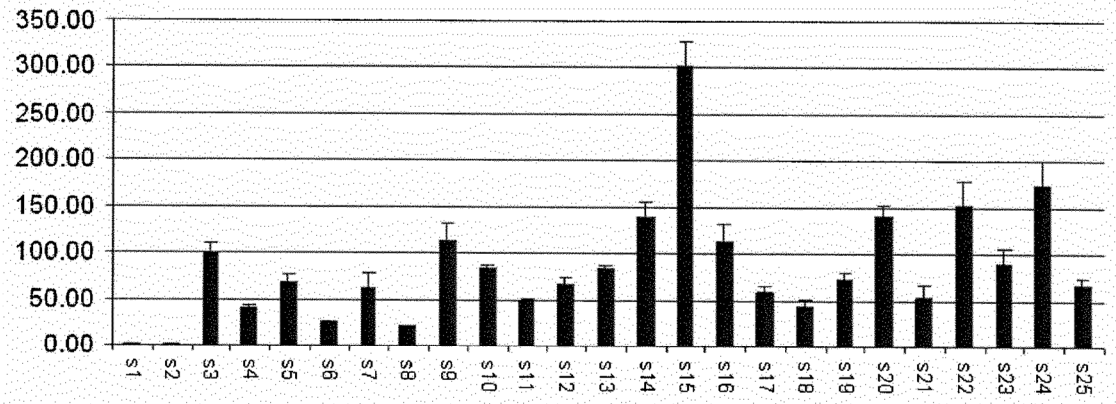


Figura 11

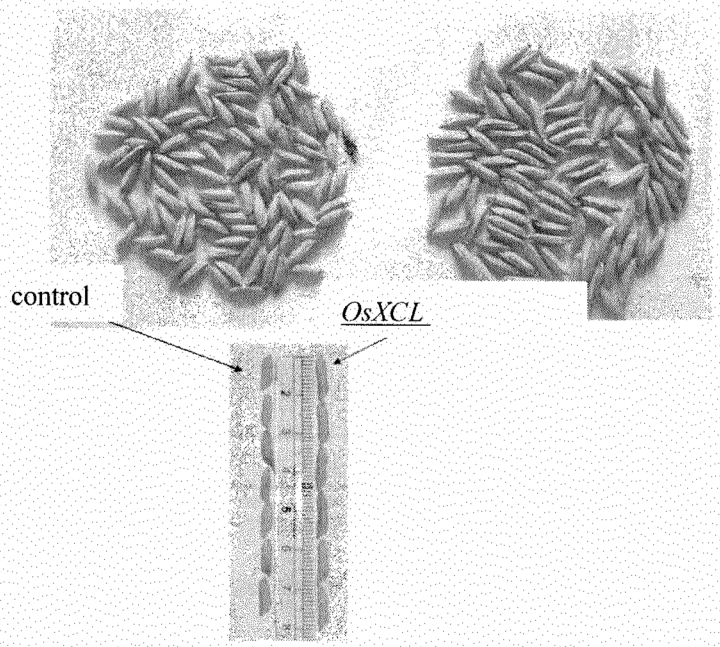


Figura 12

Figura 13

9311 transgénico *OsXCL* Control 9311 vector vacío

Figura 14

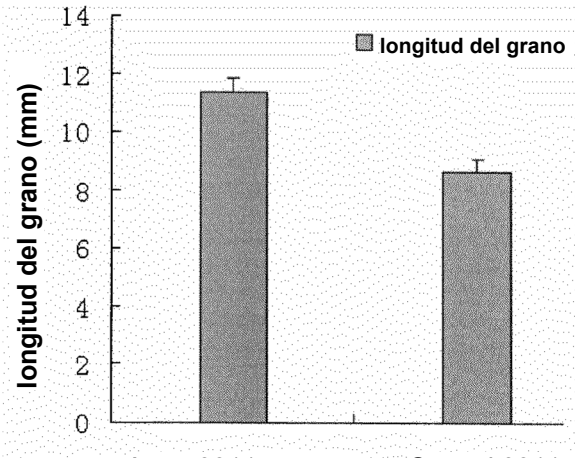
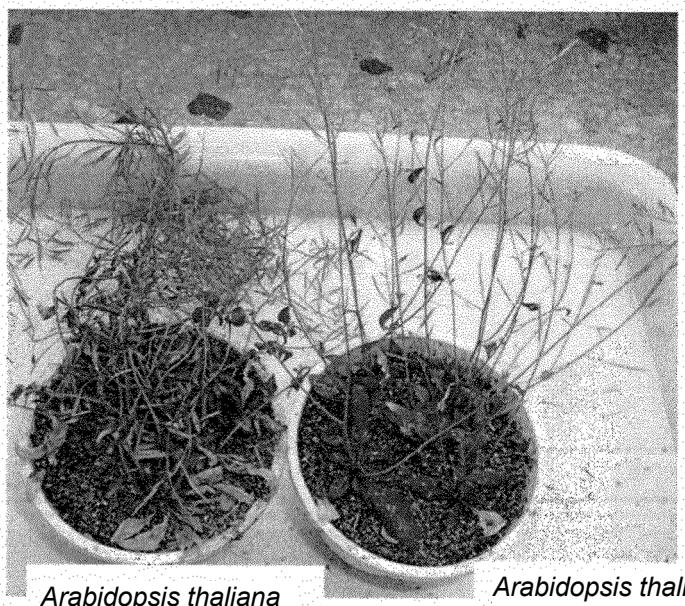


Figura 15



Arabidopsis thaliana transgénico *OsXCL*

Arabidopsis thaliana transformado con vector vacío

Figura 16