(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 738 868**

(21) Número de solicitud: 201830755

(51) Int. Cl.:

A01H 17/00 (2006.01)
A01H 6/20 (2008.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

25.07.2018

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

27.01.2020

(71) Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA (100.0%)
PATIO DE LAS ESCUELAS 1
37008 SALAMANCA ES

(72) Inventor/es:

NICOLAS RODRIGUEZ, Carlos;
MONTE VAZQUEZ, Enrique;
HERMOSA PRIETO, Rosa;
ALONSO RAMIREZ, Ana y
POVEDA ARIAS, Jorge

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

(54) Título: **Plantas transgénicas del género Brassica con capacidad de micorrización y que presentan un incremento en su productividad**

(57) Resumen:

Plantas transgénicas del género Brassica con capacidad de micorrización y que presentan un incremento en su productividad.

La presente invención se refiere a una planta transgénica, preferiblemente del género Brassica, que comprende en su genoma una secuencia fúngica, preferiblemente perteneciente al hongo Trichoderma harzianum, capaz de establecer simbiosis con hongos micorrícicos. Adicionalmente, las plantas transgénicas de la invención presentan un incremento en su biomasa y una mayor resistencia a estrés abiótico. La presente invención también proporciona métodos para aumentar la resistencia a estrés abiótico de plantas del género Brassica, así como métodos para la obtención de dichas plantas transgénicas con capacidad de establecer procesos de micorrización y resistencia a estrés abiótico y métodos para producir alimentos, piensos o un producto industrial utilizando una planta transgénica.

ES 2 738 868 A1

DESCRIPCIÓN

Plantas transgénicas del género *Brassica* con capacidad de micorrización y que presentan un incremento en su productividad.

La presente invención se engloba en el campo técnico de la biotecnología vegetal, y en concreto se refiere a una planta modificada genéticamente que adquiere la capacidad de establecer simbiosis con hongos micorrícicos, y que presenta un mayor incremento en su biomasa y rendimiento, además de una mayor resistencia a estrés abiótico, que las plantas silvestres control no modificadas genéticamente. Adicionalmente, la invención se refiere a su procedimiento de obtención, así como a métodos para producir alimentos, piensos o un producto industrial utilizando una planta transgénica.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las micorrizas son un tipo de asociación simbiótica entre hongos y raíces de plantas vasculares, que pueden transformarse en excelentes aliadas para los cultivos de cualquier tipo, ya que fomentan su rentabilidad, al propiciar el ahorro de recursos; permiten reducir el agua destinada para el riego y la fertilización; promueven la actividad biológica del suelo; y aumentan la productividad del cultivo; facilitan la protección frente a estreses abióticos y bióticos, con una potencial aplicación en el biocontrol de fitopatógenos y en fitorremediación, entre otras ventajas. Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) colonizan el tejido intrarradical de la planta hospedadora, donde desarrollan estructuras características de la simbiosis (arbúsculos y vesículas), así como micelio extraradical, el cuál interactúa con el ecosistema de la rizosfera y es el encargado de la absorción de nutrientes del suelo.

Aunque la gran mayoría de las plantas vasculares son capaces de formar simbiosis con hongos productores de micorriza, específicamente endomicorrizas, existe un 18% que no es capaz. Así, existen dos grupos de plantas no susceptibles a ser micorrizadas, dependiendo de sus adaptaciones a cada tipo de suelo. El primero de ellos son el grupo de las Brasicaceae, que incluye a las familias *Amaranthaceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Polygonaceae* y *Urticaceae*, caracterizadas por asentarse en suelos alterados, dónde la competencia con otras

plantas es baja y la disponibilidad de fósforo (P) en el suelo es alta, por lo tanto, carecen de un sistema radicular especializado para acceder al P disponible. La abundancia nutricional de estos suelos ha inducido una fuerza selectiva hacia la eliminación de la micorrización, al no ser necesaria. El otro grupo es el de las Proteaceae (avellano chileno y nuez de macadamia), dentro del cual se incluyen las familias *Cyperaceae, Haemodoraceae, Proteaceae* y *Restinaceae*, las cuales pueden vivir en suelos donde la disponibilidad de P es muy baja, para cuya asimilación desarrollan una gama de especialización radicular como raíces en racimo, dauciformes, o de unión a arena, no necesitando asociarse simbióticamente con hongos micorrícicos. Estos dos grupos representan una división ecológicamente significativa, ya que se encuentran en ambos extremos del espectro de fertilidad del suelo, en lo que a fósforo se refiere.

Centrándonos en el caso en particular de la familia Brasicaceae, cabe destacar que se han realizado diferentes estudios para determinar por qué se perdió esta simbiosis, y se ha llegado a la conclusión de que la presencia de micelio en los suelos en los que se desarrollan estas especies representaba una desventaja competitiva, ya que disminuye la ramificación y desarrollo radicular, además de que va agotando los niveles de fósforo; pero también es importante destacar que en suelos ricos en fósforo se suprime la formación de micorrizas. También es conocido que la ausencia de micorrización de las plantas de la familia Brassicaceae por hongos micorrícicos no se llega a producir debido a la producción de glucosinolatos, por parte de dichas plantas, como estrategia de protección frente al ataque de hongos patógenos y bacterias. La acción tóxica de los glucosinolatos es el resultado de la actividad mirosinasa que los convierte a isotiocianatos. La producción de isotiocianatos supone una estrategia principal de defensa.

Entre las plantas de la familia Brassicaceae destacan los cultivos de colza (*Brassica napus*), coliflor (*Brassica oleracea var. Botrytis*) o mostaza (*Brassica nigra*) y la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Particularmente, la colza es una especie oleaginosa que posee un alto porcentaje de aceite de excelente calidad y un residuo de extracción de alto nivel proteico. Actualmente, se trata de la planta oleaginosa más cultivada dentro de la Unión Europea. A nivel mundial, los mayores productores son Canadá, China e India. El cultivo de la colza retoma una importancia considerable debido al incremento de la demanda por la industria del biodiesel así como por el precio del mismo. El aceite

de colza resulta una materia prima de interés para esta industria, lo cual ha provocado el aumento de la superficie sembrada de esta oleaginosa. Además, la colza se emplea para la obtención de aceite para consumo humano, harina y forraje. Su incorporación en los sistemas de producción presenta numerosas ventajas para el productor y para la industria.

Dada la importancia de los cultivos de la familia Brassicaceae, existe en el estado de la técnica la necesidad de mejorar su producción, buscando que ésta sea cada vez mayor o que se necesite menos recursos para mantenerla. Otro aspecto a mejorar para inducir un mayor rendimiento de estos cultivos es la obtención de plantas que muestren una mayor resistencia a estreses abióticos, así como una producción de aceite con una composición adecuada, específicamente que presenten una menor concentración de glucosinolatos tóxicos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al uso de una secuencia nucleotídica fúngica, que procede del hongo *Trichoderma harzianum,* para inducir en plantas, en las que no se da de forma natural, la capacidad de establecer simbiosis con hongos (micorrización). Específicamente la presente invención se refiere al uso de la secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 1 y que procede del hongo *T. harzianum,* con número de acceso a la base de datos GenBank EU399786.1 para la inducción de micorrización, preferiblemente en plantas del género *Brassica* y más preferiblemente en plantas que se seleccionan de la lista que consiste en: *B. napus*, *B. oleraceae*, *B. nigra* y *B. rapa*, más preferiblemente la planta de la especie *B. napus*.

La SEQ ID NO: 1 es la secuencia nucleotídica del gen *ThKel1* del hongo *T. harzianum* que codifica la proteína ThKEL1 que comprende la SEQ ID NO: 2, con número de acceso a la base de Datos UniProtKB: D3TI85. Dicha proteína ThKEL1 presenta dominios kelch, ampliamente distribuidos en proteínas de origen vírico, bacteriano y eucariota. En el contexto de la presente invención, *ThKel1* se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 2 , y que comprendería diversas variantes procedentes de: a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2 , b) moléculas de ácido

nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a), c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético, d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% con la SEQ ID NO: 2 , y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína ThKEL1. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia SEQ ID NO: 1.

Tal y como se muestra en el presente documento, el uso de la SEQ ID NO: 1 para la obtención de plantas modificadas genéticamente (transgénicas) con capacidad de establecer simbiosis en presencia de hongos (micorrización) (**FIGs. 1 y 2**), induce un incremento en el rendimiento de dichas plantas transgénicas (**FIG. 6**) observándose un incremento significativo en la producción de semillas (**FIG. 4**), que además muestran un mayor peso (**FIG. 5**) y una mayor producción de silicuas por rama (**FIG. 3**), respecto de las semillas producidas por plantas silvestres control. Adicionalmente, las plantas transgénicas de la presente invención son más resistentes a diferentes tipos de estrés abiótico, como por ejemplo estrés salino (**FIG. 7**) o sequía (**FIGs. 8 a 12**).

Otra de las ventajas del uso de la SEQ ID NO: 1 para la obtención de plantas transgénicas, con las capacidades mencionadas anteriormente es que dichas plantas presentan una disminución significativa en la cantidad de glucosinolatos que sintetizan (**FIG. 13**), y en sus productos de hidrólisis (**FIG. 14**), así como una menor presencia de glucosinolatos alifáticos en el aceite obtenido a partir de las semillas de las plantas transgénicas de la invención (**FIG. 15**), y un mayor contenido en compuestos de interés nutricional (**FIG. 16**), respecto de las plantas silvestres control.

Así, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de la SEQ ID NO: 1 en la inducción de un proceso micorrización, preferiblemente en plantas de la familia *Brassicaceae*, más específicamente en plantas del género *Brassica,* más preferiblemente en plantas que se seleccionan de la lista que consiste en: *B. napus*, *B. oleraceae*, *B. nigra* y *B. rapa*, y más preferiblemente aún en plantas de la especie *B. napus*.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la SEQ ID NO: 1 en la

producción de plantas modificadas genéticamente (plantas transgénicas).

El término "molécula de ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" como se usa en el presente documento se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bicatenaria. Los términos "molécula de ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" también pueden usarse indistintamente con gen, ADNc y ARNm codificados por un gen. El término "gen" se usa ampliamente para referirse a cualquier segmento de ADN asociado con una función biológica. Por lo tanto, los genes incluyen secuencias codificantes y/o las secuencias reguladoras requeridas para su expresión. Los genes también incluyen segmentos de ADN no expresados que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento para otras proteínas. Los genes se pueden obtener a partir de una variedad de fuentes, incluida la clonación a partir de una fuente de interés o la síntesis a partir de información de secuencia conocida o predicha, y pueden incluir secuencias diseñadas para tener los parámetros deseados.

Otro aspecto descrito en la presente invención se refiere a las plantas transgénicas (a partir de aquí planta transgénica de la invención), o al material reproductor o de propagación para una planta transgénica (a partir de aquí material reproductor o de propagación de la invención), o a una célula vegetal transgénica cultivada (a partir de aquí célula vegetal transgénica de la invención), que comprenden en su genoma una secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 1.

El término "planta" como se usa en el presente documento incluye plantas enteras, cualquier material reproductor o de propagación para una planta, progenie de las plantas y partes de plantas, que incluyen semillas, silicuas, frutos, hojas, flores, brotes, tallos, raíces, células de plantas aisladas, tejidos y órganos. Las referencias a una planta también pueden incluir células vegetales, protoplastos vegetales, cultivos de tejidos vegetales, callos vegetales, acúmulos vegetales y células vegetales que están intactas en plantas o partes de plantas, tales como embriones, polen, óvulos, semillas, hojas, flores, ramas, frutos, granos, espigas, mazorcas, cáscaras, tallos, raíces, puntas de raíces y similares. La descendencia, las variantes y los mutantes de cualquiera de las plantas transgénicas descritas en este documento se encuentran dentro del alcance de la presente invención. También se incluyen las semillas de cualquiera de dichas plantas transgénicas.

El término "célula vegetal" como se usa en el presente documento incluye células vegetales que se derivan y/o se aíslan del tejido de células vegetales o del cultivo de células de plantas. Como se usa en el presente documento, el término "partes de una planta" incluye cualquier parte o partes de una planta que incluye las semillas, silicuas, frutos, hojas, flores, brotes, tallos y / o raíces.

Los términos "transformado", "transgénico" y "recombinante" se refieren a un organismo hospedador tal como una célula vegetal, planta o parte de planta en la que se ha introducido una molécula exógena de ácido nucleico. La molécula de ácido nucleico puede integrarse de forma estable en el genoma del huésped o la molécula de ácido nucleico puede estar presente como una molécula extracromosómica. Se entiende que las células de plantas transformadas, plantas o partes de plantas abarcan no solo el producto final de un proceso de transformación, sino también la progenie transgénica del mismo.

Un huésped "no transformado", "no transgénico" o "no recombinante" se refiere a un organismo de tipo silvestre, por ejemplo, una célula vegetal, planta o parte de planta que no contiene la molécula de ácido nucleico exógena.

El término "exógeno" cuando se usa en el presente documento se refiere a una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de ADN), gen o proteína, que se origina de una fuente extraña a la célula, planta o parte de planta particular en la que es introducido. La molécula de ácido nucleico exógeno se puede introducir en la planta de una manera estable o transitoria, para producir una molécula de ARN y/o una molécula de polipéptido. Una molécula, gen o proteína de ácido nucleico "endógeno" es una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de ADN), gen o proteína asociada de forma natural con, o nativa de, una célula vegetal, planta o parte de planta particular.

A efectos de la presente invención, el término "Planta modificada genéticamente" (planta transgénica) se refiere, a plantas cuyo material genético ha sido modificado deliberadamente con el fin de que expresen la proteína codificada por el gen *ThKel1*. Específicamente, las plantas transgénicas de la invención se han modificado por ingeniería genética para que presenten una expresión aumentada del gen *ThKel1*

descrito en el presente documento. A efectos de la presente invención, la célula vegetal de una planta transgénica comprende el polinucleótido de la presente invención. El término "planta transgénica" incluye plantas enteras, partes de plantas (tallos, raíces, hojas, frutos, etc.) u órganos, células vegetales, semillas y progenie de las mismas. Una planta transformada puede ser un transfectante directo, lo que significa que la construcción de ADN se introdujo directamente en la planta, tal como a través de *Agrobacterium* u otros métodos, o la planta puede ser la progenie de una planta transfectada. La segunda planta de generación o posterior puede producirse por reproducción sexual, es decir, fertilización. Además, la planta puede ser un gametofito (etapa haploide) o un esporófito (etapa diploide).

El término "planta correspondiente no modificada genéticamente" (planta silvestre, o planta silvestre control) se refiere en la presente invención a plantas cuyo material genético no ha sido modificado para que presente una expresión aumentada del gen *ThKel1* descrito en el presente documento. De la misma manera dicha definición se aplica a una célula control. En una realización, un ejemplo de una planta de control o célula huésped de control es uno que es de tipo silvestre. En una realización, un ejemplo de una planta de control o célula huésped de control es uno que no es de tipo silvestre (por ejemplo, es transgénico para algún otro tipo de región de codificación) pero no ha sido diseñado para tener expresión aumentada de la proteína codificada por el gen *ThKel1*, descrito en el presente documento.

A efectos de la presente invención, el término “material reproductor o de propagación” se refiere a cualquier material capaz de dar lugar a una planta completa o a partes de la misma. Dichos materiales se obtienen mediante métodos de reproducción vegetativa (por ejemplo, capas de aire o tierra, división, injerto, micropropagación, estolones o corredores, órganos de almacenamiento como bulbos, cormos, tubérculos y rizomas, golpear o cortar, gemelar), reproducción sexual (cruce con otra planta) y reproducción asexual (p. ej., apomixis, hibridación somática).

A efectos de la presente invención las plantas transgénicas, el material reproductor o de propagación, o la célula vegetal, modificadas genéticamente, tal y como se describen en el presente documento, pertenecen preferiblemente a la familia *Brassicaceae*, más preferentemente, género *Brassica,* más preferentemente aún a las especies que se seleccionan de la lista que consiste en: *B. napus*, *B. oleracea*, *B. rapa*

y B. nigra, y más preferiblemente aún, la especie *B. napus.*

En una realización preferida, las plantas transgénicas, el material reproductor o de propagación, o la célula vegetal de la presente invención pueden comprender en su genoma más de una copia de la SEQ ID NO: 1.

En otra realización preferida, las plantas transgénicas, el material reproductor o de propagación, o la célula vegetal, presentan capacidad de establecer procesos de micorrización, y una mayor tolerancia a estrés abiótico respecto de las plantas silvestres control.

A efectos de la presente invención, el término estrés abiótico se refiere al daño producido por salinidad, sequía y carencias nutricionales.

En otra realización preferida, las plantas transgénicas, el material reproductor o de propagación, o la célula vegetal, de la invención, muestran un incremento en su biomasa y rendimiento, respecto de las plantas silvestres control.

El término "biomasa", "biomasa de una planta" o "biomasa vegetal" como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad de un tejido producido por una planta. Un aumento en la biomasa de la planta puede ser en la planta completa o en partes de la misma, tales como partes aéreas (cosechables), semillas, silicuas, frutas, hojas, flores, tallos y/o raíces. La biomasa de la planta se puede medir, por ejemplo, por peso fresco y/o peso seco.

El término "aumentar la biomasa" o “incremento de la biomasa”, como se usa en el presente documento significa que la planta o partes de la misma han aumentado en tamaño, altura y/o masa en comparación con una planta nativa o silvestre (es decir, una planta no transformada con el ácido nucleico exógeno descrito aquí) o en comparación con un estándar predeterminado.

El término "incremento en la producción de semillas" como se usa en el presente documento se refiere a aumentar el número de semillas por planta, el número de silicuas por planta, el número de flores por planta y/o el número de semillas por silicua en comparación con una planta silvestre o control, o en comparación con un estándar

predeterminado. El término también se refiere al aumento del tamaño de la semilla y/o la longitud de la semilla en comparación con una planta silvestre o control, o en comparación con un estándar predeterminado.

En otra realización preferida, las plantas transgénicas, el material reproductor o de propagación, o la célula vegetal, de la invención, muestran un incremento en la producción de aceite de sus semillas, respecto al de las plantas silvestres control.

El término "incremento en la producción de aceite" como se usa en la presente memoria se refiere a aumentar el contenido de aceite de una planta, el contenido de aceite de las semillas de una planta y/o el contenido de aceite por semilla en comparación con una planta silvestre control, o en comparación con un estándar predeterminado.

El término “incrementar”, “aumentar” o “mejorar”, como se usa en la presente memoria se refiere a al menos un aumento del 2, 5, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 y 100%, en biomasa, producción de semillas y/o producción de aceite en comparación con una planta silvestre control o un estándar predeterminado.

En otra realización preferida de la invención, las plantas transgénicas, el material reproductor o de propagación, o la célula vegetal, de la invención, muestran una disminución en la síntesis de glucosinolatos, preferiblemente alifáticos, respeto al de una planta silvestre control.

El término “reducir” o “disminuir”, como se usa en la presente memoria se refiere a al menos un descenso del 2, 5, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 y 100%, en la concentración de glucosinolatos de una planta transgénica de la invención respecto de una planta silvestre control o un estándar predeterminado.

Los glucosinolatos son glucósidos nitrogenados y sulfurados que están presentes en algunas plantas de forma natural, como resultado de su metabolismo secundario. Son compuestos inocuos, pero cuando la planta es atacada, enzimas como la mirosinasa entran en contacto con ellos, generando glucosa, ácido sulfúrico y compuestos tóxicos como isotiocianatos, epitionitrilos, nitrilos simpes o tiocianatos. La función defensiva del sistema glucosinolato-mirosinasa principalmente se ha atribuido a la toxicidad de

los isotiocianatos.

Otro aspecto de la presente invención, tal y como se ha descrito anteriormente en el presente documento, se refiere a una célula, silicua, semilla, progenie o parte de una planta, preferiblemente seleccionada de entre una hoja, un tallo, una flor, un ovario, un fruto o un callo, obtenida a partir de la planta transgénica de la presente invención, y que se caracterizan porque comprenden la SEQ ID NO: 1.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para incrementar la biomasa y rendimiento, la producción de semillas y/o la producción de aceite de una planta silvestre, preferiblemente perteneciente a la familia *Brassicaceae*, más preferiblemente al género *Brassica* y más preferiblemente a las especies que se seleccionan de la lista que consiste en: *B. napus*, *B. oleraceae*, *B. nigra* y *B. rapa*, más preferiblemente aún a la especie *B. napus*, que comprende:

(a) transformar dicha planta con un vector de expresión que comprende secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1, y
(b) expresar la molécula de ácido nucleico transformada en dicha planta.

Como se usa en el presente documento, el término "transformación" o “transformar” se refiere a un proceso para introducir ácidos nucleicos exógenos en una célula de una planta o parte de la planta. Se conocen distintas técnicas para introducir polinucleótidos en plantas. En una realización de la presente invención, las plantas se "transforman de forma estable" con un polinucleótido o construcción de ADN que lo comprende, es decir, el polinucleótido o construcción de ADN introducido en la célula vegetal se integra en el genoma de la planta y tiene capacidad hereditaria por la descendencia de la misma. Los protocolos de transformación para introducir polinucleótidos o construcciones de ADN en las células de plantas pueden variar dependiendo del tipo de planta en cuestión. Los métodos de transformación adecuados incluyen, aunque sin limitación, microinyección, electroporación, transformación mediada por *Agrobacterium* y aceleración de partículas balísticas. En la técnica también se conocen métodos para la inserción dirigida de un polinucleótido o construcción de ADN en una ubicación específica en el genoma de la planta utilizando sistemas de recombinación específica de sitio. A través de la aplicación de técnicas tales como estas, pueden transformarse de forma estable las células de casi cualquier especie. En el caso de especies multicelulares, las células transgénicas

pueden regenerarse en organismos transgénicos.

El procedimiento más ampliamente utilizado para introducir un vector de expresión en plantas se basa en el sistema de transformación natural de *Agrobacterium*. *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* son bacterias del suelo patógenas de plantas que transforman genéticamente células vegetales.

Numerosos vectores de transformación disponibles para la transformación de plantas son conocidos por los expertos en la técnica, y las moléculas de ácido nucleico pertinentes para esta descripción se pueden usar junto con cualquiera de dichos vectores. La selección del vector dependerá de la técnica de transformación preferida y de la especie objetivo para la transformación.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la producción de plantas transgénicas según se describen en la presente invención, donde dicho método comprende:

(a) transformar una planta silvestre con un vector de expresión que comprende secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1, y
(b) expresar la molécula de ácido nucleico transformada en dicha planta.

Alternativamente, la presente invención también se refiere al uso de la SEQ ID NO: 1 para incrementar la biomasa y rendimiento, la producción de semillas y/o la producción de aceite de una planta, preferiblemente perteneciente a la familia *Brassicaceae*, más preferiblemente al género *Brassica* y más preferiblemente aún a las especies que se seleccionan de la lista que consiste en: *B. napus, B. oleraceae, B. nigra* y *B. rapa*, más preferiblemente aún a la especie *B. napus.*

Otra realización preferida se refiere al uso de las plantas transgénicas de la invención para la producción de alimentos, piensos o un producto industrial.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la producción de alimentos, piensos o un producto industrial que comprende:

(a) la obtención de la planta transgénica o de una parte de ella, según se describe en la presente invención, y
(b) preparar el alimento, pienso o producto industrial a partir de la planta o partes

de ella.

En una realización preferida del uso o método para la producción de alimento, pienso o producto industrial, descrito anteriormente, el alimento o pienso es preferiblemente aceite, preferiblemente aceite de colza, sémola, grano, almidón, harina o proteína. En otra realización preferida, el producto industrial es biocombustible, fibra, productos químicos industriales, un producto farmacéutico o un nutracéutico.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la producción de aceite, preferiblemente aceite de colza que comprende:

(a) obtener las semillas transgénicas según se describe en el presente documento,
(b) triturarlas, y
(c) extraer el aceite de las mismas.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Distintas raíces de colza transformadas con el gen *Thkel1* de *T. harzianum* micorrizadas con diferentes hongos de la especie *Glomus* spp. (A) *G. mosseae;* (B) *G. microagreatum;* (C) *G. etunicatum;* (D) *G. intraradices*. La tinción del hongo se realizó con el método de la ‘tinta china’. Las flechas señalan las vesículas formadas por la colonización del hongo.

FIG. 2. Cuantificación de la micorrización de plantas de colza con *Glomus* spp. mediante PCR a tiempo real. Control (tipo silvestre) y plantas de colza transgénicas que comprenden una copia (KEL1) o dos copias (KEL2) del gen *ThKel1* (SEQ ID NO: 1). En el eje de ordenadas se representa la cuantificación del hongo mediante la relación entre la cantidad de DNA en µg del mismo por cada 100 mg de tejido de planta.

FIG. 3. Número de silicuas por rama en colza control y colza transgénica *Thkel1*

con micorrizas. Se muestra tanto el número de silicuas por rama totalmente desarrolladas, como las abortadas que no llegaron a formarse. Las barras representan desviaciones estándar de los valores medios de todas las ramas. El asterisco indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las líneas transgénicas y el control.

FIG. 4. Número de semillas por silicua en plantas de colza control y plantas de colza transgénica *Thkel1* con micorrizas. En el eje de ordenadas se indica el número de semillas por silicua. Las barras representan desviaciones estándar de los valores medios de todas las silicuas. El asterisco indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las líneas transgénicas y el control.

FIG. 5. Peso por semilla en plantas de colza control (C) y plantas de colza transgénicas *Thkel1* (K) con micorrizas (G) o sin micorrizas. Las barras representan desviaciones estándar de los valores medios de todas las semillas. El asterisco indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las líneas transgénicas y el control.

FIG. 6. Productividad en plantas de colza control (C) y plantas de colza transgénica *Thkel1* (K) con micorrizas (G) o sin micorrizas. Las barras representan desviaciones estándar. El asterisco indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las líneas transgénicas y el control.

FIG. 7. Silicuas por planta y porcentaje de silicuas abortadas, bajo condiciones de estrés salino. Plantas de colza control y plantas de colza transgénicas (KEL) (+G, plantas tratadas con hongos *Glomus* spp.). Las barras representan desviaciones estándar. El asterisco indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las líneas transgénicas y el control. KEL1: plantas de colza transgénicas transformadas con una copia del gen *ThKel1* (SEQ ID NO: 1). KEL2: plantas de colza transgénicas transformadas con dos copias del gen *ThKel1* (SEQ ID NO: 1).

FIG. 8. Silicuas por planta y porcentaje de silicuas abortadas, bajo condiciones de estrés por sequía. Plantas de colza control y plantas de colza transgénicas (KEL) (+G, plantas tratadas con hongos *Glomus* spp.). Las barras representan desviaciones estándar. El asterisco indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las líneas transgénicas y el control. KEL1: plantas de colza transgénicas transformadas con una copia del gen *ThKel1* (SEQ ID NO: 1). KEL2: plantas de colza transgénicas transformadas con dos copias del gen *ThKel1* (SEQ ID NO: 1).

FIG. 9. Semillas por silicua bajo condiciones de estrés por sequía. Plantas de colza control y plantas de colza transgénicas (KEL) (+G, plantas tratadas con hongos *Glomus* spp.). Las barras representan desviaciones estándar. El asterisco indica

diferencias significativas (p ≤ 0,05) entre las líneas transgénicas y el control. KEL1: plantas de colza transgénicas transformadas con una copia del gen *ThKel1* (SEQ ID NO: 1). KEL2: plantas de colza transgénicas transformadas con dos copias del gen *ThKel1* (SEQ ID NO: 1).

FIG. 10. Semillas por planta bajo condiciones de estrés por sequía. Plantas de colza control y plantas de colza transgénicas (KEL) (+G, plantas tratadas con hongos *Glomus* spp.). Las barras representan desviaciones estándar. El asterisco indica diferencias significativas (p ≤ 0,05) entre las líneas transgénicas y el control. KEL1: plantas de colza transgénicas transformadas con una copia del gen *ThKel1* (SEQ ID NO: 1). KEL2: plantas de colza transgénicas transformadas con dos copias del gen *ThKel1* (SEQ ID NO: 1).

FIG. 11. Peso por semilla bajo condiciones de estrés por sequía. Plantas de colza control y plantas de colza transgénicas (KEL) (+G, plantas tratadas con hongos *Glomus* spp.). Las barras representan desviaciones estándar. El asterisco indica diferencias significativas (p ≤ 0,05) entre las líneas transgénicas y el control. KEL1: plantas de colza transgénicas transformadas con una copia del gen *ThKel1* (SEQ ID NO: 1). KEL2: plantas de colza transgénicas transformadas con dos copias del gen *ThKel1* (SEQ ID NO: 1).

FIG. 12. Productividad bajo condiciones de estrés por sequía. Plantas de colza control y plantas de colza transgénicas (KEL) (+G, plantas tratadas con hongos *Glomus* spp.). Las barras representan desviaciones estándar. El asterisco indica diferencias significativas (p ≤ 0,05) entre las líneas transgénicas y el control. KEL1: plantas de colza transgénicas transformadas con una copia del gen *ThKel1* (SEQ ID NO: 1). KEL2: plantas de colza transgénicas transformadas con dos copias del gen *ThKel1* (SEQ ID NO: 1).

FIG. 13. Determinación de los glucosinolatos (A) 4-methoxyl-I3M (4-methoxyl-indol-3-metilo), (B) 1-methoxy-I3M (1-methoxy-indol-3-metilo) y (C) 4-hydroxy-I3M (4-hydroxy-indol-3-metilo), en plantas de colza de tipo silvestre (C) y transgénicas (Kel2) sin tratamiento de micorrizas y tras tres semanas de tratamiento con micorrizas *Glomus* spp. (+G). Las barras representan desviaciones estándar. El asterisco indica diferencias significativas (p ≤ 0,05) entre las líneas transgénicas y el control. Los resultados muestran el área normalizada del pico/mg de tejido.

FIG. 14. Determinación de los productos de hidrólisis de los glucosinolatos (A) 1-MeO-IGL (1-methoxy-indol-3-metilo) y (B) 4-MeO-IGL (4-methoxyl-indol-3-

metilo), en plantas de colza de tipo silvestre (C) y transgénicas (Kel2) sin tratamiento de micorrizas y tras tres semanas de tratamiento con micorrizas *Glomus* spp. (+G). Las barras representan desviaciones estándar. El asterisco indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las líneas transgénicas y el control. Los resultados muestran el área normalizada el pico/mg de tejido.

FIG. 15. Cuantificación de los niveles de glucosinolatos (4-MTB) (4-metiltio-3-butenil), (B) 5-MTP (5-metiltiopentil) y (C) 4-MeO-I3M (4-methoxyl-indol-3-metilo) en los aceites de las semillas de colza. C: plantas de colza de tipo silvestre; Kel: plantas de colza transgénicas; +G: plantas de colza silvestres o transgénicas en contacto con *Glomus* spp. Los valores se agruparon según diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$) mediante el test de Tukey, en forma de letras mayúsculas sobre las columnas.

FIG. 16. Cuantificación de los niveles de los lípidos (A) ácido octadecatrienoico y (B) glicerofosfocolina en los aceites de las semillas de plantas de colza. C: plantas de colza de tipo silvestre; Kel: plantas de colza transgénicas; +G: plantas de colza silvestres o transgénicas en contacto con *Glomus* spp. Los valores se agruparon según diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) mediante el test de Tukey, en forma de letras mayúsculas sobre las columnas.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO.

Las semillas empleadas pertenecen a la especie *B. napus* variedad de primavera Jura.

Para los ensayos de micorrización se ha empleado un formulado a base de los hongos micorrícicos *Glomus* spp. específicamente *G. mosseae, G. microagreatum, G. etunicatum, G. intraradices y G. claroideum* denominado MIRATEXT-02 (Mirat S.A., Salamanca, España).

Ejemplo 1. Obtención de las plantas de colza transgénica *Thk1* de la invención.

Clonación por tecnología Gateway

Esta tecnología permite introducir un inserto de interés en un vector sin tener que cortar con enzimas de restricción y ligar. En primer lugar, se realiza el diseño de los oligonucleótidos para amplificar el fragmento a clonar introduciendo los sitios de recombinación attB1 (GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGC - SEQ ID NO: 3) en el extremo 5' y attB2 (GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC - SEQ ID NO: 4) en el extremo 3'. Una vez realizada la PCR, se introduce el fragmento obtenido en el plásmido pDONOR201 por la Gateway BP Clonase II Enzime mix (Invitrogen) (introduce segmentos de ADN con sitios attB en un vector donante con sitios attP), por recombinación, incubando la mezcla toda la noche a 25ºC, pasando a denominarse el plásmido pENTR201. La reacción se para añadiendo proteinasa K (digiere la keratina) durante 10 min a 37ºC.

Posteriormente, se hizo la transformación de las células competentes DH5α con la mezcla de recombinación, por electroporación. Para ello, se colocó una alícuota de las células DH5α junto con la mezcla en una cubeta (de 0,1 cm de ancho), y se puso en el electroporador (1,8 kV, 1 kW y 25 µF). Tras ello, las bacterias recuperadas de la cubeta se pasaron a medio LB, donde se incubaron a 37ºC en agitación a 250 rpm durante 1 hora, para que se regenerasen. Pasado ese tiempo, se sembraron en placas con medio LB suplementado con kanamicina, manteniendo las placas a 37ºC toda la noche. De las colonias que crecieron, se seleccionaron algunas de ellas, con las que se inocularon medios líquidos de LB suplementados con el mismo antibiótico, y se mantuvieron 24 h en agitación (250 rpm) y a 37ºC para su multiplicación.

La extracción del ADN plasmídico se realizó con el kit NucleospinPlasmid (Macherery-Nagel), siguiendo las instrucciones del suministrador. Este método está basado en la utilización de columnas diseñadas para la extraer ADN plasmídico purificado. Posteriormente, se determinó la concentración del ADN en el Nanodrop y se visualizaron en un gel de agarosa.

Los ADN plasmídicos se enviaron a secuenciar, utilizando los oligos Seq-Gate.L1.F (TCGCGTTAACGCTAGCATGCATGGATCTC – SEQ ID NO: 5) y Seq-Gate.L2.R

(GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC – SEQ ID NO: 6) diseñados para los sitios de recombinación attL1 y attL2 que se generan en el vector pENTR201 y que flanquean la secuencia de ADN introducida.

Una vez comprobada la secuencia del plásmido pENTR201, se procedió a introducirlo en un plásmido DESTINITY (con el borde derecho e izquierdo de *Agrobacterium tumefaciens*). El plásmido utilizado en este proceso fue el pKGWFS7. La recombinación de los plásmidos pENTRY y los pDEST se realizó con la clonasa LR (introduce un gen de interés flanqueado por sitios attL de un vector ENTRY en un vector de destino con sitios attR), incubando la mezcla a 25ºC toda la noche. La reacción se paró añadiendo proteinasa K durante 10 min a 37ºC.

Posteriormente, se procedió a la transformación de células competentes DH5α con la mezcla de recombinación por electroporación (1,8 kV), sembrando esta vez las bacterias obtenidas en medio LB suplementado con espectinomicina, ya que es la resistencia que presenta el plásmido de destino. Tras seleccionar las colonias transformadas se realizaron tres PCRs distintas para confirmar la construcción (la presencia del fragmento clonado y que éste se encontrara en la dirección correcta y en el vector adecuado), para ello se utilizaron los oligos attB1 (SEQ ID NO: 3) y attB2 (SEQ ID NO: 4), Seq-Gate.L1.F (SEQ ID NO: 5) y Seq-Gate.L2.R (SEQ ID NO: 6), los oligos del fragmento clonado SEQ ID No: 8 y SEQ ID No: 9) y otro del vector de destino (35S-GTW F). Los productos de la PCR obtenidos se comprobaron en un gel de agarosa, observándose banda solamente en la primera y tercera PCRs.

Por último, se realizó la extracción y purificación del ADN plasmídico con el *kit* NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel), cuantificando el producto al Nanodrop y comprobándolo por electroforesis en gel de agarosa.

Transformación de *A. tumefaciens* mediante electroporación

Las células competentes de *A. tumefaciens* se transformaron con la construcción pKGWFS7-*Thkel1* por electroporación. A una suspensión de 0,4 mL de células competentes se le añadieron entre 0,1-0,5 µg del ADN del plásmido recombinante. Inmediatamente después de la electroporación, se añadió 1 mL de medio SOC (bactotriptona 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 0,05%, KCl 2,5 mM, pH 7,0, MgCl2

10mM y glucosa 20 mM) a las células y se incubaron a 28ºC durante 2-3 h. Los transformantes se seleccionaron en placas con medio LB sólido suplementado con espectinomicina (50 µg/mL).

Extracción de ADN plasmídico de *A. tumefaciens*

Para confirmar que las células transformadas contenían la construcción adecuada, se realizó una extracción de plásmidos a partir de un cultivo saturado de las cepas transformadas en medio LB con espectinomicina. Las células presentes en 1 mL del cultivo se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 100 µL de tampón de lisis (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 7,5, EDTA 10 mM, lisozima 4 mg/mL). La suspensión se agitó vigorosamente durante 10 min y se incubó a temperatura ambiente durante otros 30 min, al cabo de los cuales se añadieron 150 µL de NaAc 3M (pH 4,8), se mezcló y se incubó en hielo durante 5 min. Tras centrifugar a 1200 rpm durante 5 min, al sobrenadante se le añadió un volumen igual de fenol: cloroformo (1:1), se mezcló mediante agitación, después de una última centrifugación, el precipitado se resuspendió en 50 µL de agua.

Transformación de *B. napus* por inmersión floral de *A. tumefaciens*

La transformación de *B. napus* por medio de *A. tumefaciens* se realizó por el método de infiltración en planta (*in vivo*). Este procedimiento ofrece varias ventajas frente a los métodos que requieren un proceso de cultivo *in vitro*. La transformación de plantas enteras no requiere regeneración, lo que evita la variación somaclonal, además, se reduce el tiempo requerido para obtener individuos transformados.

Se utilizó un cultivo saturado de *A. tumefaciens* para inocular 200 mL de medio LB (3:200). Este cultivo se incubó a 28ºC durante 24 h, las células se recogieron por centrifugación (3000 rpm, 15 min a 4ºC) y se resuspendieron en 400 mL de solución de infiltración (sacarosa 5%, detergente Siwet L-77 0,03% (v/v), medio MS 0,5X, BAP (benzilaminopurina) 0,044 µM y acetosiringona (16 mg/L).

Las plantas de *B. napus* que iban a ser infiltradas, se crecieron en macetas hasta que desarrollaron los primordios florales. Para la inoculación de las plantas con *A. tumefaciens*, se colocaron 400 mL de la suspensión de la bacteria en un vaso de

precipitado, donde se fueron introduciendo uno a uno los primordios florales de las ramas de cada planta durante 2 min, cubriéndolos posteriormente con una bolsa de plástico con el fin de mantener la humedad durante 2-3 días. Cuando la bacteria se pone en contacto con los primordios florales de *B. napus*, ésta infecta al tejido. En este período de contacto, la bacteria transfiere al tejido el ADN-T del plásmido Ti, que se integra en el material genético de sus células, transcribiéndose más tarde como si fuera un gen propio. Una vez secas las silicuas producidas se recogieron las semillas. El siguiente paso consistió en seleccionar las semillas transgénicas y llevarlas a homocigosis.

Selección de semillas transgénicas

Tras esterilizar la superficie de las semillas, se eliminó la dormición por estratificación durante 72 h a 4ºC, y se colocaron en placas con medio MS suplementado con kanamicina (50 µg/mL). Estas placas se incubaron a 22ºC, con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, y una humedad del 70% hasta que las plántulas tuvieron abiertos completamente los cotiledones (7 días). En este momento ya se pueden diferenciar plántulas transformadas de las que no, ya que estas últimas presentaban un color predominante morado por la acumulación de antocianinas. Las plántulas aparentemente transformadas se transplantaron a tierra, donde al cabo de unos días, se descartaron las no resistentes a kanamicina, obviadas en el paso anterior, ya que sus hojas primarias emergían blancas o moradas.

Caracterización molecular de las plantas transgénicas

Las plantas correspondientes a las líneas T1 se utilizaron para comprobar por medio de PCR la presencia del gen *Thkel1* en el genoma de esas líneas. Para ello, se utilizó ADN genómico junto con oligonucleótidos específicos del transgén (35S-GTW-F: CTTCGCAAGACCCTTCCTCT–SEQ ID NO: 7; Thkel1-R: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACAAAAAGTCCAACCTCC–SEQ ID NO: 8; y Thkel1-F: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCATGGCCGCTTCCATCATCT–SEQ ID NO: 9). Posteriormente, se prosiguió con las plantas confirmadas hasta la homocigosis.

Ejemplo 2. Observación visual de la micorrización de plantas de colza transgénica *Thk1*.

Para demostrar el proceso de micorrización en las plantas de colza transgénicas *Thk1* de la invención, las raíces de éstas se sumergieron en una solución de KOH al 10% durante 10-13 min a 70-80ºC con el fin de aumentar la permeabilidad de sus paredes celulares. Posteriormente se realizaron tres lavados con agua destilada para eliminar el KOH y uno más con una solución de ácido acético al 2% (v/v). A continuación, las raíces se pasaron a una solución con la 'tinta china' SheafferSkrip (5% de tinta en ácido acético al 2%) durante 10 min a 90ºC. Por último, se desechó el exceso de tinta y se aclararon las raíces con agua destilada, donde se mantuvieron hasta su observación. La visualización de la micorrización se llevó a cabo con el microscopio estereoscópico Leica M205 FA y las fotografías se tomaron con la cámara fotográfica Leica DFC 495.

Como se puede observar en la **FIG. 1**, las plantas transgénicas que expresan el gen *Thkl1* (SEQ ID NO: 1) muestran sus raíces micorrizadas, observándose las vesículas que se forman en la colonización.

A continuación, se procedió a la cuantificación de la micorrización en las plantas de colza transgénicas. Mediante PCR a tiempo real se analizaron los niveles de micorrización de plantas de colza de tipo silvestre y plantas de colza transgénicas que sobreexpresan el gen *Thkel1* (SEQ ID NO: 1). Como se observa en la **FIG. 2**, solo se detectó ADN fúngico en las plantas de colza transgénicas.

Ejemplo 3. Efecto de la micorrización en la producción de plantas colza transformadas de la invención.

Una vez obtenida la primera generación (T1) a partir de una planta de colza transgénica que sobreexpresa el gen *ThKel1* (SEQ ID NO: 1), se procedió a comprobar el efecto de la micorrización en la producción de semillas. La capacidad productiva de *B. napus* a nivel de semillas oleaginosas se realizó mediante la recogida y cuantificación del número total de silicuas producidas por planta. Posteriormente, se abrió cada una de las silicuas recogidas de forma individual y se tomaron datos del número de semillas formadas en cada silicua y se pesaron, en balanza de precisión,

grupos de 10 semillas. Por último, se realizó el cálculo del peso de semillas producido por cada planta. Tal y como se observa en la **FIG. 3**, las plantas transgénicas producen un 30% más de semillas que las plantas silvestres control, y un 10% más de semillas abortadas (las flores se forman por completo pero no frutos, silicuas, o semillas) que las plantas silvestres control.

Por otro lado, en la **FIG. 4** se observa que la producción de semillas por silicua en las plantas transgénicas micorrizadas con respecto a las plantas silvestres control muestran un claro incremento del 30%.

Adicionalmente, se analizó el peso de las semillas de las plantas transgénicas respecto de las plantas silvestres control. Los resultados mostrados en la **FIG. 5** evidencian que el peso de las semillas obtenidas de las plantas transgénicas es superior al de las semillas de las plantas silvestres control, y mayor aún en plantas transgénicas micorrizadas.

Con todos estos datos, hemos llevado a cabo una extrapolación para calcular la productividad por hectárea expresada en Kg (**FIG. 6**). Este dato se basa en multiplicar los datos de peso por semilla producido por planta, por el número de plantas de colza que habitualmente hay en una hectárea de este cultivo (aprox. 300.000 plantas, 30 por m^2).

Ejemplo 4. Efecto de la micorrización de plantas de colza transgénicas *Thkel1* frente a diferentes tipos de estrés.

4.1 Estrés salino

Se crecieron las plantas de colza transgénica *Thkel1* bajo condiciones de estrés salino, generado mediante riego con NaCl 250 mM desde que empezó a brotar la sexta hoja verdadera en las plantas. En la **FIG. 7** se muestra el número de silicuas por planta, incluyendo el porcentaje de silicuas abortadas, observando cómo todas las plantas transgénicas producen silicuas, mientras que en los controles se obtuvieron pérdidas de entorno al 75%. Además, se muestra el número de silicuas producidas por planta, observando cómo las plantas transgénicas *Thkel1* transformadas con una única copia del gen *Thkel1* (SEQ ID NO: 1) no presentan mayor producción que las

plantas silvestre control cuando se crecen bajo las mismas condiciones de estrés salino. En cambio, la presencia de micorrizas provoca un aumento muy significativo de la producción, por lo que se pone de manifiesto que la micorrización sí beneficia a las plantas de colza transgénicas de la invención sometidas a estrés salino.

Por otro lado, las plantas transgénicas *Thkel2* que presentaban en su genoma dos copias del gen *Thkel1* (SEQ ID NO: 1) tienen una mayor producción de silicuas respecto a las plantas silvestres control, posiblemente por una mayor actividad β-glucosidasa debido a la presencia de dos copias del gen *Thkel1*. Sin embargo, no se observó un aumento significativo de la producción en presencia de las micorrizas, quizás porque esa mayor actividad glucosidasa dificulta también su colonización por *Glomus* spp.

4.2 Estrés hídrico - Sequía

Se crecieron plantas de colza transgénica *Thkel1* en condiciones de sequía mediante la suspensión del riego de dichas plantas cuando comenzó a brotar la sexta hoja verdadera. En la **FIG. 8** se muestra el número de silicuas por planta, incluyendo el porcentaje de silicuas abortadas, observando como las plantas de colza transgénicas de la invención producen silicuas, mientras que las plantas de colza silvestres se producen pérdidas superiores al 60%. Además, tanto las plantas transgénicas por si solas, como con las plantas transgénicas con micorrizas presentan un número significativamente mayor de silicuas respecto al de las plantas silvestres control.

En la **FIG. 9** se muestra la producción de semillas por silicua de las plantas transgénicas de la invención con y sin micorrizas, respecto de las plantas silvestres control, con y sin micorrizas, respectivamente. En dicha figura se observa como la producción de semillas de todas las plantas transgénicas de la invención fue significativamente mayor en comparación con la de las plantas silvestres control, tanto con micorrizas como sin micorrizas. Adicionalmente, se analizó el número de semillas por planta en condiciones de sequía para cada una de las plantas analizadas. Como se observa en la **FIG. 10**, la producción de semillas en todas las plantas transgénicas fue significativamente mayor que en las control, con independencia de la presencia o no del hongo.

Con respecto al peso por semilla (**FIG. 11**), se observó cómo las plantas transgénicas de la invención, tanto las transformadas con una como las que portaban dos copias del gen *Thkel1* (SEQ ID NO: 1), presentaron un mayor peso en comparación con el de las plantas silvestres control. A su vez, las semillas de las plantas transgénicas que portaban dos copias del gen *Thkel1* (SEQ ID NO: 1) (KEL2) en su genoma mostraron un peso significativamente mayor que las de las plantas transgénicas con una sola copia de *Thkel1* (SEQ ID NO: 1) (KEL1). Por otro lado, al añadir micorrizas no se observaron diferencias para las plantas transgénicas KEL1, pero si en las plantas transgénicas KEL2 con micorrizas respecto a las que no se añadió hongo.

En la **FIG. 12**, se lleva a cabo una extrapolación de la productividad por hectárea de las plantas transgénicas en condiciones de sequía y tras la micorrización. Se comprobó que ésta fue significativamente superior que la de las plantas control, siendo especialmente elevada para las plantas transgénicas KEL2, que llevan en su genoma dos copias del gen Thkel1 (SEQ ID NO: 1).

Ejemplo 5. Medida de glucosinolatos en las plantas transgénicas *Thkel1* de la invención.

Los glucosilonatos se midieron en la raíz de plantas transgénicas Thkel1 y silvestres. Los resultados ponen de manifiesto que en las plantas transgénicas disminuye significativamente la acumulación de glucosinolatos indólicos, específicamente 4-methoxyl-I3M, 1-methoxy-I3M y 4-hydroxy-I3M (**FIG. 13**), así como los correspondientes productos de su hidrólisis, 1-MeO-IGL y 4-MeO-IGL (**FIG. 14**).

Los productos de hidrolisis de los glucosinolatos, 1-MeO-IGL y 4-MeO-IGL, han sido relacionados con la incapacidad de diversas especies de crucíferas para micorrizar, indicando la posibilidad de que ambos compuestos sean los responsables de ese impedimento. Tong y colaboradores (Tong et al., Environmental and Experimental Botany. 2015; 109: 288-295), determinaron como en un cultivo simultáneo de brócoli (*Brassica oleracea*), sésamo y hongos micorrícicos, mientras este último estaba siendo micorrizado ocurría, tanto radicular como sistémico, un aumento de 1-MeO-IGL y 4-MeO-IGL como una respuesta defensiva del brócoli a la micorrización, lo que impedía la interacción. Vierheilig y colaboradores (Vierheilig et al. New Phytologist. 2000; 146(2): 343-352) midieron cualitativa y cuantitativamente los perfiles de glucosinolatos

de diferentes plantas pertenecientes al orden Brassicales con capacidad y sin capacidad de micorrización (en este caso varias crucíferas) y observaron como la diferencia entre especies de Brassicales como *Carica papaya* y *Tropaelum majus*, con capacidad micorrícica, y crucíferas sin capacidad de micorrización como *B. napus*, *B. nigra*, *Sinapis alba* o *Nastortium officinale,* era la presencia de estos compuestos.

Ejemplo 6. Análisis de la calidad oleaginosa de las semillas obtenidas de las plantas transgénicas *Thkel1* de la invención.

Para determinar la calidad de las semillas obtenidas a partir de las plantas de colza transgénicas de la invención en comparación con la de las semillas obtenidas a partir de las plantas de colza silvestres, se procedió al análisis de compuestos como glucosinolatos en las raíces o ácidos grasos de interés nutricional presentes en las semillas.

Para cada réplica de muestra de raíz, se añadieron 500 µL de metanol al 70% suplementado con biochanina A a 1 mg/L (patrón interno, IS) a 5 mg de tejido vegetal liofilizado en polvo. Después de 10 min de ultrasonidos, las muestras se centrifugaron a 9450 g durante 10 min a 4°C. Antes del análisis de UPLC-QTOF-MS (*Ultra-high Performance Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry*), los sobrenadantes se filtraron a través de filtros de jeringa de PluriTetraFluoruroEtileno (PTFE) de 0,2 µm (Whatman International Inc., Kent, Reino Unido). Los análisis se llevaron a cabo siguiendo la metodología del metabolito polar que se describe a continuación.

Las muestras de semillas se pesaron (aprox. 50 mg) y se trituraron usando un molino de bolas y perlas de vidrio. La pasta oleosa resultante se mezcló con 300 µL de metanol puro (grado cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas o LC/MS) complementado con biochanina A a 1 mg/L. La extracción se llevó a cabo esencialmente como en las muestras de raíz, pero los extractos metanólicos se combinaron con 400 µL de agua ultrapura y 200 µL de cloroformo. La capa superior de agua se recuperó para los análisis de metabolitos polares, mientras que la capa orgánica inferior se secó al vacío y posteriormente se reconstituyó en n-butanol puro (grado LC/MS) para análisis de metabolitos no polares.

Las separaciones cromatográficas se realizaron en un sistema Acquity SDS (Waters Corp. Ltd., Milford, MA) interconectado a un QTOF Premier de Micromass Ltd. a través de una fuente de ESI. Para todas las separaciones, se usó una columna Luna Omega 1.6u Polar C18 de 100 mm x 2,1 mm i.d., 1,6 µm (Phenomenex, Torrance, EE. UU.). Durante la adquisición de datos, la columna se mantuvo a 40ºC y las muestras a 12ºC para frenar la degradación.

Para analizar los metabolitos polares, las muestras se inyectaron en el sistema UPLC en alícuotas de 10 µL usando la opción de llenado de bucle parcial. El programa de elución en gradiente usado fue 0-2 min, 95% de isocrático A [agua con 0.1% de ácido fórmico (v/v)] y 5% de B [acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico (v/v)]; 2-17 min, gradiente 5-95% B; 17-20 min, regreso a las condiciones iniciales; 20-25 min, período de reequilibrio. Durante la adquisición, la velocidad de flujo fue constante a 300 µL/min.

Para analizar los metabolitos no polares, las muestras se inyectaron en el sistema UPLC en alícuotas de 5 µL utilizando la opción de llenado parcial de bucle. El programa de elución en gradiente fue 0 min, 100% A [agua: ácido acetonitrilo, 15:85 (v / v) con ácido fórmico al 0,01% y CH_3COONH_4 0,5 mM] y 0% B [n-butanol con ácido fórmico al 0,01% y 0,5 mM CH_3COONH_4]; 0-3 min, 0-10% B; 3-6 min, gradiente 10-55% B; 6-9 min, gradiente 55-60% B; 9-11 min, gradiente 60-70% B; 11-13 retorno a las condiciones iniciales; y reequilibrio. Durante la adquisición, la velocidad de flujo fue constante a 300 µL/min.

Para los análisis de espectrometría de masas, las muestras se analizaron en modos de ionización tanto negativos como positivos. Se establecieron dos funciones en el instrumento: en la función 1, se adquirieron datos en el modo de perfil de 50 a 1000 Da utilizando un tiempo de exploración de 0.2 sy una energía de colisión de 2 eV; en la función 2, el rango de exploración fue el mismo, pero se estableció una rampa de colisión entre 4 y 65 eV. Durante todas las mediciones, el voltaje capilar de electrospray se ajustó a 4 kV, y el voltaje del cono se ajustó a 25 V. La temperatura de la fuente se mantuvo a 120°C, y la temperatura del gas de desolvatación se ajustó a 350°C. Se usó argón como gas de colisión y se usó nitrógeno como nebulizador, así como gas de desolvatación a 60 y 800 l/h, respectivamente. Se proporcionaron

mediciones de masa exactas controlando el compuesto de referencia lockmass leucine-encefalina.

Los datos se procesaron utilizando Masslynx v.4.1. Raw. Los archivos de datos se convirtieron al formato netCDF utilizando el puente de datos de la aplicación de Masslynx y se procesaron utilizando el paquete xcms. La detección cromatográfica de picos se realizó utilizando el algoritmo MatchFilter 9, aplicando las siguientes configuraciones de parámetros: snr = 3, fwhm = 15 s, step = 0.01 D, mzdiff = 0.1 D, y profmethod = bin. La corrección del tiempo de retención se logró en tres iteraciones aplicando los parámetros minfrac = 1, bw = 30 s, mzwid = 0.05 D, span = 1, y missing = extra = 1 para la primera iteración; minfrac = 1, bw = 10 s, mzwid = 0.05 D, span = 0.6, y missing = extra = 0 para la segunda iteración; y minfrac = 1, bw = 5 s, mzwid = 0.05 D, span = 0.5, y missing = extra = 0 para la tercera iteración. Después de la agrupación máxima final (minfrac = 1, bw = 5 s) y el llenado de las características faltantes utilizando la rutina fillPeaks del paquete xcms, se obtuvo una matriz de datos que consiste en la característica × muestra.

Tal y como se observa en la **FIG. 15**, la micorrización de las plantas transgénicas disminuye el contenido de todos los glucosinolatos alifáticos analizados en el aceite de sus semillas, respecto de las plantas silvestres control, micorrizadas o no. Por otro lado, se observa como la presencia de los hongos micorricicos en las raíces de las plantas de colza silvestres induce un aumento significativo en el contenido del glucosinolato indólico 4-MeO-I3M, mientras que la simple presencia del gen *Thkel1* en las plantas de colza transgénicas disminuye significativamente este contenido.

Por lo que se refiere al perfil oleico del aceite obtenido a partir de las semillas (**FIG. 16**), puede observarse un aumento significativo en el contenido en ácido octadecatrienoico y glicerofosfocolina en las plantas transgénicas de la invención respecto de las plantas silvestres control. Estos ácidos grasos son de mayor calidad que los presentes en las semillas del tipo silvestre.

REIVINDICACIONES

1. Planta transgénica, material reproductor o de propagación, célula vegetal cultivada que comprende al menos una copia de la SEQ ID NO: 1.
2. Planta transgénica, material reproductor o de propagación, célula vegetal cultivada según la reivindicación 1 caracterizada porque pertenece al género *Brassica*.
3. Planta transgénica, material reproductor o de propagación, célula vegetal cultivada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 caracterizada porque se seleccionan de la lista que consiste en: *B. napus*, *B. oleracea*, *B. rapa* y *B. nigra.*
4. Planta transgénica, material reproductor o de propagación, célula vegetal cultivada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 caracterizada porque comprende más de una copia de la SEQ ID NO: 1.
5. Planta transgénica, material reproductor o de propagación, célula vegetal cultivada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 caracterizada porque presenta capacidad de micorrización.
6. Planta transgénica, material reproductor o de propagación, célula vegetal cultivada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 caracterizada porque presenta mayor tolerancia frente a estrés abiótico que las plantas silvestres control.
7. Planta transgénica, material reproductor o de propagación, célula vegetal cultivada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde el estrés abiótico se selecciona de entre estrés hídrico y estrés salino.
8. Planta transgénica, material reproductor o de propagación, célula vegetal cultivada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 caracterizada porque presentan un incremento en su biomasa, rendimiento y/o aceite, respecto de las plantas silvestres control.
9. Planta transgénica, material reproductor o de propagación, célula vegetal cultivada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 caracterizada porque presenta un descenso en la concentración de glucosilonatos respecto a la de los de las plantas silvestres control.
10. Una célula, silicua, semilla, progenie o parte de una planta según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 caracterizada porque comprende la SEQ ID NO: 1.
11. La célula, silicua, semilla, progenie o parte de una planta según la reivindicación 10 donde las partes de la planta se seleccionan de la lista que consiste en: una hoja, un tallo, una flor, un ovario, un fruto o un callo.

12. Uso de la SEQ ID NO: 1 para inducir micorrización en plantas del género *Brassica.*
13. Uso según la reivindicación 12 donde las plantas se seleccionan de la lista que consiste en: *B. napus*, *B. oleracea*, *B. rapa* y *B. nigra.*
14. Uso de la SEQ ID NO: 1 para la producción de plantas transgénicas resistentes a estrés abiótico, y que presentan un incremento en su biomasa y rendimiento, respecto a los de las plantas silvestres control.
15. Uso de las plantas transgénicas, material reproductor o de propagación, célula vegetal cultivada, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y/o de las células, silicuas, semillas, progenie o parte de una planta según las reivindicaciones 10 a 11, para producir alimentos o piensos, o un producto industrial.
16. Uso según la reivindicación 15 donde el alimento o pienso se selecciona de la lista que consiste en: aceite, sémola, grano, almidón, harina o proteína, y el producto industrial se selecciona de la lista que consiste en: biocombustible, fibra, productos químicos industriales, un producto farmacéutico o un nutracéutico.
17. Método para incrementar la biomasa y el rendimiento de una planta silvestre que comprende:
    (a) transformar dicha planta silvestre con un vector de expresión que comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1, y
    (b) expresar la molécula de ácido nucleico transformada en dicha planta.

18. Método para producir una planta transgénica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
    (a) transformar una planta silvestre con un vector de expresión que comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1, y
    (b) expresar la molécula de ácido nucleico transformada en dicha planta.

19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 17 o 18 donde la planta pertenece al género *Brassica*.

20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19 caracterizada porque la planta se seleccionan de la lista que consiste en: *B. napus*, *B. oleracea*, *B. rapa* y *B. nigra.*

21. Un método de producción de alimentos o piensos, o un producto industrial que comprende:
    (a) la obtención de la planta, material reproductor o de propagación, célula vegetal, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o célula, silicua, semilla, progenie o parte de una planta, según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, y
    (b) preparar el alimento, pienso o producto industrial a partir de la planta o parte de ella, de la etapa (a).

22. El método según la reivindicación 21 donde el alimento o el pienso se selecciona de la lista que consiste en: aceite, sémola, grano, almidón, harina o proteína; o el producto industrial de la lista que consiste en: biocombustible, fibra, productos químicos industriales, un producto farmacéutico o un nutracéutico.

23. Un método para la producción de aceite que comprende:
    a) obtener las semillas de las plantas transgénicas de las reivindicaciones 1 a 9, o de la reivindicación 10,
    b) triturarlas, y
    c) extraer el aceite de las mismas.

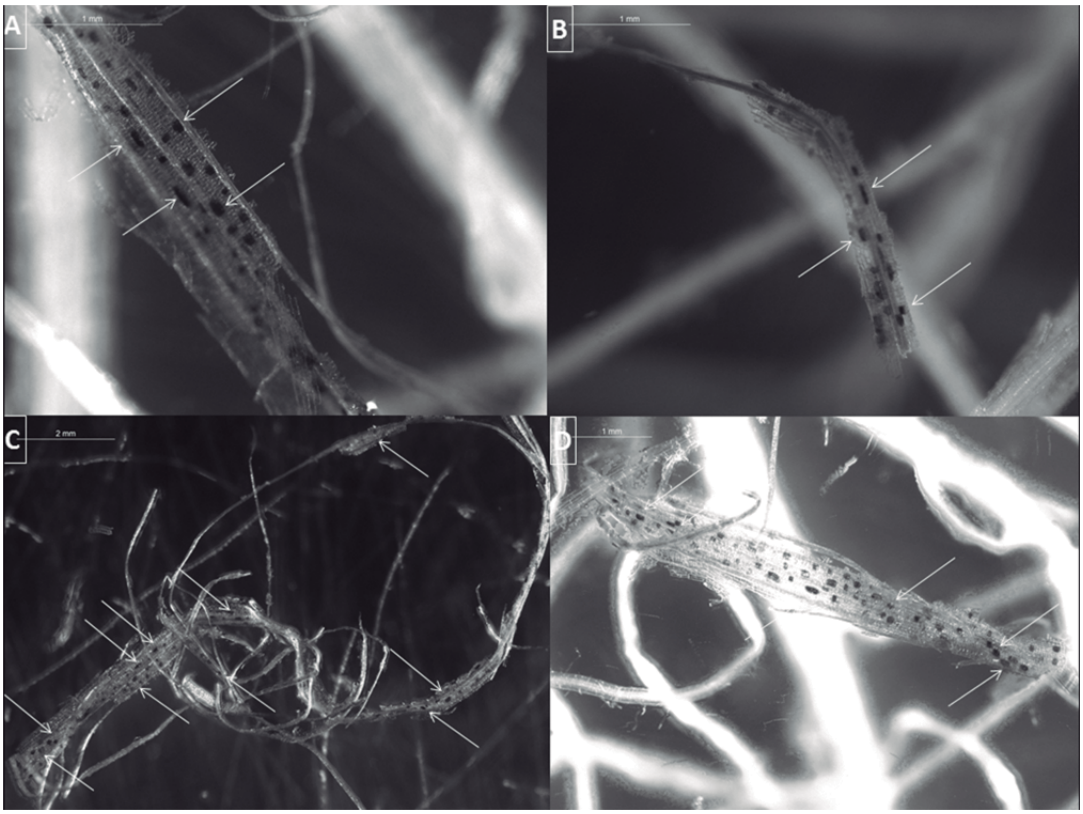

A
B
C
D

FIG. 1

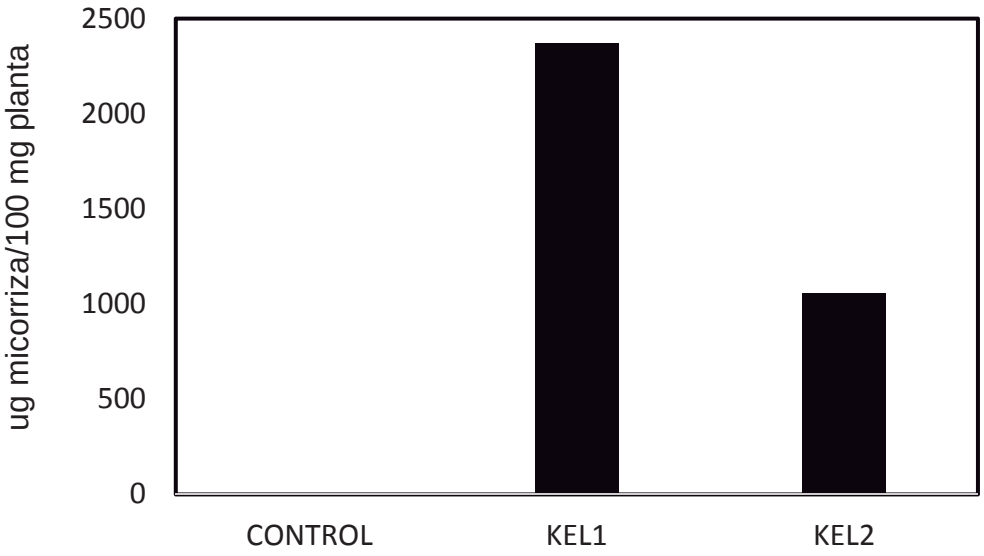

ug micorriza/100 mg planta
2500
2000
1500
1000
500
0
CONTROL
KEL1
KEL2

FIG. 2

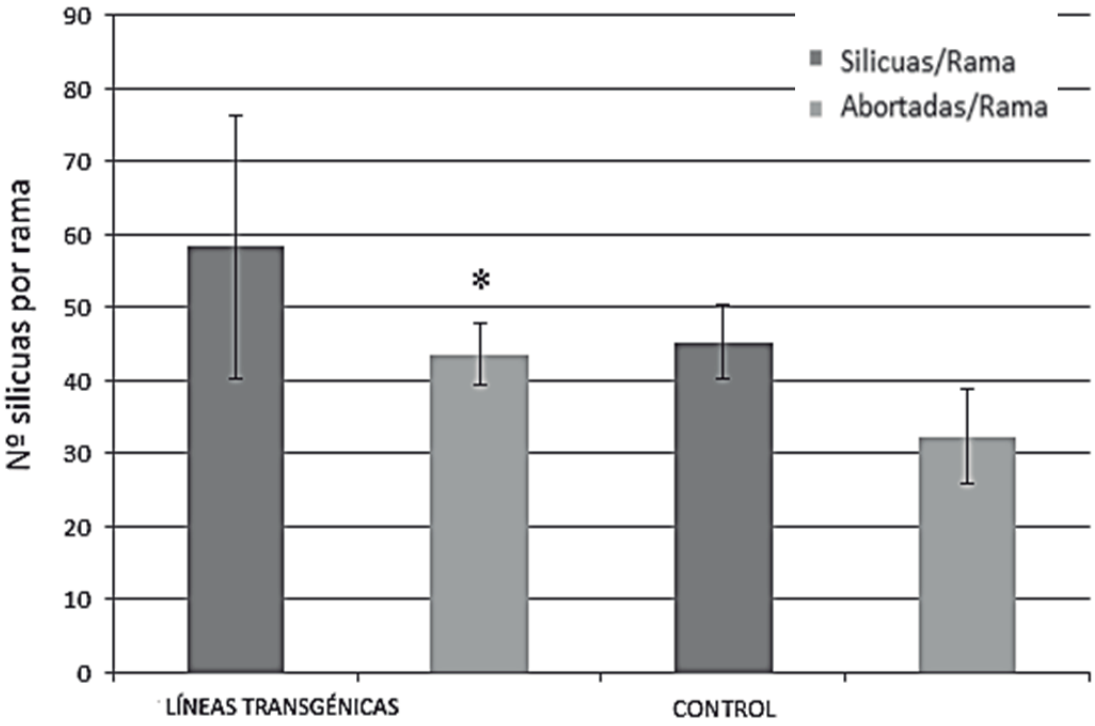

90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Nº silicuas por rama
Silicuas/Rama
Abortadas/Rama
*
LÍNEAS TRANSGÉNICAS
CONTROL

FIG. 3

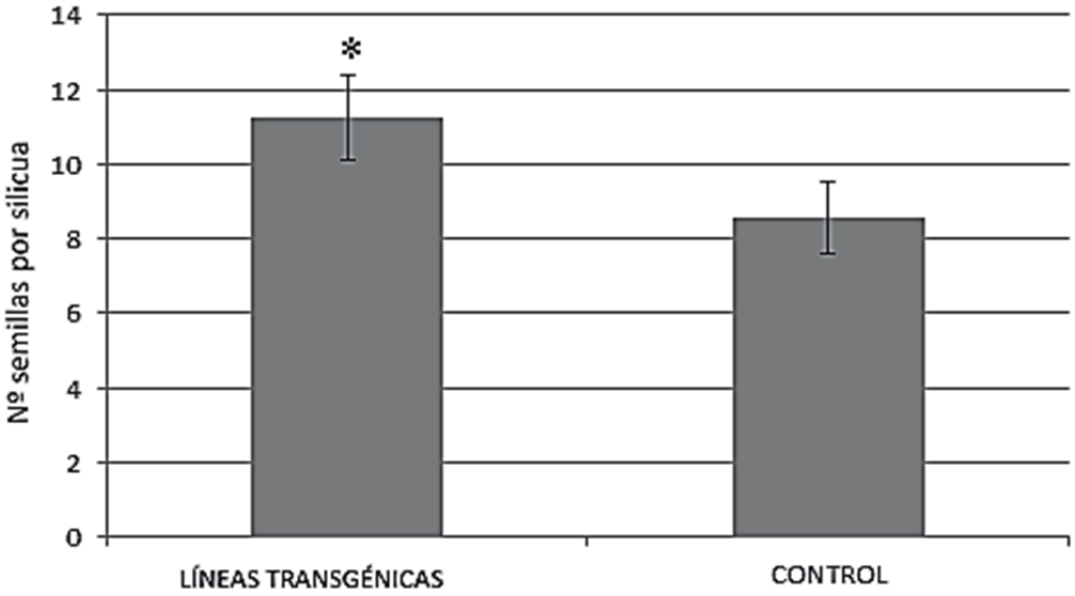

14
12
10
8
6
4
2
0
Nº semillas por silicua
*
LÍNEAS TRANSGÉNICAS
CONTROL

FIG. 4

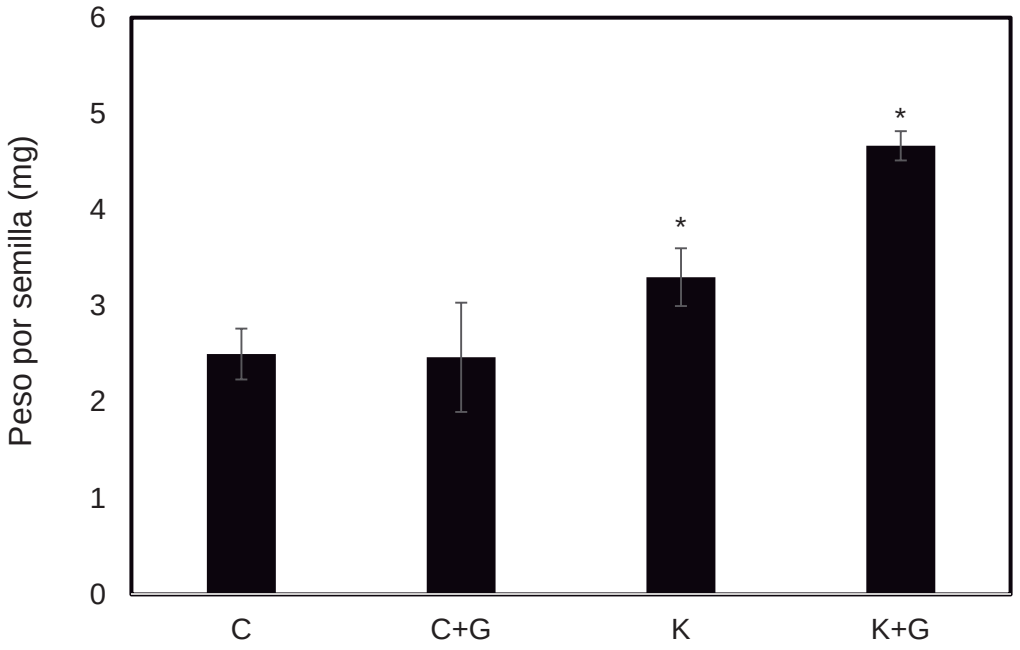

Peso por semilla (mg)
6
5
4
3
2
1
0
*
*
C
C+G
K
K+G

FIG. 5

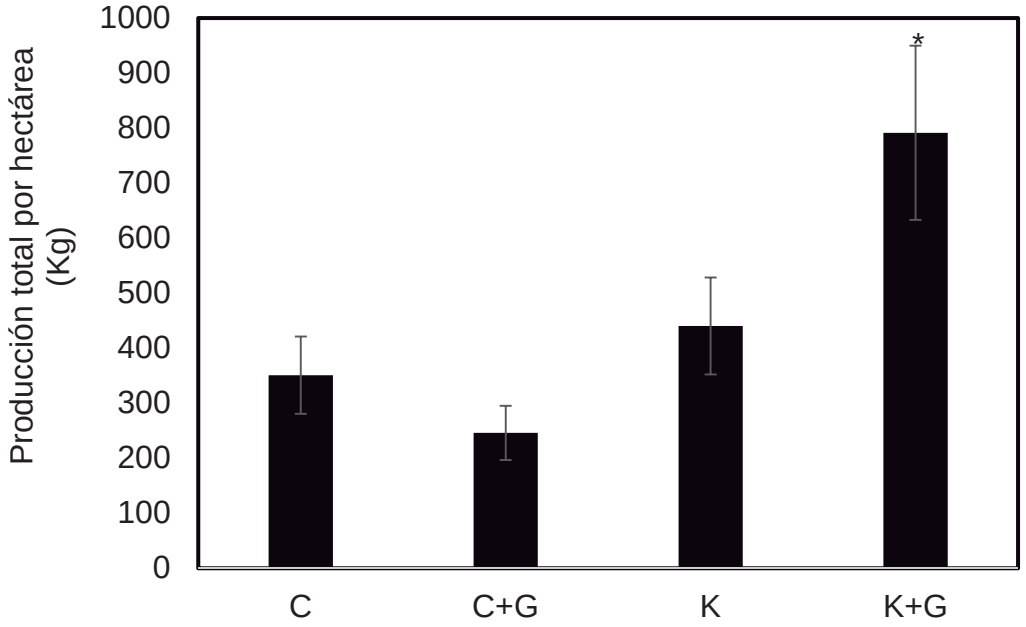

Producción total por hectárea (Kg)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
*
C
C+G
K
K+G

FIG. 6

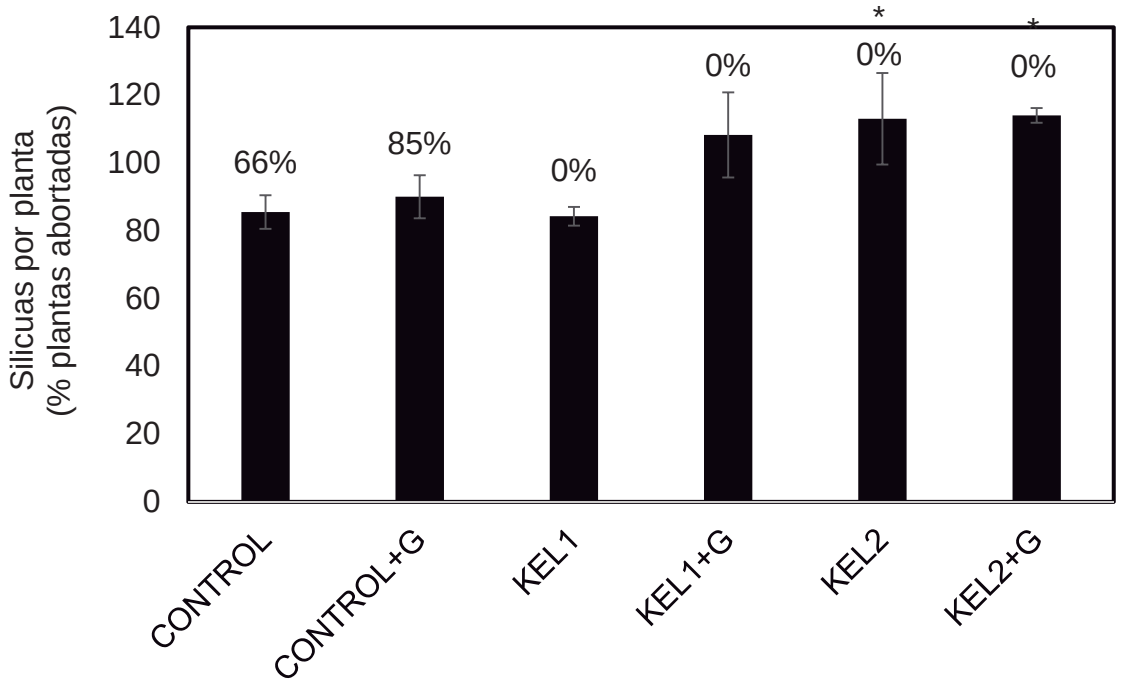

Silicuas por planta
(% plantas abortadas)
140
120
100
80
60
40
20
0
66%
85%
0%
0%
*
0%
*
0%
CONTROL
CONTROL+G
KEL1
KEL1+G
KEL2
KEL2+G

FIG. 7

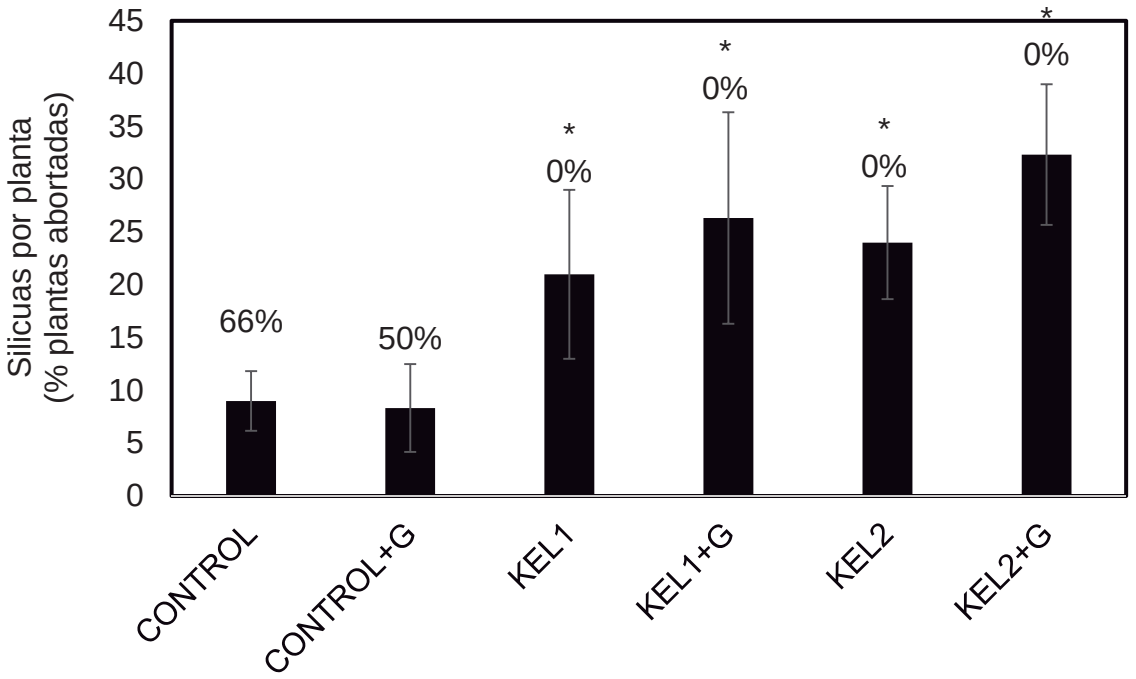

Silicuas por planta
(% plantas abortadas)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
66%
50%
*
0%
*
0%
*
0%
*
0%
CONTROL
CONTROL+G
KEL1
KEL1+G
KEL2
KEL2+G

FIG. 8

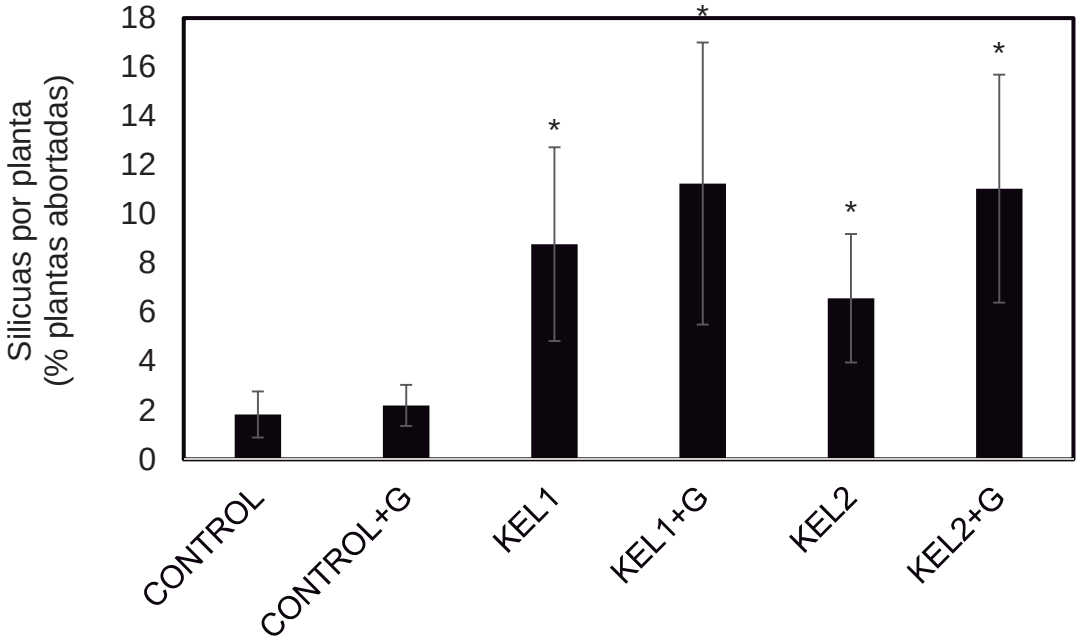

Silicuas por planta
(% plantas abortadas)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
*
*
*
*
CONTROL
CONTROL+G
KEL1
KEL1+G
KEL2
KEL2+G

FIG. 9

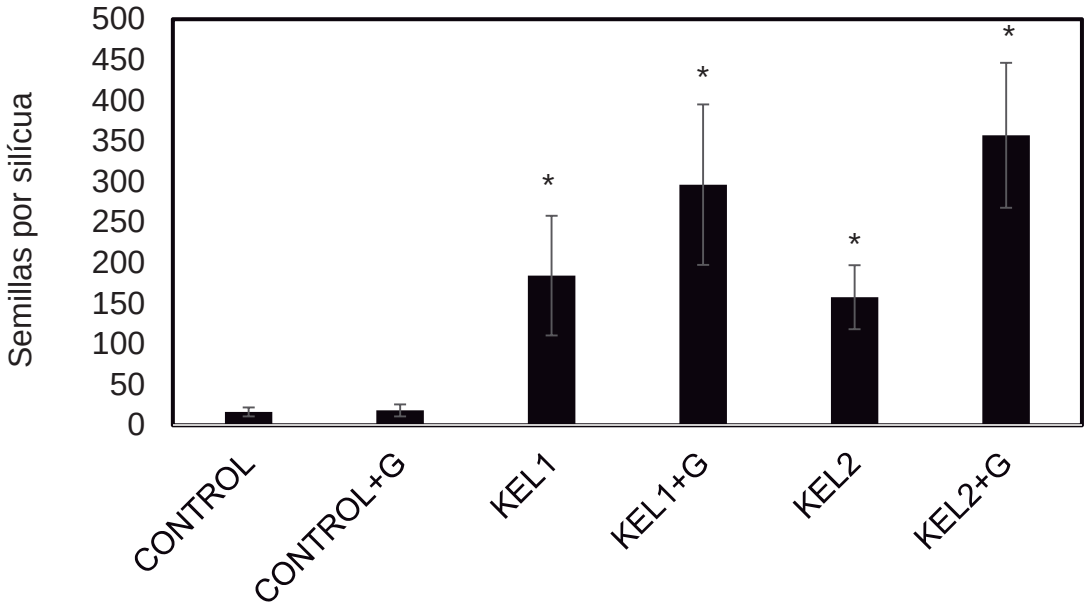

Semillas por silícua
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
*
*
*
*
CONTROL
CONTROL+G
KEL1
KEL1+G
KEL2
KEL2+G

FIG. 10

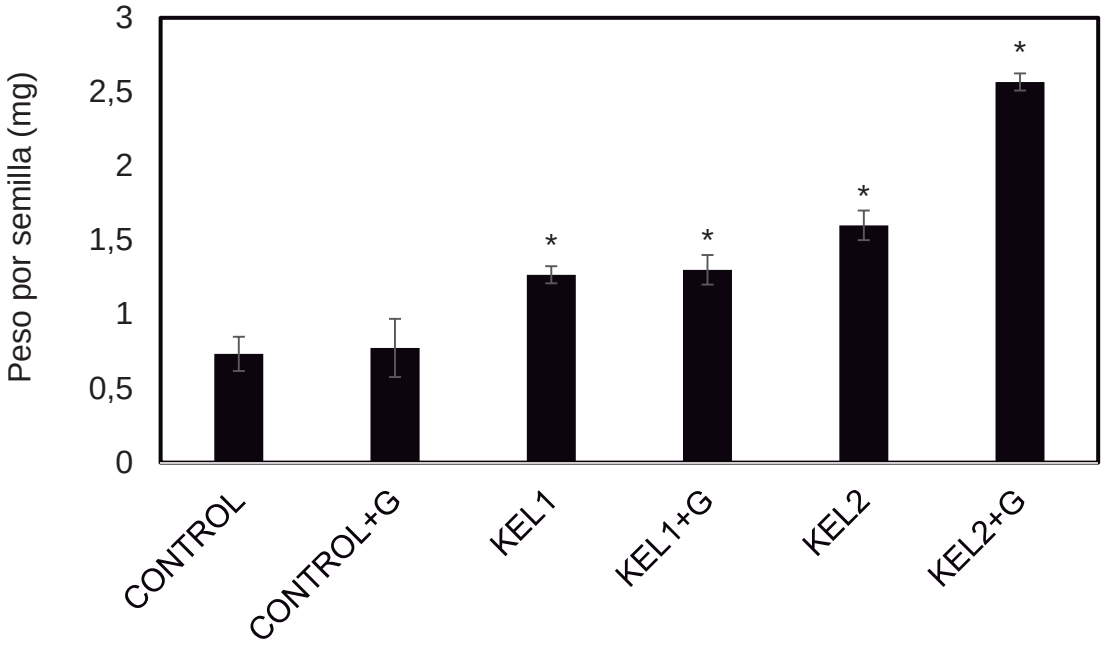

Peso por semilla (mg)
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
*
*
*
*
CONTROL
CONTROL+G
KEL1
KEL1+G
KEL2
KEL2+G

FIG. 11

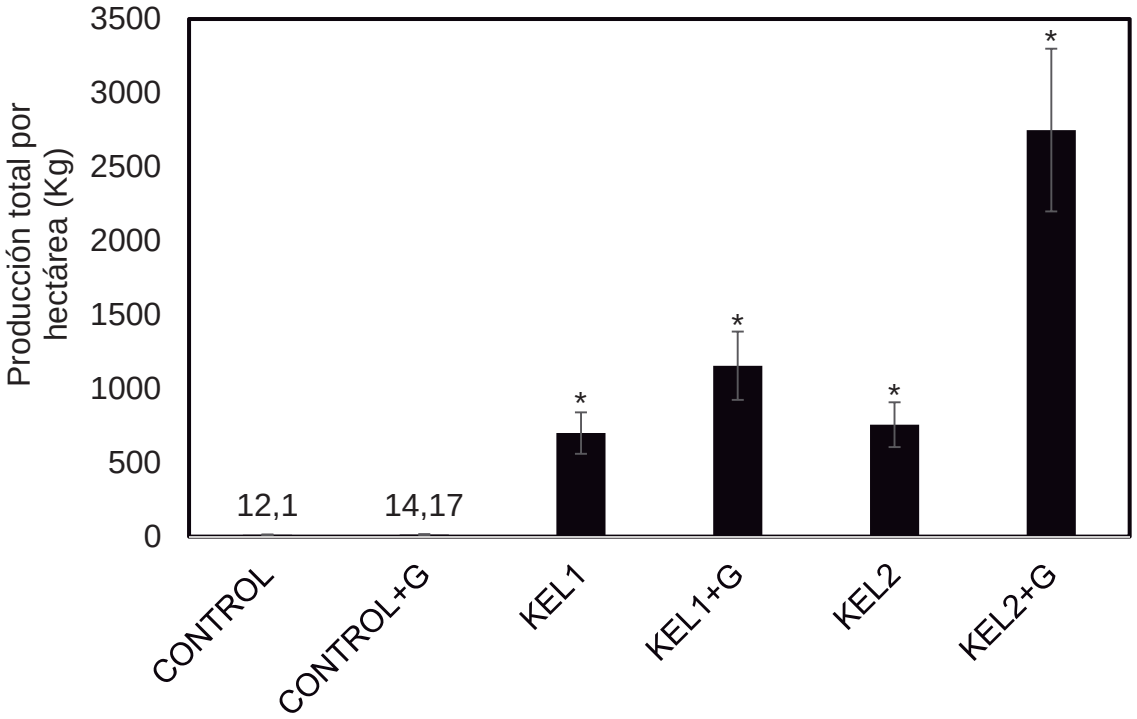

Producción total por hectárea (Kg)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
12,1
14,17
*
*
*
*
CONTROL
CONTROL+G
KEL1
KEL1+G
KEL2
KEL2+G

FIG. 12

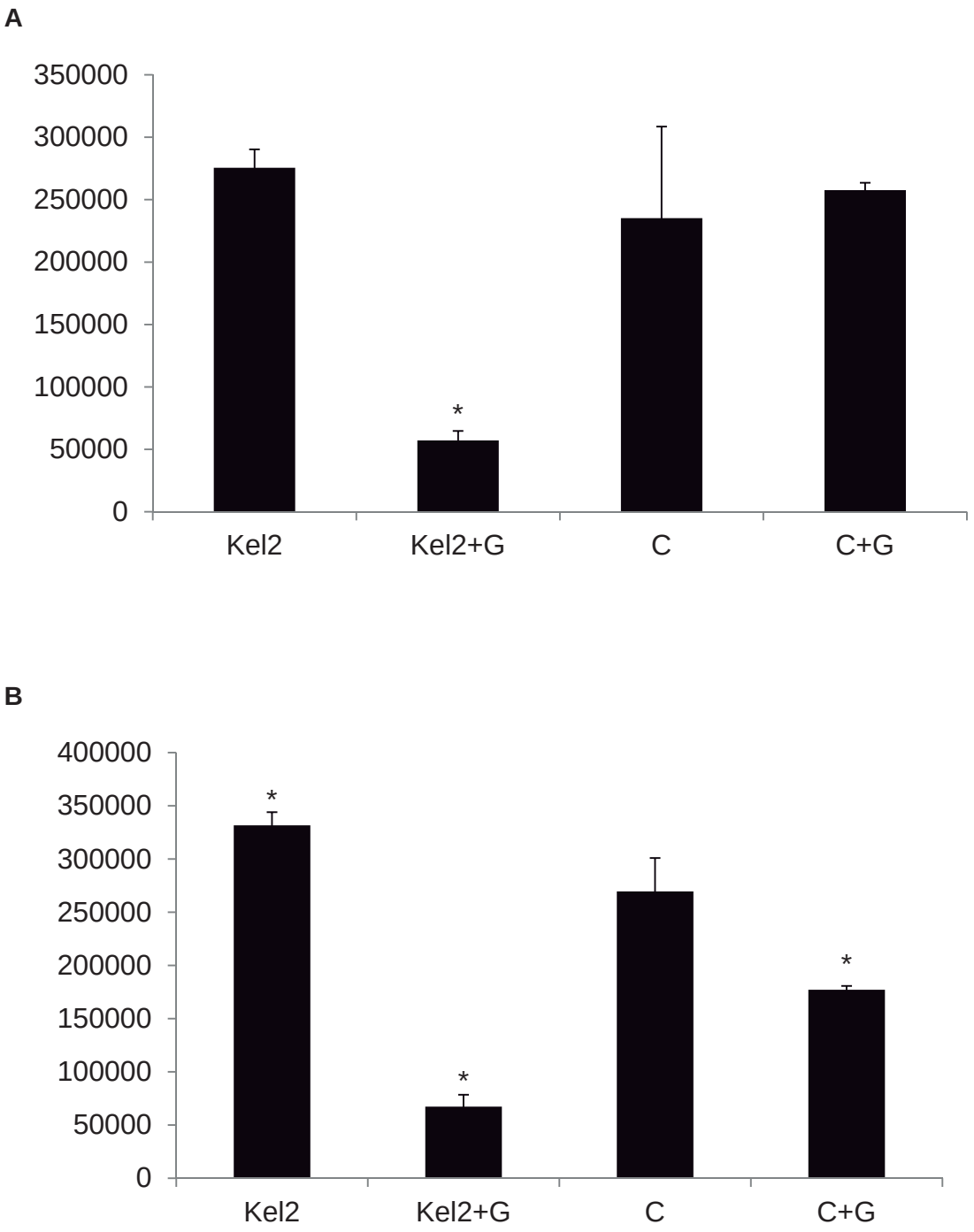

A
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
*
Kel2
Kel2+G
C
C+G
B
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
*
*
*
Kel2
Kel2+G
C
C+G

FIG. 13

C

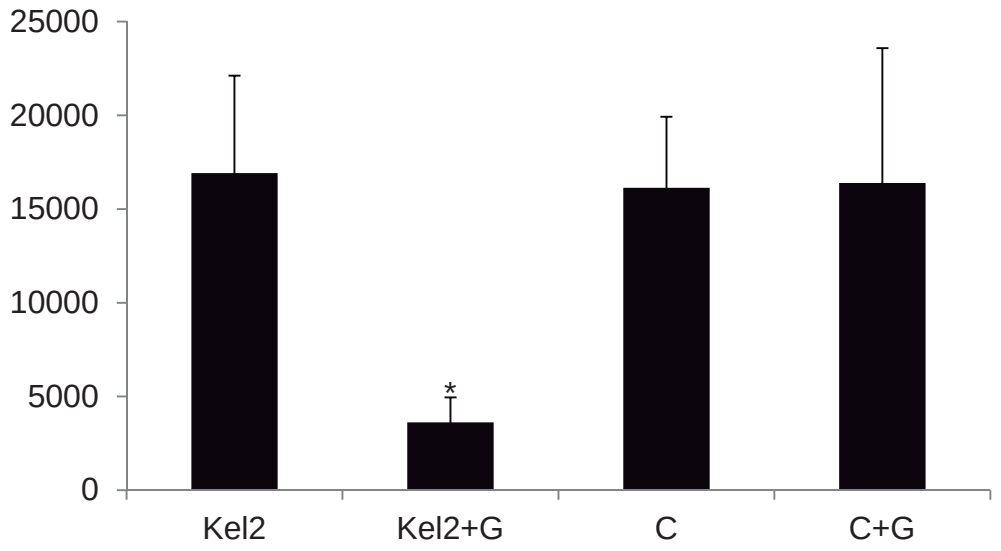


FIG. 13 (cont.)

A

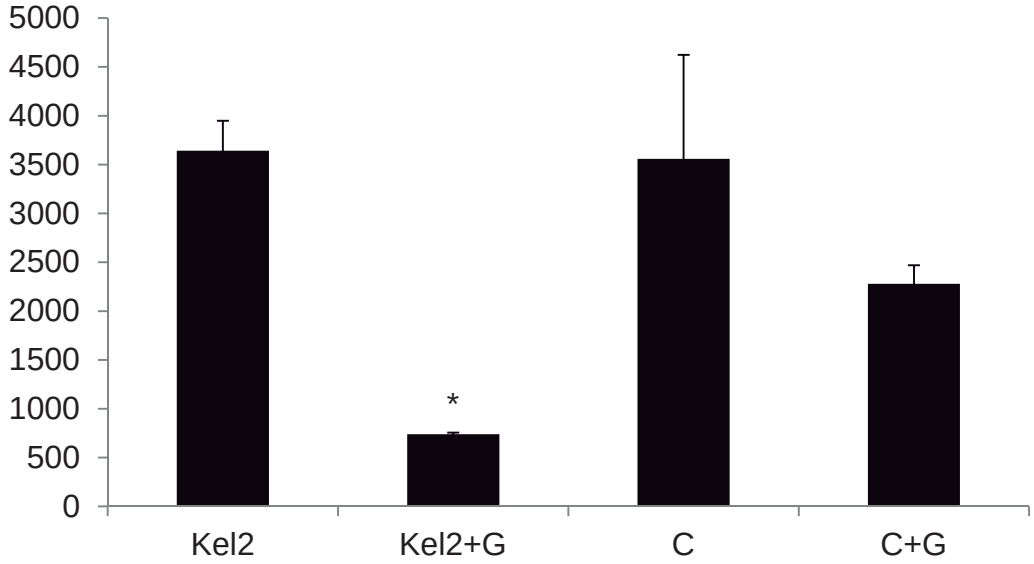


FIG. 14

B

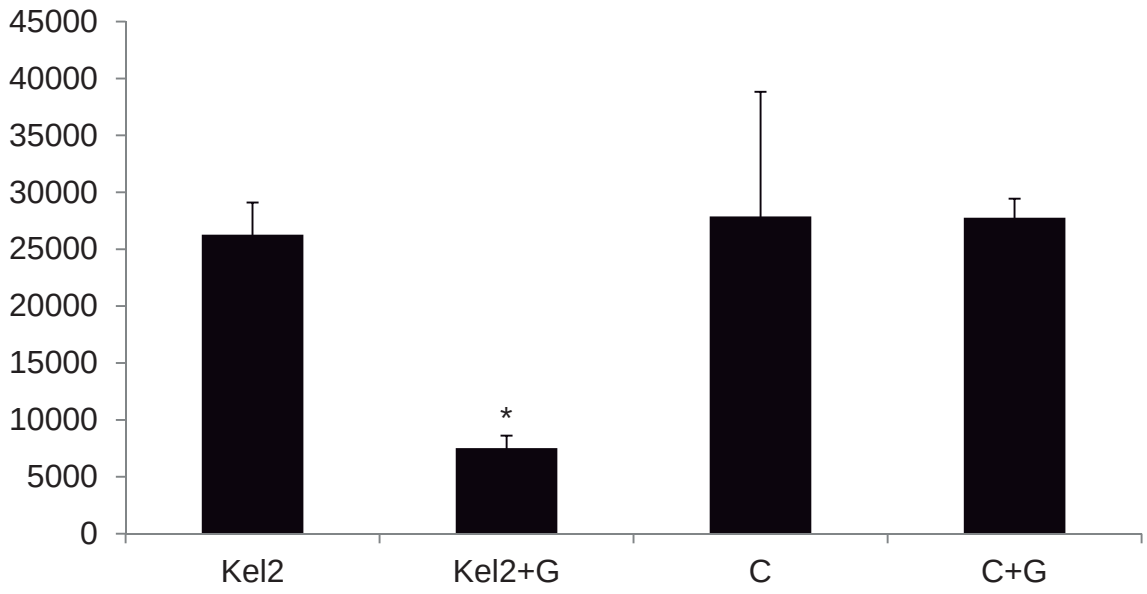


FIG. 14 (cont.)

A

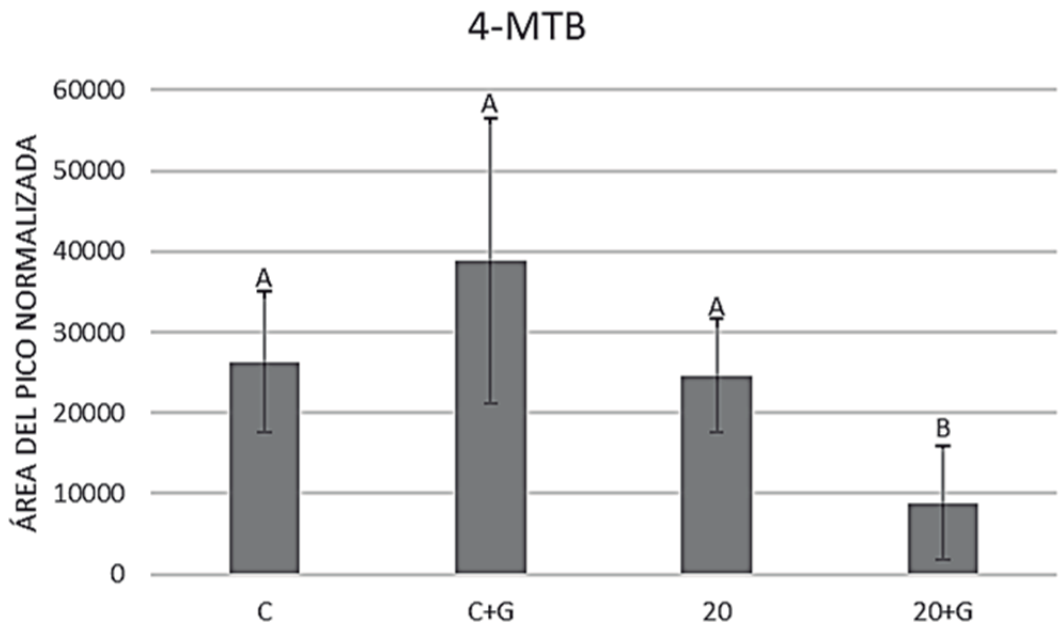
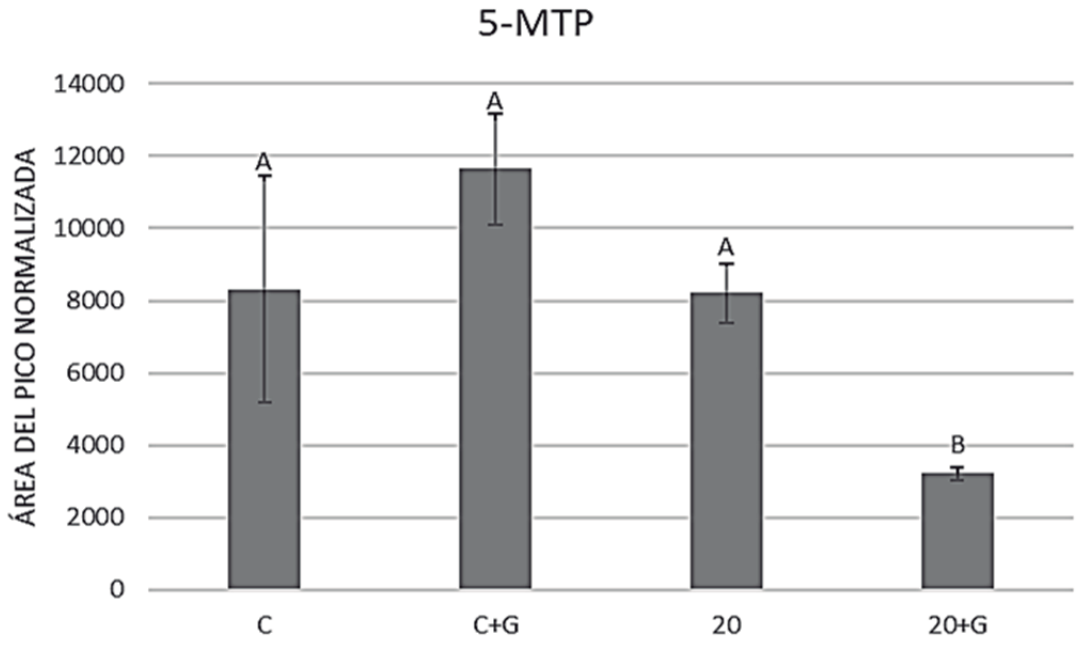


FIG. 15

B



C

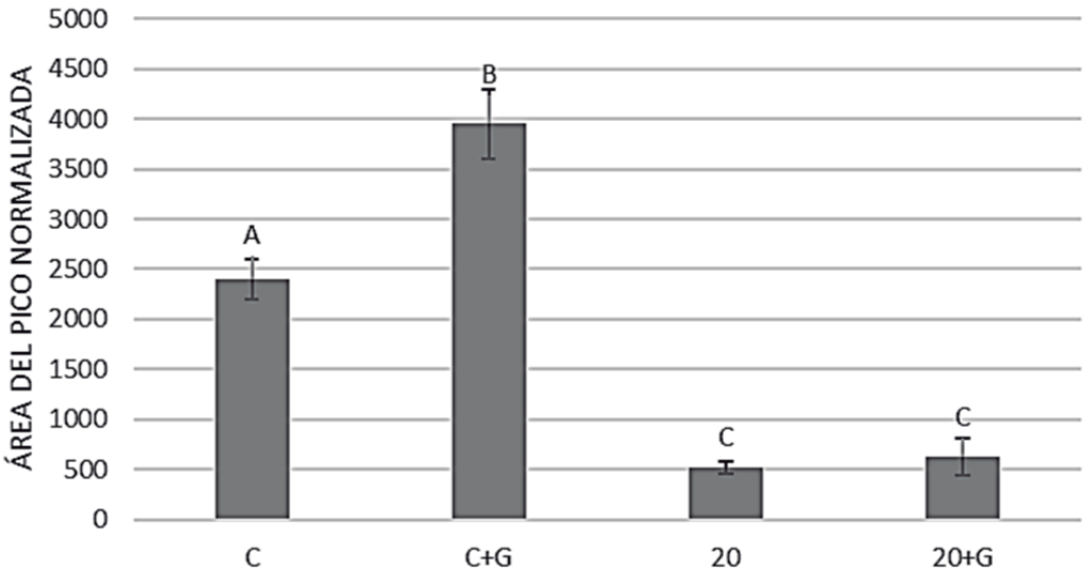
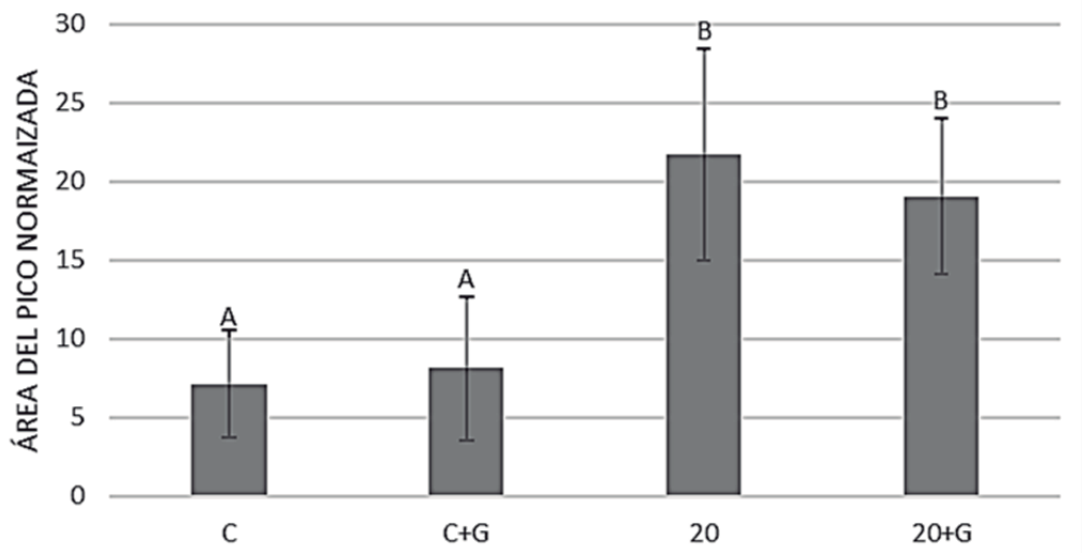


FIG. 15 (CONT.)

A


ÁREA DEL PICO NORMALIZADA
30
25
20
15
10
5
0
A
A
B
B
C
C+G
20
20+G

B

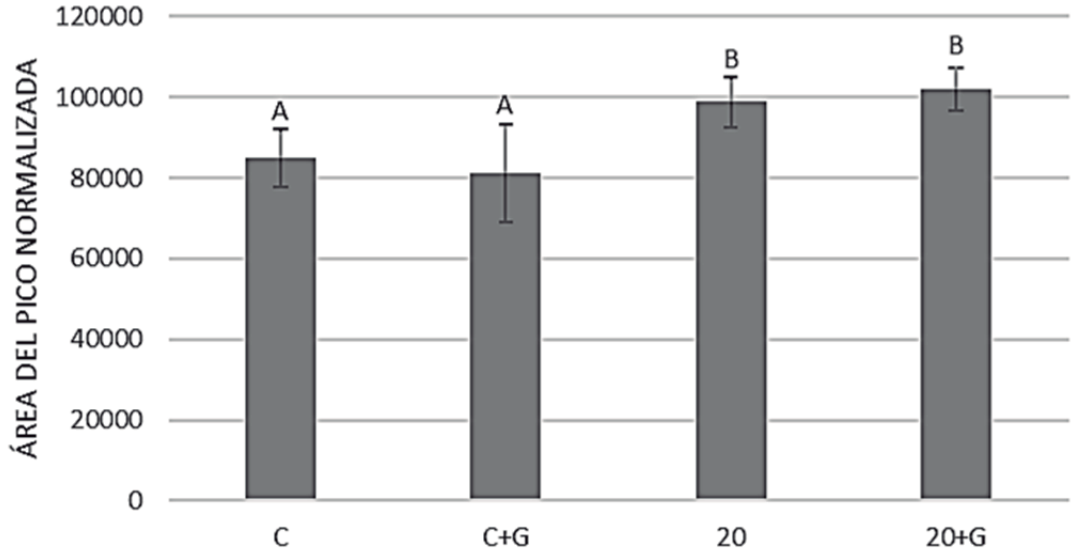

ÁREA DEL PICO NORMALIZADA
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
A
A
B
B
C
C+G
20
20+G

FIG. 16

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201830755

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 25.07.2018

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) **Documentos citados**	**Reivindicaciones afectadas**
X	NICOLAS, CARLOS, et al. Trichoderma genes in plants for stress tolerance-status and prospects. Plant Science, 2014, Vol. 228, Páginas 71-78. Página 76	1, 6-7, 10-11, 14 y 18
X	HERMOSA, ROSA, et al. The overexpression in *Arabidopsis thaliana* of a *Trichoderma harzianum* gene that modulates glucosidase activity, and enhances tolerance to salt and osmotic stresses. Journal of plant physiology, 2011, Vol. 168, Nº 11, Páginas 1295-1302. Páginas 1295, 1297 y 1300	1, 6-7, 14,10-11
A	AHMAD, PARVAIZ, et al. Role of *Trichoderma harzianum* in mitigating NaCl stress in Indian mustard (*Brassica juncea* L) through antioxidative defense system. Frontiers in plant science, 2015, Vol. 6, Páginas 868. Todo el documento.	1-23
A	WO 2017134664 A1 (RAMOT AT TEL-AVUV UNIVERSITY LTD.) 10/08/2017, Todo el documento.	1-23
A	HERMOSA, ROSA, et al. Plant-beneficial effects of Trichoderma and of its genes. Microbiology, 2012, Vol. 158, Nº 1, Páginas 17-25. Todo el documento.	1-23

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	**Examinador**	**Página**
01.02.2019	M. J. García Bueno	1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A01H17/00 (2006.01)
A01H6/20 (2018.01)
C12N15/63 (2006.01)

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

A01H, C12N

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, XPESP, NPL, BIOSIS, EMBL ALL, INTERNET.