



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 310 954**

⑫ Número de solicitud: 200601235

⑤ Int. Cl.:
C12N 9/16 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **12.05.2006**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2009**

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.01.2009

⑦ Solicitante/s:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 113
28006 Madrid, ES
Universidad Pública de Navarra**

⑦ Inventor/es: **Pozueta Romero, Javier;
Baroja Fernández, Edurne;
Muñoz Pérez, Francisco José;
Morán Zorzano, María Teresa y
Alonso Casajús, Nora**

⑦ Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

⑤ Título: **Plantas transgénicas con niveles alterados de almidón como resultado de la variación de la actividad de Nudix vegetales que hidrolizan ADPglucosa.**

⑤ Resumen:
Plantas transgénicas con niveles alterados de almidón como resultado de la variación de la actividad de Nudix vegetales que hidrolizan ADPglucosa. Por lo tanto, en esta invención se describe la obtención tanto de plantas transgénicas que sobre-expresan ASPPs vegetales y por lo tanto acumulan poco almidón, como de plantas transgénicas que presentan alto contenido en almidón como resultado de la reducción de la actividad ASPP vegetal.

ES 2 310 954 A1

DESCRIPCIÓN

Plantas transgénicas con niveles alterados de almidón como resultado de la variación de la actividad de Nudix vegetales que hidrolizan ADPglucosa.

Campo de la invención

La presente invención se engloba dentro del campo de la ingeniería genética. Concretamente la invención comprende la utilización de un producto enzimático vegetal de la familia Nudix, con actividad hidrolítica de ADP glucosa, para la obtención de plantas con niveles alterados de almidón.

Antecedentes de la invención

Tanto el glucógeno como el almidón constituyen formas de almacenamiento de carbohidratos. Concretamente, el glucógeno es la forma de almacenamiento de carbohidratos en animales y bacterias y el almidón lo es en las plantas. En plantas el almidón se acumula en grandes cantidades en órganos tales como semillas y tubérculos, y es un constituyente fundamental de la dieta del ser humano. Por otro lado, el almidón es utilizado frecuentemente en las industrias papelera, cosmética, farmacéutica y alimentaria, además de utilizarse como componente fundamental para la fabricación de plásticos biodegradables, pinturas de bajo impacto medioambiental y bioetanol.

El ADPglucosa (ADPG) es el precursor de la biosíntesis del almidón en plantas y del glucógeno bacteriano. Los mecanismos de degradación de este azúcar-nucleótido han sido poco estudiados, aunque se conoce que existen enzimas que hidrolizan ADPG tanto en plantas (Rodríguez-López, M., Baroja-Fernández, E., Zanduetta-Criado, A., Pozueta-Romero, J. (2000) "Adenosine diphosphate glucose pyrophosphatase: a plastidial phosphodiesterase that prevents starch biosynthesis". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97, 8705-8710; Baroja-Fernández, E., Zanduetta-Criado, A., Rodríguez-López, M., Akazawa, T., Pozueta-Romero, J. (2000) "Distinct isoforms of ADPglucose pyrophosphatase and ADP-glucose pyrophosphorylase occur in the suspension-cultured cells of sycamore" (*Acer pseudoplatanus* L.). *FEBS Lett.* 480, 277-282; PCT/ES01/00021; PCT: ES03/00363) como en bacterias (Moreno-Bruna, B., Baroja-Fernández, E., Muñoz, F.J., Bastarrica-Berasategui, A., Zanduetta-Criado, A., Rodríguez-López, M., Lasa, I., Akazawa, T., Pozueta-Romero, J. (2001) "Adenosine diphosphate sugar pyrophosphatase prevents glycogen biosynthesis in *Escherichia coli*" *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 8128-8132; PCT ES02/00174) sin embargo estas enzimas que hidrolizan ADPG pertenecen a una clasificación diferente al objeto de la presente invención. Además, se sabe que en bacterias existe un enzima hidrolítico de ADPG perteneciente a las "Nudix" hidrolasas (Bessman, M.J., Fricks, D.N. and O'Handley, S.F. (1996) The MutT proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile, widely distributed, housecleaning enzymes. *J. Biol. Chem.* 271: 25059-25062) que tiene acceso al pool de ADPG necesario para la biosíntesis del glucógeno. Aunque se conoce la existencia de enzimas hidrolíticos de ADPG vegetales pertenecientes a la familia de las nucleótido pirofosfatasas-fosfodiesterasas (E.C. 2.4.1.21) (Francisco José Muñoz Pérez, Milagros Rodríguez López, Edurne Baroja Fernández, Javier Pozueta Romero, Toshiaki Mitsui, Yohei Nanjo (2003) "Plant Nucleotide sugar pyrophosphatase/phosphodiesterase (NPPase), Method of production, use in the manufacture of testing devices and its application in the production of transgenic plants", PCT/ES03/00363), todavía no se han descrito Nudix vegetales que hidrolizan ADPG. La identificación de Nudix vegetales que controlen el flujo metabólico hacia la biosíntesis del almidón mediante la hidrólisis del ADPG permitirá obtener plantas genéticamente modificadas con niveles alterados de almidón tras la alteración de la expresión de genes propios de la planta.

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

En la presente invención se describe por primera vez la aplicación del producto enzimático de origen vegetal denominado ASPP (Adenosina Difosfato Azúcar Pirofosfatasa), (EC 3.6.1.21), perteneciente a la familia de enzimas Nudix hidrolasas y con actividad hidrolítica de ADPG, en la consecución de plantas transgénicas con niveles alterados de almidón.

Así, por un lado la invención describe la producción de plantas transgénicas que sobre-expresan ASPP, de origen vegetal, las cuales, al igual que ocurre con las plantas que sobre-expresan ASPP de origen bacteriano (Baroja-Fernández, E., Muñoz, F.J., Zanduetta-Criado, A., Morán-Zorzano, M.T., Viale, A.M., Etxeberria, E., Alonso-Casajús, N., Pozueta-Romero, J. (2004) "Most of ADPglucose linked to starch biosynthesis occurs outside the chloroplast in source leaves". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 13080-13085; PCT/ES02/00174), acumulan poco almidón. Teniendo en cuenta la sensibilidad social y el rechazo existente ante las plantas que expresan genes bacterianos o víricos, esta invención supone un avance ya que la alteración de los niveles de almidón son debidos a la variación de la expresión de un gen existente en la planta.

Además, otro objetivo de la invención es la obtención de plantas con alto contenido en almidón tras reducir o anular la actividad endógena ASPP. Al igual que ocurre con las bacterias con baja actividad ASPP, estas plantas poseen altos niveles de almidón.

Descripción de las figuras

Figura 1

5 Dendrograma de secuencias aminoacídicas “Nudix” de *Arabidopsis thaliana* y de *E. coli* (GenBank accession number AJ298136), *H. influenzae* (NP_438560), *Homo sapiens* (NM_016918) y *Mus musculus* (NM_014142). El dendrograma se obtuvo con el programa MegAlign (DNASStar, Madison, WI, USA). Las áreas sombreadas incluyen secuencias de *Arabidopsis* incluidas dentro del grupo ASPP.

10 Figura 2

Comparación de secuencias aminoacídicas entre AtASPP y secuencias de arroz y patata (GenBank accession number Q9SNS9 and POADP80, respectivamente). El motivo Nudix está sombreado.

15 Figura 3

Etapas de construcción del plásmido pAtASPP.

Figura 4

20 Etapas de construcción del plásmido pStASPP.

Figura 5

25 Etapas de construcción del plásmido pET-AtASPP.

Figura 6

Etapas de construcción del plásmido pET-StASPP

30 Figura 7

Etapas de construcción del plásmido p35S-AtASPP-NOS.

Figura 8

35 Etapas de construcción del plásmido pBIN35S-AtASPP-NOS.

Figura 9

40 Etapas de construcción del plásmido pDONR/Zeo-StASPP.

Figura 10

45 Etapas de construcción del plásmido pK2GW7,0-StASPP.

Figura 11

50 Actividad hidrolítica de ADPG (A) y contenido en glucógeno (B) en bacterias transformadas con pET-28c(+) y con pET-StASPP.

Figura 12

55 Actividad hidrolítica de ADPG (A), contenido en almidón (B) y ADPG (C) en hojas de *Arabidopsis* y en diferentes clones de plantas transgénicas de *Arabidopsis* (8, 5, 3, 7) que sobre-expresan *At4g11980* tras haber sido transformadas haciendo uso de la cepa DSM 18035.

Figura 13

60 Actividad hidrolítica de ADPG (A), contenido en almidón (B) y ADPG (C) en hojas de patata, y en diferentes clones de plantas transgénicas de patata (7,6,2) que sobre expresan POADP80 tras haber sido transformadas haciendo uso de la cepa DSM 18036.

Descripción detallada de la invención

65 *Obtención de cDNAs que codifican para ASPPs vegetales*

Las ASPPs de *Arabidopsis* (AtASPP) (SEQ ID NO: 3), patata (StASPP) (SEQ ID NO: 7) y arroz (OsASPP) (SEQ ID NO: 11) están codificadas por *At4g11980* (SEQ ID NO: 4) (EMBL: AJ748742), POADP80 (SEQ ID NO: 8)

(EMBL: AM180509) y Q9SNS9 (SEQ ID NO: 12), respectivamente. Estas secuencias tienen función desconocida pero fueron identificadas tras observar que presentan cierta homología con ASPPs de origen bacteriano y animal (Figura 1 y Figura 2). El conocimiento de las secuencias nucleotídicas de *At4g11980* (SEQ ID NO: 4), POADP80 (SEQ ID NO: 8) y Q9SNS9 (SEQ ID NO: 12) permitió la creación de cebadores específicos para amplificar por RT-PCR cDNAs completos que codifican para AtASPP, StASPP y OsASPP a partir de RNA total de hojas de *Arabidopsis*, patata y arroz, respectivamente. En el caso concreto de *Arabidopsis* y patata, los cDNAs se clonaron en el vector pGemT-easy (Promega), dando lugar a los plásmidos pAtASPP (Figura 3) y pStASPP (Figura 4). Los fragmentos amplificados se clonaron en el vector pET28c(+) (Novagen), dando lugar a los plásmidos pET-AtASPP (Figura 5) y pET-StASPP (Figura 6), respectivamente.

Obtención de ASPPs vegetales recombinantes

pET-AtASPP y pET-StASPP fueron introducidos por electroporación en *E. coli* BL21(DE3). La sobre-expresión de AtASPP y StASPP tuvo lugar de manera independiente mediante la adición de 1 mM isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) en 100 ml de cultivo celular. Tras seis horas de cultivo inducido se recogieron las bacterias y se resuspendieron en 6 ml de "binding buffer" (Novagen, His-bind purification kits), se sonicaron y se centrifugaron a 10.000 g durante diez minutos. Los sobrenadantes que contienen las ASPPs recombinantes con una cola de histidinas se hicieron pasar a través por una columna de afinidad del kit de purificación de proteínas "His-bind" de Novagen. Siguiendo las instrucciones del kit se eluyeron AtASPP y StASPP recombinantes con 6 ml del tampón de elución recomendado.

Identificación del producto con actividad enzimática ASPP vegetal

El producto enzimático ASPP vegetal, se identificó mediante los siguientes patrones funcionales:

- Es una ASPP (EC 3.6.1.21) que cataliza la hidrólisis del ADPG en cantidades equimolares de G1P y AMP.
- Además del ADPG, reconoce ADPmanosa y ADPribosa, pero no reconoce otros azúcares-nucleótidos tales como UDPglucosa, GDPmanosa, UDPglucorónico, etc. Tampoco reconoce nucleótidos tales como 5'-fosfosulfato, ATP, ADP, UTP, GTP ni el sustrato artificial bis-paranitrofenil-fosfato utilizado para la caracterización de fosfodiesterasas.
- No hidroliza moléculas con enlaces fosfomonoéster tales como la G1P, G6P, AMP, 3-fosfoglicerato, y otras similares. Tampoco hidroliza AMP cíclico, ni ácidos nucleicos de larga cadena, tales como ADN o ARN.

Obtención de plantas transgénicas que sobre-expresan ASPPs vegetales

Para la sobre-expresión de AtASPP, pET-AtASPP fue digerido secuencialmente con los enzimas *XhoI*, T4 DNA polimerasa y *NcoI*. El fragmento liberado (*At4g11980*) fue clonado en los sitios *NcoI/SmaI* de p35S-NOS (Baroja-Fernández, E., Muñoz, F.J., Zanduetta-Criado, A., Moran-Zorzano, M.T., Viale, A.M., Alonso-Casajus, N., Pozueta-Romero, J. (2004) Most of ADP-glucose linked to starch biosynthesis occurs outside the chloroplast in source leaves. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 13080-13085) dando lugar a p35S-AtASPP-NOS (Figura 7), el cual posee el promotor constitutivo 35S, *At4g11980* y el terminador NOS. p35S-AtASPP-NOS fue digerido secuencialmente con los enzimas *HindIII* y *EcoRI* y se clonó dentro del plásmido binario pBIN 20 (Hennegan, K., Danna, K.J. (1998) pBIN20: An improved binary vector for Agrobacterium-mediated transformation. Plant Molecular Biology Reporter 16, 129-131) que previamente había sido digerido secuencialmente con los enzimas *HindIII* y *EcoRI*. El plásmido así obtenido se designó con el nombre de pBIN35S-AtASPP-NOS (Figura 8).

Para la sobre-expresión de StASPP, se clonó en pDONR/Zeo (Invitrogen) un cDNA completo que codifica para StASPP, dando lugar al plásmido pDONR/Zeo-StASPP (Figura 9). A partir de pDONR/Zeo-StASPP y pK2GW7,0 (Karimi, M., Inze, D., Depicker, A (2002) GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. Trends Plant Sci. 7: 193-195) se obtuvo el plásmido pK2GW7,0-StASPP (Figura 10), el cual posee el promotor constitutivo 35S, un cDNA completo de POADP80 y el terminador 35S.

pBIN35S-AtASPP-NOS y pK2GW7,0-StASPP fueron introducidos en *Agrobacterium tumefaciens*, dando lugar a las cepas DSM 18035 y DSM 18036, respectivamente, las cuales fueron utilizadas para transformar especies tales como *Arabidopsis*, patata, maíz y arroz. DSM 18035 y DSM 18036 fueron depositadas el 10.3.2006 en el "German National Resource Centre for Biological Material", sita en el DMSZ, Mascheroder Weg 1b D-3 8124 (Braunschweig, Alemania).

Obtención de plantas transgénicas deficientes en ASPPs vegetales

Plantas knockouts de *At4g11980* de *Arabidopsis thaliana* se obtuvieron del "European Arabidopsis Stock Centre" Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Check, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Denn, H., Gerecht, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., Ecker, J.R. (2003) Genome-Wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. Science 301, 653-657).

Determinación del contenido en azúcares solubles y almidón

Los azúcares solubles se extrajeron según (Heim, U., Weber, H., Baumlein, H., Wobus, U. (1993) "A sucrose-synthase gene of *V. Faba* L. Expression pattern in developing seeds in relation to starch synthesis and metabolic regulation" Planta 191, 394-401). Glucosa, sacarosa, fructosa, glucosa-1-fosfato, glucosa-6-fosfato y ADPG fueron determinados haciendo uso de un HPLC ajustado a una columna CarboPac PA10 y un detector amperométrico DX500 (Baroja-Fernández, E., Muñoz, F.J., Saikusa, T., Rodríguez-Lopez, M., Akazawa, T., Pozueta-Romero, J. (2003) Sucrose synthase catalyzes the *de novo* production of ADPglucose linked to starch biosynthesis in heterotrophic tissues of plants, Plant Cell Physiol. 44, 500-509). Además, el ADPG fue determinado haciendo uso de un sistema de HPLC ajustado a una columna Partisil-10-SAX (Muñoz, F.J., Baroja-Fernández, E., Morán-Zorzano, M.T., Viale, A.M., Etxeberria, E., Alonso-Casajús, N., Pozueta-Romero, J. (2005) Sucrose synthase controls the intracellular levels of ADPglucose linked to transitory starch biosynthesis in source leaves. Plant Cell Physiol. 46, 1366-1376). Para confirmar las medidas de ADPG, éste fue eluido de las columnas Partisil-10-SAX y CarboPac PA10, enzimáticamente hidrolizado con ASPP de *E. coli* purificada y se midió su conversión en AMP y glucosa-1-fosfato. El almidón se midió haciendo uso de kits comerciales que se basan fundamentalmente en la acción de la amiloglucosidasa sobre las unidades de glucosa del almidón y posterior detección espectrofotométrica del NADH producido tras una reacción enzimática acoplada (Rodríguez-López, M., Baroja-Fernández, E., Zanduetta-Criado, A., Pozueta-Romero, J. (2000) "Adenosine diphosphate glucose pyrophosphatase: a plastidial phosphodiesterase that prevents starch biosynthesis" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 8705-8710).

Así, en un primer aspecto la presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de plantas transgénicas, las cuales presentan una expresión alterada, bien sea una sobre-expresión o una infra-expresión, del producto enzimático de origen vegetal ASPP en el interior de sus células con respecto a la expresión de dicho enzima en la planta silvestre. El procedimiento comprende la transformación de la planta silvestre con un vector que comprenda alguna de las siguientes secuencias de ADN:

- a) Secuencias de cADN que codifiquen para los polipéptidos mostrados en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7 ó SEQ ID NO: 11;
- b) Secuencias de cADN representadas por SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8 ó SEQ ID NO: 12;
- c) Secuencias de ADN que difieran de las definidas en "a" o "b" debido a la degeneración del código genético.

En este aspecto, se considera sobre-expresión del producto enzimático de origen vegetal ASPP cuando se consigue una expresión mayor o igual al doble de la expresión conseguida en la planta silvestre (wt). Por otro lado se considera infra-expresión cuando se consigue una expresión menor o igual al 80% de la expresión conseguida en la planta silvestre (wt).

En una realización preferida de la presente invención el procedimiento de transformación de la planta silvestre arriba reseñado se lleva a cabo utilizando como vector de transformación *Agrobacterium tumefaciens*.

En una realización aún más preferida de la presente invención el vector de transformación utilizado, en el procedimiento para la obtención de plantas transgénicas, es *Agrobacterium tumefaciens* concretamente las cepas DSM 18035 o DSM 18036.

En un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un producto enzimático de origen vegetal con actividad ASPP que contiene una secuencia aminoacídica seleccionada entre SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7 ó SEQ ID NO: 11 y que está codificado por alguna de las secuencias nucleotídicas SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8 ó SEQ ID NO: 12 u otra secuencia derivada de éstas por degeneración del código genético.

En una realización preferida la presente invención se refiere a un producto enzimático de origen vegetal con actividad ASPP que contiene una secuencia aminoacídica seleccionada entre SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7 ó SEQ ID NO: 11 y que está codificado por alguna de las secuencias nucleotídicas SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8 ó SEQ ID NO: 12 u otra secuencia derivada de éstas por degeneración del código genético, caracterizado por no hidrolizar moléculas del grupo comprendido por: G1P, G6P, AMP, 3-fosfoglicerato, AMPc, UDPglucosa, GDPglucosa, adenosina 5'-fosfosulfato, bis-p-nitrofenil-fosfato o ácidos nucleicos de larga cadena.

En otra realización preferida la presente invención se refiere a un producto enzimático de origen vegetal con actividad ASPP que contiene una secuencia aminoacídica seleccionada entre SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7 ó SEQ ID NO: 11 y que está codificado por alguna de las secuencias nucleotídicas SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8 ó SEQ ID NO: 12 u otra secuencia derivada de éstas por degeneración del código genético, caracterizado por no hidrolizar moléculas del grupo comprendido por: G1P, G6P, AMP, 3-fosfoglicerato, AMPc, UDPglucosa, GDPglucosa, adenosina 5'-fosfosulfato, bis-p-nitrofenil-fosfato o ácidos nucleicos de larga cadena y por presentar un peso molecular aparente determinado por filtración en gel entre 70-75 kDa y que en gel desnaturizante migra como una proteína de entre 35-40 kDa.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la secuencia de cDNA seleccionada entre SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8 ó SEQ ID NO: 12, o cualquier otra secuencia derivada de éstas por degeneración del código genético,

o que pueda hibridar con alguna de ellas, en la obtención de plantas transgénicas que sobre-expresen o infra-expresen el producto enzimático de origen vegetal ASPP.

Otro aspecto de la invención se refiere a plantas transgénicas, caracterizadas por la sobre-expresión o la infra-expresión del producto enzimático de origen vegetal, ASPP, en el interior de sus células.

En una realización preferida de la presente invención se refiere a plantas transgénicas, caracterizadas por la sobre-expresión o la infra-expresión del producto enzimático de origen vegetal, ASPP, en el interior de sus células, donde dicha planta es del género *Arabidopsis*, preferentemente *Arabidopsis thaliana*.

En otra realización preferida de la presente invención se refiere a plantas transgénicas, caracterizadas por la sobre-expresión o la infra-expresión del producto enzimático de origen vegetal, ASPP, en el interior de sus células, donde dicha planta es del género *Solanum*, preferentemente *Solanum tuberosum*.

En otra realización preferida la presente invención se refiere a plantas transgénicas, caracterizadas por la sobre-expresión o la infra-expresión del producto enzimático de origen vegetal, ASPP, en el interior de sus células, donde dicha planta es del género *Nicotiana*, preferentemente *Nicotiana tabacum*.

En otra realización preferida la presente invención se refiere a plantas transgénicas, caracterizadas por la sobre-expresión o la infra-expresión del producto enzimático de origen vegetal, ASPP, en el interior de sus células, donde dicha planta es del género *Lycopersicon*, preferentemente *Lycopersicon sculentum*.

En otra realización preferida la presente invención se refiere a plantas transgénicas, caracterizadas por la sobre-expresión o la infra-expresión del producto enzimático de origen vegetal, ASPP, en el interior de sus células, donde dicha planta es del género *Oryza*, preferentemente *Oryza sativa*.

En otra realización preferida la presente invención se refiere a plantas transgénicas, caracterizadas por la sobre-expresión o la infra-expresión del producto enzimático de origen vegetal, ASPP, en el interior de sus células, donde dicha planta es *Zea mays*.

En otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de las plantas transgénicas arriba descritas, caracterizadas por la sobre-expresión del producto enzimático de origen vegetal ASPP en el interior de sus células, como alimento dietético o en la fabricación de productos dietéticos con bajo contenido en almidón.

A este respecto se considera bajo contenido en almidón cuando la planta transgénica presenta un contenido en almidón sustancialmente menor al contenido que presenta la planta silvestre (wt). En el caso concreto de *Arabidopsis* (figura 12) se considera bajo contenido en almidón cuando la planta transgénica presenta un contenido en almidón menor al 50% del contenido en almidón que presenta la planta silvestre (wt). En el caso de la patata (figura 13) se considera bajo contenido en almidón cuando la planta transgénica presenta un contenido en almidón menor al 70% del contenido en almidón que presenta la planta silvestre (wt). Estos valores tienen carácter meramente indicativo.

En un último aspecto de la presente invención se refiere al uso de las plantas transgénicas arriba mencionadas, caracterizadas por la infra-expresión del producto enzimático de origen vegetal, ASPP, en el interior de sus células, para la producción de almidón.

A continuación se procede a la exposición de los ejemplos. La exposición detallada de los modos de realización, ejemplos y de las figuras que siguen se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención.

Ejemplos de realización de la invención

Ejemplo 1

Obtención de cDNAs completos que codifican para AtASPP, StASPP y OsASPP

El conocimiento de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para AtASPP permitió la creación de dos cebadores específicos cuyas secuencias son, en sentido 5' - 3', SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. Haciendo uso de estos cebadores y de RNA de hojas de *arabidopsis* se amplificó por métodos convencionales de RT-PCR un cDNA completo de At4g11980, que se clonó en pGemT-easy (Promega). La secuencia nucleotídica del DNA amplificado y la secuencia aminoácídica deducida se representan en SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 3 respectivamente.

El conocimiento de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para StASPP permitió la creación de dos cebadores específicos cuyas secuencias son, en sentido 5' - 3', SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6. Haciendo uso de estos cebadores y de RNA de hojas de patata se amplificó por métodos convencionales de RT-PCR un cDNA completo de POADP80, que se introdujo en pGemT-easy. La secuencia nucleotídica del DNA amplificado y la secuencia aminoácídica deducida se representan en SEQ ID NO: 8 y SEQ IN NO: 7 respectivamente.

ES 2 310 954 A1

El conocimiento de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para OsASPP, permitió la creación de dos cebadores específicos cuyas secuencias son, en sentido 5' - 3', SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10. Haciendo uso de estos cebadores y de RNA de hojas de arroz se amplificó por métodos convencionales de RT-PCR un cDNA completo de Q9SNS9, que se introdujo en pGemT-easy. La secuencia nucleotídica del DNA y la secuencia aminoacídica deducida se representan en SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 11 respectivamente.

En el caso concreto de Arabidopsis y patata, los cDNAs se clonaron en el vector pGemT-easy (Promega), dando lugar a los plásmidos pAtASPP (Figura 3) y pStASPP (Figura 4). Los fragmentos amplificados se donaron en el vector pET28c(+) (Novagen), dando lugar a los plásmidos pET-AtASPP (Figura 5) y pET-StASPP (Figura 6), respectivamente.

Ejemplo 2

Obtención de ASPPs vegetales recombinantes

Tras seis horas de cultivo en presencia de 1 mM IPTG, las bacterias de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con pET-AtASPP o pET-StASPP se recogieron, se resuspendieron en el tampón "His-bind" (Novagen) de purificación de proteínas, y se lisaron mediante sonicación. Los sobrenadantes obtenidos tras la centrifugación de los lisados se pasaron por una columna de afinidad del kit de purificación de proteínas "His-bind" de Novagen. Las bacterias transformadas con pET-StASPP poseen una actividad hidrolítica de ADPG elevada y un bajo contenido en glucógeno (Figura 11).

Ejemplo 3

Identificación del producto con actividad enzimática obtenido

El producto así obtenido cumple las siguientes características:

- La ASPP vegetal es una pirofosfatasa que cataliza la hidrólisis del ADPG produciendo cantidades equimolares de G1P y AMP.
- Además del ADPG, también hidroliza ADPribosa y ADPmanosa.
- No hidroliza moléculas con enlaces fosfomonoéster tales como la G1P, G6P, AMP, 3-fosfoglicerato, y otras similares. Tampoco hidrolizan AMP cíclico ni ácidos nucleicos de larga cadena tales como ADN y ARN.
- Requiere magnesio para su funcionamiento óptimo.
- No hidroliza bis-para-nitrofenil-fosfato.
- Peso molecular aparente de la proteína purificada en geles desnaturizantes, en torno a 35-40 kDa.
- Peso molecular aparente medido por filtración en gel, en torno a 70-75 kDa, indicando que posiblemente se trate de un homodímero.

Ejemplo 4

Obtención de plantas transgénicas que sobre expresan ASPPs vegetales

Utilizando las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* DSM 18035 y DSM 18036 se obtuvieron plantas de arabis (*Arabidopsis thaliana*) y de patata (*Solanum tuberosum*) que sobreexpresan AtASPP (*At4g11980*) y StASPP (POADP80), respectivamente. Estas plantas se caracterizan por poseer una actividad ASPP en todos los órganos analizados (raíz, hoja, frutos, tubérculos y tallo) 6-20 veces superior a la ASPP endógena existente en las plantas no transformadas (Figuras 12A y 13A). Además, presentaron las siguientes características fenotípicas:

1. Bajo contenido en almidón (Figuras 12B y 13B).
2. Bajo contenido en ADPG (Figuras 12C y 13C).
3. Niveles normales de azúcares solubles totales (Tabla 1).

La morfología externa de estas plantas no es aberrante, tras ser comparada con la de las plantas no transformadas.

ES 2 310 954 A1

TABLA 1

Contenido en azúcares (en nanomoles/gramo de peso fresco) en hojas de *Arabidopsis* no transformadas y en 4 clones independientes de plantas transformadas con la construcción 35S-AtASPP-NOS

	Control	35S-AtASPP-NOS			
	"wild type"	Línea 3	Línea 5	Línea 7	Línea 8
Glucosa	234 ± 31	183 ± 21	231 ± 23	296 ± 25	295 ± 26
Fructosa	2,843 ± 243	4,812 ± 367	3,501 ± 217	3,727 ± 310	3,717 ± 258
Sacarosa	1,175 ± 27	602 ± 28	855 ± 36	450 ± 38	876 ± 25
Azúcares solubles totales	4,252 ± 431	5,597 ± 798	4,633 ± 453	3,473 ± 399	3,888 ± 435
Glucosa-6-fosfato	299 ± 15	253 ± 10	251 ± 21	217 ± 8	207 ± 13
Glucosa-1-fosfato	63.9 ± 5.1	87.3 ± 2.1	98.5 ± 7.5	93.4 ± 9.1	107.6 ± 5.5

Ejemplo 5

Plantas con alto contenido en almidón como resultado de la baja actividad ASPP vegetal

Plantas knockouts de *At4g11980* de *Arabidopsis thaliana* poseen una actividad ASPP inferior a la observada en plantas control. Además, estas plantas presentaron las siguientes características:

1. Alto contenido en almidón.
2. Niveles normales de azúcares solubles totales.

La morfología externa de las plantas deficitarias en AtASPP no es aberrante, tras ser comparada con la de las plantas control.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de plantas transgénicas, que comprende la transformación de la planta silvestre con un vector que comprenda alguna de las siguientes secuencias de ADN:

- a) Secuencias de cADN que codifiquen para alguno de los polipéptidos mostrados en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7 ó SEQ ID NO: 11;
- b) Secuencias de cADN representadas por SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8 ó SEQ ID NO: 12;
- c) Secuencias de ADN que difieran de las definidas en “a” o “b” debido a la degeneración del código genético.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde el vector de transformación utilizado es *Agrobacterium tumefaciens*.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque el vector de transformación utilizado se selecciona entre la cepa DSM 18035, que ha sido transformada con la construcción génica pBIN35S-AtASPP-NOS que comprende la SEQ ID NO: 4, y la cepa DSM 18036, que ha sido transformada con la construcción génica pk2GW7,0-StASPP que comprende la cepa SEQ ID NO: 8.

4. Producto enzimático de origen vegetal con actividad ASPP que contiene una secuencia aminoacídica seleccionada entre SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7 ó SEQ ID NO: 11 o que está codificado por alguna de las secuencias nucleotídicas: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8 ó SEQ ID NO: 12 u otra secuencia nucleotídica derivada de éstas por degeneración del código genético.

5. Producto enzimático origen vegetal según la reivindicación 4, **caracterizado** por no hidrolizar moléculas del grupo comprendido por: G1P, G6P, AMP, 3-fosfoglicerato, AMPc, UDPglucosa, GDPglucosa, adenosina 5'-fosfosulfato, bis-p-nitrofenil-fosfato o ácidos nucleicos de larga cadena.

6. Producto enzimático origen vegetal según la reivindicación 4 ó 5, **caracterizado** por presentar un peso molecular aparente determinado por filtración en gel entre 70-75 kDa y que en gel desnaturalizante migra como una proteína de entre 35-40 kDa.

7. Uso de una secuencia de cDNA seleccionada entre SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8 ó SEQ ID NO: 12, o cualquier otra secuencia derivada de éstas por degeneración del código genético, en la obtención de plantas transgénicas que sobre-expresen o infra-expresen el producto enzimático de origen vegetal ASPP en el interior de sus células.

8. Plantas transgénicas, obtenibles según el procedimiento de las reivindicaciones 1-3, **caracterizadas** por la sobre-expresión de un producto enzimático de origen vegetal que contiene alguna de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7 ó SEQ ID NO: 11 en el interior de sus células.

9. Plantas transgénicas, obtenibles según el procedimiento de las reivindicaciones 1-3, **caracterizadas** por la infra-expresión de un producto enzimático de origen vegetal que contiene alguna de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7 ó SEQ ID NO: 11 en el interior de sus células.

10. Plantas transgénicas, según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, **caracterizadas** por ser del género *Arabidopsis*, preferentemente de la especie *Arabidopsis thaliana*.

11. Plantas transgénicas, según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, **caracterizadas** por ser del género *Solanum*, preferentemente de la especie *Solanum tuberosum*.

12. Plantas transgénicas, según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, **caracterizadas** por ser del género *Nicotiana*, preferentemente de la especie *Nicotiana tabacum*.

13. Plantas transgénicas, según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, **caracterizadas** por ser del género *Lycopersicon*, preferentemente de la especie *Lycopersicon esculentum*.

14. Plantas transgénicas, según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, **caracterizadas** por ser del género *Oryza*, preferentemente de la especie *Oryza sativa*.

15. Plantas transgénicas, según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, **caracterizada** por ser de la especie *Zea mays*.

16. Uso de las plantas transgénicas de las reivindicaciones 8 y 10-15, como alimento dietético, o en la fabricación de productos dietéticos, con bajo contenido en almidón.

17. Uso de las plantas transgénicas de las reivindicaciones 9-15, para la producción de almidón.

Figura 1

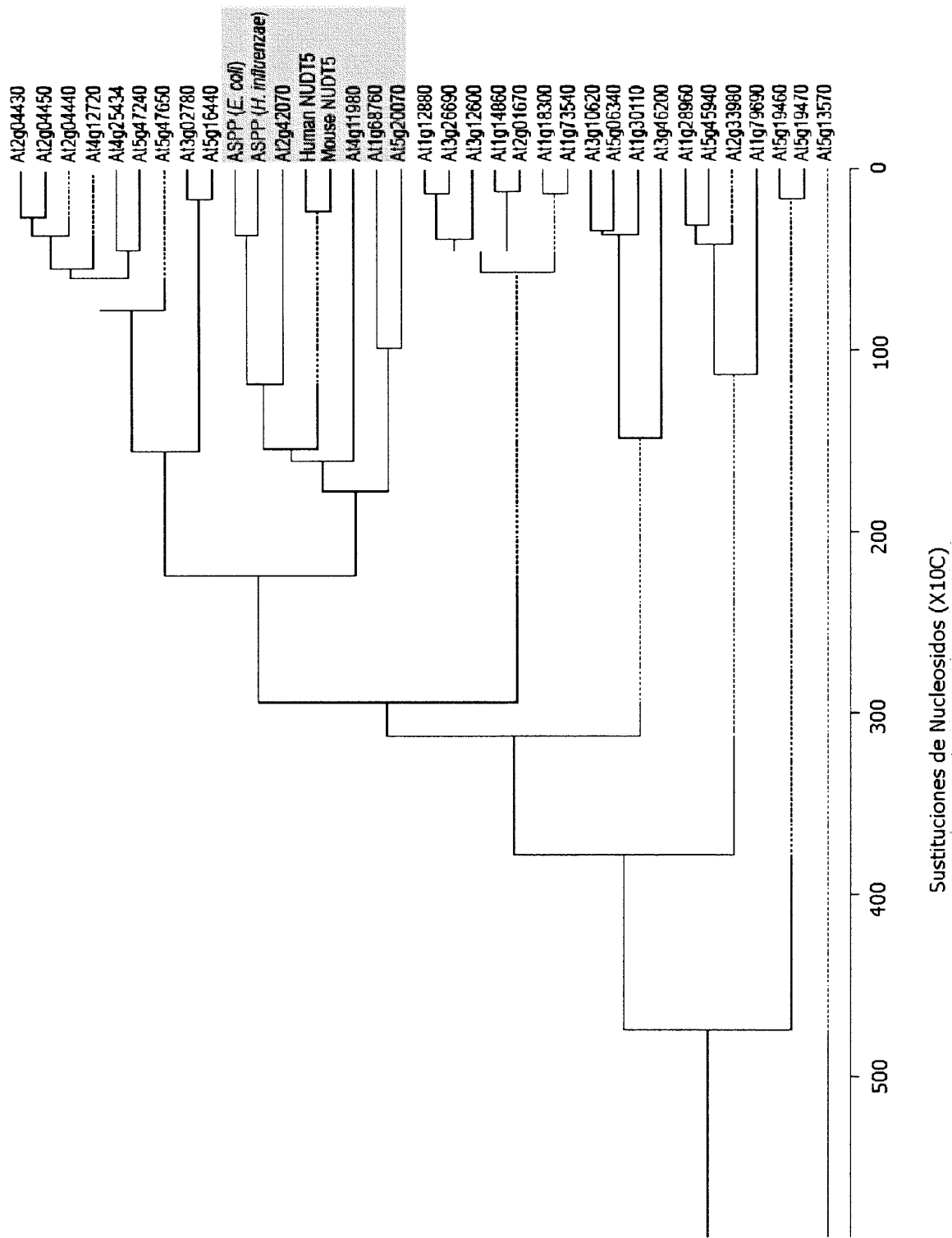


Figura 2

1	MA - - - - - GFTLLPSRL LAFPSRALPRRL	At4g11980
1	MAAAAAARQC LLGFRRAAPPLPLLSTRAPS	Q9SNS9
1	MRLTVSR - CGLPFVKP - LFEFPFSSSSSTL	POADP80
24	HHHHA KLILRC KMSSSSSSS - LTQSI TLP SQ	At4g11980
31	PAPSSRRGARMASSGDHAPQLSTAVAVPGA	Q9SNS9
29	WPRNC SG SF SVKMSTTTPPSRI TH I INLPTQ	POADP80
53	PNEPVLVSATAGISSSDFRDAIDSSSLFRNW	At4g11980
61	- GAPVRVVAAPGLTEADFTSAVESSSLFRQW	Q9SNS9
59	LDQPVSVVAAPGVSDTHFRNAIESSSLFKQW	POADP80
83	LRNLESEESGILADGSM T LKQVLIQGVDMFG	At4g11980
90	LKNLQEEKGVLT YGR LNL RQILIQGVDMFG	Q9SNS9
89	LKNIQTETGLLANGAMS LKQVLIQGVDMFG	POADP80
113	KRI GFLKFKADIFDKETGQKVPGIVFARGP	At4g11980
120	KRV GFVKFKADIIDEETKAKIPGIVFARGP	Q9SNS9
119	ERL GFLKFKADIIDKETGQKVPGIVFSRGP	POADP80
143	AVAVLILLES DGETYAVLTEQVRVPTGKIV	At4g11980
150	AVAVLILLES K GQTYAVLTEQVRVPVVGKFI	Q9SNS9
149	AVAVLILL DSEGETYAVLTEQVRVPVGR LI	POADP80
	GxxxxxExxx - xxxxEUxEE xGU	
173	LELPA GMLDDDDKGD FVGTA VREVEEEIGIK	At4g11980
180	LELPA GMLDDEKGD FVGTA VREVEEETGIK	Q9SNS9
179	LELPA GMLDDDQGD FAGTA VREVEEETGIH	POADP80
203	LKKEDMVDLTAF LDPSTGYRI F P S P G G C D E	At4g11980
210	LNLED MIDLTAL LNPDTGCRML P S P G G C D E	Q9SNS9
209	LNAHDMVDLTAF L DASTGGRV F P S P G G C D E	POADP80
233	EMS VFLYRGQVEKETIRQLQGKETGLREHG	At4g11980
240	EIGLFLYRGH ADEDTLRALQGKETGLRDHG	Q9SNS9
239	EMSLFLYRG N V SKEKIQQQLQGKETGLRDHG	POADP80
263	EFIKVR LIPYRELWRKTADAKVLM SIGLYE	At4g11980
270	ELIKLRVVPYSQLWRATADAKALSAIALYE	Q9SNS9
269	ELIKVHVVPYDKLWRATADAKALT AICLYE	POADP80
293	MAOREGLVSSQRLKPNS	At4g11980
300	MAKREGLLPS SPTTSRRRGSSSSANL	Q9SNS9
299	MAKR DGLLP	POADP80

Figura 3

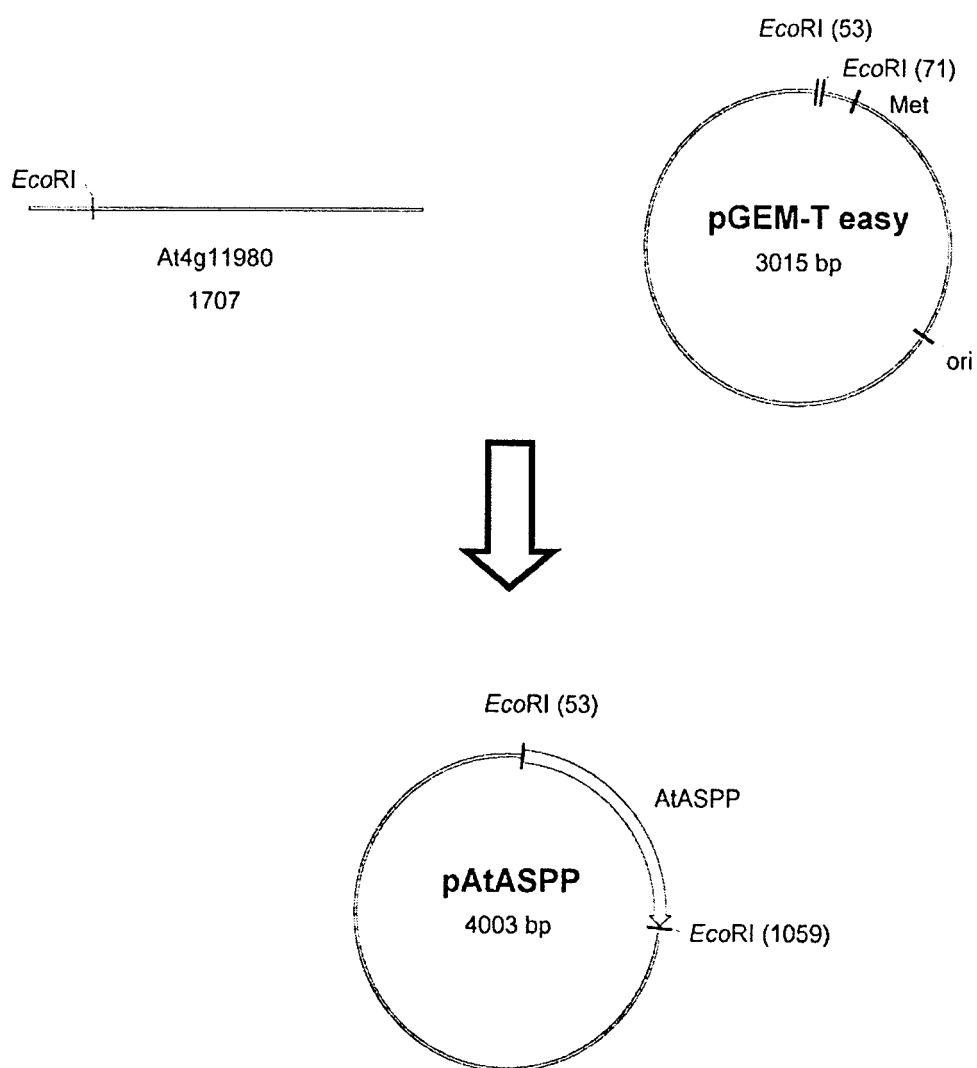


Figura 4

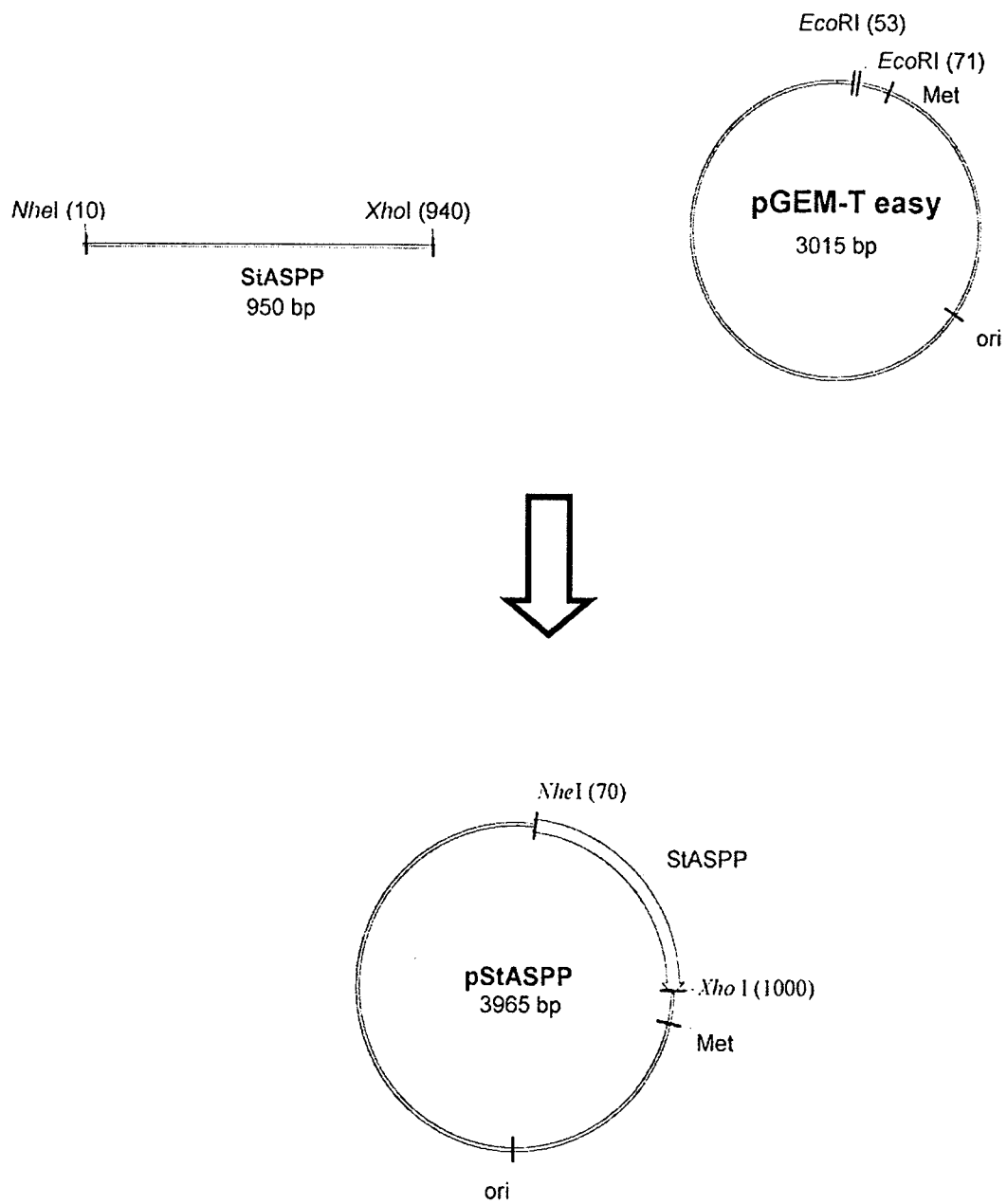


Figura 5

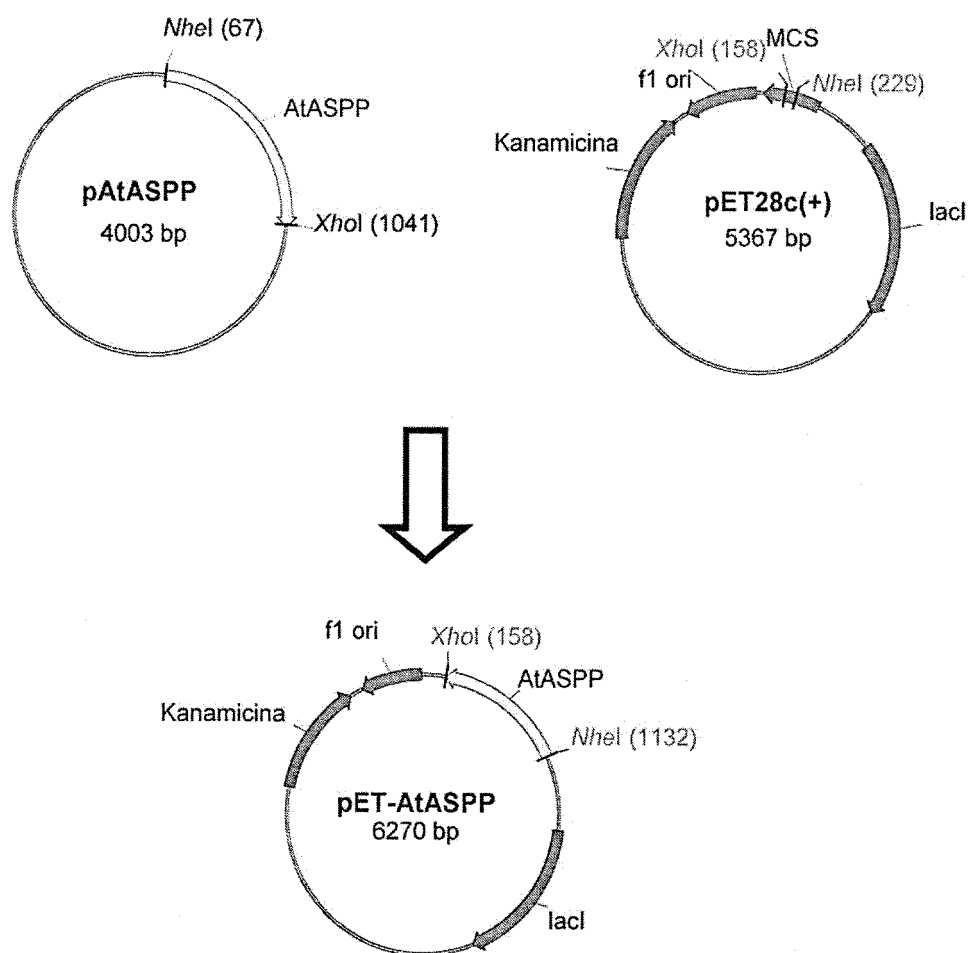


Figura 6

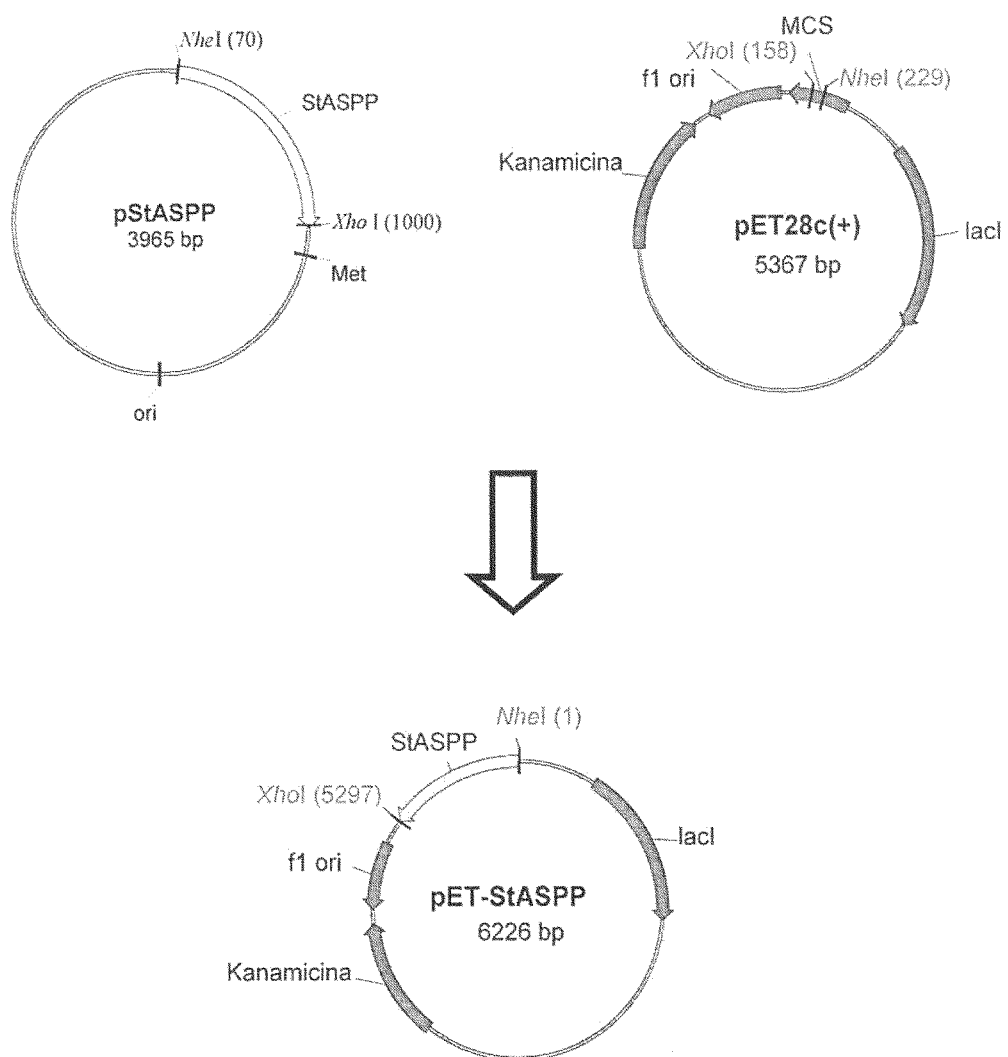


Figura 7

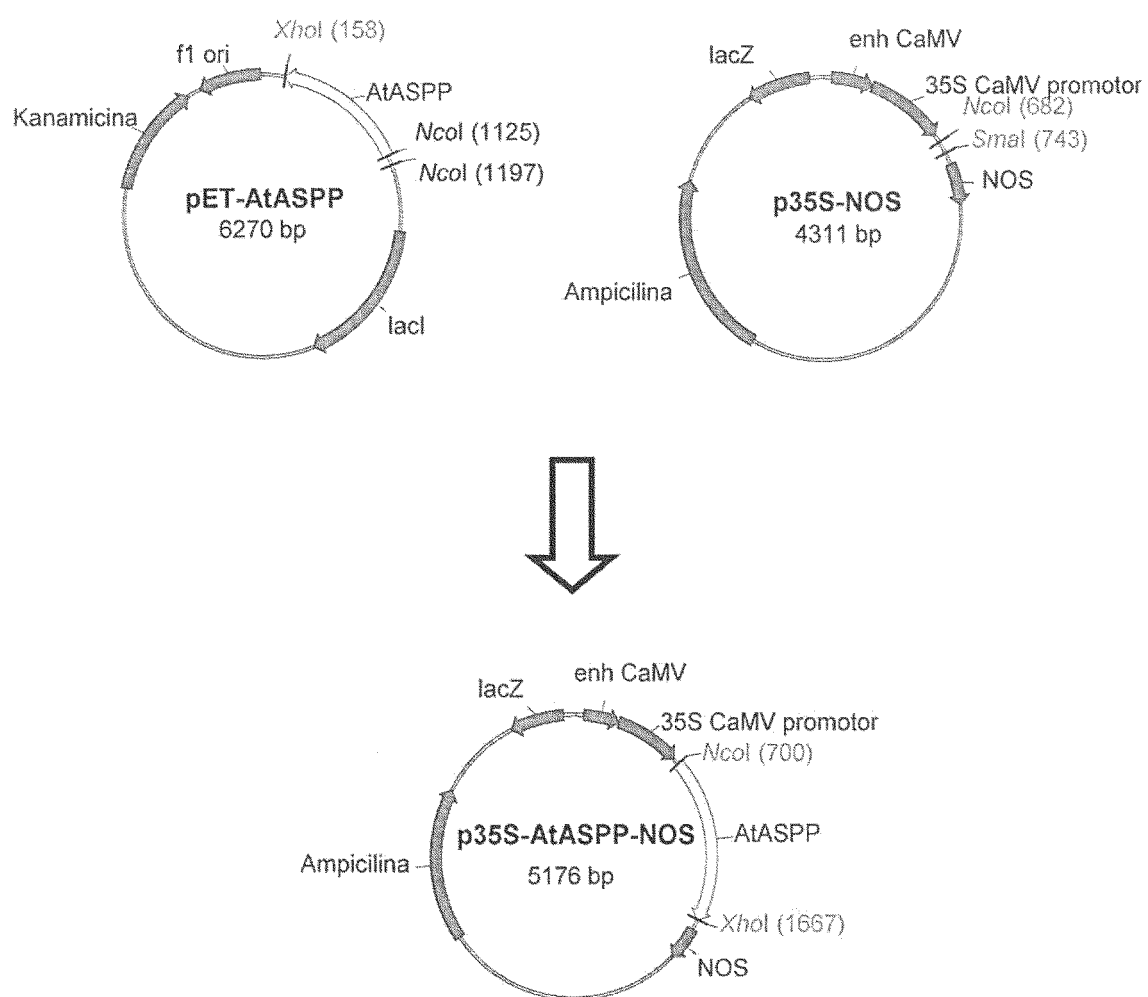


Figura 8

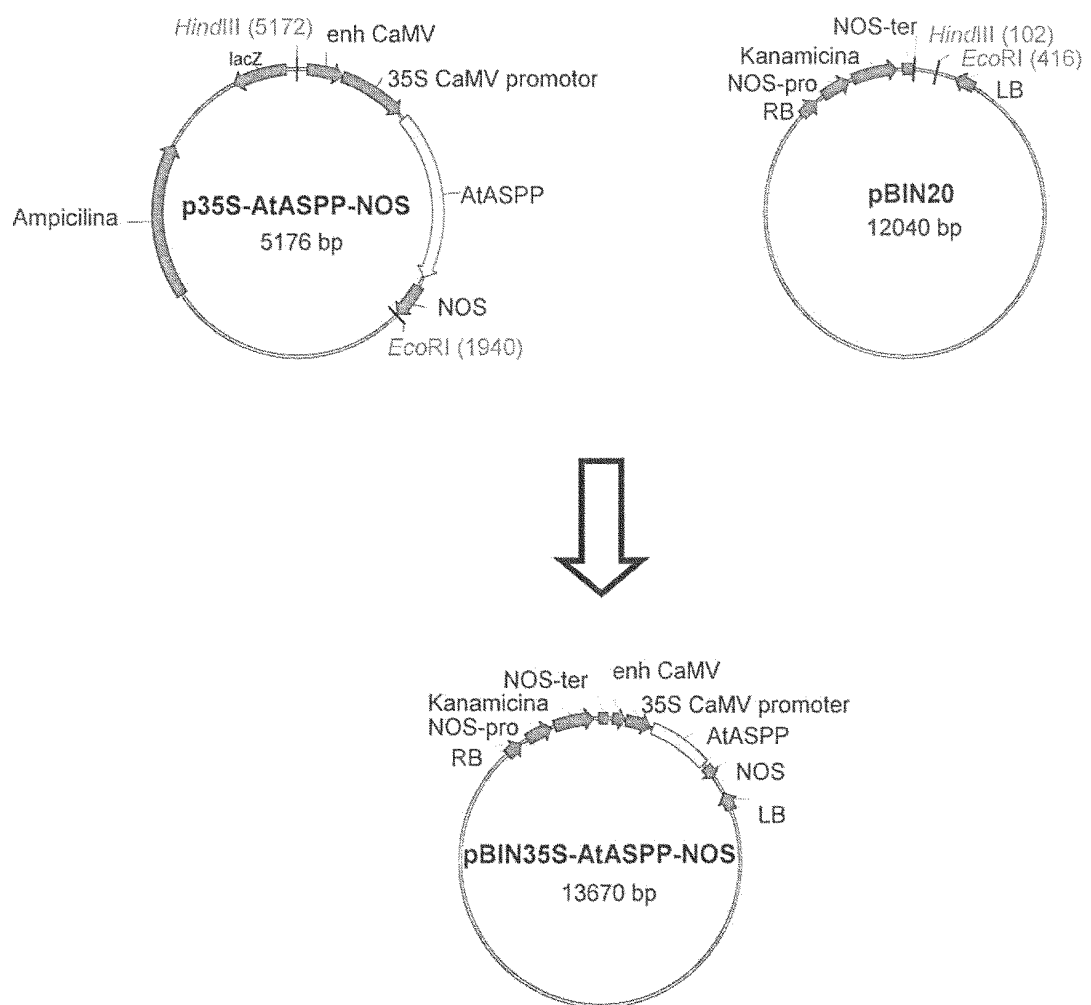


Figura 9

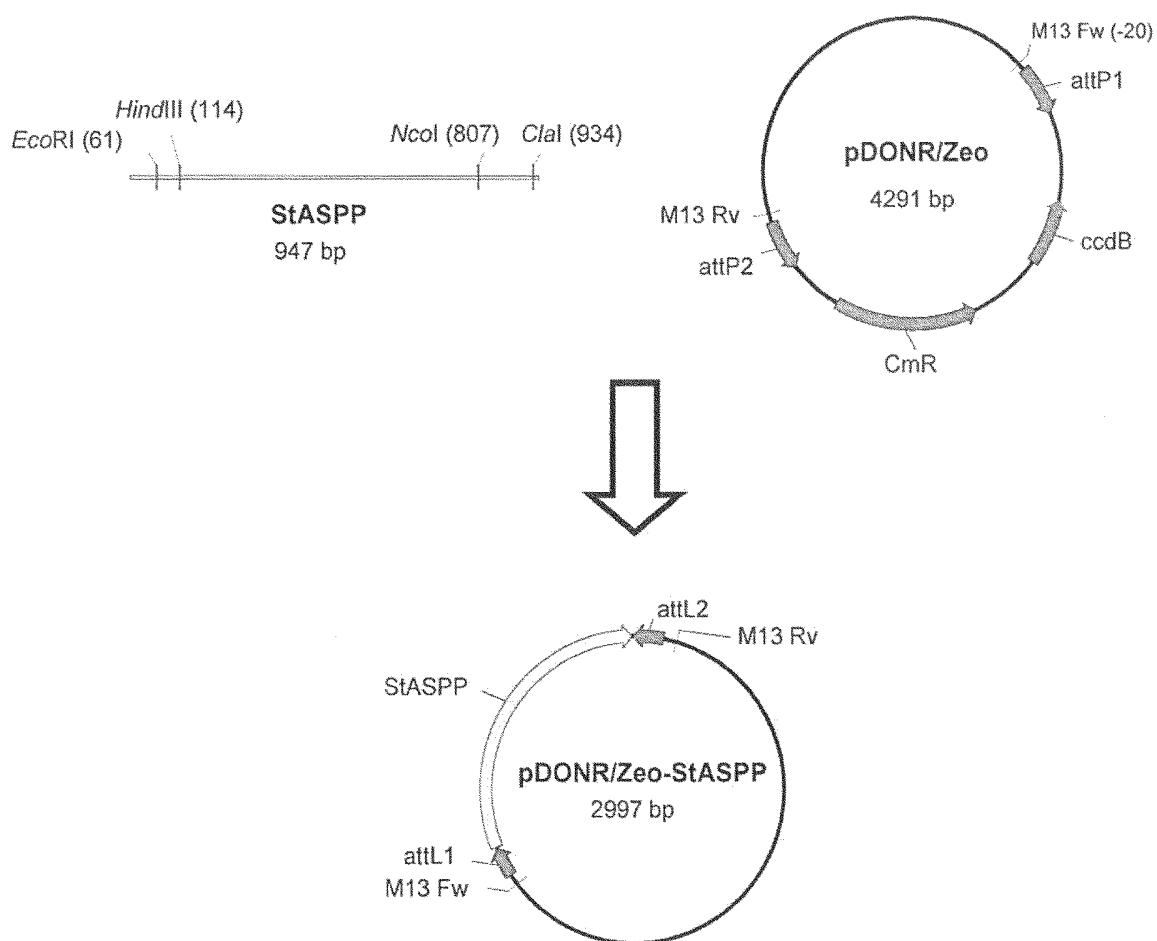


Figura 10

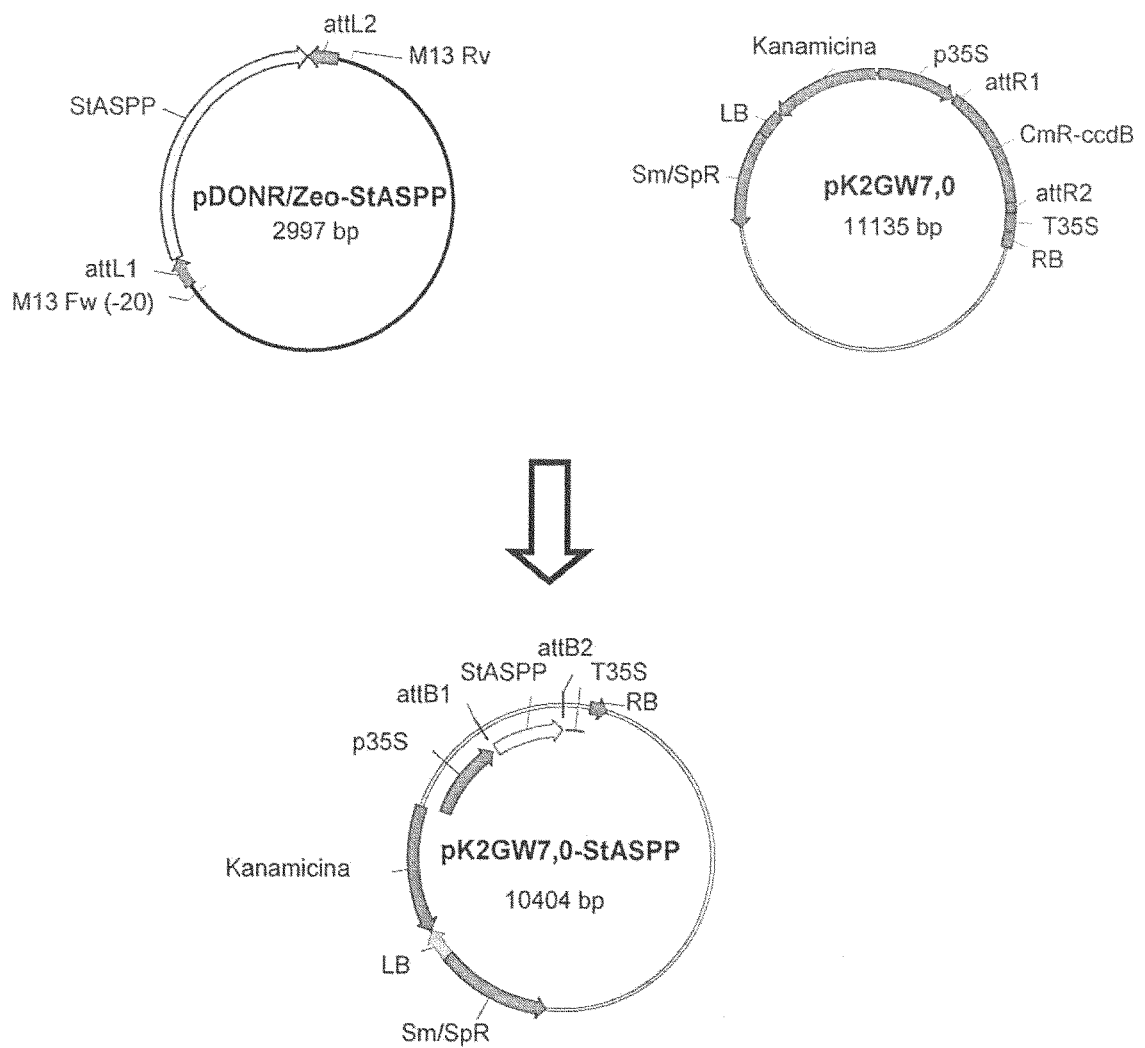


Figura 11

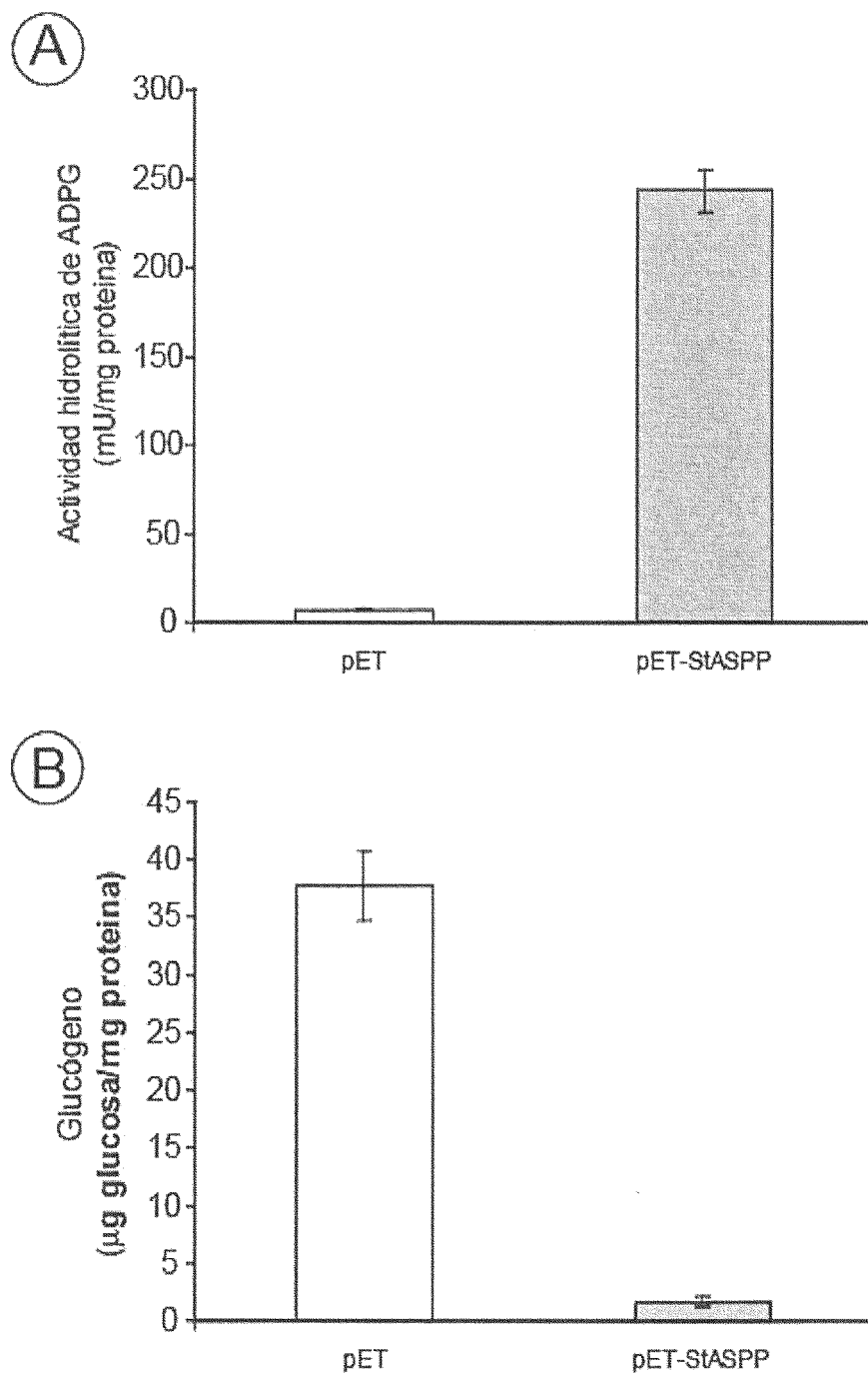


Figura 12

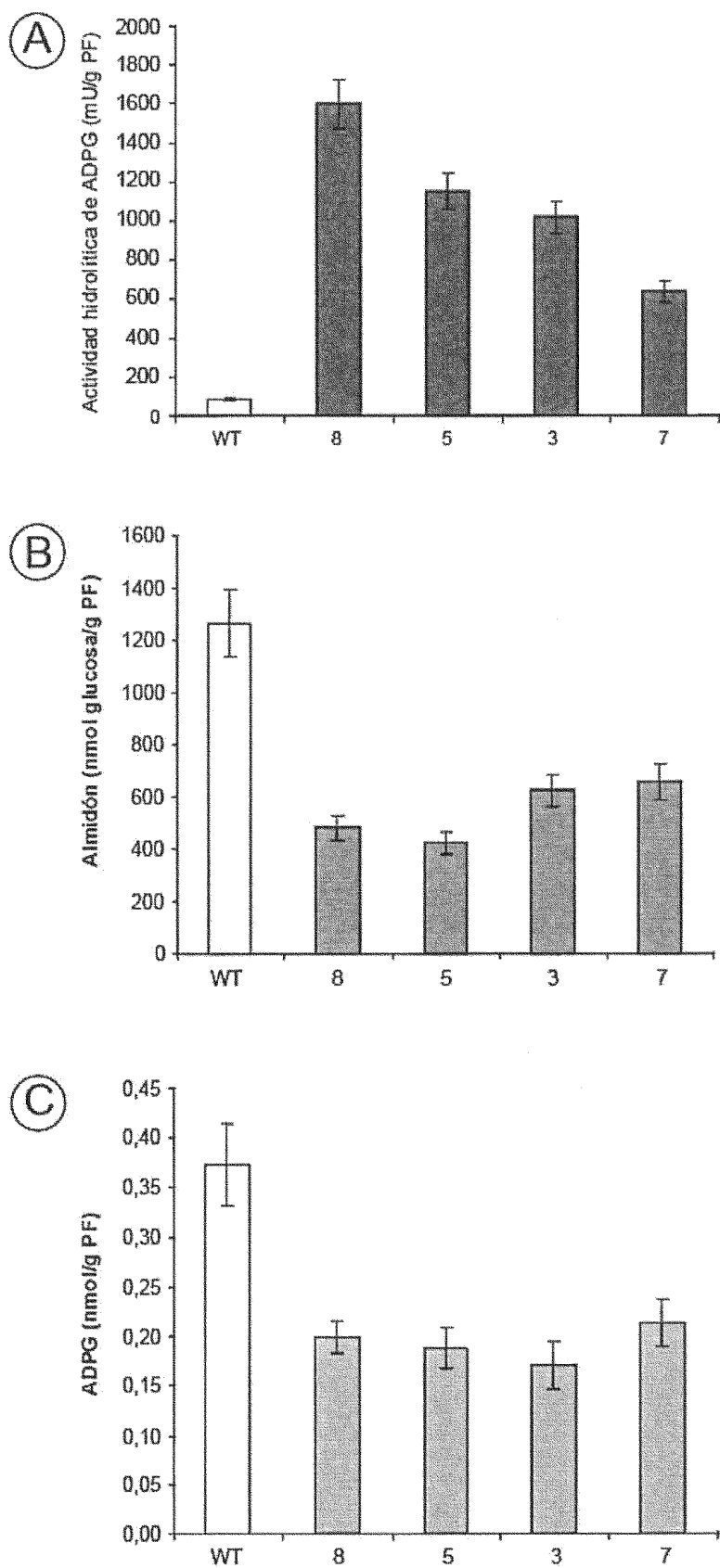
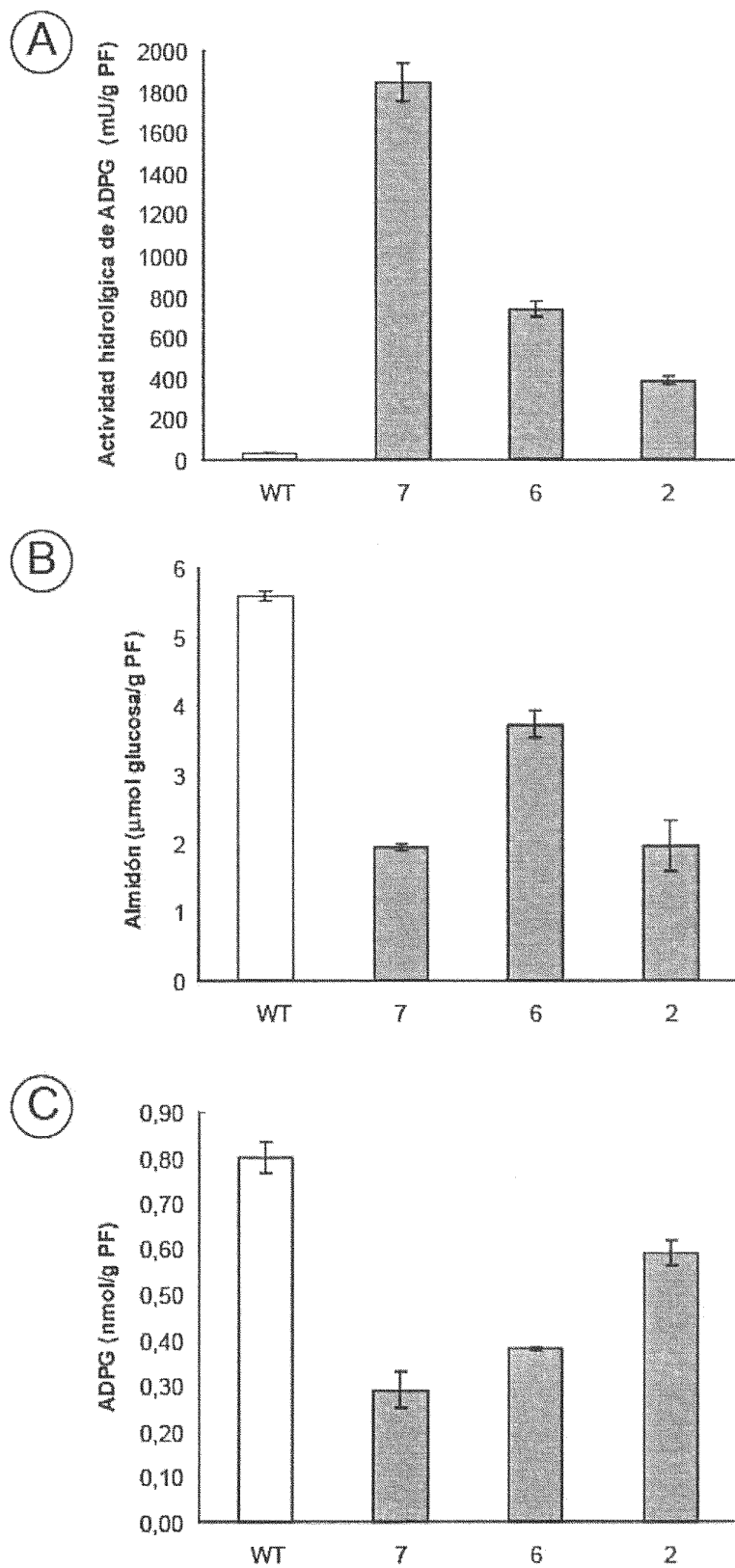


Figura 13



ES 2 310 954 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS y UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA

5

<120> PLANTAS TRANSGÉNICAS CON NIVELES ALTERADOS DE ALMIDÓN COMO RESULTADO DE LA VARIACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE NUDIX VEGETALES QUE HIDROLIZAN ADPGLUCOSA

10

<130> P-01126

<160> 12

15

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 38

20

<212> ADN

<213> Artificial

<221> Cebador At4g11980

25

<223> Secuencia artificial

<400> 1

30

gtgcggctag ccccatggct ggctttactc ttcttccc 38

<210> 2

<211> 37

35

<212> ADN

<213> Artificial

<221> Cebador At4g11980

40

<223> Secuencia artificial

<400> 2

45

ctgctcgagt ccagttattg tatatttcag agaattg 37

<210> 3

<211> 309

50

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<221> Secuencia aminoacídica At4g11980

55

<400> 3

Met Ala Gly Phe Thr Leu Leu Pro Ser Arg Leu Leu Ala Phe Pro Ser
1 5 10 15

60

Arg Ala Leu Pro Arg Arg Leu His His His His Ala Lys Leu Ile Leu
20 25 30

Arg Cys Lys Met Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Thr Gln Ser Ile Thr
35 40 45

65

Leu Pro Ser Gln Pro Asn Glu Pro Val Leu Val Ser Ala Thr Ala Gly
50 55 60

ES 2 310 954 A1

	Ile	Ser	Ser	Ser	Asp	Phe	Arg	Asp	Ala	Ile	Asp	Ser	Ser	Leu	Phe	Arg	
	65					70					75					80	
5	Asn	Trp	Leu	Arg	Asn	Leu	Glu	Ser	Glu	Ser	Gly	Ile	Leu	Ala	Asp	Gly	
					85					90					95		
10	Ser	Met	Thr	Leu	Lys	Gln	Val	Leu	Ile	Gln	Gly	Val	Asp	Met	Phe	Gly	
				100					105					110			
15	Lys	Arg	Ile	Gly	Phe	Leu	Lys	Phe	Lys	Ala	Asp	Ile	Phe	Asp	Lys	Glu	
			115					120					125				
20	Thr	Gly	Gln	Lys	Val	Pro	Gly	Ile	Val	Phe	Ala	Arg	Gly	Pro	Ala	Val	
		130					135					140					
25	Ala	Val	Leu	Ile	Leu	Leu	Glu	Ser	Asp	Gly	Glu	Thr	Tyr	Ala	Val	Leu	
	145				150						155					160	
30	Thr	Glu	Gln	Val	Arg	Val	Pro	Thr	Gly	Lys	Ile	Val	Leu	Glu	Leu	Pro	
				165						170					175		
35	Ala	Gly	Met	Leu	Asp	Asp	Asp	Lys	Gly	Asp	Phe	Val	Gly	Thr	Ala	Val	
				180					185					190			
40	Arg	Glu	Val	Glu	Glu	Glu	Ile	Gly	Ile	Lys	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp	Met	
			195					200					205				
45	Val	Asp	Leu	Thr	Ala	Phe	Leu	Asp	Pro	Ser	Thr	Gly	Tyr	Arg	Ile	Phe	
		210					215					220					
50	Pro	Ser	Pro	Gly	Gly	Cys	Asp	Glu	Glu	Met	Ser	Val	Phe	Leu	Tyr	Arg	
	225					230					235					240	
55	Gly	Gln	Val	Glu	Lys	Glu	Thr	Ile	Arg	Gln	Leu	Gln	Gly	Lys	Glu	Thr	
				245						250					255		
60	Gly	Leu	Arg	Glu	His	Gly	Glu	Phe	Ile	Lys	Val	Arg	Leu	Ile	Pro	Tyr	
			260					265						270			
65	Arg	Glu	Leu	Trp	Arg	Lys	Thr	Ala	Asp	Ala	Lys	Val	Leu	Met	Ser	Ile	
			275					280					285				
70	Gly	Leu	Tyr	Glu	Met	Ala	Gln	Arg	Glu	Gly	Leu	Val	Ser	Ser	Gln	Arg	
		290					295					300					
75	Leu	Lys	Pro	Asn	Ser												
	305																

ES 2 310 954 A1

<210> 4

<211> 930

<212> ADN

5 <213> *Arabidopsis thaliana*

<221> Secuencia nucleotídica At4g11980

<400> 4

10

atgggtgggt ttactttttt tccctcgcggt ttactcgcggt ttctttcacg cgctttacct 60

cgctcgcttc atcaccacca tgcaaagctg attcttcgct gcaaaatgtc ttcttttttt 120

15

ttcttcttta ctcaatccat cactctcccg agccaacca acgagcctgt ccttgtctct 180

gcaaccgctg gaatctcttc ttccgatttc agggatgcga ttgattcatc tctgtttagg 240

20

aattggctaa ggaatttgga atcagagagt ggaatttttag ctgatgggtc aatgacatta 300

aagcaagttc ttatccaggg agttgatatg tttggcaaaa gaattggatt tctcaaattc 360

25

aaagcggata ttttcgacaa ggaaactggt caaaagggtc caggatttgt atttgcacga 420

ggaccagctg tagctgtgct tattctcttg gagtcagatg gtgagactta tgcgggtctc 480

30

actgaacagg ttcgggttcc tactgggaag attgttctgg aattacctgc tggaatgttg 540

gatgatgata aaggtgactt tgttgggtact gcagttcgcg aggtcgaaga ggagattggt 600

35

ataaaactga aaaaagaaga tatggttgat ctactgctt ttcttgacct atctactggt 660

taccggatct tcccttctcc tggaggctgt gatgaagaga tgagcgtgtt tctttacaga 720

40

ggacaagtcg aaaaggaaac aattagacag ttgcaaggca aagagacagg actccgtgaa 780

cacggtgagt tcatcaaagt ccgactcatc ccatatagag agctctggcg caaaacagct 840

gacgctaagg ttcttatgag cattgggtctc tatgaaatgg ctacgcgaga ggggtcttgtg 900

45

tccagccaga gactgaaacc caactcttga 930

<210> 5

<211> 37

50

<212> ADN

<213> Artificial

<221> Cebador POADP80

55

<223> Secuencia artificial

<400> 5

60

caagtgcggc tagcatgaga ctaacagtgt cgcgttg

37

<210> 6

<211> 38

65

<212> ADN

<213> Artificial

ES 2 310 954 A1

<221> Cebador POADP80

<223> Secuencia artificial

5 <400> 6

caactgctcg agtcaaggca acagtccatc tcttttag

38

10 <210> 7

<211> 307

<212> PRT

<213> *Solanum tuberosum*

15

<221> Secuencia aminoacídica POADP80

<400> 7

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

ES 2 310 954 A1

Phe Ala Gly Thr Ala Val Arg Glu Val Glu Glu Glu Thr Gly Ile His
 195 200 205

5

Leu Asn Ala His Asp Met Val Asp Leu Thr Ala Phe Leu Asp Ala Ser
 210 215 220

10

Thr Gly Gly Arg Val Phe Pro Ser Pro Gly Gly Cys Asp Glu Glu Met
 225 230 235 240

15

Ser Leu Phe Leu Tyr Arg Gly Asn Val Ser Lys Glu Lys Ile Gln Gln
 245 250 255

20

Leu Gln Gly Lys Glu Thr Gly Leu Arg Asp His Gly Glu Leu Ile Lys
 260 265 270

25

Val His Val Val Pro Tyr Asp Lys Leu Trp Arg Ala Thr Ala Asp Ala
 275 280 285

30

Lys Ala Leu Thr Ala Ile Cys Leu Tyr Glu Met Ala Lys Arg Asp Gly
 290 295 300

35

Leu Leu Pro
 305

<210> 8

<211> 924

40 <212> ADN

<213> *Solanum tuberosum*

<221> Secuencia nucleotídica POADP80

45

50

55

60

65

ES 2 310 954 A1

<400> 8

	atgagactaa cagtgtcgcg ttgtggactt ccattcgtga aacctctatt tgaattcccc	60
5	ttttcctctt cttcttcaac cctttggcct agaaattggt ctggaagctt ctctgtaaaa	120
	atgtcgacaa cccacacctt tcgaatcact cacatcatca atcttccac ccaactcgat	180
10	caaccggttt ctgttgctgc tgctcccggc gtctccgata cccacttcag gaatgctatt	240
	gaatcctcat tgttcaaaca gtggttaaag aacatacaaa ctgaaacagg actgctggct	300
15	aatggagcta tgtctttaa acaagttctt atccagggtg tagatatggt tggagagcgt	360
	ttggggtttc taaaattcaa agcagatatt attgataagg agacgggtca aaaggttcct	420
20	ggatttgtct tctcacgggg tccagctggt gcagttctaa tccttttgga ttctgagggt	480
	gagacatatg ctgtgcttac ggaacagggt agggctccag ttgggagggt aattttggaa	540
25	ttgccagcag gaatgttgga tgatgaccaa ggtgactttg ctggaacagc agttcgagag	600
	gttgaggaag aaactggaat acacctgaat gccatgata tggctgacct cacggctttt	660
30	ctcgacgcat caactggggg aagagtttct ccttctcttg gtggttgatga tgaggagatg	720
	agtttgtttc tatacagagg aaatgtcagc aaagagaaaa tacaacaact gcaaggcaaa	780
35	gaaactggac tacgagacca tggtagctg attaaagtgc atgtgggttc atatgataaa	840
	ctatggcgtg ccacagctga tgccaaggct ctgaccgcca ttgcctcta cgagatggct	900
	aaaagagatg gactgttgcc ttga	924

40 <210> 9
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <221> Cebador Q9SNS9
 <223> Secuencia artificial

50 <400> 9

	caagtgcggc tagcatggcg gcggcgcg cg	32
--	-----------------------------------	----

55 <210> 10
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <221> Cebador Q9SNS9
 <223> Secuencia artificial

65 <400> 10

	caactgctcg agttacaagt tggccgacga cgag	34
--	---------------------------------------	----

ES 2 310 954 A1

<210> 11

<211> 325

<212> PRT

5 <213> *Oryza sativa*

<221> Secuencia aminoacídica Q9SNS9

10 <400> 11

15	Met	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Arg	Gln	Cys	Leu	Leu	Gly	Phe	Arg	Arg	Ala	1	5	10	15
20	Ala	Pro	Pro	Pro	Leu	Pro	Leu	Leu	Ser	Thr	Arg	Ala	Pro	Ser	Pro	Ala	20	25	30	
25	Pro	Ser	Ser	Arg	Arg	Gly	Ala	Arg	Met	Ala	Ser	Ser	Gly	Asp	His	Ala	35	40	45	
30	Pro	Gln	Leu	Ser	Thr	Ala	Val	Ala	Val	Pro	Gly	Ala	Gly	Ala	Pro	Val	50	55	60	
35	Arg	Val	Val	Ala	Ala	Pro	Gly	Leu	Thr	Glu	Ala	Asp	Phe	Thr	Ser	Ala	65	70	75	80
40																				
45																				
50																				
55																				
60																				
65																				

ES 2 310 954 A1

	Val	Glu	Ser	Ser	Leu	Phe	Arg	Gln	Trp	Leu	Lys	Asn	Leu	Gln	Glu	Glu
					85					90					95	
5	Lys	Gly	Val	Leu	Thr	Tyr	Gly	Arg	Leu	Asn	Leu	Arg	Gln	Ile	Leu	Ile
				100					105					110		
10	Gln	Gly	Val	Asp	Met	Phe	Gly	Lys	Arg	Val	Gly	Phe	Val	Lys	Phe	Lys
			115					120					125			
15	Ala	Asp	Ile	Ile	Asp	Glu	Glu	Thr	Lys	Ala	Lys	Ile	Pro	Gly	Ile	Val
		130					135					140				
20	Phe	Ala	Arg	Gly	Pro	Ala	Val	Ala	Val	Leu	Ile	Leu	Leu	Glu	Ser	Lys
	145					150					155					160
25	Gly	Gln	Thr	Tyr	Ala	Val	Leu	Thr	Glu	Gln	Val	Arg	Val	Pro	Val	Gly
					165					170					175	
30	Lys	Phe	Ile	Leu	Glu	Leu	Pro	Ala	Gly	Met	Leu	Asp	Asp	Glu	Lys	Gly
				180					185					190		
35	Asp	Phe	Val	Gly	Thr	Ala	Val	Arg	Glu	Val	Glu	Glu	Glu	Thr	Gly	Ile
			195					200					205			
40	Lys	Leu	Asn	Leu	Glu	Asp	Met	Ile	Asp	Leu	Thr	Ala	Leu	Leu	Asn	Pro
		210					215					220				
45	Asp	Thr	Gly	Cys	Arg	Met	Leu	Pro	Ser	Pro	Gly	Gly	Cys	Asp	Glu	Glu
	225					230					235					240
50	Ile	Gly	Leu	Phe	Leu	Tyr	Arg	Gly	His	Ala	Asp	Glu	Asp	Thr	Leu	Arg
					245					250					255	
55	Ala	Leu	Gln	Gly	Lys	Glu	Thr	Gly	Leu	Arg	Asp	His	Gly	Glu	Leu	Ile
				260					265					270		
60	Lys	Leu	Arg	Val	Val	Pro	Tyr	Ser	Gln	Leu	Trp	Arg	Ala	Thr	Ala	Asp
			275					280					285			
65	Ala	Lys	Ala	Leu	Ser	Ala	Ile	Ala	Leu	Tyr	Glu	Met	Ala	Lys	Arg	Glu
		290					295					300				
70	Gly	Leu	Leu	Pro	Ser	Ser	Pro	Thr	Thr	Ser	Arg	Arg	Arg	Gly	Ser	Ser
	305					310					315					320
75	Ser	Ser	Ala	Asn	Leu											
					325											

ES 2 310 954 A1

<210> 12

<211> 978

<212> ADN

5 <213> *Oryza sativa*

<221> Secuencia nucleotídica Q9SNS9

10 <400> 12

	atggcgggcg cgcgggcgcg tcagtgtctg cttggattcc gacgagcagc gccgcccgcct	60
15	ctcccgcctcc tgagcacgcg cgctccctct cccgctccgt ccagccgccg cggcgcgcgc	120
	atggcctcgt ccggcgacca cgcgccgcag ctgagcaccg ccgtcgcggt gcccggcgcg	180
20	ggcgcgcccc tccgcgtcgt ggccgcgcgc ggccctaccg aggcggattt cacgagcgcg	240
	gtggaatcct cgctgttcag gcagtggctg aagaacctgc aggaggagaa gggggtcctc	300
25	acctacggga ggctgaacct gaggcaaatc ctcatccagg gggttgacat gtttgggaaa	360
	cgctgtgggt ttgtcaagtt caaggctgac atcatcgacg aggagaccaa agccaagatt	420
30	ccaggaattg tatttgcaag agggcctgct gttgctgtgt tgattctttt ggagtctaaa	480
	gggcaaaactt acgctgttct tacagaacag gtttagagttc ctgttggaat atttatattg	540
35	gaactacctg ctgggatgct agacgatgaa aaggagagatt ttgttggcac tgcagtccgt	600
	gaggttgaag aagaaactgg aattaagcta aatttagagg atatgattga cttactgca	660
40	ttgctgaacc ctgacactgg atgcagaatg cttccttcac cgggtggctg cgacgaagag	720
	attgggctgt tcctgtacag aggccacgcc gacgaggaca cccttagggc tctccaaggg	780
45	aaggagactg ggctgcgcga ccatggcgag ctgatcaagc tgcgggtggg gccgtacagc	840
	cagctgtggc gcgccaccgc cgacgccaag gcgctcagcg ccctcgccct gtacgagatg	900
50	gccaagaggg aaggcctcct gccgtcgtct ccgacgacct ctgcccgcgc tggcagctcg	960
	tcgtcggcca acttgtaa	978

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 310 954

⑫ Nº de solicitud: 200601235

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 12.05.2006

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	OGAWA, T., UEDA, Y., YOSHIMURA, K., SHIGEOKA, S. Comprehensive analysis of cytosolic Nudix hydrolases in Arabisopsis thaliana. The Journal of Biological Chemistry. Julio 2005, Vol. 280, Nº 26, páginas 25277-25283 & Base de datos UniProt: 04.04.2006 [en línea], número de acceso Q9SZ63, Versión 25.	4-6
Y		1,2,7-17
Y	BAROJA-FERNÁNDEZ, E., MUÑOZ, F. J., ZANDUETA-CRIADO, A. et al. Most of ADP-glucose linked to starch biosynthesis occurs outside the chloroplast in source leaves. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A. Agosto 2004, Vol. 101, Nº 35, páginas 13080-13085. ISSN 0027-8424.	1,2,7-17
A		4-6
X	Base de datos UniProt; 04.04.2006; [en línea]; SASAKI, T., MATSUMOTO, T., YAMAMOTO, K. "Oryza sativa nipponbare (GA3) genomic DNA, chromosome 6, PAC clone:P0538C01"; Número de Acceso Q9SNS9, Versión 18.	4-6
Y		1,2,7-17
Y	EP 1253198 A1 (UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA & JCR PHARMACEUTICALS CO., LTD.) 30.10.2002, todo el documento.	1,2,7-17
A		4-6
X	ALONSO, J. M., STEPANOVA, A. N., LEISSE, T. J. et al. Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. Science. Enero 2003, Vol. 301, Nº 5633, páginas 653-657. [En línea] Recuperado de EBSCO HOST Research Database.	9,10

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

17.12.2008

Examinador

E. Relaño Reyes

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)