



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 325 984**

51 Int. Cl.:

C12N 9/14 (2006.01)

C12N 15/01 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02733846 .6**

96 Fecha de presentación : **14.03.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1373488**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2004**

54

Título: **Mutantes termoestables de enzimas de la biosíntesis del almidón.**

30

Prioridad: **14.03.2001 US 275768 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.09.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.09.2009

73

Titular/es:
**University of Florida Research Foundation, Inc.
223 Grinter Hall
Gainesville, Florida 32611, US**

72

Inventor/es: **Hannah, Curtis, L.;**
Greene, Thomas, W. y
Burger, Brian

74

Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 325 984 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Mutantes termoestables de enzimas de la biosíntesis del almidón.

5 **Antecedentes de la invención**

La naturaleza sésil de la vida vegetal genera una exposición constante a factores ambientales que ejercen efectos positivos y negativos sobre el crecimiento y desarrollo de la misma. Uno de los mayores impedimentos para la agricultura moderna son las condiciones ambientales. Un factor importante que causa una pérdida significativa de los cultivos es el estrés térmico. El estrés térmico reduce mucho el rendimiento de grano en muchos cultivos de cereales, tales como el maíz, el trigo y la cebada. El rendimiento se reduce debido al estrés térmico en 7% a 35% en los cereales de importancia mundial.

Varios estudios han identificado las consecuencias fisiológicas probables del estrés térmico. Los primeros trabajos, por Hunter *et al.* (Hunter, R.B., Tollenaar, M. y Breuer, C.M., *Can. J. Plant Sci.* 57:1127-1133, [1977]) en condiciones de cámara de crecimiento demostraron que la temperatura reducía el periodo de relleno del grano en el maíz. Resultados similares en los que la duración del periodo de relleno del grano resultaba adversamente afectada por las temperaturas elevadas fueron identificados por Tollenaar y Bruulsema (Tollenaar, M. y Bruulsema, T.W., *Can. J. Plant Sci.* 68:935-940, [1988]). Badu-Apraku *et al.* (Badu-Apraku, B., Hunter, R.B. y Tollenaar, M., *Can. J. Plant Sci.* 63:357-363, [1983]) midieron una reducción marcada del rendimiento de las plantas de maíz cultivadas bajo el régimen térmico día/noche de 35°C/15°C, comparado con el crecimiento en un régimen térmico de 25°C/15°C. La reducción del rendimiento debido a temperaturas elevadas también ha sido corroborado por estudios históricos, así como climatológicos (Thompson, L.M., *Agron. J.* 78:649-653, [1986]; Thompson, L.M., *Science* 188:535-541; [1975] Chang, J., *Agricul. Metero.* 24:253-262, [1981], y Conroy, J.P., Seneweera, S., Basra, A.S., Rogers, G. y Nissen-Wooler, B., *Aust. J. Plant Physiol.* 21:741-758, [1994]).

Que los procesos fisiológicos del crecimiento en desarrollo resultan adversamente afectados por el estrés térmico resulta evidente a partir de estudios que han utilizado un sistema de cultivo *in vitro* del grano (Jones, R.J., Gengenbach, B.G. y Cardwell, V.B., *Crop Science* 21:761-766, [1981]; Jones, R.J., Ouattar, S. y Crookston, R.K., *Crop Science* 24:133-137, [1984], y Cheikh, N. y Jones, R.J., *Physiol. Plant.* 95:59-66, [1995]). Los granos de maíz cultivados a temperatura superior al óptimo, de 35°C, mostraron una reducción drástica del peso.

Algunos trabajos que hacen referencia al trigo han identificado la pérdida de actividad de la almidón sintasa soluble (SSS) como la característica distintiva de la respuesta del endospermo del trigo frente al estrés térmico (Hawker, J.S. y Jenner, C.F., *Aust. J. Plant Physiol.* 20:197-209, [1993]; Denyer, K., Hylton, C.M. y Smith, A.M., *Aust. J. Plant Physiol.* 21:783-789, [1994]; Jenner, C.F., *Aust. J. Plant Physiol.* 21:791-806, [1994]). Algunos estudios adicionales que hacen referencia a la SSS del endospermo del trigo demuestran que ésta es termolábil (Rijven, A.H.G.C., *Plant Physiol.* 81:448-453, [1986]; Keeling, P.L., Bacon, P.J., Holt, D.C., *Planta* 191:342-348, [1993]; Jenner, C.F., Denyer, K. y Guerin, J., *Aust. J. Plant Physiol.* 22:703-709, [1995]).

Las funciones de la SSS y de la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGP) bajo condiciones de estrés térmico en el maíz resultan menos evidentes. La AGP cataliza la conversión del ATP y de la α -glucosa-1-fosfato en ADP-glucosa y pirofosfato. La ADP-glucosa se utiliza como donador de glucosilos en la biosíntesis del almidón por parte de las plantas y en la biosíntesis del glucógeno en bacterias. La importancia de la ADP-glucosa pirofosforilasa como enzima clave en la regulación de la biosíntesis del almidón fue apreciada en un estudio de mutantes del maíz (*Zea mays*) deficientes en almidón (Tsai, C.Y. y Nelson, Jr., O.E., *Science* 151:341-343, [1966]; Dickinson, D.B., J. Preiss, *Plant Physiol.* 44:1058-1062, [1969]).

Ou-Lee y Setter (Ou-Lee, T. y Setter, T.L., *Plant Physiol.* 79:852-855, [1985]) examinaron los efectos de la temperatura sobre las regiones apicales o distales de las mazorcas del maíz. A temperaturas elevadas, la actividad de la AGP era inferior en los granos apicales que en los granos basales durante el periodo de deposición intensa de almidón. En contraste, en los granos que se desarrollaron a temperaturas normales, la actividad de la AGP era similar en granos apicales y basales durante dicho periodo. Sin embargo, la actividad de la almidón sintasa durante dicho periodo no resultó diferencialmente afectada en granos apicales y basales. Además, los granos apicales tratados térmicamente mostraron un incremento de la actividad de la almidón sintasa comparado con el control. Lo expuesto anteriormente no se observó en el caso de la actividad de la AGP. Singletary *et al.* (Singletary, G.W., Banisadr, R. y Keeling, P.L., *Plant Physiol.* 102:6(supl.), [1993]; Singletary, G.W., Banisadra, R., Keeling, P.L., *Aust. J. Plant Physiol.* 21:829-841, [1994]) utilizando un sistema de cultivo *in vitro* cuantificaron el efecto de diversas temperaturas durante el periodo de relleno del grano. El peso de las semillas se redujo uniformemente a medida que la temperatura se incrementaba de 22°C a 36°C. El trabajo de Duke y Doehlert (Duke, E.R. y Doehlert, D.C., *Environ. Exp. Botany* 36:199-208, [1996]) también da soporte al papel de la AGP en la pérdida de rendimiento.

Un trabajo de Keeling *et al.* (1994, *supra*) cuantificó la actividad de la SSS en el maíz y en el trigo utilizando el análisis de Q_{10} y demostró que la SSS es un punto de control importante en el flujo del carbono hacia el almidón.

Los estudios bioquímicos *in vitro* con AGP y SSS demuestran claramente que ambas enzimas son termolábiles. La AGP del endospermo del maíz pierde 96% de su actividad al calentarla a 57°C durante cinco minutos (Hannah, L.C., Tuschall, D.M. y Mans, R.J., *Genetics* 95:961-970, [1980]). Lo expuesto anteriormente contrasta con la AGP de

la patata, que es completamente estable a 70°C (Sowokinos, J.R. y Preiss, J., *Plant Physiol.* 69:1459-1466, [1982]; Okita, T.W., Nakata, P.A., Anderson, J.M., Sowokinos, J., Morell, J. y Preiss, J., *Plant Physiol.* 93:785-90, [1990]). Los estudios de inactivación por calor de la SSS demostraron que ésta también es lábil a temperaturas más altas, y los estudios cinéticos han determinado que el valor de Km para la amilopectina se incrementa exponencialmente al incrementar la temperatura de 25°C a 45°C (Jenner *et al.*, 1995 *supra*).

Los datos bioquímicos y genéticos identifican la AGP como un enzima clave en la biosíntesis del almidón en plantas superiores y en la biosíntesis del glucógeno en *E. coli* (Preiss, J. y Romeo, T., *Progress in Nuc. Acids Res. and Mol. Biol.* 47:299-329, [1994]; Preiss, J. y Sivak, M., "Starch synthesis in sinks and sources", en: "*Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships*", Zamski, E., editor, Marciel Dekker Inc., páginas 139 a 168, [1996]). La AGP cataliza lo que se considera la etapa inicial de la ruta biosintética del almidón, siendo el producto de la reacción el donador glucosilo activado, la ADP-glucosa. Ésta es utilizada por la almidón sintasa para la extensión del polímero polisacárido (revisado en Hannah, L. Curtis, "Starch synthesis in the maize endosperm", en: *Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants*, vol. 4, B.A. Larkins e I.K. Vasil (editores), Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Bajos, [1996]).

Los estudios iniciales con la AGP de la patata demostraron que la expresión en *E. coli* rendía un enzima con propiedades alostéricas y cinéticas muy similares a las del enzima del tubérculo nativo (Iglesias, A., Barry, G.F., Meyer, C., Bloksberg, L., Nakata, P., Greene, T., Laughlin, M.J., Okita, T.W., Kishore, G.M. y Preiss, J., *J. Biol. Chem.* 268:1081-86, [1993]; Ballicora, M.A., Laughlin, M.J., Fu, Y., Okita, T.W., Barry, G.F. y Preiss, J., *Plant Physiol.* 109:245-251, [1995]). Greene *et al.* (Greene, T.W., Chantler, S.E., Kahn, M.L., Barry, G.F., Preiss, J. y Okita, T.W., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:1509-1513, [1996]; Greene, T.W., Woodbury, R.L. y Okita, T.W., *Plant Physiol.* 112:1315-1320, [1996]) demostraron la utilidad del sistema de expresión bacteriano en sus estudios de estructura-función de la AGP de la patata. Se identificaron múltiples mutaciones que resultaban importantes para la localización de los sitios de unión alostérica y de sustrato (Okita, T.W., Greene, T.W., Laughlin, M.J., Salamone, P., Woodbury, R., Choi, S., Ito, H., Kavakli, H. y Stephens, K., "Engineering Plant Starches by the Generation of Modified Plant Biosynthetic Enzymes", en: *Engineering Crops for Industrial End Uses*, Shewry, P.R., Napier, J.A. y Davis, P., editores, Portland Press Ltd., London, [1996]).

Se han aislado enzimas AGP a partir de tanto bacterias como plantas. La AGP bacteriana estaba constituida por un homotetrámero, mientras que la AGP vegetal procedente de tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos es un heterotetrámero compuesto de dos subunidades diferentes. El enzima vegetal se encuentra codificado por dos genes diferentes, siendo una subunidad más grande que la otra. Esta característica ha sido observada en varias plantas. Las subunidades de la AGP en la hoja de la espinaca presentan pesos moleculares de 54 kDa y 51 kDa, según estimación mediante SDS-PAGE. Ambas subunidades son inmunorreactivas con anticuerpos cultivados contra AGP que ha sido purificada a partir de hojas de espinaca (Copeland, L., J. Preiss, *Plant Physiol.* 68:996-1001, [1981]; Morell, M., M. Bloon, V. Knowles, J. Preiss, *J. Bio. Chem.* 263:633, [1988]). El análisis inmunológico utilizando antisuero preparado contra las subunidades pequeña y grande de la hoja de la espinaca demostró que la AGP del tubérculo de la patata también se encontraba codificada por dos genes (Okita *et al.*, *supra*, 1990). Los clones de ADNc de las dos subunidades del tubérculo de la patata (50 kDa y 51 kDa) también han sido aislados y secuenciados (Muller-Rober, B.T., J. Kossmann, L.C. Hannah, L. Willmitzer, U. Sounewald, *Mol. Gen. Genet.* 224:136-146, [1990]; Nakata, P.A., T.W. Greene, J.M. Anderson, B.J. Smith-White, T.W. Okita, J. Preiss, *Plant Mol. Biol.* 17:1089-1093, [1991]). La subunidad grande de la AGP del tubérculo de la patata es termoestable (Nakata *et al.*, *supra*, 1991).

Tal como han postulado Hannah y Nelson (Hannah, L.C., O.E. Nelson, *Plant Physiol.* 55:297-302, [1975]; Hannah, L.C. y Nelson, Jr., O.E., *Biochem. Genet.* 14:547-560, [1976]), tanto *Shrunken-2 (Sh2)* (Bhave, M.R., S. Lawrence, C. Barton, L.C. Hannah, *Plant Cell* 2:581-588, [1990]) y *Brittle-2 (Bt2)* (Bae, J.M., M. Giroux, L.C. Hannah, *Maydica* 35:317-322, [1990]) son genes estructurales de la ADP-glucosa pirofosforilasa del endosperma del maíz. *Sh2* y *Bt2* codifican la subunidad grande y la subunidad pequeña del enzima, respectivamente. A partir de la secuenciación del ADNc, las proteínas *Sh2* y *Bt2* presentan pesos moleculares predichos de 57.179 Da (Shaw, J.R., L.C. Hannah, *Plant Physiol.* 98:1214-1216, [1992]) y 52.224 Da, respectivamente. El endosperma es el sitio de máxima deposición de almidón durante el desarrollo del grano del maíz. Los mutantes de *Sh2* y *Bt2* del endosperma del maíz presentan niveles de almidón grandemente reducidos correspondientes a niveles deficientes de actividad de la AGP. La mutación de cualquiera de los genes ha demostrado reducir la actividad de la AGP en aproximadamente 95% (Tsai y Nelson, *supra*, 1966; Dickinson y Preiss, *supra*, 1969). Además, se ha observado que las actividades enzimáticas se incrementan con la dosis de los alelos *Sh2* y *Bt2* de tipo salvaje funcionales, mientras que los enzimas mutantes presentan propiedades cinéticas alteradas. La AGP es la etapa limitante de tasa en la biosíntesis del almidón en las plantas. Stark *et al.* introdujeron una forma mutante de AGP de *E. coli* en el tubérculo de la patata y obtuvieron un incremento de 35% del contenido de almidón (Stark *et al.*, *Science* 258:287, [1992]).

Se ha informado de la clonación y caracterización de los genes codificantes de las subunidades del enzima AGP en diversas plantas. Entre éstas se incluyen el ADNc de *Sh2* (Bhave *et al.*, *supra*, 1990), el ADN genómico de *Sh2* (Shaw y Hannah, *supra*, 1992) y el ADNc de *Bt2* (Bae *et al.*, *supra*, 1990) del maíz, el ADNc de la subunidad pequeña (Anderson, J.M., J. Hnilo, R. Larson, T.W. Okita, M. Morell, J. Preiss, *J. Biol. Chem.* 264:12238-12242, 1989) y el ADN genómico (Anderson, J.M., R. Larson, D. Landencia, W.T. Kim, D. Morrow, T.W. Okita, J. Preiss, *Gene* 97:199-205, 1991) del arroz, y los ADNc de la subunidad pequeña y de la subunidad grande de la hoja de la espinaca (Morell *et al.*, *supra*, 1988) y del tubérculo de la patata (Muller-Rober *et al.*, *supra*, 1990; Nakata, P.A., Greene, T.W., Anderson, J.W., Smith-White, B.J., Okita, T.W. y Preiss, J., *Plant Mol. Biol.* 17:1089-1093, 1991). Además, se han aislado clones

de ADNc a partir de endosperma y de tejido foliar del trigo (Olive, M.R., R.J. Ellis, W.W. Schuch, *Plant Physiol. Mol. Biol.* 12:525-538, 1989) y de la hoja de *Arabidopsis thaliana* (Lin, T., Caspar, T., Sommerville, C.R. y Preiss, J., *Plant Physiol.* 88:1175-1181, 1988). Las secuencias de la AGP de la cebada también se han descrito en Ainsworth *et al.* (Ainsworth, C., Hosein, F., Tarvis, M., Weir, F., Burrell, M., Devos, K.M., Gale, M.D., *Planta* 197:1-10, 1995).

5 La AGP funciona como enzima alostérico en todos los tejidos y organismos investigados hasta el momento. Las propiedades alostéricas de la AGP se demostró que resultaban importantes por primera vez en *E. coli*. Se aisló un mutante de *E. coli* sobreproductor de glucógeno y la mutación se localizó en el gen estructural para la AGP, denominado *glyC*. El *E. coli* mutante, denominado *glyC-16*, se demostró que era más sensible al activador, la fructosa 1,6-bisfosfato, y menos sensible al inhibidor, el AMPc (Preiss, J., *Ann. Rev. Microbiol.* 419-458, [1984]). Aunque las AGP vegetales también son alostéricas, responden a diferentes moléculas efectoras que las AGP bacterianas. En las plantas, el ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA) funciona como activador, mientras que el fosfato (PO₄) sirve de inhibidor (Dickinson y Preiss, *supra*, 1969).

15 Utilizando un sistema de mutagénesis *in vivo* creado mediante la excisión mediada por *Ac* de un elemento trasponible *Ds* situado aleatoriamente próximo a un sitio conocido de unión a activador, Giroux *et al.* (Giroux, M.J., Shaw, J., Barry, G., Cobb, G.B., Greene, T., Okita, T.W. y Hannah, L.C., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:5824-5829, [1996]) pudieron generar mutantes específicos de sitio en una región funcionalmente importante de la AGP del endospermo del maíz. Un mutante, *Rev6*, contenía una inserción de tirosina-serina en la subunidad grande de la AGP y condicionó un incremento de 11% a 18% del peso de las semillas. Además, la solicitud internacional publicada WO 01/64928 enseña que diversas características, tales como el número de semillas, la biomasa vegetal, el índice de cosecha, etc., pueden incrementarse en plantas transformadas con un polinucleótido codificante de una subunidad grande de la AGP del maíz que contiene la mutación *Rev6*.

25 Las solicitudes de patente internacional publicadas WO 99/58698 y WO 98/22601 y la patente publicada US n° 6.069.300 dan a conocer mutaciones en la subunidad grande del enzima AGP del maíz que, al expresarse, proporcionan estabilidad al calor incrementada en comparación con la observada en el enzima AGP de tipo salvaje. Se dan a conocer varios mutantes termoestables en la patente US n° 6.069.300 y las patentes WO indicadas anteriormente, incluyendo los mutantes denominados HS 13 (que presenta una sustitución de Ala por Pro en la posición 177), HS 14 (que presenta una sustitución de Asp por His en la posición 400 y una sustitución de Val por Ile en la posición 454), HS 16 (que presenta una sustitución de Arg por Thr en la posición 104), HS 33 (que presenta una sustitución de His por Tyr en la posición 333), HS 39 (que presenta una sustitución de His por Tyr en la posición 333), HS 40 (que presenta una sustitución de His por Tyr en la posición 333 y una sustitución de Thr por Ile en la posición 460), HS 47 (que presenta una sustitución de Arg por Pro en la posición 216 y una sustitución de His por Tyr en la posición 333), RTS 48-2 (que presenta una sustitución de Ala por Val en la posición 177) y RTS 60-1 (que presenta una sustitución de Ala por Val en la posición 396).

Breve resumen de la invención

40 La presente invención se refiere a materiales y métodos que resultan útiles para mejorar los rendimientos de cultivos en plantas, tales como aquellas plantas que producen cereales. En una forma de realización, la invención proporciona enzimas AGP termoestables y secuencias de nucleótidos que codifican estos enzimas. En una forma de realización preferida, los enzimas termoestables de la invención pueden utilizarse para proporcionar plantas que presentan mayor tolerancia a temperaturas más altas, incrementando de esta manera los rendimientos de cultivo de estas plantas. En una forma de realización particularmente preferida, la planta mejorada es una planta de cereal. Entre los cereales a los que se aplica la presente invención se incluyen, por ejemplo, maíz, trigo, arroz y cebada.

Breve descripción de los dibujos

50 La figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos genómica de un alelo Shrunken-2 de tipo salvaje de *Zea mays*. Los intrones se encuentran indicados en letras minúsculas. La base número 1 es el sitio de inicio de transcripción.

55 La figura 2 muestra una comparación entre la actividad enzimática de tipo salvaje y los mutantes de subunidad grande de la AGP del maíz. Todas las reacciones se llevaron a cabo por duplicado. Los números proporcionados son la media de los duplicados, tras eliminar el fondo. Los porcentajes se refieren a la actividad restante tras el tratamiento de calor en comparación con la actividad antes del tratamiento de calor. La leyenda de la figura es la siguiente:

“sh2” = proteína sh2 de tipo salvaje,

60 “sh2ht” = proteína sh2 de tipo salvaje, tras el tratamiento térmico

“33” = proteína sh2 que contiene la mutación *HS 33* (es decir, una sustitución de aminoácido histidina por tirosina en la posición 333 en la subunidad grande de la AGP del maíz),

65 “33ht” = proteína sh2 que contiene la mutación *HS 33*, tras el tratamiento térmico,

“177” = proteína sh2 que contiene la mutación *rts48-2* (es decir, una sustitución de aminoácido alanina por valina en la posición 177 en la subunidad grande de la AGP del maíz),

ES 2 325 984 T3

“177ht” = proteína sh2 que contiene la mutación *rts48-2* (es decir, una sustitución de aminoácido alanina por valina en la posición 177 en la subunidad grande de la AGP del maíz), tras el tratamiento térmico,

5 “396” = proteína sh2 que contiene la mutación *rts60-1* (es decir, una sustitución de aminoácido alanina por valina en la posición 396 en la subunidad grande de la AGP del maíz),

“396ht” = proteína sh2 que contiene la mutación *rts60-1* (es decir, una sustitución de aminoácido alanina por valina en la posición 396 en la subunidad grande de la AGP del maíz), tras el tratamiento térmico,

10 “7+6” = proteína sh2 que contiene la combinación de las mutaciones “177” y “396”,

“7+6ht” = proteína sh2 que contiene la combinación de las mutaciones “177” y “396”, tras el tratamiento térmico,

15 “7+3” = proteína sh2 que contiene la combinación de las mutaciones “177” y “HS 33”,

“7+3ht” = proteína sh2 que contiene la combinación de las mutaciones “177” y “HS 33”, tras el tratamiento térmico,

20 “6+3” = proteína sh2 que contiene la combinación de las mutaciones “396” y “HS 33”,

“6+3ht” = proteína sh2 que contiene la combinación de las mutaciones “396” y “HS 33”, tras el tratamiento térmico.

25 La figura 3 muestra un mapa de restricción de la región codificante de *Sh2*. Los enzimas de restricción mostrados son aquellos utilizados para el aislamiento de la región codificante completa y para la creación de los mutantes dobles y triples. Las mutaciones se encuentran indicadas por asteriscos (*).

Breve descripción de las secuencias

30 La SEC ID nº 1 es una secuencia de aminoácidos de una región correspondiente a los aminoácidos 318 a 350 de la subunidad grande de la AGP del maíz que contiene la mutación HS 33.

35 La SEC ID nº 2 es una secuencia de aminoácidos de una región correspondiente a los aminoácidos 170 a 189 de la subunidad grande de la AGP en el maíz que contiene la mutación RTS48-2.

La SEC ID nº 3 es una secuencia de aminoácidos de una región correspondiente a los aminoácidos 389 a 406 de la subunidad grande de la AGP en el maíz que contiene la mutación RTS60-1.

40 La SEC ID nº 4 es la secuencia de nucleótidos genómica de un alelo Shrunken-2 de tipo salvaje de *Zea mays*.

La SEC ID nº 5 es un cebador oligonucleótido sintético que puede utilizarse según la invención.

La SEC ID nº 6 es un cebador oligonucleótido sintético que puede utilizarse según la invención.

45 La SEC ID nº 7 es un cebador oligonucleótido sintético que puede utilizarse según la invención.

La SEC ID nº 8 es un cebador oligonucleótido sintético que puede utilizarse según la invención.

50 La SEC ID nº 9 es un cebador oligonucleótido sintético que puede utilizarse según la invención.

La SEC ID nº 10 es un cebador oligonucleótido sintético que puede utilizarse según la invención.

Exposición detallada de la invención

55 El objeto de la invención se refiere a nuevas moléculas polinucleótidas mutantes y a los polipéptidos codificados por las mismas, que proporcionan una resistencia al calor y un rendimiento incrementados bajo condiciones de estrés térmico respecto a plantas que expresan el genotipo de tipo salvaje. En las formas de realización específicas, las moléculas polinucleótidas de la invención codifican actividades enzimáticas de ADP-glucosa pirofosforilasa (AGP) del endospermo del maíz y de almidón sintasa soluble (SSS). Los enzimas mutantes proporcionan estabilidad incrementada frente a condiciones de estrés térmico durante el desarrollo de las semillas y de la planta tanto en semillas como en tejidos vegetales que expresan los enzimas en comparación con las actividades enzimáticas de tipo salvaje.

60 Un aspecto de la invención se refiere a polinucleótidos que codifican dos o más cambios aminoácidos en una subunidad grande de AGP en comparación con la secuencia de tipo salvaje del polipéptido de subunidad grande de la AGP, en el que la proteína mutante expresada muestra una estabilidad incrementada. Preferentemente el polipéptido codificado por los polinucleótidos de la invención, al expresarse con la subunidad pequeña, muestran una actividad enzimática incrementada en comparación con la proteína de tipo salvaje y, preferentemente, a un nivel aproximadamente igual o superior al mostrado por una mutación de un solo aminoácido que proporcione estabilidad frente al

ES 2 325 984 T3

calor incrementada, tal como HS 33. Los polinucleótidos de la invención pueden codificar dos, tres o más cambios aminoácidos respecto a la secuencia de tipo salvaje.

5 En una forma de realización, un polinucleótido de la presente invención codifican un subunidad grande mutante de una AGP vegetal que contiene una doble mutación: una sustitución de aminoácido histidina por tirosina y una sustitución de aminoácido alanina por valina en la secuencia del polipéptido. En una forma de realización ejemplificativa, la sustitución de histidina por tirosina se produce en el aminoácido correspondiente al número de residuo 333 en la secuencia de la subunidad grande de la AGP del maíz. En una forma de realización, la sustitución de alanina por valina se produce en el aminoácido correspondiente al residuo número 177 en la secuencia de la subunidad grande de la AGP del maíz. En otra forma de realización, la sustitución de alanina por valina se produce en el aminoácido correspondiente al residuo 396 en la secuencia de la subunidad grande de la AGP del maíz.

15 La actividad enzimática asociada a las proteínas mutantes de la presente invención que presentan dos mutaciones se muestra en la figura 2.

20 Otra forma de realización se refiere a un triple mutante que comprende una sustitución de histidina por tirosina en el aminoácido correspondiente al residuo número 333, una sustitución de alanina por valina en el aminoácido correspondiente al residuo número 177, y una sustitución de alanina por valina en el aminoácido correspondiente al residuo 396 en la secuencia de la subunidad grande de la AGP del maíz.

25 Los números de residuo aminoácido a los que se ha hecho referencia anteriormente se basan en el número aceptado de los aminoácidos en dicha proteína (Shaw y Hannah, *supra*, 1992). La posición de estas sustituciones puede ser fácilmente identificada por un experto en la materia. La Tabla 1 a continuación muestra los mutantes por doble y triple sustitución de aminoácidos ejemplificados en la presente memoria ("HS 6+3" y "HS 7+6" se proporcionan a modo de referencia).

Tabla 1.

Polipéptido mutante Sh2	Cambio de aminoácidos
HS 7+3	Ala por Val en la posición 177 e His por Tyr en la posición 333
HS 6+3	Ala por Val en la posición 396 e His por Tyr en la posición 333
HS 7+6	Ala por Val en la posición 177 y Ala por Val en la posición 396
35 HS 7+6+3	Ala por Val en la posición 177 y Ala por Val en la posición 396 y His por Tyr en la posición 333

40 Debido a la homología de los polipéptidos AGP entre diversas especies vegetales (Smith-White y Preiss, *J. Mol. Evol.* 34:449-464, [1992]), el experto ordinario en la materia podrá determinar fácilmente la posición de las mutaciones en la AGP de plantas que no son el maíz que corresponde a la posición de mutaciones en la AGP del maíz tal como se da a conocer en la presente invención. De esta manera, la presente invención comprende polinucleótidos que codifican AGP mutante de plantas que no son el maíz, incluyendo, aunque sin limitación, trigo, cebada, avena y arroz, que proporcionan una estabilidad frente al calor incrementada al expresarse en la planta.

45 Se da a conocer mutaciones de un solo aminoácido en la AGP que proporciona estabilidad frente al calor, y procedimiento para producir y seleccionar dichas mutaciones, en la patente US nº 6.069.300 y en las solicitudes publicadas de patente internacional WO 99/58698 y WO 98/22601. Típicamente se mutagenizó un plásmido que comprende un polinucleótido codificante de la subunidad SH2 de la AGP del maíz, se introdujo en células de *E. coli* *glg C⁻* mutantes que expresaban la subunidad BT2 y las células se cultivaron a 42°C para seleccionar los mutantes que podía producir glucógeno a esta temperatura. Se aislaron varios mutantes, denominados mutantes termoestables (HS). Se prepararon extractos crudos de estos mutantes y se realizó el seguimiento de la estabilidad frente al calor de la AGP resultante. Los mutantes de una sola sustitución de aminoácido retuvieron entre 8% y 59% de su actividad tras la incubación a 60°C durante cinco minutos. Además, se elevó la actividad enzimática total de la AGP del endospermo del maíz mutante aproximadamente dos a tres veces en algunos de los mutantes.

55 Pueden combinarse fácilmente dentro de una subunidad múltiples mutaciones que proporcionan estabilidad frente al calor. Por ejemplo, pueden utilizarse diferentes sitios de restricción únicos que dividen las regiones codificantes de *Sh2* en tres fragmentos discretos. En caso apropiado, pueden generarse combinaciones de mutaciones mediante la subclonación del fragmento correspondiente que contiene la mutación añadida. Si dos mutaciones se encuentran en proximidad estrecha, puede utilizarse la mutagénesis sitio-dirigida para construir dichas combinaciones. Un procedimiento para las mutaciones específicas de sitio implica PCR, cebador mutagénico y la utilización de endonucleasa de restricción *DpnI*. Pueden construirse cebadores que contengan la mutación en el extremo 5' y utilizarse para amplificar por PCR utilizando la polimerasa correctora Vent. A continuación, el ADN amplificado puede digerirse con *DpnI*. El ADN parental aislado a partir de *E. coli* se metila y por lo tanto es susceptible de la digestión con *DpnI*. El ADN digerido se fracciona por tamaños mediante electroforesis en gel, se liga y se clona en los vectores de expresión. Las mutaciones se confirman mediante análisis de secuencia y se transforman en la cepa AC70R1-504 que porta la subunidad pequeña de tipo salvaje. Pueden analizarse a continuación los mutantes combinatoriales.

ES 2 325 984 T3

Asimismo, la invención se refiere a polipéptidos mutantes, codificados por los polinucleótidos de la invención, que presentan las sustituciones aminoácidas indicadas en la presente memoria. En una forma de realización preferida, los polipéptidos mutantes proceden del maíz.

5 Asimismo, la invención se refiere a los mutantes termoestables de la AGP de la presente invención combinados con mutaciones de estabilidad frente al calor en la subunidad pequeña del enzima. También pueden prepararse fácilmente mutaciones en la subunidad pequeña de la AGP que proporcionan estabilidad frente al calor al enzima e identificarse utilizando los procedimientos descritos en la patente US n° 6.069.300 y en las solicitudes publicadas de patente internacional WO 99/58698 y WO 98/22601. Los mutantes termoestables de la subunidad pequeña pueden coexpresarse con los mutantes de la presente invención con el fin de incrementar adicionalmente la estabilidad del enzima AGP.

15 Las plantas y tejidos vegetales cultivados para que contengan los polinucleótidos mutantes de la invención o transformados con los mismos, y que expresan los polipéptidos codificados por los polinucleótidos, también se encuentran contemplados por la presente invención. Las plantas y tejidos vegetales que expresan los polinucleótidos mutantes producen tejidos que presentan, por ejemplo, una pérdida inducida por el calor menor en peso o rendimiento al someterlos a estrés térmico durante el desarrollo. Entre las plantas comprendidas dentro del alcance de la presente invención se incluyen plantas monocotiledóneas, tales como arroz, trigo, cebada, avena, sorgo, maíz, lirios y mijo, y plantas dicotiledóneas, tales como guisantes, alfalfa, garbanzo, achicoria, trébol, col verde, lenteja, pasto de pradera, soja, tabaco, 20 patata, boniato, rábano, col, colza, manzanos y lechuga. En una forma de realización particularmente preferida, la planta es un cereal. Entre los cereales a los que se aplica la presente invención se incluyen, por ejemplo, maíz, trigo, arroz, cebada, avena, centeno y mijo.

25 Asimismo, la invención se refiere a procedimientos para producir e identificar polinucleótidos y polipéptidos comprendidos dentro del alcance de la invención. En una forma de realización, puede utilizarse la mutación génica, seguida de la selección utilizando un sistema de expresión bacteriano, para aislar moléculas polinucleótidas que codifiquen subunidades de AGP vegetal que presenten mutaciones que puedan aliviar la pérdida inducida por calor de la síntesis del almidón en las plantas. Pueden combinarse sustituciones individuales de aminoácidos en una subunidad tal como se describe en la presente memoria.

30 Asimismo, la invención se refiere a plantas y tejido vegetal que comprenden un polinucleótido de la presente invención que codifica un polipéptido mutante de la invención. En una forma de realización preferida, la planta o tejido vegetal presenta un gen AGP mutante de la invención incorporado en el genoma. También pueden incorporarse en el genoma vegetal otros alelos que proporcionan fenotipos ventajosos. En una forma de realización preferida, la planta es una planta de cereal. Más preferentemente, la planta es *Zea mays*. Las plantas que presentan un gen AGP mutante pueden cultivarse a partir de semillas que comprenden un gen mutante en el genoma de las mismas. Además, las técnicas para transformar plantas con un gen, tal como la infección por *Agrobacterium*, los procedimientos biolísticos, etc., son conocidos en la técnica.

40 Debido a la degeneración del código genético, una diversidad de diferentes secuencias polinucleótidas puede codificada cada uno de los polinucleótidos de AGP variantes dados a conocer en la presente memoria. Además, se encuentra perfectamente comprendido dentro de los conocimientos del experto en la materia la creación de secuencias polinucleótidas alternativas codificantes de los mismos, o esencialmente los mismos polipéptidos de la invención. Estas secuencias polinucleótidas variantes o alternativas se encuentran comprendidas dentro del alcance de la invención. 45 Tal como se utilizan en la presente invención, las referencias a una secuencia “esencialmente igual” se refieren a secuencias que codifican sustituciones, deleciones, adiciones o inserciones de aminoácidos que no alteran materialmente la actividad funcional del polipéptido codificado por el polinucleótido AGP mutante indicado en la presente memoria.

50 Tal como se utilizan en la presente memoria, las expresiones “ácido nucleico” y “secuencia polinucleótida” se refieren a un polímero desoxirribonucleótido o ribonucleótido en forma de una o dos cadenas, y a menos que se encuentre limitado de otra manera, comprendería análogos conocidos de nucleótidos naturales que pueden funcionar de una manera similar a la de los nucleótidos naturales. Entre las secuencias polinucleótidas se incluyen tanto la secuencia de la cadena de ADN que se transcribe en ARN, y la secuencia de ARN que se traduce en proteína. Las secuencias polinucleótidas incluyen tanto las secuencias de longitud completa, así como secuencias más cortas derivadas de las secuencias de longitud completa. Se entiende que una secuencia polinucleótida particular incluye los codones degenerados de la secuencia o secuencias nativas que pueden introducirse para proporcionar preferencia de codones en una célula huésped específica. Las variaciones alélicas de las secuencias ejemplificadas también se encuentran comprendidas dentro del alcance de la invención. Las secuencias polinucleótidas comprendidas dentro del alcance de la invención incluyen además secuencias que se hibridan específicamente con las secuencias ejemplificadas. 60 El polinucleótido incluye las cadenas tanto sentido como antisentido en forma de cadenas individuales o en el dúplex.

La sustitución de aminoácidos diferentes de los ejemplificados específicamente en los mutantes dados a conocer en la presente memoria también se encuentra contemplada dentro del alcance de la presente invención. Pueden clasificarse los aminoácidos en las clases siguientes: no polares, polares no cargados, básicos y ácidos. Las sustituciones conservadoras en las que un polipéptido AGP mutante que presenta un aminoácido de una clase se sustituye por otro aminoácido de la misma clase se encuentran comprendidas dentro del alcance de la invención, con la condición de que el polipéptido AGP mutante que presenta la sustitución todavía conserve una estabilidad frente al calor incremen-

ES 2 325 984 T3

tada comparado con el polipéptido de tipo salvaje. La Tabla 2 a continuación proporciona un listado de ejemplos de aminoácidos pertenecientes a cada clase.

	Tabla 2.
Clase de aminoácido	Ejemplos de aminoácidos
No polares	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
Polares no cargados	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln
Ácidos	Asp, Glu
Básicos	Lys, Arg, His

La sustitución de la tirosina en la posición 333 en los mutantes HS 7+3, HS 6+3 y HS 7+6+3 por otros aminoácidos, tales como glicina, serina, treonina, cisteína, asparagina y glutamina, se encuentran comprendidos dentro del alcance de la invención. También se encuentra específicamente contemplado dentro del alcance de la invención la sustitución de una fenilalanina o una metionina en la posición 333 en la subunidad grande de AGP. De esta manera, una combinación de fenilalanina o metionina en la posición 333 por una valina en la posición 177 o una valina en la posición 396, o ambas, se encuentra específicamente contemplada por la presente invención. De manera similar, la sustitución de la valina en las posición 177 y 396 en lo mutantes HS 7+3, HS 6+3 y HS 7+6+3 por otros aminoácidos, tales como leucina, isoleucina, prolina, metionina, fenilalanina y triptófano, se encuentra comprendida dentro del alcance de la invención. Las sustituciones de aminoácidos en posiciones diferentes del sitio de mutación de estabilidad frente a calor también se encuentran comprendidas dentro del alcance de la invención, con la condición de que el polipéptido conserve o proporcione estabilidad frente al calor incrementada comparado con los polipéptidos de tipo salvaje.

Los polinucleótidos y proteínas de la invención también pueden definirse en términos de intervalos de identidad y/o similitud más particular respecto a los ejemplificados en la presente memoria. La identidad de secuencia típicamente es superior a 60%, preferentemente superior a 75%, más preferentemente superior a 80%, todavía más preferentemente superior a 90%, y puede ser superior a 95%. La identidad y/o similitud de una secuencia puede ser 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% en comparación con una secuencia ejemplificada en la presente memoria. A menos que se indique lo contrario, tal como se utiliza en la presente memoria, el porcentaje de identidad y/o de similitud de secuencia entre dos secuencias puede determinarse utilizando el algoritmo de Karlin y Altschul (Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268, [1990]), modificado tal como en Karlin y Altschul (Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877, [1993]). Este tipo de algoritmo se encuentra incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul *et al.* (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:402-410, [1990]). Pueden realizarse búsquedas en BLAST con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias con el porcentaje de identidad de secuencia deseado. Para obtener alineaciones con huecos a fines comparativos, puede utilizarse Gapped BLAST, tal como se describe en Altschul *et al.* (Altschul *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402, [1997]). Al utilizar los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden utilizarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (NBLAST y XBLAST) (ver el sitio de internet de NCBI/NIH).

Asimismo, la invención se refiere a polinucleótidos que codifican fragmentos del polipéptido mutante de longitud completa, con la condición de que los fragmentos conserven sustancialmente la misma actividad funcional que el polipéptido de longitud completa. Los fragmentos de polipéptido AGP mutante codificados por estos polinucleótidos también se encuentran comprendidos dentro del alcance de la presente invención. Pueden prepararse fragmentos de la secuencia de longitud completa utilizando técnicas estándares conocidas en la técnica.

La invención comprende asimismo las polinucleótidas codificantes de enzimas de biosíntesis de almidón que presenten secuencias suficientemente homólogas respecto a la secuencia de tipo salvaje para permitir la hibridación con dicha secuencia bajo condiciones restrictivas estándares y la utilización de procedimientos estándares (Maniatis, T., E.F. Fritsch, J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, [1982]). Tal como se utiliza en la presente memoria, las condiciones "restrictivas" de hibridación se refieren a condiciones en las que la hibridación típicamente se lleva a cabo durante la noche a una temperatura 20°C a 25°C inferior a la temperatura de fusión (Tm) del híbrido de ADN en 6x SSPE, 5x solución de Denhardt, SDS al 0,1%, ADN desnaturalizado 0,1 mg/ml. La temperatura de fusión se encuentra descrita por la fórmula siguiente (Beltz, G.A., K.A. Jacobs, T.H. Eickbush, P.T. Cherbas y F.C. Kafatos, *Methods of Enzymology*; R. Wu, L. Grossman y K. Moldave, editores, Academic Press, New York 100:266-285, [1983]).

$T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 \text{ Log}[\text{Na}^+] + 0,41(\%G+C) - 0,61(\%\text{formamida}) - 600/\text{longitud del dúplex}$, en pares de bases.

Los lavados típicamente se llevan a cabo de la manera siguiente:

- (1) Dos veces a temperatura ambiente durante 15 minutos en 1x SSPE, SDS al 0,1% (lavado de astringencia reducida).
- (2) Una vez a $T_m - 20^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos en 0,2x SSPE, SDS al 0,1% (lavado de astringencia moderada)

ES 2 325 984 T3

Las moléculas polinucleótidas de la invención pueden utilizarse para transformar plantas para expresar el enzima termoestable mutante en dichas plantas. Además, los polinucleótidas de la invención pueden utilizarse para expresar el enzima variante recombinante. También pueden utilizarse como sonda para detectar enzimas relacionados. Los polinucleótidos también pueden utilizarse como estándares de tamaño del ADN.

Las moléculas polinucleótidas de la invención comprende asimismo los polinucleótidos que codifican enzimas de biosíntesis del almidón, tales como enzimas AGP, que contienen mutaciones que proporcionan un peso de semilla incrementado, además de una estabilidad frente al calor incrementada, a una planta que exprese dichos mutantes. La combinación de una mutación de estabilización frente al calor, tal como, por ejemplo, *Sh2-HS 7+3*, con una mutación que proporcione un peso de semilla incrementado, por ejemplo *Rev6*, en un polinucleótido que codifica la subunidad grande de la AGP del maíz se encuentra específicamente contemplada en la presente invención. Las patentes US nº 5.589.618 y nº 5.650.557 dan a conocer polinucleótidos (por ejemplo *Rev6*) que codifican mutaciones en la subunidad grande de AGP que proporcionan un peso de semilla incrementado en plantas que expresan el polipéptido mutante.

Las mutaciones en las subunidades de AGP que proporcionan estabilidad frente al calor pueden combinarse según la invención con mutantes del maíz insensibles al fosfato, tales como la mutación *Rev6*, para incrementar la estabilidad de la subunidad grande con *Rev6*.

Se espera que la actividad enzimática de SSS resultará perjudicada a temperaturas más altas tal como se ha observado en AGP. De esta manera, las formas mutagenizadas de SSS pueden expresarse bajo condiciones térmicas incrementadas (42°C) para aislar las variantes estables frente a calor de acuerdo con los procedimientos descritos en la presente memoria. Estas formas mutagenizadas de SSS estables frente al calor son aspectos adicionales de la invención.

Asimismo, la invención se refiere a procedimientos para incrementar las características de rendimiento de las plantas bajo condiciones de estrés térmico, mediante la incorporación de un polinucleótido de la presente invención que comprende una mutación en un enzima de biosíntesis del almidón que proporciona estabilidad o resistencia incrementada frente a condiciones de estrés térmico, y una mutación que proporciona características de rendimiento incrementado a la planta. Entre las características de rendimiento incrementado se incluyen, por ejemplo, un número de semillas incrementado, un peso de semilla incrementado, una biomasa vegetal incrementada y un índice de cosecha incrementado.

A continuación se proporcionan ejemplos ilustrativos de los procedimientos para poner en práctica la invención. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitativos. Todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de mezcla de solventes son en volumen, a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 1

Ensayo de las pirofosforilasas de ADP-glucosa del endospermo del maíz que presentan múltiples mutaciones de aminoácidos

Expresión de ADP-glucosa pirofosforilasas del endospermo del maíz. Se inocularon alícuotas de 10 ml de caldo Luria (75 g/ml de espectinomicina y 50 g/ml de canamicina) procedentes de soluciones madre en glicerol de células *E. coli* AC70R1-504 que expresaban el endospermo del maíz o ADP-glucosa pirofosforilasa de tubérculo de la patata, y se cultivaron durante la noche a 37°C bajo agitación a 220 rpm. Estos cultivos se utilizaron para inocular 250 ml de caldo Luria (75 g/ml de espectinomicina y 50 g/ml de canamicina). Los cultivos se mantuvieron hasta alcanzar una $DO_{600}=0,55$ a 37°C bajo agitación a 220 rpm. Los cultivos se indujeron con isopropil-D-tiogalactósido 0,2 mM y ácido nalidíxico 0,02 mg/ml durante 7 horas a temperatura ambiente bajo agitación a 220 rpm. Se recolectaron las células a 3.500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se resuspendieron los pellets celulares en 800 litros de tampón de extracción: HEPES 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 5 mM, EDTA 5 mM, sacarosa al 20% y sulfato amónico al 30%. Se añadieron DTT (1 mM), 50 g/ml de lisozima, 1 g/ml de pepstatina, 1 g/ml de leupeptina, 1 g/ml de antipaina, 10 g/ml de quimostatina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y benzamidina 1 mM a tampón de extracción inmediatamente antes de la utilización. Los lisados se sonicaron tres veces durante tres segundos con incubación sobre hielo entre sonicaciones. Las muestras se centrifugaron durante 1 minuto a 13.000 rpm a 4°C. Se separaron los sobrenadantes y se prepararon alícuotas para los ensayos.

Combinación de mutaciones individuales. Se diseñó una estrategia de subclonación para estudiar los efectos de las mutaciones en combinación con *HS 33*, y entre sí. Para combinar las mutaciones por reversión de *RTS 48-2* y *RTS 60-1*, los plásmidos que contienen cada mutación por reversión (las mutaciones parentales sensibles a la temperatura se eliminaron antes de combinar las mutaciones) se digirieron con *Eco RV* y se intercambió un fragmento de 339 pb de *RTS 48-2* por el fragmento correspondiente de *RTS 60-1* (figura 3). El plásmido resultante se denominó *Sh2-HS 7+6*. Se utilizó una estrategia similar para combinar la mutación por reversión de *RTS 48-2* con la mutación identificada en *HS 33*. Los plásmidos que contenían las mutaciones se digirieron con *Eco RV* y se intercambió un fragmento de 339 pb de *RTS 48-2* por el fragmento correspondiente de *HS 33*. El plásmido resultante se denominó *Sh2-HS 7+3*. Para combinar la mutación por reversión de *RTS 60-1* con la mutación identificada en *HS 33*, se digirieron los plásmidos que contenían las mutaciones con *Mun I/Kpn I* y se intercambió un fragmento de 390 pb de *RTS 60-1* por el fragmento

ES 2 325 984 T3

correspondiente de *HS 33* (figura 3). El plásmido resultante se denominó *Sh2-HS 6+3*. Con el fin de combinar las mutaciones por reversión de *RTS 60-1* y *RTS 48-2* con la mutación identificada en *HS 33*, se digirieron el plásmido *Sh2-HS 6+3* y un plásmido que contenía la mutación por reversión *RTS 48-2* con *EcoRV* y se intercambiaron un fragmento de 339 pb de *RTS 48-2* por el fragmento correspondiente de *Sh2-HS 6+3*. El plásmido resultante se denominó *Sh2-HS 7+6+3*.

Se llevó a cabo la secuenciación final de todos los plásmidos utilizando seis cebadores para cubrir la región codificante entera de *Sh2* en ambas direcciones. Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

LHBB1 (5' → 3')	5'-CGACTCACTATAGGGAGACC-3'	(SEC ID nº 5);
LH27 (5' → 3')	5'-CCCTATGAGTAACTG-3'	(SEC ID nº 6);
LH9 (5' → 3')	5'-TATACTCAATTACAT-3'	(SEC ID nº 7);
LHBB2 (3' → 5')	5'-GTGCCACCTGACGTCTAAG-3'	(SEC ID nº 8);
LH2135 (3' → 5')	5'-CAGAGCTGACACGTG-3'	(SEC ID nº 9);
LH32 (3' → 5')	5'-AAGCTGATCGCCACTC-3'	(SEC ID nº 10).

Tratamiento térmico de la ADP-glucosa pirofosforilasa. Se sometieron a ensayo la ADP-glucosa pirofosforilasa de tipo salvaje (*sh2*) y mutante que contenía una única mutación de aminoácido (*HS 33*, *RTS 48-2*, *RTS 60-1*) y múltiple mutante (*HS 7+3*, es decir, *RTS 48-2* más *HS 33*; *HS 6+3*, es decir, *RTS 60-1* más *HS 33*; y *HS 7+6*, es decir, *RTS 48-2* más *RTS 60-1*) por cambios de aminoácidos, para la actividad enzimática antes y después del tratamiento de calor. El tratamiento de calor consistía de la incubación de la proteína de ensayo a 60°C durante 5 minutos.

El porcentaje de actividad restante tras el tratamiento térmico a 60°C durante 5 minutos se presenta en la Tabla 3. Los genotipos en la base de datos son *Sh2* de tipo salvaje (wt), *HS 33*, *RTS 60-1* (únicamente mutación por reversión), *RTS 48-2* (únicamente mutación por reversión), *Sh2-HS 7+6*, *Sh2-HS 6+3*, *Sh2-HS 7+3* y *Sh2-HS 7+6+3*.

Tabla 3. Porcentaje de actividad restante tras el tratamiento térmico

Enzima	% de actividad	SEM ^a	N ^b
<i>Sh2 wt</i>	32	11	3
<i>HS 33</i>	69	7	7
<i>RTS 60-1</i>	61	13*	2
<i>RTS 48-2</i>	64	6	3
<i>Sh2-HS 7+6</i>	77	21*	2
<i>Sh2-HS 6+3</i>	69	9	3
<i>Sh2-HS 7+3</i>	83	8	3
<i>Sh2-HS 7+6+3</i>	72	11	3

^a error estándar de la media (S.E.M.)
^b número de réplicas experimentales
 * representa el intervalo, y no el S.E.M.

Las actividades antes del tratamiento térmico para *Sh2* tipo salvaje, *HS 33*, *RTS 60-1*, *RTS 48-2*, *Sh2-HS 7+6*, *Sh2-HS 6+3*, *Sh2-HS 7+3* y *Sh2-HS 7+6+3* se muestran en la Tabla 4. *HS 33* presenta una actividad 2,1 veces superior a *Sh2* tipo salvaje. Tanto *RTS 48-2* como *RTS 60-1* muestran un incremento de actividad de 1,4 veces. El doble mutante de los mismos contiene una actividad 1,9 veces superior. Aunque la combinación de los dos mutantes incrementa la actividad, el doble mutante no experimenta efectos sinérgicos. La mutación de *RTS 60-1*, en combinación con la de *HS 33*, experimenta un efecto aditivo, incrementando la actividad 3,4 veces en comparación con *Sh2* tipo salvaje. La mutación de *RTS 48-2* en combinación con la de *HS 33* muestra un incremento ligeramente inferior, de 2,9 veces. Resulta interesante que el triple mutante muestre un incremento ligeramente superior que la mutación por reversión del segundo sitio sola, aunque inferior a la del doble mutante entre reversores de segundo sitio.

Tabla 4. Factor de incremento de la actividad

Enzima	Factor de incremento	Intervalo	N ^b
<i>Sh2 wt</i>	n/a	n/a	n/a
<i>HS 33</i>	2,1	0,2 ^a	3
<i>RTS 60-1</i>	1,4	0	1
<i>RTS 48-2</i>	1,4	0	1
<i>Sh2-HS 7+6</i>	1,9	0,2	2
<i>Sh2-HS 6+3</i>	3,4	0	1
<i>Sh2-HS 7+3</i>	2,9	0,1	2
<i>Sh2-HS 7+6+3</i>	1,8	0,1	2

^a error estándar de la media
^b número de réplicas experimentales
n/a no aplicable

Ensayos de ADP-glucosa pirofosforilasa. Para obtener datos cuantitativos de los mutantes indicados anteriormente, se midió la actividad con el ensayo de síntesis (directa) que mide la incorporación de [¹⁴C]glucosa-1-P en el nucleótido azúcar ADP-glucosa. Los ensayos se llevaron a cabo en extractos enzimáticos crudos preparados tal como se describe posteriormente.

La reacción de síntesis de la ADP-glucosa mide la incorporación de [¹⁴C]glucosa-1-P en la ADP-glucosa. La mezcla de reacción contenía HEPES 80 mM, pH 7,5, glucosa-1-P 1 mM, MgCl₂ 4 mM, 0,5 mg ml⁻¹ de albúmina de suero bovino, 3-PGA 10 mM y 15.000 cpm de [¹⁴C]glucosa-1-P. El volumen de reacción era 50 ml. Los ensayos se iniciaron mediante la adición de ATP 1,5 mM. La reacción se incubó durante 30 minutos a 37°C y se terminó mediante ebullición durante 2 minutos. La glucosa-1-P no incorporada se cortó mediante la adición de 0,3 U de fosfatasa alcalina bacteriana (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ) y la incubación durante 2,5 horas a 37°C. Se transfirió una alícuota de 20 ml de la mezcla de reacción en un punto sobre papel DEAE, se lavó con agua destilada tres veces, se secó y se cuantificó en un contador de centelleo líquido.

Se muestran otros resultados para mutantes únicos y dobles en la figura 2. Para el mutante de combinación *Sh2-HS 7+6* (*RTS 48-2* más *RTS 60-1*) y el mutante de combinación *Sh2-HS 6+3* (*RTS 60-1* más *HS 33*), los números proporcionados son la media de los datos de 3 diluciones del enzima (por duplicado), multiplicados por su factor de dilución, menos el fondo. Para el mutante de combinación *Sh2-HS 7+3* (*RTS 48-2* más *HS 33*), los números proporcionados son medias de 2 diluciones del enzima (por duplicado), multiplicadas por su factor de dilución, menos el fondo. La representación gráfica de los números se llevó a cabo utilizando Excel de Microsoft.

Ejemplo 2

Combinación de mutaciones de estabilidad frente al calor con Rev6

Según la invención, pueden combinarse mutaciones de estabilidad frente al calor con una mutación asociada al peso de semilla incrementado, tal como, por ejemplo, la mutación *Rev6*. El objetivo es mantener la característica de insensibilidad al fosfato de *Rev6* incrementando simultáneamente su estabilidad. Los mutantes que comprenden las mutaciones de estabilidad frente al calor combinadas con la mutación *Rev6* pueden construirse y confirmarse tal como se describe en la presente memoria. Estos mutantes “de combinación” pueden transformarse en AC70R1-504 que porta la subunidad pequeña de tipo salvaje. Puede identificarse fácilmente la estabilidad frente al calor incrementada mediante una tinción positiva del glucógeno en un medio pobre en glucosa. *Rev6* no tiñe al cultivarse en este medio. Inicialmente pueden cribarse enzimáticamente todas las combinaciones mutantes para el mantenimiento de la insensibilidad al fosfato, y únicamente las combinaciones que mantienen la insensibilidad al fosfato se analizan adicionalmente.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polinucleótido codificante de un polipéptido mutante que es una subunidad grande mutante de una ADP-glucosa pirofosforilasa de maíz o un fragmento biológicamente activo del mismo, en el que dicho polipéptido mutante o dicho fragmento biológicamente activo del mismo se expresa con la subunidad pequeña de la ADP-glucosa pirofosforilasa para formar un enzima ADP-glucosa pirofosforilasa mutante, mostrando dicho enzima mutante una estabilidad térmica incrementada en relación con el enzima ADP-glucosa pirofosforilasa de tipo salvaje, en el que dicho polipéptido mutante comprende una sustitución de aminoácido en la posición de aminoácido 333, y una sustitución de aminoácido
10 en una o ambas posiciones de aminoácido 177 y 396 de la subunidad grande de tipo salvaje de la ADP-glucosa pirofosforilasa del maíz, en el que la histidina en la posición 333 de dicha subunidad grande de tipo salvaje se sustituye por un aminoácido seleccionado de entre tirosina, fenilalanina, metionina, glicina, serina, treonina, cisteína, asparagina y glutamina, cuando es sustituida la alanina en la posición 177 de dicha subunidad grande de tipo salvaje, se sustituye por prolina o valina, y cuando es sustituida la alanina en la posición 396 de dicha subunidad grande de tipo salvaje, se sustituye por valina.
15
2. Polinucleótido según la reivindicación 1, en el que dichas sustituciones de aminoácidos se encuentran en las posiciones de aminoácidos 177 y 333 de dicha subunidad grande de tipo salvaje.
- 20 3. Polinucleótido según la reivindicación 1, en el que dichas sustituciones de aminoácidos se encuentran en las posiciones de aminoácidos 333 y 396 de dicha subunidad grande de tipo salvaje.
4. Polinucleótido según la reivindicación 1, en el que dichas sustituciones de aminoácidos se encuentran en las posiciones de aminoácidos 177, 333 y 396 de dicha subunidad grande de tipo salvaje.
- 25 5. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho polipéptido mutante comprende además una mutación de aminoácido que proporciona un peso de semilla incrementado a una planta que expresa dicho polipéptido.
- 30 6. Polinucleótido según la reivindicación 5, que comprende la mutación *Rev6*.
7. Polinucleótido según la reivindicación 5 ó 6, que codifica una subunidad grande del enzima AGP, en el que existe una inserción de por lo menos un residuo de serina entre los aminoácidos correspondientes a las posiciones 494 y 495 de dicha subunidad grande de tipo salvaje.
- 35 8. Polinucleótido según la reivindicación 7, en el que la inserción es de la pareja de aminoácidos tirosina:serina.
9. Polinucleótido según la reivindicación 7, en el que la inserción es de la pareja de aminoácidos serina:tirosina.
- 40 10. Procedimiento para incrementar la resistencia de una planta en condiciones de estrés térmico, que comprende incorporar el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la planta, y expresar la proteína codificada por dicho polinucleótido.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicha planta es monocotiledónea.
- 45 12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que dicha planta monocotiledónea se selecciona de entre arroz, trigo, cebada, avena, sorgo, maíz, liliáceas y mijo.
13. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicha planta es *Zea mays*.
- 50 14. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicha planta es dicotiledónea.
15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que dicha planta dicotiledónea se selecciona de entre guisante, alfalfa, garbanzo, achicoria, trébol, col rizada, lenteja, pasto de pradera, soja, tabaco, patata, boniato, rábano, col, colza, manzanos y lechuga.
55
16. Planta o tejido vegetal transgénico que comprende como transgén el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 60 17. Planta o tejido vegetal según la reivindicación 16, que es tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15.
18. Tejido vegetal según la reivindicación 16 ó 17, que es una semilla.
- 65 19. Proteína de biosíntesis de almidón mutante codificada por el polinucleótido según la reivindicación 1.

1020 TGATGCTTTTCCCTGGCAGGAGAGCTATGAGACGTAATGTCTCTCAAGCCACTTTGCGAT
 -960 TGTGTGAAACCAATAATCGATCTTTGTTACTTTCATCATGCATGAACATTTGTGGAAACTAC
 -900 TAGCTTACAAGCATIAGTGACAGCTCAGAAAAGTTATCTCTGAAAGGTTTCATGTGTA
 -840 CCGTGGGAAATGAGAAAATGTTGCCAACTCAAACACCTTCAATAATGTTGTTGCAGGCAAA
 -780 CTCCTCTGGAAGAAAGGTGTCTAAAACATGAACGGGTTACAGAAAAGGTATAAACCCACGG
 -720 CTGTGCATTTTGGAAAGTATCATCTATAGATGCTGTTGAGGGGAAAAGCCGTACGCCAACG
 -660 TTATTTACTCAGAAACAGCTTCAACACACAGTTGTCGCTTTATGATGGCATCTCCACCC
 -600 AGGCACCCACCATCACCTATTCACCTATCTCTGTCGCTGTTTATTTCTTGCCCTTTCT
 -540 GATCATAAAAAATCATTAAGAGTTTGCAAAACATGCATAGGCATATCAATATGCTCATTTA
 -480 TTAATTTGCTAGCAGATCATCTTCCTACTCTTTACTTTTATTTATTTGTTGAAAAATATGT
 -420 CCTGCACCTAGGGAGCTCGTATAACAGTACCAATGCATCTTCATTAATGTGAATTTCAGA
 -360 AAGGAAGTAGGAACCTATGAGAGTATTTTCAAATTAATTAGCGGCTTCTATTAATGTTT
 -300 ATAGCAAAGGCCAAAGGCAAAATCGGAACACTAATGATGTTGTTGCTGATGAGTCTGTGCG
 -240 ATTACTTGCAAGAAATGTGAACCTTTGTTTCTGTGCGTGGGCATAAAACAAACAGCTTCT
 -180 AGCCTCTTTTACGGTACTTGCACTTGCAAGAAATGTGAACCTCTTTTCAATTTCTGTATGT
 -120 GGACATAATGCCAAAGCATCCAGGCTTTTTCATGGTTGTTGATGTTTACACAGTTTCAT
 -60 CTCACCCAGTATGCCCTCCCTCATACTCTATATAAACACATCAACAGCATCGCAATTAGCC
 1 ACAAGATCACTTCGGGAGGCAAGTGTGATTCGACCTTGCAGCCACCTTTTTTTGTTCTG
 61 TTgtaagtatactttccccttaccatctttatctgttagtttaattgtaattgggaagta
 121 ttagtggaaaggatgagatgctatcatctatgtactctgcaaatgcatctgacgttat
 181 atgggctgcttcataataattgaaattgctccattctgcccacaataatgcaaggat
 241 atgcctagtccatcaaaagtctgtttttcattctaaaagcatttttagtggcacgcaa
 301 ttttgtccatgaggaaagaaatctgttttggttactttgcttgaggtgcattcttcat
 361 atgtccagttttatggaagtaataaaacttcagtttggtcataaagatgtcataatgaaagg
 421 caaacatataatcaatggttcaatcactgtaaatgttcccctttttgtaaaagattgcata
 481 ctcatattattgagttgcaggtgatactagtagttggaggagataatgcagtttgcaacttg

FIG. 1A

M Q F A L
 541 CATTGGACAGAACTCAGGTCCTCACCAGATAAGATCTTGTGAGGGTGATGGGATTGACA
 A L D T N S G P H Q I R S C E G D G I D
 601 GGTGGAAAAATTAAGTATTGGGGGCAGAAAGCAGGAGAAAGCTTTGAGAAAATAGGTGCT
 R L E K L S I G G R K Q E K A L R N R C
 661 TTGGTGGTAGAGTTGCTGCAACTACACAATGTATTCTTACCCTCAGATGCTTGTCCCTGAAA
 F G G R V A A T T Q C I L T S D A C P E
 721 CTCTTgtaagtatccacctcaattattactcttacatgttggtttactttacgtttgtct
 T L
 781 tttcaagggaaatttactgtatTTTTgtgtttgtgggagttctatacttctgttggac
 841 tggttattgtaaagatttgttcaaatagggtcatactaaatgTTTTgaaatctgggaac
 901 tgtggttccactgcgttcagggaaaaagtgaattattggttactgcatgaataacttatgg
 961 aaatagaccttagagttgctgcatgatcacaaatcattgctacgatatcttataata
 1021 gttctttcgacctcgcatatataataactgcaactcctagttgcgttcaaaaaaaaa
 1081 atgcaactcttagaacgctcaccagtgtaactttcctgaaattgTTtaattggtcatgt
 1141 atgcactactgtatacttacttaggattaagtaactaaacttaggccccatatttgca
 1201 gCATTCTCAAACACAGTCTCTAGGAAAAATTATGCTGATGCAAAACCGTGTATCTGCTAT
 H S Q T Q S S R K N Y A D A N R V S A I
 1261 CATTTTGGGGAGGCACTGGATCTCAGCTCTTTCTCTGACAAGCACAAAGAGCTACGCC
 I L G G G T G S Q L F P L T S T R A T P
 1321 TGCTgtaaggataaacactgaacatccaacggttgattactctattatagattatacaga
 A
 1381 ctgtacttttcgaaatttatcttagttttctacaataatttagtggattcttctcatTTca
 1441 agatacacaattgatccataatcgaagtggtatgtaagacagtgagttaaaagattatat
 1501 tttttgggagacttccagtcaaaattttcttagaaagtttttttgggtccagatggttcataaa

FIG. 1B

2401 TCATGTGCTCCTGTTGATGAGAGgtaatcagttggtttatatcatcctaataatgaatatgt
 S C A P V D E S
 2461 catcttgttatccaacacaggatgcataatggtcctaactctgctttccctttttttcccttc
 2521 ggaagccgagcTTCTAAAAATGGCTAGTGAAGATTGATCATACTGGACGTGACTTCAA
 R A S K N G L V K I D H T G R V L Q
 2581 TTCTTTGAAAAACCAAGGGTCTGATTGAATTCTATGGttagaatcccttctgtgtaat
 F F E K P K G A D L N S M
 2641 ccaattccttttggtttccctttctttctttgagatgaacccctcttttagttatttccatgg
 2701 ataacctgacttgacttattcagaaatgatttctattttgctgtagaatctgacacta
 2761 aagctaatagcaactgatgtgagAGAGTTGAGACCAACTTCCTGAGCTATGCTATAGAT
 R V E T N F L S Y A I D
 2821 GATGCACAGAAATATCCATACCTTGCATCAATGGGCATTTATGTCTTCAAGAAAGATGCA
 D A Q K Y P Y L A S M G I Y V F K K D A
 2881 CTTTAGACCCTTCTCAAgtaatcaactttccctgtgacttatttctatccaactcctagttt
 L L D L L K
 2941 accttctaacagtggtcaattcttagGTCAAAATATACTCAATTACATGACTTTGGATCTG
 S K Y T Q L H D F G S
 3001 AAATCCTCCCAAGAGCTGTACTAGATCATAGTGTGCAGgtaagtctgatctgtctggagt
 E I L P R A V L D H S V Q
 3061 atgtgtctgtaaactgtaaaattcttcatgtcaaaaagttgtttttccagtttcca
 3121 ctaccaatgcacgatttatgtattttcgcctccatgcatcatacatacaataacatt
 3181 ttacgtattgttagGCATGCATTTTACGGGCTATTGGGAGGATGTTGGAACAATCAA
 A C I F T G Y W E D V G T I K
 3241 ATCATTCTTTGATGCAAAACTTGGCCCTCACTGAGCAGgtactctgtcatgtattctgtac

FIG. 1D

S F F D A N L A L T E Q
 3301 tgcataatattaccctggaattcaatgcatagaaatggttagaccatcttagttccatcc
 3361 tgtttcttcaattagcttataatagttgtggctagaatttaaacacaaaattta
 3421 cctaataatgttctctctcagCCTTCCAAGTTTGATTTTACGATCCAAAACACCTTT
 P S K F D F Y D P K T P F
 3481 CTTCACTGCACCCCGATGCTTGCCTCCGACGCAATTGGACAAGTGCAAGGTatatatgtctt
 F T A P R C L P P T Q L D K C K
 3541 actgagcacaattggttacctgagcaagattttgtgtacttgacttgttctcctccacaga
 3601 TGAATAATGCATTTAATCTCAGATGGTTGCTTACTGAGAGAATGCAACATCGAGCATTCIG
 M K Y A F I S D G C L L R E C N I E H S
 3661 TGATTGGAGTCTGCTCACGTGTCAGCTCTGGATGTGAACCTCAAGGTacataactctgccc
 V I G V C S R V S S G C E L K
 3721 tgtatctactcttgagtataaccatttcaacaccaagcatcaccaaatcacacagaacaat
 3781 agcaacaagccttttagttccaagcaatttagggtagcctagagttgaaatctaaca
 3841 acaaaagtcaaagctctatcacgtgtagttgttttccatgcaactcttatttaagctaa
 3901 ttttttgggtatactacatccatttaattattgttttattgcttcttcccttgccttc
 3961 cccattactatcgcgtcttaagatcatactacgcaactagtgctttagaggctctggt
 4021 ggacatgttcaaaccatctcaatcgggttggacaagttttcttgaatttgtgtacac
 4081 ctaacctatcacgtatgtcatcgtttcaaacatttatctgtgaacatgtcatctttgtaggta
 4141 atgcaacatacgcatttatgcaacatttatctgtgaacatgtcatctttgtaggta
 4201 acattatgcaccatacaaatgtagcatgtctaatcatcctataaaaatttacatcttag
 4261 cttatgtggtatcctcttgccacttagaacaccatattgcttgatgccatttcatccacc
 4321 tgctttgattctatggctaacaatcttcaattaataatcctcctctctgtatcattggtcc

FIG. 1E

4381 taaatatggaataacattctttctgggcactacttgaccttccaaactaaagttctccttt
 4441 gctcctttcttggtagtagtaccggaagtcacatctcatatattcgggttttagttcta
 4501 ctaagtcgggttcgatccccctcaggggtgaatttcgggcttggtaaaaaaaatcccc
 4561 tcgctgtgtccgcccgcctctcggggatcgataatcctgcgcgacccctcggctgggca
 4621 ttgcagagtgagcagttgatcggctcgttagtgatggggagcgggttcaagggttttct
 4681 cggccgggaccatgtttcgggtcttaataataatgccgggagggcagtccttccctcccc
 4741 ggtcgagtttagttctaccgagttcaaaacctttggactctagagtcccctgtcacaac
 4801 tcacaactctagtttctatttacttctacctagcgtttattaatgatcactatcgtc
 4861 tgtaaaaagcatcaccaatgtaatcccccttgtatgtcccccttghtaatattatccatcaca
 4921 agaaaaaaaggtaaggctcaaagttgacttttgatatagtcctattcctaaccgagaagtc
 4981 atctgtatcttcgctctctgttcgaaactagtcacaaaaattttgtacatgttcttaa
 5041 tgagtccaacgtaataatcccttgatatttgtcataagccctcatcaagtcaatgaaaaat
 5101 cacgtgtaggtccttcatcttcttactgctccatcacttgcattcattaaagaaaaat
 5161 ctctctcatagttaaccttttggcatgaaacaaaaatcacacagaagttgttcccttttt
 5221 taagatcccacacaaaagaggtttgatctaaggaatctggatccctgacaggtttatcaa
 5281 aatcctttgttttcttaaaactgaataatcctccagcttctagtattgatgtaatat
 5341 tcaatctgttttagcaagtgaacaccttgggtcttgttactgtacccccccccccc
 5401 cccccccgagggccagattaccacgacatgaatacaagaatattgaacccagatctaga
 5461 gtttgtttgtactgttgaaaaatcgggtgacaattcattttgttattgctgcttctgataac
 5521 gacagGACTCCGTGATGATGGGAGCGGACACCTATGAAACTGAAGAAGAGCTTCAAAGC

 D S V M G A D T Y E T E E E A S K
 5581 TACTGTTAGCTGGGAAGGTCACAGTTGGAATAGGAAGGACACAAGATAAGgtgagtat
 L L L A G K V P V G I G R N T K I R
 5641 ggatgtggaaccaccgggttagttccccaaaaatatacactcactgatacctgatgggtatcct

FIG. 1F

5701 ctgattattttcagGAACTGTATCATTTGACATGAATGCTAGGATTGGGAAGAACGTGGTG
N C I I D M N A R I G K N V V
5761 ATCACAACAGTAAGgtgagcgagcgccacctacatgggtgcagaatcttgtgtgctcatc
I T N S K
5821 taccctaattcggtaattcctatccagcgctagtcttgtgaccatggggcatggggttcga
5881 ctctgtgacagGGCATCCAAGAGGCTGATCACCCGGAAGGTTACTACATAAGGTCTG
G I Q E A D H P E E G Y Y I R S
5941 GAATCGTGGTGTATCTTGAAGAATGCAACCAATCAACGATGGGTCTGT CATATAGATCGGCT
G I V V I L K N A T I N D G S V I -
6001 GCGTGTCCGTCTACAAAACAAGAACCTACAATGGTATTGCATCGATGGATCGTGTAAACCT
6061 TGGTATGGTAAGAGCCGCTTGACAGAAAGTCGAGCGTTCGGCAAGATGCCGTAGTCTGGC
6121 ATGCTGTTCCCTTGACCATTGTGCTGCTAGTATGTACTGTTATAAGCTGCCCTAGAAGTT
6181 GCAGCAAACCTTTTATGAACCTTTGTATTCCATTACCCTGCTTTGGATCAACTATATCT
6241 GTCATCCTATATATTACTAAATTTTACGTGTTTTTCTAATTCCGGTGCCTTTTGGGAT

FIG. 1G

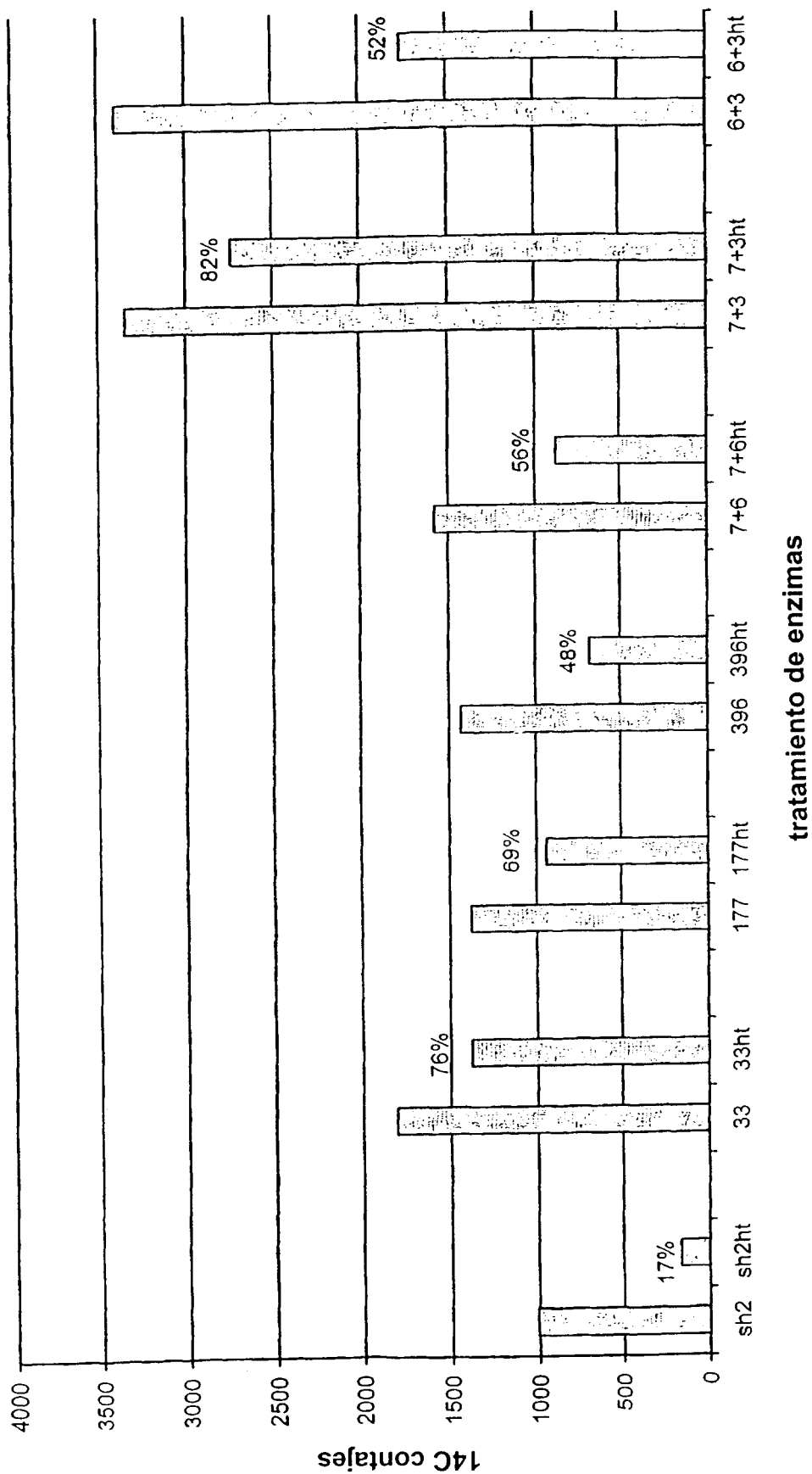


FIG. 2

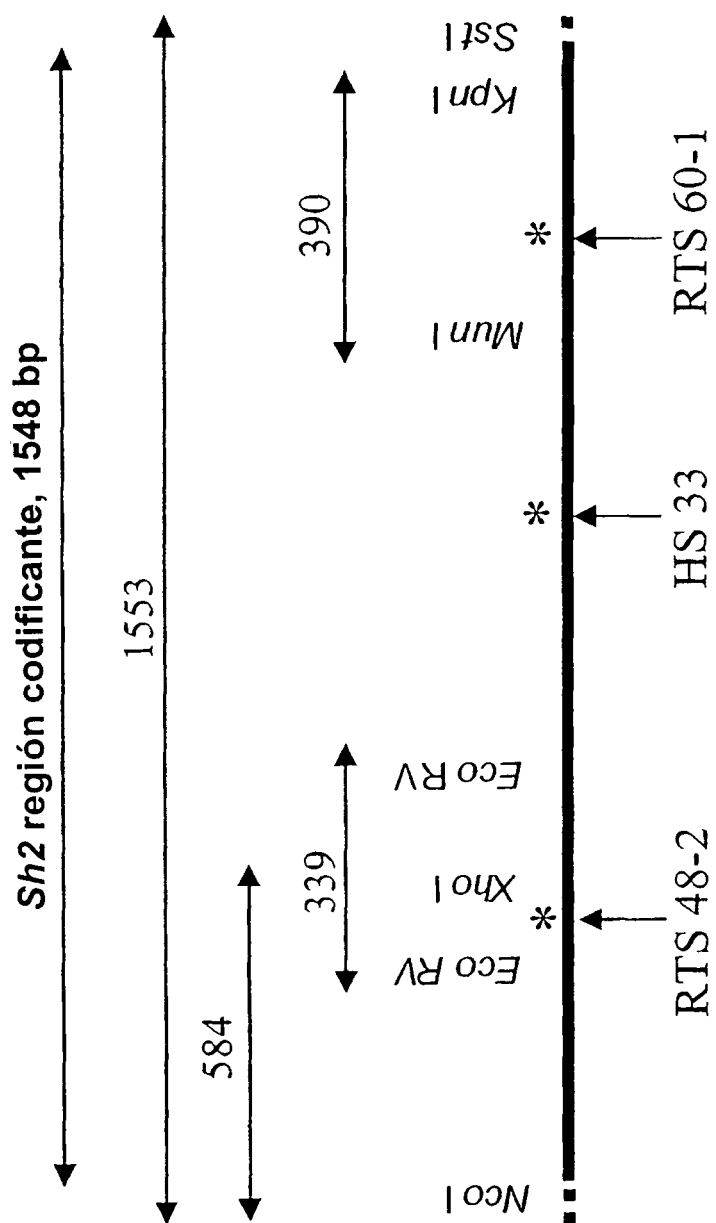


FIG. 3

ES 2 325 984 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Hannah, L. Curtis
Greene, Thomas W.
Burger, Brian
- <120> Mutantes termoestables de enzimas de la biosíntesis del almidón
- <130> UF-305
- <160> 10
- <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
<211> 33
<212> PRT
<213> mutante HS 33 de *Zea mays*
- <400> 1
- Leu His Asp Phe Gly Ser Glu Ile Leu Pro Arg Ala Val Leu Asp Tyr
1 5 10 15
Ser Val Gln Ala Cys Ile Phe Thr Gly Tyr Trp Glu Asp Val Gly Thr
20 25 30
Ile
- <210> 2
<211> 20
<212> PRT
<213> mutante RTS48-2 de *Zea mays*
- <400> 2
- Thr Gln Met Pro Glu Glu Pro Val Gly Trp Phe Gln Gly Thr Ala Asp
1 5 10 15
Ser Ile Arg Lys
20
- <210> 3
<211> 18
<212> PRT
<213> mutante RTS60-1 de *Zea mays*
- <400> 3
- Asp Lys Cys Lys Met Lys Tyr Val Phe Ile Ser Asp Gly Cys Leu Leu
1 5 10 15
Arg Glu
- <210> 4
<211> 7739
<212> ADN

ES 2 325 984 T3

<213> Alelo Shrunken-2 de tipo salvaje de *Zea mays*

<400> 4

5	taagaggggt gcacctagca tagatTTTTT gggctccctg gcctctcctt tcttccgcct	60
	gaaaacaacc tacatggata catctgcaac cagagggagt atctgatgct ttttcctggg	120
10	cagggagagc tatgagacgt atgtcctcaa agccactttg cattgtgtga aaccaatadc	180
	gatctttggt acttcatcat gcatgaacat ttgtggaaac tactagctta caagcattag	240
	tgacagctca gaaaaagtt atctctgaaa ggtttcatgt gtaccgtggg aatgagaaa	300
15	tgttgccaac tcaaacacct tcaatatggt gtttgcaggc aaactcttct ggaagaaagg	360
	tgtctaaaac tatgaacggg ttacagaaag gtataaacca cggctgtgca ttttgggaagt	420
20	atcatctata gatgtctggt gaggggaaag ccgtacgcca acgttattta ctcagaaaca	480
	gcttcaacac acagttgtct gctttatgat ggcatctcca cccaggcacc caccatcacc	540
	tattcaccta tctctcgtgc ctgtttattt tcttgccctt tctgatcata aaaaatcatt	600
25	aagagtttgc aaacatgcat aggcataatca atatgctcat ttattaattt gctagcagat	660
	catcttcta ctctttactt tatttattgt ttgaaaaata tgtcctgcac ctagggagct	720
	cgtatacagt accaatgcat cttcattaa tgtgaatttc agaaaggaag taggaaccta	780
30	tgagagtatt tttcaaaatt aattagcggc ttctattatg tttatagcaa aggccaaagg	840
	caaaatcgga acactaatga tggttggttg catgagtctg tcgattactt gcaagaaatg	900
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		

ES 2 325 984 T3

	tgaacctttg tttctgtgcg tgggcataaa acaaacagct tctagcctct tttacggtag	960
	ttgcacttgc aagaaatgtg aactcctttt catttctgta tgtggacata atgccaaage	1020
5	atccaggctt tttcatgggt gttgatgtct ttacacagtt catctccacc agtatgccct	1080
	cctcactctc tatataaaca catcaacagc atcgcaatta gccacaagat cacttcggga	1140
	ggcaagtgtg atttcgacct tgcagccacc tttttttggt ctggtgtaag tatactttcc	1200
10	cttaccatct ttatctgtta gtttaatttg taattgggaa gtattagtgg aaagaggatg	1260
	agatgctatc atctatgtac tctgcaaatg catctgacgt tatatgggct gcttcatata	1320
15	atltgaattg ctccattctt gccgacaata tattgcaagg tatatgccta gttccatcaa	1380
	aagtctctgt ttttcattct aaaagcattt tagtggcacg caattttgtc catgagggaa	1440
	aggaaatctg ttttggttac tttgcttgag gtgcattctt catatgtcca gttttatgga	1500
20	agtaataaac ttcagtttgg tcataagatg tcatatataa gggcaaacat atattcaatg	1560
	ttcaattcat cgtaaatggt ccctttttgt aaaagattgc atactcattt atttgagttg	1620
	caggtgtatc tagtagttgg aggagatatg cagtttgac ttgcattgga cacgaactca	1680
25	ggtcctcacc agataagatc ttgtgagggt gatgggattg acaggttggg aaaattaagt	1740
	attgggggca gaaagcagga gaaagctttg agaaataggt gctttggtgg tagagttgct	1800
	gcaactacac aatgtattct tacctcagat gcttgtcctg aaactcttgt aagtatccac	1860
30	ctcaattatt actcttcat gttggtttac tttacgtttg tcttttcaag ggaaatttac	1920
	tgtatttttt gtgttttgtg ggagtctat acttctgttg gactggttat tgtaaagatt	1980
35	tgttcaaata gggcatccta ataattgttt gaaatctggg aactgtggtt tcaactgcgtt	2040
	caggaaaaag tgaattattg gttactgcat gaataactta tggaaataga ccttagagtt	2100
	gctgcatgat taccacaaat cattgctacg atatcttata atagttcttt cgacctcgca	2160
40	ttacatatat aactgcaact cctagttgag ttcaaaaaaa aaaatgcaac tcttagaacg	2220
	ctcaccagtg taactcttcc tgaattgtta tttaatggca tgtatgcact acttgatac	2280
	ttatctagga ttaagtaatc taactctagg cccatattt gcagcattct caaacacagt	2340
45	cctctaggaa aaattatgct gatgcaaacc gtgtatctgc tatcattttg ggcggaggca	2400
	ctggatctca gctctttcct ctgacaagca caagagctac gcctgctgta agggataaca	2460
50	ctgaacatcc aacgttgatt actctattat agtattatac agactgtact tttcgaattt	2520
	atcttagttt tctacaatat ttagtggtt cttctcattt tcaagataca caattgatcc	2580
	ataatcgaag tggatgtaa gacagtgagt taaaagatta tatttttttg gagacttcca	2640
55	gtcaaatttt cttagaagtt tttttggtcc agatgttcat aaagtcgccg ctttcactct	2700
	ttttttaatt ttttaattgg tgcactatta ggtacctggt ggaggatggt acaggcttat	2760
	tgatatccct atgagtaact gcttcaacag tggataaat aagatatttg tgatgagtca	2820
60	gttcaattct acttcgctta accgccatat tcatcgtaca taccttgaag gcgggatcaa	2880
	ctttgctgat ggatctgtac aggtgattta cctcatcttg ttgatgtgta atactgtaat	2940

65

ES 2 325 984 T3

	taggagtaga tttgtgtgga gagaataata aacagatgcc gagattcttt tctaaaagtc	3000
	tagatccaaa ggcattgtgg ttcaaaacac tatggacttc taccatttat gtcattactt	3060
5	tgccttaatg ttccattgaa tggggcaaat tattgattct acaagtgttt aattaaaac	3120
	taattgttca tctgcaggt attagcggt acacaaatgc ctgaagagcc agctggatgg	3180
	ttccagggta cagcagactc tatcagaaaa tttatctggg tactcgaggt agttgatatt	3240
10	ttctcgttta tgaatgtcca ttcactcatt cctgtagcat tgtttctttg taattttgag	3300
	ttctcctgta tttcttttagg attattacag tcacaaatcc attgacaaca ttgtaatctt	3360
	gagtggcgat cagctttatc ggatgaatta catggaactt gtgcaggtat ggtgttctct	3420
15	tgttcctcat gtttcacgta atgtcctgat tttggattaa ccaactactt ttggcatgca	3480
	ttatttccag aaacatgtcg aggacgatgc tgatatactc atatcatgtg ctctgttga	3540
20	tgagaggtaa tcagttgttt atatcatcct aatatagaata tgcatacttg ttatccaaca	3600
	caggatgcat atggctaat ctgctttcct tttttttccc ttcggaagcc gagcttctaa	3660
	aaatgggcta gtgaagattg atcatactgg acgtgtactt caattctttg aaaaaccaa	3720
25	gggtgctgat ttgaattcta tggttagaaa ttcttgtgt aatccaattc ttttgtttc	3780
	ctttctttct tgagatgaac ccctctttta gttatttcca tggataacct gtacttgact	3840
	tattcagaaa tgattttcta ttttctgta gaatctgaca ctaaagctaa tagcactgat	3900
30	gttgcagaga gttgagacca acttctgag ctatgtata gatgatgcac agaaatatcc	3960
	ataccttgca tcaatgggca tttatgtctt caagaaagat gcacttttag accttctcaa	4020
35	gtaatcactt tctctgtgact tatttctatc caactcctag tttaccttct aacagtgca	4080
	attcttaggt caaaatatac tcaattacat gactttggat ctgaaatcct cccaagagct	4140
	gtactagatc atagtgtgca ggtaagtctg atctgtctgg agtatgtgtt ctgtaaactg	4200
40	taaattcttc atgtcaaaaa gttgtttttg tttccagttt ccactaccaa tgcaogattt	4260
	atgtattttc gcttccatgc atcacacata ctaacaatac attttacgta ttgtgttagg	4320
45	catgcatttt tacgggctat tgggaggatg ttggaacaat caaatcattc tttgatgcaa	4380
	acttggccct cactgagcag gtactctgtc atgtattctg tactgcatat atattacctg	4440
	gaattcaatg catagaatgt gttagaccat cttagtcca tctgttttc ttcaattagc	4500
50	ttatcattta atagtgttg gctagaattt aaacacaaat ttaccttaata tgtttctctc	4560
	ttcagccttc caagtttgat ttttacgac caaaaacacc tttcttctact gcaccccgat	4620
	gcttgccctc gacgcaattg gacaagtgca aggtatatgt cttactgagc acaattgtta	4680
55	cctgagcaag attttgtgta cttgacttgt tctctccac agatgaaata tgcatttatc	4740
	tcagatggtt gcttactgag agaatgcaac atcgagcatt ctgtgattgg agtctgctca	4800
60	cgtgtcagct ctggatgtga actcaaggta catactctgc caatgtatct actcttgagt	4860
	ataccatttc aacaccaagc atcaccaaat cacacagaac aatagcaaca aagcctttta	4920

65

ES 2 325 984 T3

	gttccaagca atttagggta gcctagagtt gaaatctaac aaaacaaaag tcaaagctct	4980
	atcaecgtgga tagttgtttt ccatgcactc ttatttaagc taattttttg ggtatactac	5040
5	atccatttaa ttattgtttt attgcttctt ccctttgcct ttccccatt actatcgcgt	5100
	cttaagatca tactacgcac tagtgtcttt agaggctctt ggtggacatg ttcaaaccat	5160
	ctcaatcggg gttggacaag tttttcttga atttggcta cacctaacct atcaecgtatg	5220
10	tcacgtttc aaactcgatc cttcctgtat catcataaat ccaatgcaac atacgcattt	5280
	atgcaacatt tatctgttga acatgtcatc tttttgtagg ttaacattat gcaccataca	5340
15	atgtagcatg tctaatac atcctataaa atttacattt tagcttatgt ggtatcctct	5400
	tgccacttag aacaccatat gcttgatgcc atttcatcca cctgctttg attctatggc	5460
	taacatcttc attaatatcc tcgcctctct gtatcattgg tcctaaatat ggaaatacat	5520
20	tctttctggg cactacttga ctttccaaac taacgtctcc tttgctcctt tcttgtgtgt	5580
	agtagtaccg aagtcacatc tcataatcc gggttttagt ctactaagtc ccgggttcga	5640
	tccccctcag ggggtgaattt cgggcttggg aaaaaaaatc ccctcgtgt gtccccccg	5700
25	ctctcgggga tcgatatcct gcgcgccacc ctccggctgg gcattgcaga gtgagcagtt	5760
	gatcggctcg ttagtgatgg ggagcggggg tcaagggttt tctcggccgg gaccatgttt	5820
30	cggctcttta atataatgcc gggagggcag tctttccctc cccggtcgag ttttagttct	5880
	accgagtcta aaacctttgg actctagagt cccctgtcac aactcacaac tctagttttc	5940
	tatttacttc tacctagcgt ttattaatga tcactatata gtctgtaaaa agcatacacc	6000
35	aatgtaatcc ccttgatgt cccttgtaat attatccatc acaagaaaa aaggttaaggc	6060
	tcaaagttga cttttgatat agtcctatc taatcgagaa gtcactctgta tcttcgtctc	6120
	ttgttcgaac actagtcaca aaatTTTTTg tacatgttct taatgagtcc aacgtaatat	6180
40	tccttgatat tttgtcataa gccctcatca agtcaatgaa aatcacgtgt aggtccttca	6240
	ttgttctctt aactgtctcc atcaattgtc tcattaagaa aatctctctc atagttaacc	6300
45	ttttggcatg aaacaaaatc acacagaagt tgtttccttt ttttaagatc ccacacaaaa	6360
	gaggtttgat ctaaggaatc tggatccctg acaggtttat caaaatcctt tgtgtttttc	6420
	ttaaaactga atattoctcc agcttctagt attgatgtaa tattcaatct gtttagcaag	6480
50	tgaacacctt ggttcttgtt gtactgtac ccccccccc ccccccccc cgaggcccag	6540
	attaccacga catgaataca agaataatga acccagatct agagtttgtt tgtactgttg	6600
	aaaatcggtg acaattcatt ttgttattgc gctttctgat aacgacagga ctccgtgatg	6660
55	atgggagcgg acacctatga aactgaagaa gaagcttcaa agctactgtt agctgggaag	6720
	gtcccagttg gaataggaag gaacacaaag ataagggtgag tatggatgtg gaaccaccgg	6780
60	ttagttccca aaaatatcac tcaactgatac ctgatggtat cctctgatta ttttcaggaa	6840
	ctgtatcatt gacatgaatg ctaggattgg gaagaacgtg gtgatcaca acagtaagg	6900

65

ES 2 325 984 T3

	gagcgagegc acctacatgg gtgcagaatc ttgtgtgctc atctatccta attcggtaat	6960
	tcctatccag cgctagtctt gtgacatgg ggcattgggtt cgactctgtg acagggcadc	7020
5	caagaggctg atcaccggga agaagggtac tacataaggt ctggaatcgt ggtgatcttg	7080
	aagaatgcaa ccatcaacga tgggtctgtc atatagatcg gctgcgtgtg cgtctacaaa	7140
	acaagaacct acaatgggat tgcacgatg gatcgtgtaa ccttgggatg gtaagagccg	7200
10	cttgacagaa agtcgagcgt tcgggcaaga tgcgtagtct ggcattgctgt tccttgacca	7260
	tttgtgctgc tagtatgtac tgttataagc tgccttagaa gttgcagcaa acctttttat	7320
15	gaacctttgt atttccatta cctgctttgg atcaactata tctgtcatcc tatatattac	7380
	taaattttta cgtgtttttc taattcggtg ctgcttttgg gatctggctt cgatgaccgc	7440
	tcgacctgg gccattgggt cagctctgtt ccttagagca actccaagga gtcctaaatt	7500
20	ttgtattaga tacgaaggac ttcagccgtg tatgtcgtcc tcaccaaagc ctctttttgc	7560
	atagtgcagg ggtttagac ttgtagccct tgtttaaaga ggaatttgaa tatcaaatta	7620
	taagtattaa atatatattt aattaggtta acaaatttgg ctgcttttta gtctttattt	7680
25	atgtaattag ttttaaaaat agacctatat ttcaatacga aatatcatta acatcgata	7739

30 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido sintético

40 <400> 5

cgactcacta tagggagacc

20

45 <210> 6
 <211> 15
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleótido sintético

55 <400> 6

ccctatgagt aactg

15

60 <210> 7
 <211> 15
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 325 984 T3

	<220>		
	<223> Cebador oligonucleótido sintético		
5	<400> 7		
	tatactcaat tacat		15
	<210> 8		
10	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador oligonucleótido sintético		
	<400> 8		
20	gtgccacctg acgtctaag		19
	<210> 9		
	<211> 15		
25	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> Cebador oligonucleótido sintético		
	<400> 9		
35	cagagctgac acgtg		15
	<210> 10		
	<211> 16		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> Cebador oligonucleótido sintético		
	<400> 10		
50	aagctgatcg ccactc		16
55			
60			
65			