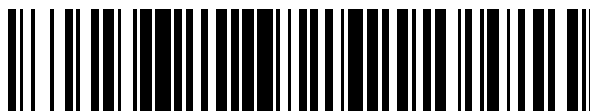


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 006**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**A01H 5/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06847950 .0**  
96 Fecha de presentación: **21.12.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1968372**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.09.2008**

54 Título: **Secuencia promotora obtenida de arroz y procedimientos de uso**

30 Prioridad:  
**23.12.2005 US 753848 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.08.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.08.2012**

73 Titular/es:  
**ARCADIA BIOSCIENCES INC.  
202 COUSTEAU PLACE SUITE 200  
DAVIS, CA 95616, US**

72 Inventor/es:  
**GOOD, Allen, G.;  
DEPAUW, Mary y  
SHRAWAT, Ashok, K.**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

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).

ES 2 386 006 T3

## DESCRIPCIÓN

Secuencia promotora obtenida de arroz y procedimientos de uso

### Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a una secuencia promotora obtenida de arroz, a procedimientos de uso de la secuencia promotora y a plantas que incluyen la secuencia promotora.

### Antecedentes de la invención

- 10 Las plantas de cultivo tienen una dependencia fundamental de fertilizantes nitrogenados inorgánicos, principalmente en forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). Cada año se añaden aproximadamente de 85 a 90 millones de toneladas métricas (MTt) de fertilizantes nitrogenados al suelo en todo el mundo. Esta cantidad ha aumentado desde sólo 1,3 MTm en 1930 y de 10,2 MTm en 1960. Se ha predicho que aumentará a 240 MTm para el año 2050 (Tilman y col., 1999, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 96: 5995-6000). Se ha estimado que el 50 % al 70 % del nitrógeno aplicado se pierde en el sistema planta-suelo. Dado que el  $\text{NO}_3^-$  es soluble y no es retenida por la matriz del suelo, el exceso de  $\text{NO}_3^-$  puede salir al agua y ser eliminado por los microorganismos.

- 15 Es importante mejorar la eficiencia del uso de nitrógeno (EUN) de las plantas de cultivo por dos razones. La primera, el uso de fertilizantes comerciales constituye uno de los principales costes asociados con la producción de cosechas de alto rendimiento. En segundo lugar, sería un beneficio para el ambiente para reducir los niveles de los fertilizantes nitrogenados que se pierden en el ecosistema. Los efectos ambientales incluyen el deterioro de la calidad del suelo, la polución y los riesgos para la salud.

- 20 La alanina es uno de los aminoácidos más frecuentes en las plantas. La alanina es sintetizada por la enzima alanina aminotransferasa (Ala) a partir de piruvato y glutamato en una reacción reversible, como se muestra en la Figura 1. La alanina es un aminoácido que se sabe que aumenta en otras condiciones ambientales específicas, tales como sequía y agresión anaeróbica (Muench and Good, 1994, Plant Mol. Biol. 24:417-427; Vanlerberge y col., 1993, Plant Physiol. 95:655-658). Se sabe que los niveles de alanina aumentan sustancialmente en el tejido de la raíz en condiciones de agresión anaeróbica. Como ejemplo, los niveles de alanina en raíces de cebada aumentan 20 veces después de 24 horas de agresión anaeróbica. La luz induce el gen de la Ala en la escoba de mijo y cuando las plantas se están recuperando de la agresión del nitrógeno (Son y col., 1992, Arch. Biochem. Biophys. 289: 262-266). Vanlerberge et al. (1993) han demostrado que en algas anaerobias mantenidas sin nitrógeno, la adición de nitrógeno en forma de amoniaco tuvo como resultado la incorporación del 93 % de un marcador  $\text{N}_{15}$  directamente en la alanina. Por tanto, la alanina parece ser un aminoácido importante en la respuesta a la tensión en plantas.

- 30 El documento US 6.084.153 divulga la inducción de AlaAT en las raíces de plantas de cáñola y un fenotipo eficiente en nitrógeno resultante.

- 35 El documento WO 01/55433 enseña el uso del gen 26 de la turgencia de *Brassica* (btg26). Recientemente, las proteínas similares al gen 26 de turgencia se han denominado antiqutinas (Tang y col., 2002, FEBS Lett. 516(1-3):183-186). Plantas de *Brassica napus* se transformaron con construcciones que contienen el gen de AlaAT en unión operativa con el promotor de btg26. Se demostró que las plantas transgénicas tienen niveles elevados de AlaAT en el tejido de la raíz.

- El documento US2005/0044585 divulga el uso de promotores LeAMT1, LeNRT1, GmNRT2, KDC1, PHT1, GOGAT, OsRAB5 y ALF5 para dirigir la expresión específica en la raíz de un gen que codifica una proteína de utilización de nitrógeno, por ejemplo AlaAT.

- 40 En la técnica también se desea incrementar la EUN en el arroz. En 2006, el área en acres de todo el mundo dedicados al cultivo de arroz fue 151.730.000 hectáreas con un consumo de nitrógeno estimado a 11.963 MTm. Por tanto, mejorar la EUN en arroz no solo disminuiría los costes de la producción de las cosechas pero reduciría los efectos ambientales dañinos de los fertilizantes de nitrógeno, incluido el desarrollo de "zonas muertas" en los océanos del mundo que son el resultado de la muerte y descomposición de las flores masivas de algas alimentadas por líquidos residuales de nutrientes excesivos.

### Sumario de la invención

Los objetivos de la presente invención son proporcionar una secuencia promotora obtenida de *Oryza sativa* (arroz), procedimientos de uso de la secuencia promotora y plantas que incluyen la secuencia promotora.

- 50 En una realización, la presente invención proporciona procedimientos por los cuales se puede modificar *Oryza sativa* para expresar un gen diana heterólogo o región codificadora de interés usando una secuencia promotora consistente en la SEC ID N° 1 unida operativamente a la región codificadora. En otra realización, la presente invención también proporciona procedimientos de producir plantas de *Oryza sativa* que tienen mayor biomasa y rendimiento de las semillas. Incrementando la biomasa y el rendimiento de las semillas, se proporciona plantas de *Oryza sativa* que tienen un beneficio ambiental en cuanto a que mantienen un rendimiento deseado reduciendo la necesidad de

niveles altos de aplicación de nitrógeno.

La invención proporciona una secuencia promotora de la antiquina asilada de *Oryza sativa* que consiste en la SEC ID N° 1.

- 5 También se proporciona una construcción genética que incluye una secuencia promotora OsAnt1 que consiste en la SEC ID N° 1 unida operativamente con una región de codificación de interés que codifica una proteína diana. La proteína diana puede ser una proteína de utilización de nitrógeno, por ejemplo alanina aminotransferasa (AlaAT).

Un vector que incluye una construcción genética con una secuencia promotora OsAnt1 que consiste en la SEC ID N° 1 unida operativamente con una región de codificación de interés que codifica una proteína diana. La proteína diana puede ser una proteína de utilización de nitrógeno, por ejemplo AlaAT.

- 10 Se describe un procedimiento para dirigir la expresión de un gen diana en una planta *Oryza saliva*. El procedimiento puede incluir poner en contacto e introducir en una planta de *Oryza saliva* el gen diana en unión operativa con una secuencia promotora OsAnt1 que consiste en la SEC ID N° 1 y que expresa el gen diana. El gen diana puede codificar una proteína de utilización de nitrógeno, por ejemplo AlaAT. Además, la expresión del gen diana puede dirigirse a un tejido concreto, por ejemplo a la raíz de la planta.
- 15 También se describe un procedimiento para incrementar la biomasa de una planta de *Oryza saliva* poniendo en contacto e introduciendo en una planta de *Oryza saliva* un gen diana en unión operativa con una secuencia promotora OsAnt1 que consiste en la SEC ID N° 1. El gen diana puede codificar una proteína de utilización de nitrógeno, por ejemplo AlaAT. Además, la expresión del gen diana puede dirigirse a un tejido concreto, por ejemplo a la raíz de la planta.
- 20 Se describe un procedimiento para incrementar el rendimiento de las semillas de una planta *Oryza saliva*. El procedimiento puede incluir poner en contacto e introducir en una planta de *Oryza saliva* un gen diana en unión operativa con una secuencia promotora OsAnt1 que consiste en la SEC ID N° 1. El gen diana puede codificar una proteína de utilización de nitrógeno, por ejemplo AlaAT. Además, la expresión del gen diana puede dirigirse a un tejido concreto, por ejemplo a la raíz de la planta.
- 25 También se describe una planta de *Oryza saliva* transformada que incluye un gen diana en unión operativa con una secuencia promotora OsAnt1 que consiste en la SEC ID N° 1. El gen diana puede codificar una proteína de utilización de nitrógeno, por ejemplo AlaAT.
- Una semilla de la planta de *Oryza saliva* que incluye un gen diana en unión operativa con una secuencia promotora OsAnt1 que consiste en la SEC ID N° 1. El gen diana puede codificar una proteína de utilización de nitrógeno, por ejemplo AlaAT.
- 30

### **Breve descripción de las figuras**

Estas y otras características de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción en la que se hace referencia a las figuras adjuntas, en las que:

- 35 **La FIGURA 1** muestra una representación esquemática de las etapas clave en la utilización de nitrógeno en una célula vegetal. El nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) se transporta a la célula vegetal y se convierte en nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) mediante la acción de la nitrato reductasa (NR). El nitrito se transloca desde el citoplasma al cloroplasto, donde es reducido por la nitrito reductasa (NiR) en amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). La glutamina sintetasa (GS) funciona asimilando o reciclando el amonio. Una pareja enzimática, glutamina sintetasa (GS)/glutamato sintasa (GOGAT), cataliza la conversión de glutamina (Gln) en glutamato (Glu). El glutamato es un bloque componente de muchos aminoácidos. Además, la alanina es sintetizada por la enzima alanina aminotransferasa (AlaAT) a partir de piruvato y glutamato en una reacción reversible.
- 40

- La FIGURA 2** muestra la secuencia nucleotídica del promotor OSAnt1 de la presente invención (SEC ID N° 1). La secuencia se aisló usando una búsqueda blastn de la base de datos NCBI usando la secuencia de nucleótidos (366-3175 pb) del gen btg26 de *Brassica* (Stroeher y col., 1995, Plant Mol. Biol. 27:541-551) para identificar la secuencia de nucleótidos homóloga de arroz (número de registro AF323586). Después, esta secuencia se usó a su vez frente al proyecto de secuenciación TIGR de *Oryza sativa* (véase: [tigr.org/tdb/e2kl/osal/](http://tigr.org/tdb/e2kl/osal/)), como se indica en el Ejemplo 1. La supuesta caja TATA se muestra en negrita y los cebadores usados en la amplificación por PCR de la secuencia del genoma del arroz están subrayados.
- 45

- La FIGURA 3** muestra una representación esquemática de las etapas para producir la construcción genética OsAnt1pro-Gus, usando el gen indicador beta-glucuronidasa (GUS) de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 2.
- 50

**La FIGURA 4** muestra una representación esquemática de las etapas para producir la construcción genética OsAnt1 pro- AlaAT de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 2.

**La FIGURA 5** muestra la expresión del gen indicador GUS dirigido por el promotor OsAnt1 de la presente invención.

La expresión está presente en el área de expansión celular de las puntas de raíz de las raíces en desarrollo (panel A); en los pelos radiculares de las raíces en desarrollo (panel B); y en las raíces laterales de las raíces (panel C) de una planta de *Oryza sativa* transformada con la construcción genética OsAnt1pro-Gus como se muestra en la **FIGURA 3**, de acuerdo con el procedimiento descrito en el **Ejemplo 3**. Las áreas con manchas oscuras indican la expresión del gen indicador GUS.

La **FIGURA 6** muestra la biomasa media en peso seco (gramos) de plantas *Oryza saliva* transformadas con la construcción genética OsAnt1 pro-AlaAT como se muestra en la **FIGURA 4** comparado con la biomasa media en peso seco (gramos) de las plantas control de *Oryza sativa* silvestre cultivadas en las mismas condiciones de crecimiento que se indican en el Ejemplo 3.

La **FIGURA 7** muestra el peso medio total de semilla (gramos) de semillas recolectadas de plantas *Oryza saliva* transformadas con la construcción genética OsAnt1pro-AlaAT como se muestra en la **FIGURA 4** comparado con el peso medio total de semilla (gramos) de las semillas de plantas control de *Oryza sativa* silvestre cultivadas en las mismas condiciones de crecimiento que se indican en el Ejemplo 3.

La **FIGURA 8** muestra la relación entre la biomasa en peso seco (gramos) y el peso total de semilla (gramos) para cada planta transgénica.

#### **Descripción detallada**

Una secuencia promotora obtenida de arroz, procedimientos de uso de la secuencia promotora y una planta de arroz y una porción de una planta de arroz que incluye la secuencia promotora que consiste en la SEC ID N° 1

La descripción siguiente es de una realización preferida. La secuencia promotora es una secuencia promotora de antequitina aislada de *Oryza saliva* (OsAnt1) que consiste en la SEC ID N° 1.

La expresión "región de codificación de interés" incluye cualquier gen que deseablemente se expresa en uno o más de un tejido vegetal. Ejemplos de una región de codificación de interés que pueden usarse de forma ventajosa junto con los procedimientos descritos en el presente documento incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican una o más de una proteína implicada en la asimilación del nitrógeno, la utilización del nitrógeno o una combinación de los mismos. Otros ejemplos serían secuencias de ácido nucleico que codifica una o más de una proteína implicada en la captación y utilización de nitrógeno.

Por "promotor" se quiere decir la secuencia de una molécula de ADN que dirige la transcripción de un gen en 3' al que está operativamente unida o que, cuando se fusiona con un gen concreto e introduce en una célula, produce la expresión del gen a un nivel mayor de lo posible en ausencia de la secuencia de ADN. Dichos promotores pueden ser el promotor de longitud completa o fragmentos activos del mismo. Por "fragmento activo" se quiere decir un fragmento que tiene al menos aproximadamente 0,1 %, preferentemente al menos aproximadamente 10 % y, más preferentemente, al menos aproximadamente 25 % de la actividad de una secuencia promotora de referencia tal como se ha analizado mediante procedimientos conocidos para los expertos en la técnica para detectar la actividad promotora, por ejemplo la medición de los niveles del gen indicador GUS. Las secuencias de ADN necesarias para la actividad se pueden identificar sintetizando varios fragmentos y analizando la expresión o introduciendo mutaciones puntuales en ciertas regiones y analizando la pérdida de actividad. Fragmentos heterólogos de promotores u otras secuencias promotoras se pueden combinar para participar en la actividad de una secuencia promotora. Por ejemplo, el promotor CaMV 35S u otras secuencias promotoras conocidas se pueden combinar con la secuencia promotora descrita en el presente documento para mediar en la expresión de una región codificadora de interés.

Las construcciones génicas descritas en el presente documento pueden también incluir otros potenciadores, potenciadores de la traducción o de la transcripción, como sea necesario. Estas regiones potenciadoras son bien conocidas para los expertos en la técnica y pueden incluir el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. El codón de iniciación tiene que estar en fase con el marco de lectura de la secuencia de codificación para garantizar la traducción de todo la secuencia. Las señales de control de la traducción y los codones de iniciación pueden proceder de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. Las regiones de iniciación de la traducción se pueden proporcionar de la fuente de la región de iniciación de la transcripción o del gen estructural. La secuencia también puede derivar del promotor seleccionado para expresar el gen y puede modificarse específicamente para incrementar la traducción del ARNm.

Las construcciones génicas descritas en el presente documento pueden incluir además una región en 3' sin traducir (o de terminación) que contiene una señal de poliadenilación y otras señales reguladoras capaces de efectuar el procesamiento del ARNm o la expresión génica. Ejemplos no limitantes de regiones adecuadas en 3' son las regiones no traducidas transcritas en 3' que contienen una señal de poliadenilación de genes plasmídicos inductores de tumor (Ti) de *Agrobacterium* tal como la nopalina sintasa (gen Nos), genes vegetales tales como los genes de la proteína de almacenamiento de la soja y el gen de la subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa (ssRUBISCO).

Por “operativamente unido” o “unión operativa” se quiere decir que las secuencias concretas interaccionan bien directa o indirectamente para llevar a cabo una función indicada, tal como la mediación o la modulación de la expresión génica. La interacción de secuencias operativamente unidas puede estar mediada por, por ejemplo, proteínas que interaccionan con las secuencias operativamente unidas.

El término “exógeno”, como se usa en el presente documento en referencia a una molécula de ácido nucleico, significa una molécula de ácido nucleico que se origina desde el exterior de la planta. Una molécula de ácido nucleico exógena puede tener una secuencia de nucleótidos natural o no natural. Un experto en la técnica entiende que una molécula de ácido nucleico exógena puede ser una molécula de ácido nucleico heteróloga derivada de la misma especie de planta o de una especie de planta diferente a la planta en la que se introduce la molécula de ácido nucleico. Como alternativa, puede ser una molécula de ácido nucleico derivada de una especie no vegetal, tal como hongos, levaduras, bacterias u otros organismos no vegetales.

Dado el nivel de expresión transgénica en monocotiledóneas es, en general, mayor que cuando está dirigida por un promotor de monocotiledóneas que un promotor de dicotiledóneas, el genoma de arroz se analizó para identificar un homólogo de *btg26* en el arroz. Esto se realizó usando una búsqueda *blastn* usando la secuencia de aminoácidos del gen *btg26* de *Brassica* (Stroeher y col., 1995, *Plant Mol. Biol.* 27:541-551) frente al proyecto de secuenciación de TIGR de *Oryza sativa* (véase el Ejemplo 1). El gen de la antiquina de *Oryza sativa* (*OsAnt1*) se identificó en el cromosoma 9 del arroz y se identificó una secuencia promotora en 5' del codón de iniciación ATG del gen *OsAnt1* (Figura 2; SEC ID N° 1). Esta secuencia promotora se usó para dirigir la expresión de una región de codificación de interés. Las plantas que expresan, por ejemplo, entre otros, *AlaAT* bajo el control de la secuencia promotora *OsAnt1*, exhibieron mayor biomasa, rendimiento en semillas y EUN (véase el Ejemplo 3).

Por tanto, se describe la producción de plantas de *Oryza sativa* que expresan uno o más genes diana o regiones de codificación de interés. Además se proporciona un procedimiento para incrementar la biomasa de una planta de arroz y un procedimiento para incrementar el rendimiento en semillas de una planta de arroz. Mediante los procedimientos descritos en el presente documento es posible producir plantas de arroz que tengan uno o más rasgos o propiedades deseados; por ejemplo, alterar específicamente las propiedades genéticas de la planta, las propiedades fisiológicas de la planta o las propiedades genéticas y fisiológicas de la planta. Además, se describen procedimientos de producir plantas de arroz que tienen expresión en las raíces de uno o más de un gen deseado o región de codificación de interés, usando la secuencia promotora *OsAnt1* divulgada en el presente documento.

La producción de plantas de arroz que tienen la expresión de uno o más de un gen diana o región de codificación de interés se consigue usando la secuencia promotora *OsAnt1* de la presente invención, que dirige la expresión de la región de codificación de interés. La secuencia promotora *OsAnt1* permite la expresión de la secuencia diana en uno o más de un tejido de la planta de arroz, adecuadamente en el tejido de la raíz.

Un experto en la técnica entenderá que se pueden realizar modificaciones en la secuencia promotora *OsAnt1* útil en los procedimientos y construcciones de la invención para mejorar o modular la actividad de la secuencia promotora. Regiones seleccionadas de la secuencia promotora *OsAnt1* pueden estar operativamente unidas a una única región de codificación diana para alterar el nivel de expresión de la región de codificación unida, o la secuencia promotora *OsAnt1* puede estar operativamente unida a una o más de una región de codificación diana de modo que la expresión de cada región de codificación diana puede estar regulada de forma coordinada. La secuencia promotora *OsAnt1* puede ser de cualquier tamaño adecuado para permitir su funcionamiento como promotor. La secuencia promotora *OsAnt1* puede modificarse usando procedimientos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, entre otros, mutagénesis, delección, inserción, sustitución o truncamiento, para alterar el grado al que se expresa la región de codificación unida operativamente, o para alterar la especificidad de la expresión dirigida por la secuencia promotora. Además, la introducción de la secuencia promotora *OsAnt1* respecto a la región de codificación unida operativamente puede modularse (p. ej., alejarla o acercarla) para alcanzar un nivel deseado de la expresión dirigida al promotor.

Se prevé que la secuencia promotora *OsAnt1* puede dirigir la expresión de la región de codificación de interés en respuesta a una condición ambiental o fisiológica específica. Por ejemplo, la secuencia promotora puede activarse en condiciones de tensión por sequía, tensión osmótica, tensión salina, tensión térmica, privación de nutrientes o en condiciones de desarrollo específicas, por ejemplo, entre otros, tras germinación, generación del fruto o producción de semillas.

Una región de codificación de interés, un gen diana, de la invención puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que se expresa deseablemente dentro de una planta de arroz. Clases generales de regiones de codificación que se pueden usar de forma ventajosa en los procedimientos y construcciones de la invención incluyen secuencias de nucleótidos que codifican proteínas estructurales; proteínas implicadas en el transporte de nitrógeno; proteínas implicadas en la captación de nitrógeno; proteínas implicadas en el transporte y la captación de nitrógeno; enzimas y proteínas implicadas en el uso de nitrógeno; proteínas implicadas en la resistencia de las plantas a pesticidas o herbicidas; proteínas implicadas en la resistencia de las plantas a los nematodos, virus, insectos o bacterias; proteínas implicadas en la resistencia de las plantas a la tensión, por ejemplo, entre otras, tensión osmótica, térmica, de pH o de oxígeno; proteínas implicadas en la estimulación o continuación del crecimiento de las plantas; proteínas implicadas en la fotomediación; o proteínas que tienen propiedades farmacéuticas o enzimas de codificación que

producen compuestos que tienen propiedades farmacéuticas.

Por ejemplo, la región de codificación de interés puede codificar una proteína de utilización de nitrógeno y, en particular, una enzima que asimila el amoníaco en aminoácidos o usa los aminoácidos formados en reacciones biosintéticas. Esta proteína se puede seleccionar a partir de, entre otros, un transportador de nitrato (de alta o baja afinidad), un transportador de amoníaco, un transportador de amonio, un transportador de aminoácidos, alanina deshidrogenasa, glutamina sintetasa (GS), asparagina sintetasa (AS), glutamato sintasa (también conocida como glutamato 2:oxoglutarato aminotransferasa y GOCAT), asparaginasa (ASN), glutamato deshidrogenasa (GDH), nitrato reductasa, aspartato aminotransferasa (AspAT), alanina aminotransferasa (AlaAT) y otras aminotransferasas conocidas. Dichas proteínas se divulgan en la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. número 2005/0044585.

El gen diana o la región de codificación de interés se puede expresar de forma natural en la planta de arroz o puede ser heterólogo para la planta de arroz. El gen puede proceder de cualquier fuente, incluidas las fuentes víricas, bacterianas, vegetales o animales. La región de codificación de interés es heteróloga para la secuencia promotora OsAnt1 a la que está unida operativamente en cuanto a que no es del gen al que la secuencia promotora OsAnt1 está unida de forma natural.

La región de codificación se puede modificar de cualquier modo adecuado con el fin de realizar ingeniería en un gen o planta de arroz con propiedades deseables. La región de codificación se puede modificar para que se pueda transcribir y traducir en el sistema vegetal, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de interés se puede modificar de un modo tal que contenga todas las secuencias de poliadenilación necesarias, sitios de inicio y sitios de terminación que permiten que la secuencia de codificación se transcriba a ARNm (ácido ribonucleico mensajero) y el ARNm que se va a traducir en la planta de arroz. Además, la región de codificación se puede modificar de modo tal que su uso de codones sea más similar al de los genes nativos de la planta de arroz (es decir, se puede usar una secuencia optimizada de la planta). Dichas modificaciones de la secuencia de nucleótidos y los procedimientos por los cuales se pueden realizar son bien conocidos para un experto en la técnica.

Las construcciones descritas en el presente documento incluyen una secuencia promotora OsAnt1-región codificadora de interés se introducen con más eficiencia en una planta de arroz, una célula de planta de arroz o un protoplasto vegetal a través del uso de un vector. Ejemplos de vectores de clonación o de expresión adecuados para usar con la invención son plásmidos (tales como pACr001), cósmidos, ADN o ARN viral y minicromosomas. En la técnica se conocen bien vectores vegetales adecuados (p. ej., Clark, M., ed. (1997) Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual. Springer Verlag, ISBN: 354U584056).

Los vectores pueden contener de forma ventajosa uno o más marcadores detectables o seleccionables que se expresan en bacterias o plantas o genes indicadores, de modo que se pueda monitorizar la incorporación del vector en una célula vegetal de arroz o protoplasto. Es preferible que dichos marcadores seleccionables o detectables confieren un fenotipo fácilmente detectable, tal como la resistencia a un compuesto de otro modo tóxico (p. ej., resistencia a kanamicina) o una reacción colorimétrica o luminiscente tras la incubación de la planta con un sustrato adecuado (p. ej., genes de beta-glucuronidasa (GUS) o luciferasa) Dichos genes indicadores son bien conocidos en la técnica.

Las construcciones descritas en el presente documento se pueden introducir en una planta de arroz o célula vegetal mediante cualquier procedimiento útil. Se dispone de un gran número de procedimientos y se sabe bien que liberan genes en las células vegetales. Uno de los procedimientos mejor conocidos implica el uso de *Agrobacterium* o una bacteria similar del suelo como vector, en los que *Agrobacterium* se transforma con la construcción de interés o un vector que contiene la construcción. Los tejidos diana de una planta se cultivan junto con *Agrobacterium* transformada que inserta la secuencia de nucleótidos de interés en el genoma de la planta, como se describe en la patente de EE.UU. 4.940.838 (Schilperoort y col.) y Horsch y col. (1985, Science 227:1229-1231) Procedimientos alternativos de transformación y transferencia génica útiles en la presente invención incluyen, entre otros, liposomas, liposomas, captación de ADN libre mediada por electroporación o química, técnicas de coprecipitación en fosfato cálcico, microproyectiles dirigidos y micro o macroinyección, transformación directa de ADN, y puede implicar plásmidos Ti, plásmidos Ri o vectores de virus vegetales. Dichos procedimientos de transformación están bien documentados en la técnica. Un experto en la técnica entenderá que el procedimiento escogido para la transformación de la planta de arroz, la célula vegetal de arroz o del protoplasto vendrá determinado en gran medida por la naturaleza de la construcción secuencia promotora OsAnt1-secuencia diana o el vector que contiene la construcción.

También se describe una planta de *Oryza saliva* transformada que incluye una región de codificación en unión operativa con una secuencia promotora OsAnt1. También se proporciona una semilla de planta de *Oryza saliva* que incluye una región de codificación en unión operativa con una secuencia promotora OsAnt1 descrita en el presente documento. Las plantas y semillas de arroz transformadas producidas de acuerdo con la presente invención pueden ser útiles además en los programas de cultivo para la producción de plantas de arroz que tienen más de un rasgo deseado. Por ejemplo, dos plantas de arroz transformadas de la invención, cada una de las cuales tiene la expresión de un transgen deseado, se puede cruzar usando procedimientos conocidos para producir progenie que se

caracterice por tener la expresión de ambos transgenes. De este modo, es posible producir plantas de arroz transformadas que tienen una combinación de rasgos deseados expresados en la planta.

Además, un experto en la técnica entenderá que diferentes variedades de plantas pueden ser más o menor susceptibles a la manipulación genética, en general; por tanto, puede ser ventajoso transformar primero una variedad relacionada de la planta del arroz mediante los procedimientos y con las construcciones descritas en el presente documento y, después, introducir la expresión del gen diana en la planta de arroz mediante técnicas de cultivo cruzado. Dichas técnicas y variedades de plantas adecuadamente relacionadas son bien conocidas en la técnica.

Las semillas se pueden recolectar de plantas de arroz transformadas usando procedimientos bien conocidos en la técnica y se pueden usar adicionalmente para volver a cultivar las plantas transformadas y los híbridos descritos en el presente documento.

Los procedimientos y construcciones descritos en el presente documento permiten la producción de plantas y semillas de arroz que tienen la expresión de uno o más genes deseados en la planta de arroz. Existe una amplia variedad de posibles aplicaciones de las plantas descritas en el presente documento, incluidos, entre otros, la producción de plantas de arroz que tienen una mayor tolerancia a la tensión, mejor captación de nitrógeno, mejor utilización de nitrógeno, mejor contenido en nutrientes, mejor rendimiento en nutrientes de compuestos deseados y propiedades de fitoremedios. Las aplicaciones específicas se describen adicionalmente a continuación.

Las plantas descritas en el presente documento pueden crecer en suelos pobres en nutrientes. En la técnica es bien conocido que ciertas especies de plantas, particularmente plantas de cultivo, eliminan del suelo los nutrientes necesarios para crecer, tales como nitrógeno, fosfato y potasio. Con el fin de reponer los nutrientes que faltan, es necesario fertilizar el suelo (un procedimiento caro y dañino para el medioambiente) o cultivar plantas que se sabe que depositan el nutriente deplecionado en el suelo (p. ej., trébol y soja en el caso de la depleción de nitrógeno). No obstante, estas alternativas pueden ser menos económicamente aceptables. Los procedimientos descritos en el presente documento permiten la expresión dirigida de secuencias de nucleótidos implicadas en la captación de nutrientes (p. ej., moléculas de transporte) a dichos tejidos en los que se produce la captación (por ejemplo, la raíz o los pelos de la raíz) para mejorar de este modo la capacidad de la planta de arroz para absorber los nutrientes del medioambiente.

Los procedimientos descritos en el presente documento también se pueden usar para producir plantas de arroz que expresan genes de utilización de nutrientes heterólogos o nativos optimizados o regiones de codificación que permiten un uso más eficiente del nutriente de modo que se requiere menos cantidad del nutriente (p. ej., nitrógeno) para el crecimiento y el funcionamiento normales de la planta. Además, es posible, usando los procedimientos descritos en el presente documento, expresar regiones de codificación de interés implicadas en el uso y captación de nutrientes no usados normalmente por la planta de arroz adecuados en dichos tejidos vegetales que están directamente expuestos a los diferentes nutrientes (p. ej., raíz y hojas). De este modo, se pueden producir plantas de arroz que pueden crecer y desarrollarse con diferentes fuentes de nutrientes (p. ej., diferentes fuentes de nitrógeno). Genes diana particularmente útiles para la optimización de la eficiencia de nitrógeno de la planta incluyen: un transportador de nitrato (de alta o baja afinidad), un transportador de amoníaco, un transportador de amonio, un transportador de aminoácidos, alanina deshidrogenasa, glutamina sintetasa (GS), asparagina sintetasa (AS), glutamato sintasa (también conocida como glutamato 2:oxoglutarato aminotransferasa y GOCAT), asparaginasa (ASN), glutamato deshidrogenasa (GDH), nitrato reductasa y una aminotransferasa tal como alanina aminotransferasa (AlaAT) o aspartato aminotransferasa (AspAT), tal como las descritas en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. número 2005/0044585.

Las técnicas descritas en el presente documento se pueden usar para producir plantas de arroz que pueden utilizar con más eficiencia fertilizante tomando rápidamente el nitrógeno proporcionado por el fertilizante y almacenándolo en el momento de la aplicación, reduciendo de este modo las cantidades de fertilizante nitrogenado perdido por fugas etc. Esto puede permitir una reducción de la cantidad de fertilizante nitrogenado requerido para aplicar a un cultivo de arroz para obtener rendimientos del cultivo comparables con los obtenidos usando técnicas de cultivo normal y plantas de arroz que no se han modificado de acuerdo con la presente invención. Ventajas agronómicas adicionales pueden incluir un crecimiento más rápido y rendimiento del cultivo de arroz, donde la entrada de fertilizante nitrogenado se mantiene a niveles usados en las técnicas habituales de cultivo de cosechas.

Se produjeron plantas de *Oryza sativa* transformadas que expresan una secuencia de oligonucleótidos que codifican la alanina aminotransferasa (AlaAT) en unión operativa con la secuencia promotora OsAnt1 de la presente invención. Como se muestra en el Ejemplo 3, las plantas transformadas que expresan AlaAT bajo el control de la secuencia promotora OsAnt1 exhibieron mayor biomasa en peso seco y mayores rendimientos de semillas en comparación con las plantas control. Estos resultados indican que las plantas de arroz que expresan una AlaAT heteróloga bajo el control de la secuencia promotora OsAnt1 son capaces de optimizar la utilización del nitrógeno disponible, de modo que tiene como resultado un incremento de la biomasa de la planta, el rendimiento de semillas o una combinación de ambos.

Por tanto, se describen procedimientos para incrementar la biomasa de una planta de *Oryza sativa*, incluyendo una planta de *Oryza sativa* con una región de codificación de interés en unión operativa con una secuencia promotora OsAnt1 descrita en el presente documento. La región de codificación de interés puede codificar una enzima implicada en la optimización de la eficiencia del nitrógeno de la planta, por ejemplo puede codificar la alanina aminotransferasa (AlaAT) y tiene lugar la expresión de la región de codificación adecuadamente en la raíz.

También se proporciona un procedimiento para incrementar el rendimiento en semillas de una planta de *Oryza sativa*, incluyendo proporcionar una planta de *Oryza sativa* con una región de codificación de interés en unión operativa con una secuencia promotora OsAnt1 descrita en la presente invención. La región de codificación de interés puede codificar una enzima implicada en la optimización de la eficiencia del nitrógeno de la planta, por ejemplo puede codificar alanina aminotransferasa (AlaAT).

Los ejemplos siguientes ilustran adicionalmente ciertas realizaciones de la invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Aislamiento y caracterización de la secuencia promotora OsAnt1

La secuencia de nucleótidos (pb 366-3175) del gen btg26 de *Brassica* (Stroeher y col., 1995, Plant Mol. Biol. 27:541-551), número de registro S77096, se usó para buscar en la base de datos de nucleótidos del NCBI usando la herramienta de búsqueda blastn. Se identificó una secuencia de arroz (número de registro AF323586) y esta secuencia de nucleótidos se usó para buscar el proyecto de secuenciación de *Oryza sativa* TIGR ((tigr.org/tdb/e2kl/osal/). El homólogo de arroz de btg26, antiquinina de *Oryza sativa* (OsAnt1), se identificó en el cromosoma 9 del arroz (número de registro AP005570; 98524-101189 pares de bases). La secuencia anterior de 973 pb del codón de iniciación de OsAnt1 se muestra en la figura 2 (SEC ID N° 1). La secuencia de los 403 pb anterior (en 5') del codón de iniciación ATG del gen OsAnt1 se seleccionó para analizar. Para determinar si era probable que la secuencia funcionara como secuencia promotora, la secuencia se analizó usando el software de predicción de promotores de plantas TSSP que se encuentra en <http://softberry.com/>. El análisis predijo que la secuencia era una secuencia promotora de plantas. Se determinó la localización más probable de la caja TATA (en negrita en la Figura 2), así como otros elementos de la secuencia promotora.

Dado que se había predicho que la secuencia promotora OsAnt1 proyectada contenía los elementos del promotor de acuerdo con el análisis con softberry, se analizó en la secuencia los motivos promotores que puedan ser sitios de reconocimiento para factores de transcripción usando el software de barrio de señales (Prestridge, 1991; <http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/signal>). Se predijeron cinco secuencias señal diferentes en el promotor OsAnt1, incluidos los sitios de unión de factores de transcripción ADR1, DBF-A, GAL4, HSTF y RAF.

La secuencia OsAnt1 se comparó con las secuencias de ácido nucleico de las secuencias promotoras de btg26 de *Brassica napus* y *Arabidopsis* usando el software de alineación de secuencia múltiple en la página de inicio BCM Search Launcher ([searchlauncher.bcm.tmc.edu/](http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/)) y BOXSHADE server ([ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://ch.embnet.org/software/BOX_form.html)). La inspección de los nucleótidos conservados reveló que las secuencias promotoras del gen 26 de turgencia de *Brassica* y *Arabidopsis* son más similares entre sí que con la secuencia OsAnt1. Una característica entre las tres secuencias promotoras es el tracto de polipirimidina (CT) evidente dentro de las secuencias de nucleótidos. Estos trectos varían de 20-22 bases y se encuentran justo en 5' de las probables cajas TATA en las tres secuencias promotoras. Además, la secuencia OsAnt1 tiene un segundo tracto r polipirimidina justo en 5' del codón de iniciación ATG.

Se aisló ADN genómico del arroz se aisló de cv. Kitaake. Se seleccionaron los siguientes cebadores para PCR (posiciones subrayadas en la Figura 2) correspondientes a la región promotora OsAnt1:

Cebador 1: AGGAAGTGATTTTGTAGCGTAGCTG (SEC ID N° 2);  
Cebador 2: ATGGCAGAAGAGAGAGAGAGAGAGG (SEC ID N° 3).

Se realizó PCR de tipo touch-down usando ADN genómico de arroz y los cebadores anteriores. Se produjo un fragmento de 975 pb. El fragmento amplificado por PCR se ligó en el vector pCR®II-TOPO (Invitrogen) y se transformó en células TOP 10 de *E.coli*. El plásmido resultante se denominó pT-riceOsAnt1pro.

El análisis de la secuencia indicó que el pegamento de 975 pb de la PCR codifica una secuencia promotora denominada la secuencia promotora OsAnt1. La comparación del promotor OSAnt1 de cv. Kitaake con el de cv. Nipponbare (obtenido de la base de dato) reveló que comparten un 99,9 % de identidad. La presunta caja TATA se encontró 145 pb en 5' del codón de iniciación.

### Ejemplo 2: Construcciones genéticas que contienen la secuencia promotora OsAnt1

Las construcciones genéticas que contienen la secuencia promotora OsAnt1 que dirigir el gen indicador de la beta-glucuronidasa (GUS) OsAnt1pro-Gus) o el gen de AlaAT de la cebada (OsAnt1pro-AlaAT) se produjeron usando las etapas que se muestran esquemáticamente en las figuras 3 y 4, respectivamente.



**Construcción de RiceOsAnt1pro-GUS**

La construcción RiceOsAnt 1 pro-GUS se produjo amplificando el molde pT-RiceOsAnt1pro usando los siguientes cebadores:

- 5                   Cebador 3: Secuencia promotora EcoRI-OsAnt1  
GGAATTCAGGAAGTGATTTTT (SEC ID N° 4)  
Cebador 4: Secuencia promotora NcoI-OsAnt1  
CATGCCATGGATGGCAGAAGA (SEC ID N° 5)

10                   Los fragmentos resultantes de la PCR se unieron en el vector binario vegetal, pCAMBIA1305.1, digerido con EcoRI y NcoI para producir una construcción pCAMBIA1305.1-riceOsAnt1pro-GUS. Las secuencias de EcoRI y NcoI al final de los cebadores 3 y 4, respectivamente, permitieron la inserción del fragmento de la PCR en el vector pCAMBIA1305, sustituyendo el promotor CaMV35s existente con la secuencia promotora OsAnt1. La secuencia NcoI (CCATGG) incluye un codón Met, ATG, que está en el marco con el gen indicador GUS y permite la expresión del gen indicador GUS a partir de la secuencia promotora OsAnt1.

**Construcción de RiceOsAnt1pro-AlaAT**

15                   La construcción RiceOsAnt1pro-AlaAT se produjo amplificando el molde pT-RiceOsAnt1pro usando los siguientes cebadores:

- Cebador 3: Secuencia promotora EcoRI-OsAnt1  
GGAATTCAGGAAGTGATTTTT (SEC ID N° 4)  
Cebador 5: Secuencia promotora PstI-OsAnt1 AACTGCAGATGGCAGAAGA (SEC ID N° 6)

20                   y los fragmentos resultantes de la PCR digeridos con EcoRI and PstI se unieron en el vector binaria vegetal pCAMBIA1300, digerido con EcoRI y PstI para proucir pCAMBIA1300-riceOsAnt1pro.

                    Un fragmento de ADN de AlaAt se amplificó mediante PCR usando pAG001 como molde. pAG001 se describe en la patente n° 6.084.153 en la que se identifica como pbtg26/AlaAT/nos. Contiene el promotor btg26 unid al gen de AlaAT de la cebada con un terminador de nopalina sintasa. Las secuencias terminadoras AlaAT/nos de cebada se amplificaron a partir de pAG001 usando los cebadores siguientes.

- Cebador 6: Secuencia de PstIAlaAT AACTGCAGATGGCTGCCACCG (SEC ID N° 7)  
Cebador 7: Secuencia terminadora HindIII-NOS  
CCCAAGCTTCCCGATCTAGTA (SEC ID N° 8)

30                   El fragmento AlaAT/nos resultante se digirió con Pst y HindIII y se unió en pCAMBIA1300- riceOsAnt1pro digerido con Pst y HindIII para producir una construcción pCAMBIA1300-riceOsAnt1pro-AlaAT.

**Ejemplo 3: Transformación de las plantas de arroz con vectores que incluyen OsAnt1**

35                   pCAMBIA1305.1-riceOsAnt1pro-GUS y pCAMBIA1300-riceOsAnt1pro-AlaAT se transfirieron en la cepa de *Agrobacterium* EHA105 (Hood y col., (1993) Transgenic Res. 2: 208-218) mediante electroporación (Sambrook y col. 1989 en Molecular Cloning, A Laboratory Manual Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press). Las células de *Agrobacterium* se sembraron en medio AB sólido (Chilton y col. 1974) que contiene 50 mg/l de kanamicina y se incubaron a 28 °C durante 3 días. Las bacterias se recogieron con una espátula plana y se resuspendieron en medio de cocultivo líquido (R2-CL, Tabla 1) mediante agitación suave en vórtex antes de transformar los tejidos de arroz.

**Transformación de arroz**

40                   En el experimento de transformación se usaron semillas maduras de arroz (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare). Se quitó la cáscara de las semillas y se esterilizó la superficie con lejía al 50 % más Tween-20 al 0,1 % durante 10 minutos seguido de inmersión (1 min) en 70 % (v/v) de etanol y, después, aclarado cinco veces en agua destilada estéril. Tras esterilización, las semillas se cultivaron en medio de inducción de callo (NB, Tabla 1) y se incubaron durante tres semanas en oscuridad a 28 °C.

45

**Tabla 1. Medio usado para la inducción del callo, inoculación, co-cultivo, fase de reposo, selección, regeneración y enraizamiento**

Medio	Composición
<b>NB<sup>a</sup></b> Medio de inducción del callo (esterilizar con filtro)	N6 principal fuente de sales y de hierro (Chu (1975) Sci. Sin. 5:659-668) + B5 principales fuentes de sales y vitaminas (Gamborg y col. (1968) Exp. Cell Res. 50: 151-158) + 3AA (100 mg/l de L-triptófano + 500 mg/l de L-prolina + 500 mg/l de L-glutamina) + 500 mg/l de hidrolizado de caseína + 2,0 mg/l de 2,4-D + 0,5 mg/l de picloram + 30 g/l de sacarosa, pH 5,8, 0,3% de gelrite
<b>R2-CL</b> Medio líquido de co-cultivo (esterilizar con filtro)	R2 fuentes principales y minoritarias de sales, vitaminas y hierro son sacarosa (Ohira y col. (1973) Plant and Cell Physiol. 14:1113-1121) + glucosa 0,25 M + acetosiringona 125 µM + tampón MES 10 mM, pH 5,2 + tampón de fosfato potásico 50 mM, pH 5,2 + L-cisteína 400 mg/l + 2,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l picloram + 0,5 mg/l BAP, pH 5,2
<b>R2-CS</b> Medio sólido de co-cultivo (esterilizar con filtro)	R2 fuentes principales y minoritarias de sales, vitaminas y hierro son sacarosa (Ohira y col. (1973) Plant and Cell Physiol. 14:1113-1121) + glucosa 0,25 M + acetosiringona 125 µM + tampón MES 10 mM, pH 5,2 + tampón de fosfato potásico 50 mM, pH 5,2 + L-cisteína 400 mg/l + 2,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l picloram + 0,5 mg/l BAP, pH 5,2 + 0,3 % de gelrite
<b>R2-AS</b> Fase de reposo (esterilizar con filtro)	R2 fuentes principales y minoritarias de sales, vitaminas y hierro sin sacarosa + sacarosa 0,25M + acetosiringona 0,5 mM + tampón MES 10 mM, pH 5,0 + tampón de fosfato potásico 50 mM, pH 5,0 + CaCl <sub>2</sub> 10 mM + 400 mg/l L-cisteína + 2,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l picloram + 0,5 mg/l BAP + 250 mg/l cefotaxima + 250 mg/l amoxicilina, pH 5,0, 0,3% de gelrite
<b>R25</b> Fase de selección (esterilizar con filtro)	R2 fuentes principales y minoritarias de sales, vitaminas y hierro + 30 g/l sacarosa + 2,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l picloram + 50 mg/l higromicina + 250 mg/l cefotaxima + 100 mg/l amoxicilina, pH 5,8, 0,3% de gelrite
<b>NBS</b> Medio de selección (esterilizar con filtro)	Medio NB + 3AA + 2,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l Picloram + 50 mg/l higromicina + 250 mg/l de cefotaxima + 100 mg/l amoxicilina, pH 5,8, 0,3% de gelrite
<b>PRN</b> Medio de pre-regeneración (esterilizar con filtro)	Medio NB + 3AA + 5 mg/l ABA + 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA + 50 mg/l higromicina + 100 mg/l cefotaxima + 50 mg/l amoxicilina, pH 5,8, 0,4% de gelrite
<b>RN</b> Medio de regeneración (esterilizar con filtro)	Medio NB + 3 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA + 50 mg/l higromicina + 100 mg/l cefotaxima + 50 mg/l amoxicilina, pH 5,8, 0,4% de gelrite
<b>R</b> Medio de enraizamiento (Esterilizar con autoclave/filtro)	1/2MS (Murashige y Skoog (1962) Physiol. Plant 15: 473-497) + 50 mg/l higromicina + 100 mg/l cefotaxima + 50 mg/l amoxicilina, pH 5,8, 0,3% de gelrite
<sup>a</sup> Medio NB con 1,25 mg/l CUSO <sub>4</sub>	
<sup>b</sup> Opcional	

5 Tras tres semanas unidades nodulares embrionarias de 3-5 mm de longitud liberadas del callo derivado del escudete en la interfaz explante/medio se sumergieron en 25 ml de medio líquido de co-cultivo (R2-CL, Tabla 1) que contiene células de *Agrobacterium* a una densidad de 3-5 x 10<sup>9</sup> células/ml (DO<sub>600</sub>= 1) en una placa Petri de 100 mm de

diámetro durante 10-15 minutos. Las unidades embrionarias se transfirieron en seco sobre papel de filtro esterilizado, se transfirieron a una placa petri que contenía medio sólido de co-cultivo (R2-CS, Tabla 1) y se incubaron durante tres días a 25 °C en oscuridad. Los callos embrionarios cocultivados se transfirieron después a medio de reposo (R2-AS, Tabla 1) y se incubaron a 28 °C en oscuridad durante una semana.

- 5 Tras una semana, las unidades embrionarias sin contaminar se transfirieron individualmente a medio de selección (R2S, Tabla 1) que contenía higromicina para la selección de tejido transformado y se incubaron a 28 °C en oscuridad. Tras 3 semanas de selección en medio R2S, las unidades embrionarias que se volvieron marrón oscuro con protuberancias marronáceas que se proyectan a lo largo de la superficie del callo se transfirieron a medio de selección NBS (Tabla 1). Tras 5 semanas de cocultivo, las protuberancias se desarrollaron en estructuras globulares marronáceas que suavemente se separaron del callo y se incubaron durante 2 semanas en la placa Petri liberada. Tras 2 semanas, estas estructuras globulares se convirtieron en callos de forma redonda, compactos y amarillentos.

- 10 Los supuestos callos transgénicos resistentes a higromicina se escogieron suavemente, se transfirieron, se cultivaron en medio de preregeneración (PRN, Tabla 1) y después se incubaron durante una semana más. Todos los callos resistentes que se originaron de una única unidad nodular embrionaria cocultivada se agruparon en un sector de la placa con PRN. Los callos lobulados de color crema con un aspecto liso y seco se transfirieron individualmente a medio de regeneración (RN, Tabla 1), se incubaron durante 2 días en oscuridad, después se mantuvieron durante tres semanas en un fotoperiodo de 12/12 h (día/noche) con luz proporcionada a una intensidad de 55 µmol/m por segundo. Los brotes verdes en regeneración a partir de callos resistentes se diseccionaron y subcultivaron en un tubo de ensayo que contenía medio de enraizamiento (R, Tabla 1) durante 1-2 semanas para estimular raíces y vástagos fuertes antes de su transferencia a macetas en las salas de crecimiento. Las plantas transgénicas se cultivaron hasta la madurez en macetas de 16 cm que contenían mezcla para macetas sin suelo (Metromix 220). Las plantas se mantuvieron en salas de crecimiento a 28 °C y a fotoperiodos de 14/10 día/noche. Se aplicó fertilizante dos veces a la semana comenzando dos semanas después de plantar las macetas. La mezcla de fertilizante contenía 225 g de fertilizante 20/20/20, 50 g de micronutrientes para plantas, 6,1 g de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 140 g de FeEDTA, 13,8 g de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 260 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3,7 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> para un total de 712,4 g. Dos granos de la mezcla de fertilizantes se disuelven en 8 litros de agua y se aplican dos veces a la semana a 24 plantas.

#### **Análisis de la expresión dirigida por la secuencia promotora OsAnt1**

- 30 La inducción de la expresión dirigida por la secuencia promotora OsAnt1 se analizó usando plantas de arroz transformadas con la construcción OsAnt1pro-GUS. Las plantas germinaron y crecieron hidropónicamente en condiciones estériles en botes de Magenta. Las plantas de dos semanas de edad se tiñeron para determinar la actividad GUS in vivo inyectando en los medios para raíces 5 ml de tampón fosfato 50 mM (pH 7,5) que contenía X-gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-glucurónico) 0,2 mM e incubando las plantas en este medio durante 1-25 horas. Después, el tejido radicular se visualizó bajo un microscopio de disección y se tomaron fotografías, que se muestran en la Figura 5.

- 35 Las áreas teñidas de oscuro en la Figura 5 indican expresión del gen indicador GUS. No hay expresión del gen indicador GUS dirigida por el promotor OsAnt1 en la punta de la raíz (específicamente las células en división); no obstante, la expresión comienza muy rápido en la zona de expansión celular, justo detrás de la punta de la raíz. La secuencia promotora OsAnt1 dirigió la expresión del gen indicador GUS también en los pelos de la raíz. Más allá de la punta de la raíz en raíces más maduras, la expresión se pierde desde la raíz principal, pero las raíces laterales se tiñen mucho, lo que indica que OsAnt1 dirige la expresión en estas raíces laterales con mucha fuerza.

#### **Análisis de plantas transformadas que contienen la construcción AlaAT**

Se generaron cincuenta y ocho plantas transgénicas OsAnt1/AlaAT/NOS y las mediciones de la floración, el número de vástagos, pesos de las semillas y biomasa en la madurez se registraron para las plantas de generación To.

- 45 La biomasa en peso seco de las plantas OsAnt1/AlaAT y las plantas control se midió en la madurez y los datos se presentan en la Figura 6. La biomasa media de las plantas OsAnt1/AlaAT transgénicas fue superior que la biomasa media de las plantas control.

Las semillas se recogieron de las plantas OsAnt1/AlaAT y las plantas control en la madurez y se midió el peso total de las semillas. Los resultados se muestran en la Figura 7, que muestra que el peso total de la semilla de las semillas recogidas de las plantas OsAnt1/AlaAT fue superior que el del peso de la semilla de las plantas control.

- 50 La Figura 8 muestra la relación entre la biomasa en peso seco y el peso total de semilla de cada planta transgénica. Se muestra una correlación sustancialmente lineal, que indica que un incremento de la biomasa tiene como resultado un correspondiente incremento del peso total de la semilla en plantas OsAnt1/AlaAT.

- 55 Estos resultados indican que las plantas transgénicas OsAnt1/AlaAT son capaces de optimizar la utilización de los nutrientes disponibles, de modo que tiene como resultado un incremento de la biomasa de la planta, un rendimiento de semillas o una combinación de ambos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Good, Allen G.  
DePauw, Mary  
Shrawat, Ashok K.

5 <120> SECUENCIA PROMOTOR OBTENIDA DE ARROZ Y PROCEDIMIENTOS DE USO

<130> 595792001600

<140> No asignado todavía

<141> Adjunto al presente documento

<150> 60/753,848

10 <151> 2005-12-23

<160> 8

<170> FastSEQ para la versión 4.0 de Windows

<210> 1

<211> 973

15 <212> ADN

<213> Oryza sativa

<400> 1

```

aggaagtgat ttttagcgta gctgtggttg tagcgtaatt gcgtaaagtc ctttcaattt 60
tgctatatct cactcgaaag attttttctt atctctcaet cgattttctc actcaaattt 120
acagtgtatt ttcttgtaag ttacagtgtg atttatgaaa cttacactgt aacttttgta 180
agttacactg taatttttga atcttcacat gtaaatttta aattttgtat tggatttggt 240
cttttctctg aggatatggt aattttaatgt tcattatggt gtttcttaat tgctttttgc 300
tttttattat atctatcgga ttttaataca aagattaaaa atctgtgtga tacgattata 360
aaaatctttc gaaagatgta taggtactcc caagcccttt taagaaagtt tttcaagaca 420
aaagtttttg gatgaaaggt agttataggg aaaaaggaat gtgcgtttat gtttatattgc 480
attgcttatt ggcaaccaaa aactaatcta taagtaaatc ttttatatac gtgcgcttaa 540
taattcaaaa gcaaattcat gtaaaataaa atgcgatgaa gaaactttaa aaagttatca 600
aatttagatt ttattaaatt ttagtttaca agagcgctac gatgaaggct ttaaaaagat 660
gggaaaataa aacctttgac ctttctggac ttcaccaaac agctcacgct ttccgcttcg 720
tgccgtctcg tcccggtgta ctgctacccc ctcctgaccc caccgcccac tccacgctcc 780
cttctcctcc ccttcccgtg acacacagtc cccactccac cgcctccgta taagtatccc 840
ttccttaccg ccggccagcc acagccaccg cctccccccac cccaccccca tccccctccc 900
gccgtacggg cgcagaagga acccgtcttc tagaaggagg aggagggcta cctctctctc 960
tctctcttct gcc 973

```

<210> 2

20 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25 <400> 2

aggaagtgat ttttagcgta gctg 24

<210> 3

<211> 25

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 3

atggcagaag agagagagag agagg 25

35

<210> 4  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 4  
 ggaattcagg aagtgatttt t 21  
 10 <210> 5  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 15 <400> 5  
 catgccatgg atggcagaag a 21  
 <210> 6  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 6  
 aactgcagat ggcagaaga 19  
 25 <210> 7  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Construcción sintética  
 <400> 7  
 aactgcagat ggctgccacc g 21  
 <210> 8  
 <211> 21  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 8  
 40 cccaagcttc ccgatctagt a 21

## REIVINDICACIONES

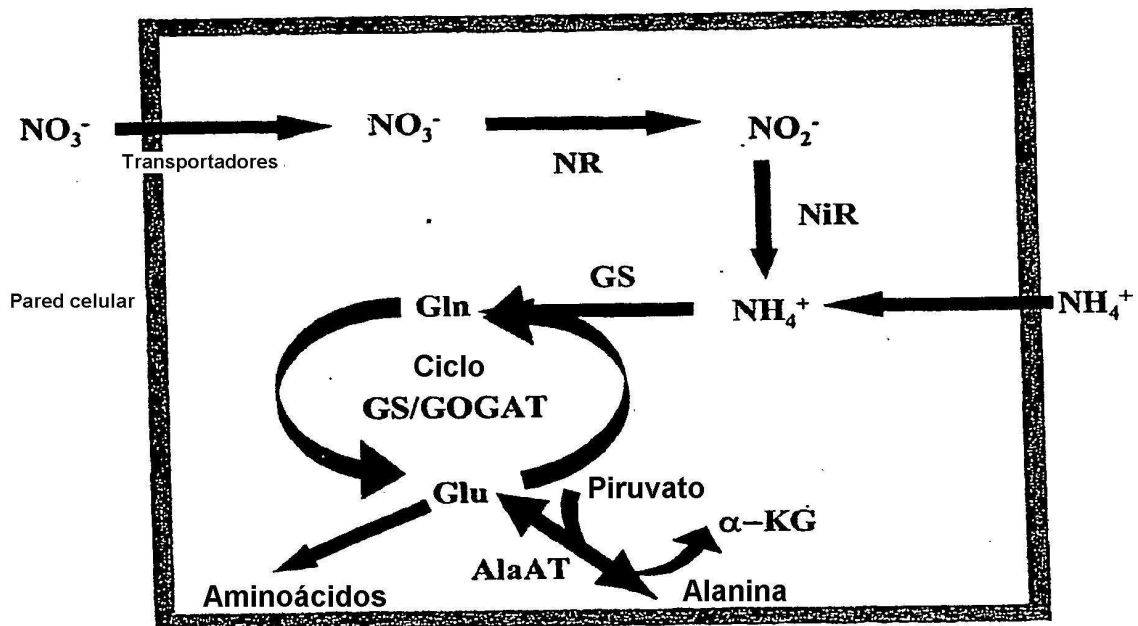
1. Una secuencia promotora de la antiquina asilada de *Oryza sativa* (OsAnt1) que consiste en la SEC ID N° 1.
2. Una construcción genética que comprende la secuencia promotora OsAnt1 de la reivindicación 1 unida de forma operativa a una secuencia de codificación de una proteína diana.
- 5 3. La construcción genética de la reivindicación 2, en la que la proteína diana es una proteína de utilización de nitrógeno.
4. La construcción genética de la reivindicación 3, en la que la proteína de utilización de nitrógeno se selecciona del grupo que consiste en: un transportador de nitrato de alta afinidad o un transportador de nitrato de baja afinidad, un transportador de amoníaco, un transportador de amonio, un transportador de aminoácidos, alanina deshidrogenasa, glutamina sintetasa, asparagina sintetasa, glutamato sintasa, glutamato 2:oxoglutarato aminotransferasa, asparaginasa, glutamato deshidrogenasa, nitrato reductasa, aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa.
- 10 5. La construcción genética de la reivindicación 4, en la que la proteína de utilización de nitrógeno es alanina aminotransferasa.
6. Un vector que incluye la construcción genética de la reivindicación 2.
- 15 7. Un procedimiento para dirigir la expresión de un gen diana en una planta *Oryza saliva*, que comprende:
  - poner en contacto una planta de *Oryza saliva* con un gen diana en unión operativa con la secuencia promotora OsAnt1 de la reivindicación 1, y
  - b. introducir en la planta el gen diana en unión operativa con la secuencia promotora OsAnt1 de la reivindicación 1, en el que el promotor OsAnt1 dirige la expresión del gen diana en la planta.
- 20 8. Un procedimiento para incrementar la biomasa de una planta *Oryza saliva*, que comprende:
  - a. poner en contacto una planta de *Oryza sativa* con un gen diana en unión operativa con la secuencia promotora OsAnt1 de la reivindicación 1, en la que el gen diana codifica una proteína de utilización de nitrógeno seleccionada del grupo que consiste en un transportador de nitrato de alta afinidad o un transportador de nitrato de baja afinidad, un transportador de amoníaco, un transportador de amonio, un transportador de aminoácidos, alanina deshidrogenasa, glutamina sintetasa, asparagina sintetasa, glutamato sintasa, glutamato 2:oxoglutarato aminotransferasa, asparaginasa, glutamato deshidrogenasa, nitrato reductasa, aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa; y
  - b. introducir en la planta el gen diana en unión operativa con la secuencia promotora OsAnt1 de la reivindicación 1, en el que el promotor OsAnt1 dirige la expresión del gen diana para obtener una planta de *Oryza sativa* con mayor biomasa.
- 25 9. Un procedimiento para incrementar el rendimiento en semillas de una planta *Oryza saliva*, que comprende:
  - a. poner en contacto una planta de *Oryza sativa* con un gen diana en unión operativa con la secuencia promotora OsAnt1 de la reivindicación 1, en la que el gen diana codifica una proteína de utilización de nitrógeno seleccionada del grupo que consiste en un transportador de nitrato de alta afinidad o un transportador de nitrato de baja afinidad, un transportador de amoníaco, un transportador de amonio, un transportador de aminoácidos, alanina deshidrogenasa, glutamina sintetasa, asparagina sintetasa, glutamato sintasa, glutamato 2:oxoglutarato aminotransferasa, asparaginasa, glutamato deshidrogenasa, nitrato reductasa, aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa; y
  - b. introducir en la planta el gen diana en unión operativa con la secuencia promotora OsAnt1 de la reivindicación 1, en el que el promotor OsAnt1 dirige la expresión del gen diana para obtener una planta de *Oryza sativa* con mayor rendimiento en semillas..
- 30 10. Una planta de *Oryza sativa* transformada que comprende el gen diana en unión operativa con la secuencia promotora OsAnt1 de la reivindicación 1, en el que el gen diana es heterólogo con respecto a la secuencia promotora OsAnt1.
- 35 11. La semilla de la planta de *Oryza sativa* que comprende un gen diana en unión operativa con la secuencia promotora OsAnt1 de la reivindicación 1, en la que el gen diana es heterólogo con respecto a la secuencia promotora OsAnt1.
- 40 12. El procedimiento de la reivindicación 7 o la planta de la reivindicación 10 o la semilla de la reivindicación 11, en el que el gen diana codifica una proteína de utilización de nitrógeno seleccionada del grupo que consiste en un transportador de nitrato de alta afinidad o un transportador de nitrato de baja afinidad, un transportador de amoníaco, un transportador de amonio, un transportador de aminoácidos, alanina deshidrogenasa, glutamina sintetasa, asparagina sintetasa, glutamato sintasa, glutamato 2:oxoglutarato aminotransferasa, asparaginasa, glutamato deshidrogenasa, nitrato reductasa, aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa.
- 50

13. El procedimiento, la planta o la semilla de cualquiera de las reivindicaciones 8, 9 o 12, en el que la proteína de utilización de nitrógeno es alanina aminotransferasa.

14. El procedimiento, la planta o la semilla de la reivindicación 13, en el que la planta está transformada con la construcción genética de la reivindicación 5.

5 15. El procedimiento, la planta o la semilla de la reivindicación 13, en el que la expresión del gen diana tiene lugar en la raíz de la planta.

**FIGURA 1: Esquema de las etapas clave en la utilización de nitrógeno en una célula vegetal**





## Región reguladora OsAnt1

## Cebador 1

1 AGGAAGTGAT TTTTAGCGTA GCTGTGTTG TAGCGTAATT GCGTAAAGTC CTTTCAATTT  
 61 TGCTATATCT CACTCGAAAG ATTTTTTCTT ATCTCTCACT CGATTTTCTC ACTCAAATTT  
 121 ACAGTGTATT TTCTTGTAAG TTACAGTGTA ATTTATGAAA CTTACACTGT AACTTTTGTA  
 181 AGTTACACTG TAATTTTGA ATCTTCACAT GTAAATTTTA AATTTTGTAT TGGATTTGGT  
 241 CTTTTTCTTG AGGATATGGT AATTTAATGT TCATTATGGT GTTCTTAAT TGCTTTTGC  
 301 TTTTTATTAT ATCTATCGGA TTTTAATACA AAGATTAAAA ATCTGTGTGA TACGATTATA  
 361 AAAATCTTTC GAAAGATGTA TAGGTACTCC CAAGCCCTTT TAAGAAAGTT TTTCAAGACA  
 421 AAAGTTTTTG GATGAAAGGT AGTTATAGGG AAAAAGGAAT GTGCGTTTAT GTTTATTTGC  
 481 ATTGCTTATT GGCAACCAAA AACTAATCTA TAAGTAAATC TTTTATATAC GTGCGCTTAA  
 541 TAATTCAAAA GCAAATTCAT GTAAAATAAA ATGCGATGAA GAAACTTTAA AAAGTTATCA  
 601 AATTTAGATT TTATTAAATT TTAGTTTACA AGAGCGCTAC GATGAAGGCT TTAAAAAGAT  
 661 GGGAAAATAA AACCTTTGAC CTTTCTGGAC TTCACCAAAC AGCTCACGCT TTCGGCTTCG  
 721 TGCCGTCTCG TCCCGTGCTA CTGCTACCCC CTCCTGACCC CACCCGCCAC TCCACGCTCC  
 781 CTTCTCCTCC CCTTCCCGTG ACACACAGTC CCCACTCCAC CGCCTCCGTA **TAAGTATCCC**  
 841 TTCCTTACCG CCGGCCAGCC ACAGCCACCG CCTCCCCAC CCCACCCGA TCCCCTCCCC  
 901 GCCGTACGGG CGCAGAAGGA ACCCGTCTTC TAGAAGGAGG AGGAGGGCTA CCTCTCTCTC  
 961 TCTCTCTTCT GCC

## Cebador 2

FIGURA 2

**FIGURA 3: Representación esquemática de las etapas para producir la construcción OsAnt1pro-GUS**

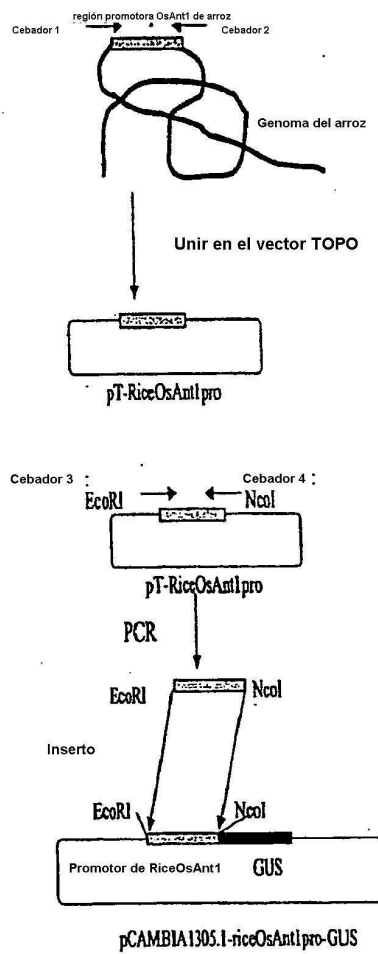
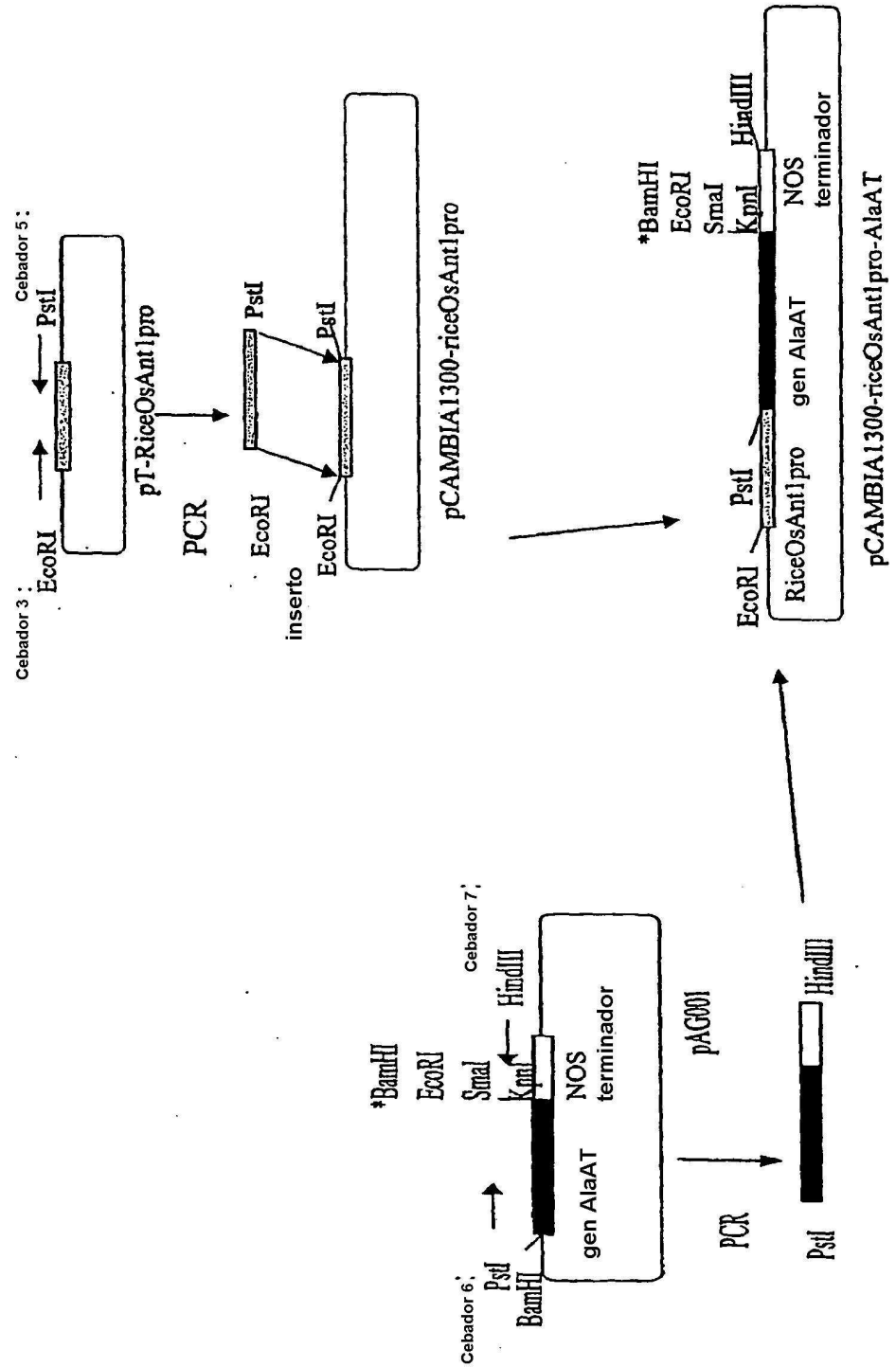
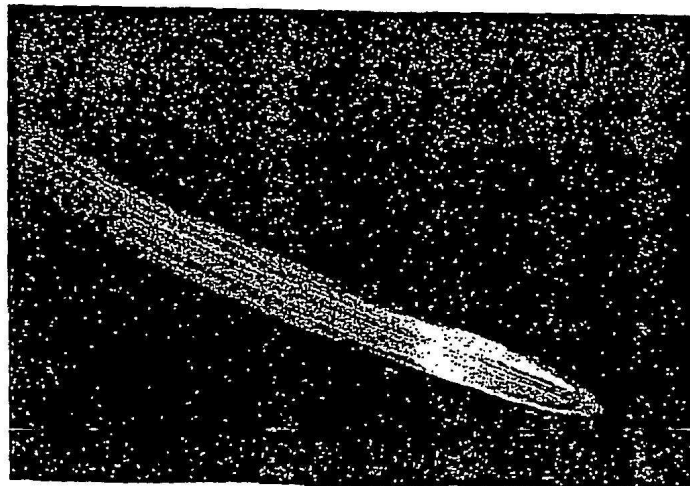


FIGURA 4: Representación esquemática de las etapas para producir la construcción OsAnt1pro-AlaAT

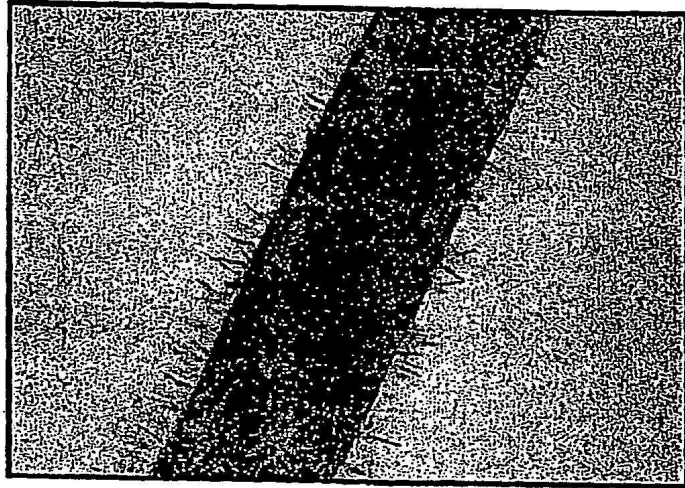


**FIGURA 5: Expresión del gen indicador GUS  
dirigida por el promotor OsAnt1**

**A) Raíces en desarrollo**



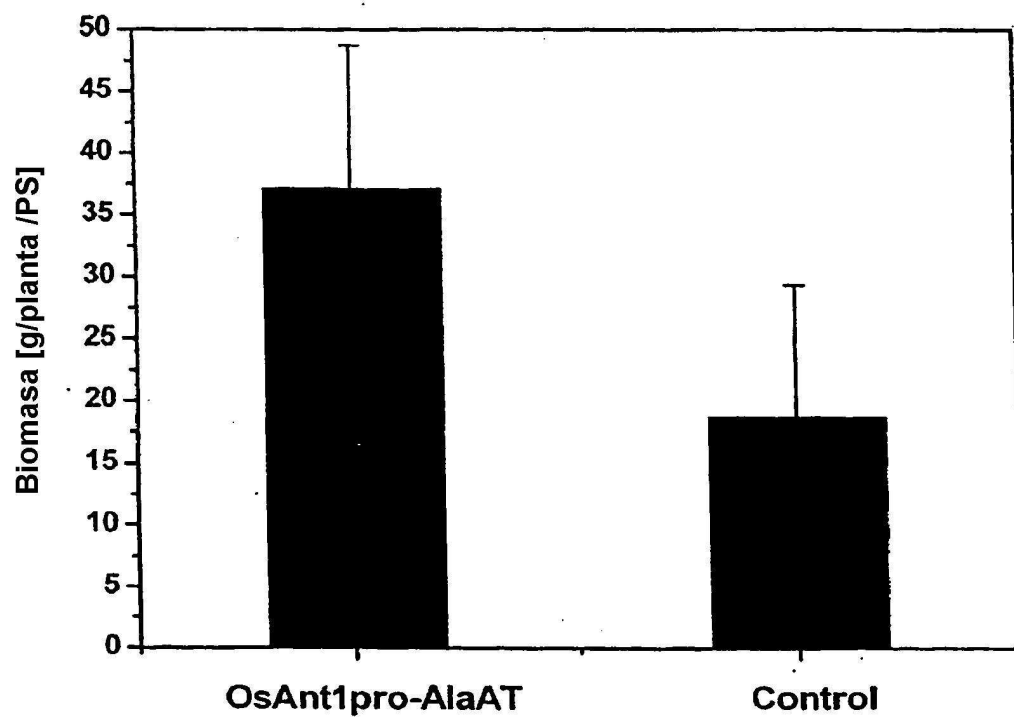
**B) Pelos de raíces**



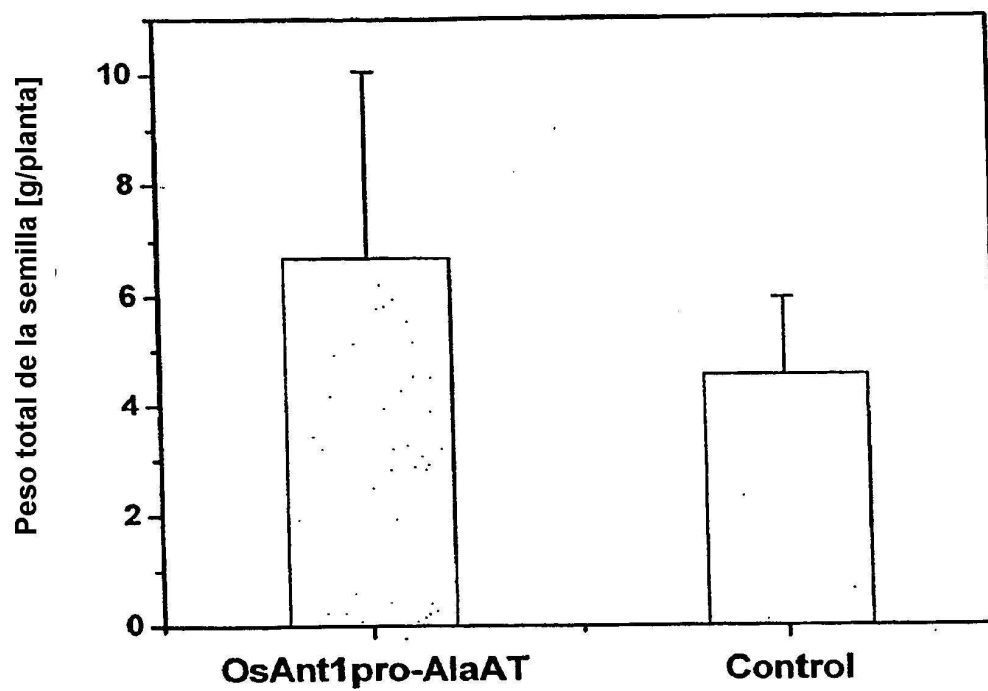
**C) Raíces laterales**



**FIGURA 6: Biomasa media en peso seco de plantas de *Oryza sativa* transformadas con OsAnt1pro-AlaAt**



**FIGURA 7: Peso medio total de semilla de plantas de *Oryza sativa* transformadas con OsAnt1pro-AlaAT**



**FIGURA 8: Relación entre la biomasa en peso seco y el peso total de la semilla de plantas de *Oryza sativa* transformadas con OsAnt1pro-AlaAt**

