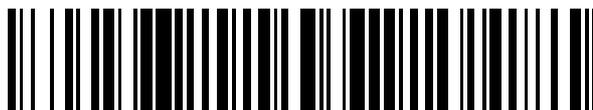


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 454 978**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/415** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2009 E 09736723 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014 EP 2352748**

54 Título: **Gen de nodulina precoz sensible a nitrógeno**

30 Prioridad:

**25.09.2008 US 99954 P**

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

**14.04.2014**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF GUELPH (50.0%)  
Catalyst Centre, Ichthyology Bldg No. 92, 50  
Stone Rd East  
Guelph, Ontario N1G 2W1, CA y  
SYNGENTA PARTICIPATIONS AG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KANT, SURYA;  
ROTHSTEIN, STEVEN;  
BI, YONG-MEI y  
CLARKE, JOSEPH**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 454 978 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

Gen de nodulina precoz sensible a nitrógeno

## 5 REFERENCIAS CRUZADAS CON SOLICITUDES RELACIONADAS

**[0001]** Se reivindica prioridad para la solicitud provisional de patente de EE. UU. N.º 61/099.954, presentada el 25 de septiembre de 2008, que se incorpora a este documento en su totalidad.

## 10 CAMPO DE LA INVENCION

**[0002]** La presente invención se refiere en general a procedimientos para modular las características de las plantas como el uso eficiente del nitrógeno (UEN).

## 15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

**[0003]** En los próximos 50 años se ejercerá una considerable presión sobre la producción de cosechas a nivel mundial debido a una combinación de factores como el aumento de la población humana, un aumento en la utilización de las cosechas por persona y diversos problemas medioambientales. Teniendo en cuenta las tendencias actuales, será necesario duplicar aproximadamente los rendimientos a nivel mundial durante este periodo de tiempo y supondrá un esfuerzo considerable cumplir este desafío de forma económica y medioambientalmente sostenible (Rothstein SJ Plant Cell 2007, 19: 2695-2699). El nitrógeno es un elemento fundamental para el crecimiento de las plantas y se considera que es el principal factor de control de la productividad vegetal después de la deficiencia en agua (Lea PJ, Morot-Gaudry J-F Plant nitrogen, 2001, Springer, Berlín, Londres). La producción de cosechas de alto rendimiento se asocia con la aplicación de grandes cantidades de fertilizantes nitrogenados. Estas grandes entradas de nitrógeno se estiman actualmente en 90 millones de toneladas métricas y se han convertido en el principal coste a nivel mundial en la producción de las cosechas (Frink CR, y col., PNAS 1999, 96: 1175-1180). Sin embargo, el nitrógeno incorporado a las cosechas agrícolas en raras ocasiones excede del 40% del nitrógeno aplicado, lo que indica una grave ineficacia en la utilización del nitrógeno (Raun WR, Johnson GV Agronomy Journal 1999, 91: 357-363; Glass ADM Critical Reviews in Plant Sciences 2003, 22: 453-470). Por tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar cosechas con un mejor uso eficiente del nitrógeno (UEN).

**[0004]** Existen dos fases principales del uso del nitrógeno en el ciclo vital de las plantas. La primera es la fase vegetativa, en la que está más involucrada la asimilación del nitrógeno. La segunda es la fase reproductiva, en la que están involucrados tanto la asimilación como la movilización del nitrógeno. Para medir el UEN se han desarrollado a lo largo de los años varias definiciones y procedimientos de evaluación, siendo uno de estos el rendimiento de biomasa o de grano frente a la cantidad de nitrógeno suministrado (Good AG, y col., Trends Plant Sci 2004, 9: 597-605). En general, este UEN puede dividirse adicionalmente en dos partes, siendo una la eficacia de asimilación y la otra la eficiencia de la utilización.

**[0005]** Para evaluar la base molecular de las respuestas de las plantas al nitrógeno e identificar los genes sensibles al nitrógeno, en varios estudios de respuesta al nitrógeno se ha empleado la obtención de perfiles de expresión génica mediante micromatrices en *Arabidopsis* (Wang R., y col., Plant Cell 2000, 12: 1491-1509; Wang RC, y col., Plant Physiology 2003, 132: 556-567; Price J, y col., Plant Cell 2004, 16: 2128-2150; Scheible WR, y col., Plant Physiology 2004, 136: 2483-2499). En otros estudios se han investigado los genes sensibles al nitrógeno de *Arabidopsis* bajo estrés crónico de nitrógeno, así como el cambio transcripcional transitorio tras un aumento corto y prolongado de la disponibilidad de nitrógeno (Bi YM, y col., BMC Genomics 2007, 8: 281). También se ha usado un sistema de crecimiento en suelo nitrogenado definido para *Arabidopsis* (Bi YM, y col., Plant Journal 2005, 44: 680-692) para aislar el gen *NLA*, el cual controla la capacidad de adaptación de *Arabidopsis* a la limitación de nitrógeno, e identificar genes adicionales implicados en la respuesta al nitrógeno (Peng M, y col., Plant J 2007, 50: 320-337; Peng MS, y col., Plant Molecular Biology 2007, 65: 775-797). También se han realizado estudios sobre genes sensibles al nitrógeno en raíces de tomate (Wang YH, y col., Plant Physiol 2001, 127: 345-359) y en plántulas de arroz (Lian X, y col., Plant Mol Biol 2006, 60: 617-631).

**[0006]** Aunque se han identificado muchos genes sensibles al nitrógeno a partir de los estudios anteriores, faltan publicaciones sobre cómo utilizar estos conocimientos para manipular la expresión génica de modo que esto permita que las plantas utilicen el nitrógeno de forma más eficiente. Para cumplir esta necesidad, en la presente descripción se proporciona un gen de nodulina precoz sensible al nitrógeno (LOC\_Os06g05010), denominado *OsENOD93* y plantas que sobreexpresan este gen de nodulina precoz sensible al nitrógeno, que muestran un

aumento del UEN, incluyendo un aumento del rendimiento de semillas, tolerancia al estrés, niveles de nitrato y niveles de aminoácidos. También se proporcionan los procedimientos para producir dichas plantas, o alternativamente, procedimientos para mimetizar el fenotipo de sobreexpresión usando un activador del gen de nodulina precoz sensible al nitrógeno. También se proporcionan además ácidos nucleicos y proteínas aislados útiles en los procedimientos descritos.

#### RESUMEN DE LA INVENCION

- [0007]** La invención es como se describe en las reivindicaciones adjuntas. La presente descripción proporciona ácidos nucleicos y proteínas OsENOD93 aislados, vectores y células que expresan los ácidos nucleicos descritos y anticuerpos que se unen específicamente a la proteína descrita. Entre los ácidos nucleicos *OsENOD93* representativos de la invención se incluyen ácidos nucleicos que comprenden a) una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO: 1; b) un ácido nucleico que hibrida específicamente con la secuencia complementaria de SEQ ID NO: 1 en condiciones rigurosas de hibridación; c) una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO: 2; d) un ácido nucleico que hibrida específicamente con la secuencia complementaria de SEQ ID NO: 2 en condiciones rigurosas de hibridación; e) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína OsENOD93 que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 3. Adicionalmente, entre los ácidos nucleicos *OsENOD93* representativos de la descripción se incluyen ácidos nucleicos que comprenden a) una secuencia de nucleótidos que es al menos el 80% idéntica a SEQ ID NO: 1; b) una secuencia de nucleótidos que es al menos el 80% idéntica a SEQ ID NO: 2 y c) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína OsENOD93 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80% idéntica a SEQ ID NO: 3. Entre las proteínas OsENOD93 representativas de la descripción se incluyen proteínas que comprenden a) una secuencia de aminoácidos al menos el 80% idéntica a SEQ ID NO: 3 y b) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.
- [0008]** También se proporcionan plantas que sobreexpresan *OsENOD93*, incluyendo plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, y los procedimientos para producir dichas plantas usando las secuencias de nucleótidos del gen *OsENOD93* descrito en este documento. Las plantas *OsENOD93* se caracterizan por un aumento de la expresión de *OsENOD93* y un aumento del uso eficiente del nitrógeno.
- [0009]** Adicionalmente se proporcionan procedimientos para identificar agentes y activadores que se unen a *OsENOD93*. En un aspecto de la invención, el procedimiento puede comprender a) proporcionar una proteína OsENOD93; b) poner en contacto la proteína OsENOD93 con uno o más agentes de ensayo o con un agente de control en condiciones suficientes para la unión; c) analizar la unión de un agente de ensayo a la proteína OsENOD93 aislada y d) seleccionar un agente de ensayo que muestre una unión específica a la proteína OsENOD93. En un aspecto adicional de la descripción, el procedimiento puede comprender a) proporcionar una célula que exprese una proteína OsENOD93, b) poner en contacto la célula con uno o más agentes de ensayo o un agente control; c) analizar la expresión del gen *OsENOD93* y d) seleccionar un agente de ensayo que induce la elevación de la expresión del gen cuando se pone en contacto con el agente de ensayo cuando se compara con el agente control. En otro aspecto de la descripción, el procedimiento puede comprender a) proporcionar una planta que exprese una proteína OsENOD93; b) poner en contacto la planta con uno o más agentes de ensayo o un agente control; c) analizar el contenido de nitrógeno, la captación de nitrógeno, el crecimiento lateral de las raíces, el contenido de aminoácidos, el rendimiento de semillas o la biomasa de la planta y d) seleccionar un agente de ensayo que induzca un aumento del contenido de nitrato, aumento de la captación de nitrato, aumento del crecimiento lateral de las raíces, rendimiento de semillas y/o aumento de la biomasa cuando se pone en contacto con el agente de ensayo en comparación con el agente control.
- [0010]** Además también se proporcionan procedimientos de identificación de potenciadores de *OsENOD93* en una planta que comprende a) proporcionar una célula que exprese una proteína OsENOD93; b) poner en contacto la célula con uno o más agentes de ensayo o un agente control; c) analizar la expresión de un gen *OsENOD93* diana y d) seleccionar un agente de ensayo que induzca la elevación de la expresión del gen, cuyo gen normalmente está sometido a inducción por *OsENOD93*, cuando se pone en contacto con el agente de ensayo en comparación con el agente control. En otro aspecto de la descripción, el procedimiento puede comprender a) proporcionar una planta que exprese una proteína OsENOD93; b) poner en contacto la planta con uno o más agentes de ensayo o un agente de control; c) analizar el contenido de nitrógeno, la captación de nitrógeno, el crecimiento lateral de las raíces, el contenido de aminoácidos, el rendimiento de semillas o la biomasa de la planta y d) seleccionar un agente de ensayo que induzca un aumento del contenido de nitrato, aumento de la captación de nitrato, aumento del crecimiento lateral de las raíces, rendimiento de semillas y/o aumento de la biomasa cuando se pone en contacto con el agente de ensayo en comparación con el agente de control.

**[0011]** También se proporcionan procedimientos para mejorar el rendimiento de la planta usando agentes y activadores de unión a OsENOD93 identificados según los procedimientos descritos en este documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5

**[0012]**

En la figura 1A se muestra la media del peso seco de los brotes ( $\pm$  DT, n=3-5) en plantas silvestres crecidas en nitrato 1 mM, 5 mM y 10 mM durante 28 días.

10

En la figura 1B se muestra la media del peso seco de la raíz ( $\pm$  DT, n=3-5) en plantas silvestres crecidas en nitrato 1 mM, 5 mM y 10 mM durante 28 días.

15 En la figura 1C se muestra la media de la relación brote/raíz ( $\pm$  DT, n=3-5), medida en peso seco en plantas silvestres crecidas en nitrato 1 mM, 5 mM y 10 mM durante 28 días.

En la figura 1D se muestra la media del contenido de clorofila ( $\pm$  DT, n=3-5), expresado como mg/g (peso fresco) de planta, en plantas silvestres crecidas en nitrato 1 mM, 5 mM y 10 mM durante 28 días.

20 En la figura 1E se muestra la media del contenido de antocianina ( $\pm$  DT, n=3-5), expresado como unidades/g (peso fresco) de planta, en plantas silvestres crecidas en nitrato 1 mM, 5 mM y 10 mM durante 28 días.

En la figura 2A se muestra la media del contenido de nitrato en los brotes ( $\pm$  DT, n=3-5), expresado como mg/g (peso fresco) de planta, en plantas silvestres crecidas en nitrato 1 mM, 5 mM y 10 mM durante 28 días.

25

En la figura 2B se muestra la media del contenido de nitrato en las raíces ( $\pm$  DT, n=3-5), expresado como mg/g (peso fresco) de planta, en plantas silvestres crecidas en nitrato 1 mM, 5 mM y 10 mM durante 28 días.

30 En la figura 2C se muestra la media de aminoácidos totales en los brotes ( $\pm$  DT, n=3-5), expresado como micromoles/g (peso fresco) de planta, en plantas silvestres crecidas en nitrato 1 mM, 5 mM y 10 mM durante 28 días.

En la figura 2D se muestra la media de aminoácidos totales en las raíces ( $\pm$  DT, n=3-5), expresado como micromoles/g (peso fresco) de planta, en plantas silvestres crecidas en nitrato 1 mM, 5 mM y 10 mM durante 28 días.

35 En la figura 2E se muestra la media de proteína soluble total en los brotes ( $\pm$  DT, n=3-5), expresada como mg/g (peso fresco) de planta, en plantas silvestres crecidas en nitrato 1 mM, 5 mM y 10 mM durante 28 días.

En la figura 2F se muestra la media de proteína soluble total en las raíces ( $\pm$  DT, n=3-5), expresada como mg/g (peso fresco) de planta, en plantas silvestres crecidas en nitrato 1 mM, 5 mM y 10 mM durante 28 días.

40

En la figura 2G se muestra la media del contenido de nitrógeno en los brotes ( $\pm$  DT, n=3-5), expresado como porcentaje del peso seco de la planta, en plantas silvestres crecidas en nitrato 1 mM, 5 mM y 10 mM durante 28 días.

45 En la figura 2H se muestra la media del contenido de nitrógeno en las raíces ( $\pm$  DT, n=3-5), expresado como porcentaje del peso seco de la planta, en plantas silvestres crecidas en nitrato 1 mM, 5 mM y 10 mM durante 28 días.

50 En la figura 3A se muestra la media del contenido de nitrato en los brotes ( $\pm$  DT, n=3-5), expresado como mg/g (peso fresco) de planta, en plantas silvestres crecidas en nitrato 1 mM durante 28 días y plantas crecidas en nitrato 1 mM durante 28 días seguido de 2 horas de crecimiento en nitrato 10 mM (inducción).

55 En la figura 3B se muestra la media del contenido de nitrato en las raíces ( $\pm$  DT, n=3-5), expresado como mg/g (peso fresco) de planta, en plantas silvestres crecidas en nitrato 1 mM durante 28 días y plantas crecidas en nitrato 1 mM durante 28 días seguido de 2 horas de crecimiento en nitrato 10 mM (inducción).

En la figura 3C se muestra la media del contenido de nitrato en los brotes ( $\pm$  DT, n=3-5), expresado como mg/g (peso fresco) de planta, en plantas silvestres crecidas en nitrato 10 mM durante 28 días y plantas crecidas en nitrato 10 mM durante 28 días seguido de 2 horas de crecimiento en nitrato 1 mM (reducción).

En la figura 3D se muestra la media del contenido de nitrato en las raíces ( $\pm$  DT, n=3-5), expresado como mg/g (peso fresco) de planta, en plantas silvestres crecidas en nitrato 10 mM durante 28 días y plantas crecidas en nitrato 10 mM durante 28 días seguido de 2 horas de crecimiento en nitrato 1 mM (reducción).

5

En la figura 4A se muestra la abundancia relativa de transcritos, determinado mediante el análisis de la expresión mediante micromatrices, de *OsENOD93* en raíces de plantas silvestres crecidas en nitrato 10 mM durante 28 días y plantas crecidas en nitrato 10 mM durante 28 días, nitrato 1 mM durante 28 días, nitrato 10 mM durante 28 días seguido de 2 horas de crecimiento en nitrato 1 mM (reducción) y nitrato 1 mM durante 28 días seguido de 2 horas en nitrato 10 mM.

10

En la figura 4B se muestra la expresión del gen *OsENOD93* en diferentes fases de crecimiento y en diferentes partes de la planta en plantas silvestre de arroz.

15 En la figura 4C se muestran los niveles relativos de expresión del gen *OsENOD93* tanto en los brotes como en las raíces de plantas silvestres crecidas en nitrato 1 mM y nitrato 10 mM durante 28 días, determinado mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando actina como control interno. Los niveles de expresión se normalizaron con respecto a brotes silvestres crecidos en nitrato 1 mM.

20 En la figura 4D se muestran los niveles relativos de expresión del gen *OsENOD93* tanto en los brotes como en las raíces de plantas transgénicas que sobreexpresan el gen *OsENOD93* crecidas en nitrato 1 mM y nitrato 10 mM durante 28 días, determinado mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando actina como control interno. Los niveles de expresión se normalizaron con respecto a brotes silvestres crecidos en nitrato 1 mM.

25 En la figura 5A se muestra la media de aminoácidos totales en las raíces ( $\pm$  DT, n=3-5), expresada como moles/g (peso fresco) de planta, tanto en plantas silvestres como en plantas transgénicas que sobreexpresan el gen *OsENOD93* crecidas en nitrato 1 mM, 3 mM y 10 mM durante 28 días.

En la figura 5B se muestra la media del contenido de nitrógeno en las raíces ( $\pm$  DT, n=3-5), expresada como porcentaje del peso seco de la planta, tanto en plantas silvestres como en plantas transgénicas que sobreexpresan el gen *OsENOD93* crecidas en nitrato 1 mM, 3 mM y 10 mM durante 28 días.

30

En la Figura 5C se muestra la media de aminoácidos totales en las raíces ( $\pm$  DT, n=3-5), expresada como micromoles/g (peso fresco) de planta, tanto en plantas silvestres como en plantas transgénicas que sobreexpresan el gen *OsENOD93* crecidas en nitrato 3 mM y 10 mM durante 60 días.

35

En la figura 5D se muestra la media del contenido de nitrógeno en las raíces ( $\pm$  DT, n=3-5), expresada como porcentaje del peso seco de la planta, tanto en plantas silvestres como en plantas transgénicas que sobreexpresan el gen *OsENOD93* crecidas en nitrato 3 mM y 10 mM durante 60 días.

40

En la figura 6A se muestra la secuencia genómica del gen *OsENOD93* (SEQ ID NO: 1).

En la figura 6B se muestra la secuencia del ADNc del gen *OsENOD93* (SEQ ID NO: 2).

45 En la figura 6C se muestra la secuencia de aminoácidos predicha de la proteína codificada por el gen *OsENOD93* (SEQ ID NO: 3).

En la figura 6D se muestra la localización de tres exones (subrayados) y dos intrones dentro de la secuencia genómica del gen *OsENOD93*.

50

En la figura 6E se muestra el dominio *OsENOD93* (subrayado) en la secuencia de aminoácidos.

En la figura 7 se muestran los aminoácidos totales en la savia del xilema ( $\pm$  DT, n=3-5), expresado como micromoles/ml de savia del xilema, tanto en plantas silvestres como en plantas transgénicas de arroz que sobreexpresan el gen *OsENOD93* crecidas en nitrato 1 mM, 3 mM y 10 mM durante 28 días. Las barras con letras diferentes indican una diferencia significativa con  $p < 0,05$  (prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher).

55

DESCRIPCIÓN DETALLADA

## I. Ácidos nucleicos y proteínas OsENOD93

**[0013]** La presente descripción proporciona ácidos nucleicos y proteínas *OsENOD93*, sus variantes y sus activadores. En los ácidos nucleicos y proteínas descritos previamente no se mostraba cómo utilizar dichas moléculas para estimular el uso eficiente del nitrógeno en plantas, como se describe actualmente.

**[0014]** En la SEQ ID NO: 1 se muestra un ácido nucleico *OsENOD93* representativo que codifica la proteína *OsENOD93* representativa de la SEQ ID NO: 3. Entre las variantes de *OsENOD93* de la presente descripción se incluyen proteínas variantes que tienen actividad *OsENOD93*.

**[0015]** En plantas de leguminosas los genes de nodulina precoz (*ENOD*) se expresan durante el desarrollo nodular y puede mediar en la organogénesis del nódulo (Mylona y col., 1995). Sin embargo, también se han postulado funciones diferenciales de los genes *ENOD*. Se ha demostrado que *ENOD40* se expresa durante la fase precoz del inicio del nódulo (Kouchi y Hata, 1993; Yang y col., 1993) y esta proteína podría estar implicada en la división celular cortical (Charon y col. 1997), en la diferenciación de haces vasculares (Kouchi y col., 1999) y también tiene un posible papel en el transporte de fotosintatos (Kouchi y Hata, 1993; Yang y col., 1993). De manera similar, la expresión de *GmENOD93* se ha encontrado en los nódulos de soja (Kouchi y Hata, 1993) y tiene un homólogo en el arroz, el *OsENOD93a* (Reddy y col., 1998), aunque no se ha caracterizado su función. Una búsqueda de homología del gen *OsENOD93* de la presente descripción en arroz indica que existe una familia de al menos cinco genes que tienen un dominio *ENOD93* y que el gen *OsENOD93* de la presente descripción codifica una proteína que tiene aproximadamente el 98% de identidad de secuencia de aminoácidos con *OsENOD93a*.

**[0016]** El gen *OsENOD93* de la presente descripción consta de tres exones y dos intrones, y codifica una proteína de 116 aminoácidos con un peso molecular de 12.424 Da y un pI de 10,95 (figuras 6C-E y tabla 6).

I.A. Ácidos nucleicos *OsENOD93*

**[0017]** Los ácidos nucleicos son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma de cadena sencilla, cadena doble o triplete. Siempre que no esté específicamente limitado, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades similares a las del ácido nucleico natural de referencia. Los términos molécula de ácido nucleico o ácido nucleico también pueden usarse en lugar de gen, ADNc, ARNm o ARNc. Los ácidos nucleicos pueden sintetizarse o pueden derivar de cualquier fuente biológica, incluido cualquier organismo.

**[0018]** Los ácidos nucleicos representativos de la descripción comprenden las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y sustancialmente secuencias idénticas que codifican proteínas *OsENOD93* con actividad sustancialmente idéntica, por ejemplo, secuencias al menos el 50% idénticas a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, como al menos el 55% idénticas, o al menos el 60% idénticas, o al menos el 65% idénticas, como al menos el 70% idénticas, o al menos el 75% idénticas, o al menos el 80% idénticas, o al menos el 85% idénticas, o al menos el 90% idénticas, o al menos el 91% idénticas, o al menos el 92% idénticas, o al menos el 93% idénticas, o al menos el 94% idénticas, o al menos el 95% idénticas, o al menos el 96% idénticas, o al menos el 97% idénticas, o al menos el 98% idénticas, o al menos el 99% idénticas. Las secuencias se comparan para buscar correspondencia máxima usando un algoritmo de comparación de secuencia que utiliza la secuencia de longitud completa de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 como la secuencia problema, como se describe en este documento a continuación, o mediante inspección visual.

**[0019]** Las secuencias sustancialmente idénticas pueden ser secuencias polimórficas, es decir, secuencias o alelos alternativos en una población. Una diferencia alélica puede ser de tan solo un par de bases.

**[0020]** Las secuencias sustancialmente idénticas también pueden comprender secuencias mutagenizadas, incluyendo secuencias que comprenden mutaciones silenciosas. Una mutación puede comprender uno o más cambios de restos, una delección de uno o más restos, o una inserción de uno o más restos adicionales.

**[0021]** Los ácidos nucleicos sustancialmente idénticos se identifican también como ácidos nucleicos que hibridan específicamente o hibridan sustancialmente con la longitud completa de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 en condiciones rigurosas. En el contexto de la hibridación de ácidos nucleicos, dos secuencias de ácidos nucleicos que se están comparando pueden denominarse sonda y diana. Una sonda es una molécula de ácido nucleico de referencia y una diana es una molécula de ácido nucleico problema, que a menudo se encuentran dentro de una población heterogénea de moléculas de ácido nucleico. Una secuencia diana es sinónimo de secuencia problema.

**[0022]** Una secuencia de nucleótidos en especial empleada para los estudios o ensayos de hibridación incluye secuencias sonda que son complementarias a al menos una secuencia de aproximadamente 14 a 40 nucleótidos de una molécula de ácido nucleico de la presente descripción. Preferiblemente, las sondas comprenden de 14 a 20 nucleótidos, o incluso pueden ser más largas si se desea, por ejemplo 30, 40, 50, 60, 100, 200, 300 o 500 nucleótidos o hasta la longitud completa de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. Estos fragmentos pueden prepararse fácilmente, por ejemplo, mediante síntesis química del fragmento, mediante la aplicación de tecnología de amplificación de ácidos nucleicos o introduciendo secuencias seleccionadas dentro de vectores recombinantes para la producción recombinante.

**[0023]** El término hibridación específica se refiere a la unión, formación de un dúplex o hibridación de una molécula solo con una secuencia de nucleótidos en particular en condiciones rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos (p. ej., ADN o ARN celular total). La hibridación específica puede incluir faltas de coincidencia entre la sonda y la secuencia diana dependiendo de la rigurosidad de las condiciones de hibridación.

**[0024]** Condiciones de hibridación rigurosas y condiciones de lavado de hibridación rigurosas en el contexto de los experimentos de hibridación de ácidos nucleicos, como análisis de transferencia de ADN y ARN, son tanto dependientes de secuencias como del ambiente. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más altas. En Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, 1993, parte I, capítulo 2, Elsevier, Nueva York, Nueva York puede encontrarse una amplia guía para la hibridación de ácidos nucleicos. Generalmente, la hibridación y las condiciones de lavado altamente rigurosas se seleccionan para que estén a aproximadamente 5°C por debajo del punto de fusión térmico (T<sub>m</sub>) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. Normalmente, en condiciones rigurosas una sonda hibridará específicamente con su subsecuencia diana, pero no con otras secuencias.

**[0025]** La T<sub>m</sub> es la temperatura (en condiciones de fuerza iónica y pH definidas) a la cual el 50% de la secuencia diana hibrida con una sonda con la que coincide a la perfección. Las condiciones muy rigurosas se seleccionan para que sean iguales a la T<sub>m</sub> para una sonda en particular. Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas para el análisis de transferencias de ADN y ARN de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de aproximadamente 100 restos complementarios sería la hibridación durante toda la noche en formamida al 50% con 1 mg de heparina a 42°C. Un ejemplo de condiciones de lavado altamente rigurosas sería 15 minutos en citrato sódico salino (SSC) x0,1 a 65°C. Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas sería 15 minutos en tampón SSC x0,2 a 65°C. Véase Sambrook y col., eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, para una descripción del tampón SSC. A menudo, un lavado altamente riguroso va precedido por un lavado poco riguroso para eliminar la señal de fondo de la sonda. Un ejemplo de condiciones de lavado de rigurosidad media para un dúplex de más de aproximadamente 100 nucleótidos sería 15 minutos en SSC x1 a 45°C. Un ejemplo de lavado de rigurosidad baja para un dúplex de más de aproximadamente 100 nucleótidos sería 15 minutos en SSC x4 a x6 a 40°C. Para sondas cortas (p. ej., aproximadamente 10 a 50 nucleótidos), las condiciones rigurosas normalmente suponen concentraciones de sal de menos de aproximadamente 1M de ión Na<sup>+</sup>, normalmente aproximadamente 0,01 a 1 M de concentración de ión Na<sup>+</sup> (u otras sales) a pH 7,0-8,3 y la temperatura normalmente es de al menos aproximadamente 30°C. Las condiciones rigurosas también pueden conseguirse con la adición de agentes desestabilizantes como formamida. En general, una señal con una proporción con respecto al fondo de 2 veces (o mayor) que la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación en particular indica la detección de una hibridación específica.

**[0026]** A continuación aparecen ejemplos de condiciones de hibridación y lavado que pueden usarse para identificar secuencias de nucleótidos que son sustancialmente idénticas a las secuencias de nucleótidos de referencia de la presente descripción: una secuencia de nucleótidos sonda hibrida preferiblemente con una secuencia de nucleótidos diana en dodecil sulfato sódico (SDS) al 7%, NaPO<sub>4</sub> 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C seguido del lavado en SSC x2, SDS al 0,1% a 50°C; más preferiblemente, una sonda y una secuencia diana hibridan en dodecil sulfato sódico (SDS) al 7%, NaPO<sub>4</sub> 0,5 M, EDTA 1 mM al 50°C seguido del lavado en SSC x1, SDS al 0,1% a 50°C; más preferiblemente, una sonda y una secuencia diana hibridan en dodecil sulfato sódico (SDS) al 7%, NaPO<sub>4</sub> 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C seguido del lavado en SSC x0,5, SDS al 0,1% a 50°C; más preferiblemente, una sonda y secuencia diana hibridan en dodecil sulfato sódico (SDS) al 7%, NaPO<sub>4</sub> 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C seguido del lavado en SSC x0,1, SDS al 0,1% a 50°C; más preferiblemente, una sonda y una secuencia diana hibridan en dodecil sulfato sódico (SDS) al 7%, NaPO<sub>4</sub> 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C seguido del lavado en SSC x0,1, SDS al 0,1% a 65°C.

**[0027]** Una indicación adicional de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las proteínas codificadas por los ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas, comparten una estructura tridimensional global o son equivalentes biológicamente funcionales. Estos términos se definen adicionalmente a continuación en este documento. Las moléculas de ácido nucleico que no hibridan entre sí en condiciones rigurosas 5 siguen siendo sustancialmente idénticas si las proteínas correspondientes son sustancialmente idénticas. Esto puede ocurrir, por ejemplo, cuando dos secuencias de nucleótidos comprenden variantes sustituidos de forma conservadora según permite el código genético.

**[0028]** El término variantes sustituidas de forma conservadora se refiere a secuencias de ácido nucleico que 10 tienen sustituciones de codón degenerado en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye por restos con mezclas de bases y/o desoxiinosina. Véase Batzer y col., *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19:5081; Ohtsuka y col., *J. Biol. Chem.*, 1985, 260:2605-2608 y Rossolini y col. *Mol. Cell Probes*, 1994, 8:91-98.

**[0029]** Los ácidos nucleicos de la descripción también comprenden ácidos nucleicos complementarios a la 15 SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2. Las secuencias complementarias son dos secuencias de nucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos antiparalelas capaces de aparearse con otra tras la formación de enlaces de hidrógeno entre pares de bases. Según se usa en este documento, el término secuencias complementarias significa secuencias de nucleótidos que son sustancialmente complementarias según puede evaluarse mediante los mismos 20 procedimientos de comparación de nucleótidos establecidos a continuación, o se define como ser capa de hibridar con el segmento de ácido nucleico en cuestión en condiciones relativamente rigurosas, como las descritas en este documento. Un ejemplo particular de segmento de ácido nucleico complementario es un oligonucleótido antisentido.

**[0030]** Los ácidos nucleicos de la descripción también comprenden ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1 y SEQ 25 ID NO: 2 que se han alterado para su expresión en organismos distintos a las plantas que explican las diferencias en el uso de codones entre las plantas y el otro organismo. Por ejemplo, el uso de codones específicos en plantas difiere del uso de codones específicos en determinados microorganismos. La comparación del uso de codones dentro de un marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) microbiano clonado para el uso en genes vegetales (y en genes concretos de la planta diana) permitirá una identificación de los codones dentro del ORF que 30 deberían cambiarse específicamente. Normalmente, la evolución vegetal ha tendido hacia una fuerte preferencia de los nucleótidos C y G en la posición de la tercera base de las monocotiledóneas, mientras que en las dicotiledóneas a menudo se usan los nucleótidos A o T en esta posición. Modificando un gen para incorporar el uso de codones específico para una especie transgénica diana en particular se resolverán muchos de los problemas descritos a continuación sobre el contenido GC/AT y el ajuste ilegítimo.

**[0031]** Los genes de plantas normalmente tienen un contenido GC de más del 35%. Las secuencias ORF que 35 son ricas en nucleótidos A y T pueden causar varios problemas en las plantas. En primer lugar, se cree que los motivos ATTTA causan desestabilización de los mensajeros y se encuentran en el extremo 3' de muchos ARNm de vida corta. En segundo lugar, se considera que la aparición de señales de poliadenilación como AATAAA en 40 posiciones inapropiadas dentro del mensajero causa un truncamiento prematuro de la transcripción. Además, las monocotiledóneas pueden reconocer secuencias ricas en AT como sitios de ajuste (véase a continuación).

**[0032]** El término subsecuencia se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una parte de 45 una secuencia de ácido nucleico más largo. Un ejemplo de subsecuencia es una sonda, descrita anteriormente en este documento, o un cebador. El término cebador según se usa en este documento, se refiere a una secuencia contigua que comprende aproximadamente 8 o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, preferiblemente de 10 a 20 nucleótidos y, más preferiblemente, de 20 a 30 nucleótidos de una molécula de ácido nucleico seleccionada. Los cebadores de la descripción abarcan oligonucleótidos de longitud suficiente y secuencia apropiada de modo que 50 se proporcione el inicio de la polimerización en una molécula de ácido nucleico de la presente descripción.

**[0033]** Entre los ácidos nucleicos representativos de la descripción también se incluyen ácidos nucleicos que 55 consisten esencialmente en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, en la medida en que los ácidos nucleicos se aíslan de, y no contienen, secuencias adicionales de nucleótidos con los que los ácidos nucleicos se puedan asociar normalmente. Adicionalmente, el ácido nucleico de la invención puede expresarse en la planta completa o puede expresarse de forma diferencial en partes especiales de la planta. Además, los ácidos nucleicos de la invención pueden expresarse en momentos diferentes durante el desarrollo de la planta, como por ejemplo, durante la fase reproductiva o la fase vegetativa del desarrollo de la planta (p. ej., las fases de desarrollo y las partes de la planta identificadas en la figura 4B).

**[0034]** Se proporcionan vectores que comprenden los ácidos nucleicos descritos, incluyendo vectores para la expresión recombinante, en los que un ácido nucleico de la invención está unido de forma operativa a un promotor funcional. Cuando se une operativamente a un ácido nucleico, el promotor está en combinación funcional con el ácido nucleico de modo que la transcripción del ácido nucleico está controlada y regulada por la región promotora. El término vectores se refiere a ácidos nucleicos capaces de replicarse en una célula huésped, como plásmidos, cósmidos y vectores víricos.

**[0035]** Los ácidos nucleicos de la presente descripción pueden haber sido clonados, sintetizados, alterados, sometidos a mutagénesis o pueden ser combinaciones de los mismos. Las técnicas de ADN recombinante y clonación molecular usadas para aislar ácidos nucleicos son conocidas en la técnica. También es conocida en la técnica la mutagénesis específica de sitio para crear cambios, deleciones o pequeñas inserciones de pares de bases. Véase p. ej., Sambrook y col. (eds.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; Silhavy y col., *Experiments with Gene Fusions*, 1984, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; Glover & Hames, *DNA Cloning: A Practical Approach*, 2ª ed., 1995, IRL Press at Oxford University Press, Oxford/Nueva York; Ausubel (ed.) *Short Protocols in Molecular Biology*, 3ª ed., 1995, Wiley, Nueva York.

**[0036]** En otro aspecto de la descripción, se proporciona un procedimiento para detectar una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína OsENOD93. Estos procedimientos pueden usarse para detectar variantes del gen OsENOD93 o expresión génica alterada. Las secuencias detectadas mediante los procedimientos de la descripción pueden ser detectadas, subclonadas, secuenciadas y evaluadas adicionalmente mediante cualquier medida bien conocida en la técnica usando cualquier procedimiento normalmente aplicado a la detección de una secuencia de ADN específica. Por tanto, los ácidos nucleicos de la presente descripción pueden usarse para clonar genes y ADN genómico que comprende las secuencias descritas. Alternativamente, los ácidos nucleicos de la presente descripción pueden usarse para clonar genes y ADN genómico de secuencias relacionadas. Los niveles de una molécula de ácido nucleico *OsENOD93* pueden medirse, por ejemplo, usando un ensayo de RT-PCR. Véase Chiang, J. *Chromatogr. A.*, 1998, 806:209-218 y las referencias citadas en este.

**[0037]** En otro aspecto de la descripción pueden realizarse ensayos genéticos que usan ácidos nucleicos *OsENOD93* para análisis de loci de carácter cuantitativo (QTL, por sus siglas en inglés) y para seleccionar variantes genéticas, por ejemplo, mediante análisis de sondas de oligonucleótido específico de alelo (ASO) (Conner y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80(1):278-282), ensayos de ligamiento de oligonucleótidos (OLA) (Nickerson y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87(22):8923-8927), análisis de polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP) (Orita y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86(8):2766-2770), análisis de SSCP/heterodúplex, método de rotura enzimática, análisis directo de secuencia de exones amplificados (Kestila y col., *Mol. Cell*, 1998, 1(4):575-582; Yuan y col., *Hum. Mutat.*, 1999, 14(5):440-446), hibridación específica de alelo (Stoneking y col., *Am. J. Hum. Genet.*, 1991, 48(2):370-382) y análisis de restricción de ADN genómico amplificado que contiene la mutación específica. También pueden aplicarse procedimientos automáticos para la caracterización a gran escala de polimorfismos de un solo nucleótido (Wang y col., *Am. J. Physiol.*, 1998, 274(4 Pt2):H1132-1140; Brookes, *Gene*, 1999, 234(2):177-186). Los procedimientos de detección preferidos son los no electroforéticos como, por ejemplo, el ensayo de discriminación alélica TAQMAN™, PCR-OLA, balizas moleculares, sondas circularizables y fluorescencia en pocillo. Véase Landegren y col., *Genoma Res.*, 1998, 8:769-776 y las referencias citadas en el mismo.

#### I.B. Proteínas OsENOD93

**[0038]** La presente descripción también proporciona polipéptidos OsENOD93 aislados. Los términos polipéptidos y proteínas se refieren cada uno a un compuesto formado por una cadena sencilla de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. En la SEQ ID NO: 3 se muestra un polipéptido OsENOD93 representativo. Polipéptidos adicionales de la descripción incluyen proteínas OsENOD93 con actividad sustancialmente idéntica, por ejemplo, secuencias al menos el 50% idénticas a la SEQ ID NO: 3, como al menos el 55% idénticas, o al menos el 60% idénticas, o al menos el 65% idénticas, como al menos el 70% idénticas o al menos el 75% idénticas, o al menos el 80% idénticas, o al menos el 85% idénticas, o al menos el 90% idénticas, o al menos el 91% idénticas, o al menos el 92% idénticas, o al menos el 93% idénticas, o al menos el 94% idénticas, o al menos el 95% idénticas, o al menos el 96% idénticas, o al menos el 97% idénticas, o al menos el 98% idénticas, o al menos el 99% idénticas. Las secuencias se comparan para buscar correspondencia máxima usando un algoritmo de comparación de secuencias con la secuencia de longitud completa de SEQ ID NO: 3 como la secuencia problema, como se describe en este documento a continuación, o mediante inspección visual. Entre las proteínas representativas de la invención también se incluyen polipéptidos que consisten esencialmente en la SEQ ID NO: s, en la medida en que los polipéptidos se aíslan de entre, y no contienen, secuencias adicionales de aminoácidos con las que los polipéptidos se pueden

asociar normalmente. En este documento se describen polipéptidos codificados por uno cualquiera de los ácidos nucleicos de la descripción.

**[0039]** Los polipéptidos de la descripción pueden comprender aminoácidos naturales, aminoácidos sintéticos, aminoácidos genéticamente codificados, aminoácidos no genéticamente codificados y combinaciones de los mismos. Los polipéptidos pueden incluir tanto aminoácidos de forma L como de forma D.

**[0040]** Entre los aminoácidos no genéticamente codificados representativos se incluyen, pero sin limitaciones, ácido 2-amionadípico, ácido 3-amionadípico, ácido  $\beta$ -aminopropiónico, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico (ácido piperidínico), ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminopimélico; ácido 2,4-diaminobutírico, desmosina, ácido 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiónico, N-etilglicina; N-etilasparagina; hidroxilisina, alohidroxilisina, 3-hidroxi prolina, 4-hidroxi prolina, isodesmosina, aloisoleucina, N-metilglicina (sarcosina), N-metilisoleucina, N-metilvalina, norvalina, norleucina y ornitina.

**[0041]** Entre los aminoácidos derivatizados representativos se incluyen, por ejemplo, aquellas moléculas en las que los grupos amino libres se han derivatizados para formar clorhidratos de amina, grupos p-toluensulfonilo, grupos carbobenzoxi, grupos t-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo y grupos formilo. Los grupos carboxilo libres pueden derivatizarse para formar sales, ésteres de metilo y etilo u otros tipos de ésteres o hidrazidas. Los grupos hidroxilo libres pueden derivatizarse para formar derivados O-acilo u O-alquilo. El nitrógeno imidazol de la histidina puede derivatizarse para formar N-im-bencilhistidina.

**[0042]** La presente descripción también proporcionar fragmentos funcionales de un polipéptido OsENOD93, por ejemplo, fragmentos que tienen una actividad similar a la de una proteína OsENOD93 de longitud completa. También se proporcionan secuencias polipeptídicas funcionales que son más largas que las secuencias descritas. Por ejemplo, pueden añadirse uno o más aminoácidos al extremo N-terminal o C-terminal de un polipéptido. Estos aminoácidos adicionales pueden emplearse en diversas aplicaciones, incluyendo, pero sin limitaciones, aplicaciones de purificación. Los procedimientos para la preparación de proteínas elongadas son conocidos en la técnica.

**[0043]** Entre las proteínas OsENOD93 de la descripción se incluyen proteínas que comprenden aminoácidos que son variantes sustituidas de forma conservadora de la SEQ ID NO: 3. La expresión una variante sustituida de forma conservadora se refiere a un polipéptido que comprende un aminoácido en el que se han sustituido de forma conservadora uno o más restos por un resto funcionalmente similar.

**[0044]** Entre los ejemplos de sustituciones conservadoras se incluyen la sustitución de un resto no polar (hidrófobo) como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro; la sustitución de un resto polar (hidrófilo) por otro como entre arginina y lisina, entre glutamina y asparagina, entre glicina y serina; la sustitución de un resto básico como lisina, arginina o histidina por otro; o la sustitución de un resto ácido, como ácido aspártico o ácido glutámico por otro.

**[0045]** Los polipéptidos aislados de la descripción pueden purificarse y caracterizarse usando diversas técnicas convencionales que son conocidas por los expertos. Véanse, por ejemplo, Schröder y col., *The Peptides*, 1965, Academic Press, Nueva York; Bodanszky, *Principles of Peptide Synthesis*, 2ª ed. rev. 1993, Springer-Verlag, Berlín/Nueva York; Ausubel (ed.) *Short Protocols in Molecular Biology*, 3ª ed., 1995, Wiley, Nueva York.

**[0046]** La presente descripción además proporciona procedimientos para detectar un polipéptido OsENOD93. Los procedimientos descritos pueden usarse, por ejemplo, para determinar los niveles alterados de la proteína OsENOD93, por ejemplo, niveles inducidos de proteína OsENOD93.

**[0047]** Por ejemplo, el procedimiento puede suponer realizar una reacción inmunoquímica con un anticuerpo que reconozca específicamente una proteína OsENOD93. Las técnicas para detectar estos conjugados o complejos antígeno-anticuerpo con conocidas en la técnica e incluyen, pero sin limitaciones, centrifugación, cromatografía de afinidad y otros procedimientos inmunoquímicos. Véase, por ejemplo, Ishikawa *Ultrasensitive and Rapid Enzyme Immunoassay*, 1999, Elsevier, Ámsterdam/Nueva York, Estados Unidos de América; Law, *Immunoassay: A Practical Guide*, 1996, Taylor & Francis, London/Bristol, Pennsylvania, Estados Unidos de América; Liddell y col., *Antibody Technology*, 1995, Bios Scientific Publishers, Oxford, Reino Unido y las referencias citadas en ellos.

I.C. Comparaciones de secuencias de nucleótidos y aminoácidos

**[0048]** Los términos idéntico o porcentaje de identidad en el contexto de dos o más secuencias de nucleótidos o proteína, referido a dos o más secuencias o subsecuencias que son la misma o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o restos aminoacídicos que son los mismos, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias descritos en este documento o mediante inspección visual.

**[0049]** El término sustancialmente idéntico con respecto a una secuencia de nucleótidos o de proteína significa que una secuencia en particular varía con respecto a la secuencia de una secuencia natural en una o más deleciones, sustituciones o adiciones, cuyo efecto neto es retener la función biológica de un ácido nucleico o proteína ENOD93.

**[0050]** Para la comparación de dos o más secuencias, una secuencia normalmente actúa como secuencia de referencia con la que se compara una o más secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias se introducen en un ordenador las secuencias problema y de referencia, se diseñan coordenadas de subsecuencia si es necesario y se seleccionan parámetros para el programa de algoritmo de secuencias. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia o secuencias problema designadas con respecto a la secuencia de referencia, en función de los parámetros especificados en el programa.

**[0051]** El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math, 1981, 2:482-489, mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol., 1970, 48:443-453, mediante la búsqueda del procedimiento de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85:2444-2448, mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) o mediante inspección visual. Véase, en general, Ausubel (ed.), Short Protocols in Molecular Biology, 3ª ed., 1995, Wiley, Nueva York.

**[0052]** Un algoritmo preferido para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul y col., J. Mol. Biol., 1990, 215:403-410. El software para realizar los análisis BLAST está a disposición pública a través del National Center for Biotechnology Information (dirección de Internet ncbi.nlm.nih.gov/). Los parámetros del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. Para la comparación de dos secuencias de nucleótidos, los parámetros predeterminados de BLASTn se establecen como W=11 (longitud de palabra) y E=10 (valor esperado) y también incluyen el uso de un filtro de complejidad baja para enmascarar los restos de la secuencia problema que tiene baja complejidad de composición. Para la comparación de dos secuencias de aminoácidos, los parámetros predeterminados del programa BLASTp se establecen como W=3 (longitud de palabra), E=10 (valor esperado), uso de la matriz de valoración BLOSUM62, penalización por creación=11 y extensión=11 de hueco, y uso de un filtro de baja complejidad para enmascarar los restos de la secuencia problema que tiene baja complejidad de composición.

## 40 II. Sistema para la expresión recombinante de una proteína OsENOD93

**[0053]** En la presente descripción además se proporciona un sistema para la expresión de una proteína OsENOD93 recombinante. Este sistema puede usarse para la posterior purificación y/o caracterización de una proteína OsENOD93. También puede usarse un sistema para la expresión recombinante de una proteína OsENOD93 para la identificación de activadores, o dianas de una proteína OsENOD93, como se describe adicionalmente a continuación en este documento. Un sistema de expresión se refiere a una célula huésped que comprende un ácido nucleico heterólogo y la proteína codificada por el ácido nucleico heterólogo. Por ejemplo, un sistema de expresión heterólogo puede comprender una célula huésped transfectada con una construcción que comprende un ácido nucleico *OsENOD93* que codifica una proteína OsENOD93 unida de forma operativa a un promotor, o una línea celular obtenida introduciendo ácidos nucleicos OsENOD93 dentro del genoma de la célula huésped. El sistema de expresión puede comprender además uno o más ácidos nucleicos heterólogos adicionales importantes para la función de OsENOD93, como dianas de la actividad de OsENOD93. Estos ácidos nucleicos adicionales pueden expresarse como una única construcción o múltiples construcciones.

**[0054]** Las proteínas aisladas y las proteínas producidas mediante tecnología recombinante pueden purificarse y caracterizarse usando diversas técnicas convencionales que son conocidas para los expertos. Véanse por ejemplo, Schröder y col., The Peptides, 1965, Academic Press, Nueva York; Bodanszky, Principles of Peptide Synthesis, 2ª ed. rev. 1993, Springer-Verlag, Berlín/Nueva York; Ausubel (ed.), Short Protocols in Molecular Biology, 3ª ed., 1995, Wiley, Nueva York.

## II.A. Construcciones de expresión

**[0055]** Una construcción de expresión de una proteína OsENOD93 puede incluir una secuencia vector y una secuencia de nucleótidos OsENOD93, en la que la secuencia de nucleótidos *OsENOD93* está unida de forma operativa a una secuencia promotor. Una construcción para la expresión de OsENOD93 recombinante también puede comprender señales de terminación de la transcripción y secuencias requeridas para la traducción adecuada de la secuencia de nucleótidos. La preparación de una construcción de expresión, incluyendo la adición de secuencias señal de traducción y terminación, es conocida para los expertos en la materia.

10

**[0056]** El promotor puede ser cualquier secuencia polinucleotídica que muestre actividad transcripcional en las células vegetales, partes de la planta o plantas elegidas. El promotor puede ser nativo o análogo, o extraño o heterólogo, a la planta huésped y/o a la secuencia de ADN de la invención. Que el promotor sea nativo o endógeno para la planta huésped significa que dicho promotor se encuentra en la planta nativa dentro de la que se introduce el promotor. Que el promotor sea extraño o heterólogo para la secuencia de ADN de la invención significa que el promotor no es el promotor nativo o natural para la secuencia de ADN unida de forma operativa de la invención. El promotor puede ser inducible o constitutivo. Puede ser natural, puede estar compuesto por partes de diversos promotores naturales o puede ser total o parcialmente sintético. Las directrices para el diseño de promotores se proporcionan en los estudios de estructura de promotores, como el de Harley y col., *Nucleic Acids Res.*, 1987, 15:2343-61. También, puede optimizarse la localización del promotor con respecto al inicio de la transcripción. Véase, por ejemplo., Roberts y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76:760-4. Muchos promotores adecuados para su uso en plantas son bien conocidos en la técnica.

**[0057]** Por ejemplo, entre los promotores constitutivos adecuados para su uso en plantas se incluyen los promotores de virus vegetales, como el promotor del caulimovirus del rayado clorótico del cacahuete (PC1SV) (patente de EE. UU. N.º 5.850.019); el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell y col., *Nature*, 1985, 313:810-812); promotores de los genes de la metiltransferasa del virus de *Chlorella* (patente de EE. UU. N.º 5.563.328) y el promotor transcripto de longitud completa del virus del mosaico del pasto setaria (FMV) (patente de EE. UU. N.º 5.378.619); los promotores de genes como la actina de arroz (McElroy y col. (1990) *Plant Cell* 2:163-171); ubiquitina (Christensen y col., *Plant Mol. Biol.*, 1989, 12:619-632 y Christensen y col., *Plant Mol. Biol.*, 1992, 18:675-689); pEMU (Last y col., *Theor. Appl. Genet.*, 1991, 81:581-588); MAS (Velten y col., *EMBO J.*, 1984, 3:2723-2730); histona H3 del maíz (Lepetit y col., *Mol. Gen. Genet.*, 1992, 231:276-285 y Atanassova y col., *Plant J.*, 1992, 2(3):291-300); ALS3 de *Brassica napus* (publicación internacional PCT N.º WO 97/41228) y promotores de diversos genes de *Agrobacterium* (véanse las patentes de EE. UU. N.º 4.771.002; 5.102.796; 5.182.200 y 5.428.147).

35

**[0058]** Entre los promotores inducibles adecuados para su uso en plantas se incluyen el promotor del sistema ACE1 que responde al cobre (Mett y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90:4567-4571); el promotor del gen In2 del maíz que responde a fitoprotectores del herbicida bencenosulfonamida (Hershey y col., *Mol. Gen. Genetics*, 1991, 227:229-237 y Gatz y col., *Mol. Gen. Genetics*, 1994, 243:32-38) y el promotor del represor Tet de Tn10 (Gatz y col., *Mol. Gen. Genet.*, 1991, 227:229-237). Otro promotor inducible para su uso en plantas es aquel que responde a un agente de inducción al que las plantas normalmente no responden. Un ejemplo de promotor inducible de este tipo es el promotor inducible de un gen de hormona esteroidea, cuya actividad transcripcional se induce mediante una hormona glucocorticoesteroide (Schena y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88:10421) o la reciente aplicación del activador de transcripción quimérico XVE para su uso en un sistema de expresión en plantas inducible basado en el receptor de estrógenos que se activa mediante estradiol (Zuo y col., *Plant J.*, 2000, 24:265-273). Otros promotores inducibles para su uso en plantas se describen en el documento EP 332104 y en las publicaciones internacionales PCT N.º WO 93/21334 y WO 97/06269. También pueden utilizarse promotores compuestos por porciones de otros promotores u otros promotores parcial o totalmente sintéticos. Véanse, por ejemplo, Ni y col., *Plant J.*, 1995, 7:661-676 y la publicación internacional PCT N.º WO 95/14098 en las que se describen estos promotores para su uso en plantas.

50

**[0059]** El promotor puede incluir, o modificarse para incluir, uno o más elementos potenciadores que proporcionen de este modo niveles de transcripción más altos. Entre los elementos potenciadores adecuados para su uso en plantas se incluyen el elemento potenciador PC1SV (patente de EE. UU. N.º 5.850.019), el elemento potenciador 35S del CaMV (patentes de EE. UU. N.º 5.106.739 y 5.164.316) y el elemento potenciador de FMV (Maiti y col., *Transgenic Res.*, 1997, 6:143-156). Véase también la publicación internacional PCT N.º WO 96/23898.

55

**[0060]** Estas construcciones pueden contener una «secuencia señal» o «secuencia líder» para facilitar el transporte cotraduccional o postraduccional del péptido de interés hasta determinadas estructuras intracelulares

como el cloroplasto (u otro plástido), el retículo endoplásmico o el aparato de Golgi, o para ser secretado. Por ejemplo, la construcción puede manipularse genéticamente para que contenga un péptido señal que facilite la transferencia del péptido al retículo endoplásmico. Es sabido, o se supone, que una secuencia señal tiene como resultado el transporte cotraduccional o postraduccional del péptido a través de la membrana celular. En eucariotas, esto implica normalmente la secreción dentro del aparato de Golgi, con cierto grado de glucosilación. Una secuencia líder se refiere a cualquier secuencia que, cuando se traduce, tiene como resultado una secuencia de aminoácidos suficiente para desencadenar el transporte cotraduccional de la cadena peptídica hasta un orgánulo subcelular. Por tanto, esto incluye secuencias líder que dirigen el transporte y/o la glucosilación pasando a través del retículo endoplásmico, paso a las vacuolas, plástidos incluyendo cloroplastos, mitocondrias y similares. Los casetes de expresión en plantas también pueden contener un intrón, de modo que se requiere el procesamiento del ARNm del intrón para su expresión.

**[0061]** Estas construcciones también pueden contener regiones 5' y 3' no traducidas. Una región 3' no traducida es un polinucleótido localizado después del extremo 3' de una secuencia codificadora. Las secuencias señal de poliadenilación y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar a la adición de extensiones de ácido poliadenílico al extremo 3' del ARNm precursor son regiones 3' no traducidas. Una región 5' no traducida es un polinucleótido localizado antes del extremo 5' de una secuencia codificadora.

**[0062]** La región de terminación puede ser nativa con respecto a la región de inicio de la transcripción, puede ser nativa con respecto a la secuencia de la presente invención o puede derivar de otra fuente. Las regiones de terminación convenientes están disponibles a partir del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, como las regiones de terminación de la octopina sintetasa y de la nopalina sintetasa. Véanse también Guerineau y col., Mol. Gen. Genet., 1991, 262:141-144; Proudfoot, Cell, 1991, 64:671-674; Sanfacon y col., Genes Dev. 1991, 5:141-149; Mogen y col., Plant Cell, 1990, 2:1261-1272; Munroe y col., Genes, 1990, 91:151-158; Ballas y col., Nucleic Acids Res., 1989, 17:7891-7903 y Joshi y col., Nucleic Acid Res., 1987, 15:9627-9639.

**[0063]** Cuando sea apropiado, el vector y las secuencias de *OsENOD93* pueden optimizarse para aumentar su expresión en la célula huésped transformada. Es decir, las secuencias pueden sintetizarse usando codones preferidos por la célula huésped para mejorar su expresión o pueden sintetizarse usando codones a una frecuencia de uso de codón preferida por el huésped. En general, el contenido en GC del polinucleótido aumentará. Véanse, por ejemplo, Campbell y col., Plant Physiol., 1990, 92:1-11 para una discusión sobre el uso de codones preferido por el huésped. En la técnica se conocen procedimientos para sintetizar polinucleótidos preferidos por el huésped. Véanse por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.º 6.320.100; 6.075.185; 5.380.831 y 5.436.391, solicitudes publicadas de EE. UU. N.º 20040005600 y 20010003849, y Murray y col., Nucleic Acids Res., 1989, 17:477-498.

**[0064]** Por ejemplo, pueden dirigirse los polinucleótidos de interés para su expresión en el cloroplasto. De esta forma, donde el polinucleótido de interés no esté insertado directamente en el cloroplasto, el casete de expresión puede contener adicionalmente un polinucleótido que codifique un péptido de tránsito para dirigir el nucleótido de interés hacia los cloroplastos. Estos péptidos de tránsito son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Von Heijne y col., Plant Mol. Biol. Rep., 1991, 9:104-126; Clark y col., J. Biol. Chem., 1989, 264:17544-17550; Della-Cioppa y col., Plant Physiol., 1987, 84:965-968; Romer y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1993, 196:1414-1421 y Shah y col., Science, 1986, 233:478-481. Se puede optimizar la expresión en el cloroplasto de los polinucleótidos de interés que se dirigen al cloroplasto para explicar las diferencias en el uso de codones entre el núcleo de la planta y este orgánulo. De esta forma pueden sintetizarse los polinucleótidos de interés usando codones preferidos por los cloroplastos. Véase por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 5.380.831.

**[0065]** Un casete de expresión en plantas (es decir, un marco de lectura abierto de *OsENOD93* unido de forma operativa a un promotor) puede insertarse en un vector de transformación de plantas, que permite la transformación del ADN dentro de una célula. Esta molécula puede constar de uno o más casetes de expresión y puede estar organizada en más de una moléculas de ADN vector. Por ejemplo, los vectores binarios son vectores de transformación de plantas que utilizan dos vectores de ADN no contiguos para codificar todas las funciones de activación en cis y trans requeridas para la transformación de las células vegetales (Hellens y col., Trends in Plant Science, 2000, 5:446-451).

**[0066]** Un vector de transformación de plantas comprende uno o más vectores de ADN para conseguir la transformación de la planta. Por ejemplo, es una práctica habitual en la técnica utilizar vectores de transformación de plantas que comprendan más de un segmento de ADN contiguo. A menudo, estos vectores se denominan en la técnica vectores binarios. Los vectores binarios, al igual que los vectores con plásmidos auxiliares, se utilizan más frecuentemente para la transformación mediada por *Agrobacterium*, donde el tamaño y la complejidad de los

segmentos que necesitan una transformación eficaz es bastante grande, y supone una ventaja para separar funciones en moléculas de ADN independientes. Normalmente los vectores binarios contiene un vector plasmídico que contiene las secuencias que actúan en cis necesarias para transferir el ADN-T (como los bordes izquierdo y derecho), un marcador seleccionable que se manipula genéticamente para que sea capaz de expresarse en una 5 célula vegetal, y un polinucleótido de interés (es decir, un polinucleótido manipulado genéticamente para que sea capaz de expresarse en una célula vegetal para la que se desea la generación de plantas transgénicas). También se encuentran en este vector plasmídico las secuencias necesarias para la replicación bacteriana. Las secuencias que actúan en cis se disponen de forma que permitan la transferencia eficaz dentro de las células vegetales y su expresión en las mismas. Por ejemplo, la secuencia del marcador seleccionable y la secuencia de interés se 10 localizan entre los bordes izquierdo y derecho. A menudo un segundo vector plasmídico contiene los factores que actúan en trans que median en la transferencia del ADN-T desde *Agrobacterium* a las células vegetales. Este plásmido a menudo contiene las funciones de virulencia (genes *Vir*) que permiten la infección de las células vegetales por *Agrobacterium* y la transferencia del ADN mediante la escisión de las secuencias bordes y la transferencia de ADN mediada por vir, como se conoce en la materia (Hellens y col., 2000). Pueden usarse varios 15 tipos de cepas de *Agrobacterium* (p. ej., LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105, etc.) para la transformación de plantas. El segundo vector plasmídico no es necesario para la introducción de polinucleótidos dentro de las plantas por otros procedimientos como microproyección, microinyección, electroporación, polietilenglicol, etc.

#### II.B. Células huésped

20 **[0067]** Las células huésped son células en las que puede introducirse una molécula de ácido nucleico heterólogo. Entre las células huésped eucariotas representativas se incluyen células de levadura y vegetales, así como huéspedes procariotas como *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Las células huésped preferidas para ensayos funcionales carecen sustancial o completamente de expresión endógena de una proteína OsENOD93.

25 **[0068]** Puede elegirse una cepa de célula huésped que lleve a cabo la expresión de la secuencia recombinante, o modifique y procese el producto génico de forma específica. Por ejemplo, diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y modificación traduccional y postraduccional (p. ej., glucosilación, fosforilación de proteínas, etc). Pueden elegirse líneas celulares o células 30 huésped apropiadas para asegurar la modificación deseada y el procesamiento de la proteína extraña expresada. Por ejemplo, puede usarse la expresión en un sistema bacteriano para producir un producto proteico central sin glucosilar y la expresión en levaduras producirá un producto glucosilado.

35 **[0069]** La presente invención además abarca la expresión recombinante de una proteína OsENOD93 en una línea celular estable. Los procedimientos para generar una línea celular estable tras la transformación de una construcción heteróloga en una célula huésped son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Joyner, Gene Targeting: A Practical Approach, 1993, Oxford University Press, Oxford/Nueva York. Por tanto, se entiende que células, tejidos y plantas transformados abarcan no solo el producto final de un proceso de transformación sino 40 también a su progenie transgénica o formas propagadas.

#### III. Plantas que sobreexpresan *OsENOD93*

45 **[0070]** La presente invención también proporciona plantas que sobreexpresan *OsENOD93* que comprende un ácido nucleico o proteína *OsENOD93* sobreexpresada. La presente invención también proporciona la generación de plantas con expresión condicionada o inducible de *OsENOD93*.

**[0071]** Pueden prepararse plantas que sobreexpresen *OsENOD93* tanto a partir de plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas, por ejemplo, en maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, patata, algodón, 50 arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada y colza, *Brassica* sp., alfalfa, centeno, mijo, alazor, cacahuètes, boniato, mandioca, café, coco, piña, árboles de cítricos, cacao, té, plátano, aguacate, higo, guayaba, mango, aceituna, papaya, anacardo, nueces de macadamia, almendras, avena, verduras, plantas ornamentales y coníferas. Entre las verduras representativas se incluyen tomate, lechuga, judías verdes, frijoles, guisantes, batata, cebolla y miembros del género *Curcumis* como pepino, melón y sandía. Entre las plantas ornamentales se incluyen, pero sin limitaciones, azalea, hortensia, hibisco, rosas, tulipanes, narcisos, petunias, 55 clavel, flor de pascua y crisantemo. Según se usa en este documento, el término planta se refiere a una planta completa, un órgano de una planta (p. ej., hojas, tallos, raíces, etc), una semilla, una célula vegetal, un propágulo, un embrión y la progenie de la misma. Las células vegetales pueden estar diferenciadas o indiferenciadas (p. ej., callo, células en cultivo en suspensión, protoplastos, células de la hoja, células de la raíz, células de floema, polen, etc.).

**[0072]** Las plantas que sobreexpresan *OsENOD93* pueden estar modificadas adicionalmente en un locus diferente al de *OsENOD93* para conferirle un aumento en el uso eficiente del nitrógeno u otra característica de interés. Entre las características deseadas representativas se incluyen la mejora del rendimiento de las cosechas, aumento del rendimiento de semillas, aumento del contenido de aminoácidos, aumento del contenido de nitrato, aumento de la tolerancia al estrés, resistencia a insectos, tolerancia a herbicidas de amplio espectro, resistencia a enfermedades causadas por virus, bacterias, hongos y helmintos, y potenciamiento de los mecanismo de protección frente a presiones medioambientales como calor, frío, sequía y alta concentración salina. Entre las características deseadas adicionales se incluyen características fenotípicas que benefician a los consumidores, por ejemplo, alimentos nutricionalmente enriquecidos que contienen más almidón o proteína, más vitaminas, más antioxidantes y/o menos ácidos grasos trans; alimentos con mejor sabor, aumento de la durabilidad y mejores características de maduración; árboles que facilitan la producción de papel con menos perjuicio para el medio ambiente, tabaco sin nicotina, flores ornamentales con nuevos colores, fragancias y aumento de su duración, etc. Aún adicionalmente, entre las características deseadas que pueden utilizarse según la descripción se incluyen productos génicos producidos en plantas como medio de fabricación, por ejemplo, de proteínas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades y vacunas; fibras textiles; plásticos biodegradables, aceites utilizados en pinturas, detergentes y lubricantes, etc. En el caso de las modificaciones genéticas que confieren características asociadas con una alteración de la expresión génica, el contenido de nitrato, contenido de aminoácidos, captación de nitrato, crecimiento lateral de las raíces o biomasa de la planta, la combinación de una planta que sobreexpresa *OsENOD93* y una segunda modificación genética puede producir un efecto sinérgico, es decir, un cambio en la expresión génica, el contenido de nitrato, contenido de aminoácidos, captación de nitrato, crecimiento lateral de las raíces o biomasa de la planta que sea mayor que el cambio inducido por cada modificación genética por separado.

**[0073]** Para la preparación de una planta que sobreexpresa *OsENOD93*, la introducción de un polinucleótido en células vegetales se consigue mediante una de las diversas técnicas conocidas en la materia incluyendo, pero sin limitaciones, electroporación o transformación química (véase, por ejemplo, Ausubel, ed. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., Indianápolis, Indiana. Los marcadores que confieren resistencia a sustancias tóxicas son útiles para identificar células transformadas (que ha captado y expresado la secuencia polinucleotídica problema) de células no transformadas (aquellas que no contienen ni expresan la secuencia polinucleotídica problema). En un aspecto de la invención, los genes son útiles como marcadores para evaluar la introducción de ADN dentro de las células vegetales. Plantas transgénicas, plantas transformadas o plantas transformadas de forma estable, o células, tejidos o semillas de cualquiera de las anteriores, se refiere a plantas que han incorporado o integrado polinucleótidos exógenos en sus células. El término transformación estable se refiere a la introducción de una construcción polinucleotídica en una planta, de modo que esta se integre en el genoma de la planta y sea capaz de ser heredada por su progenie.

**[0074]** En general, los procedimientos de transformación de plantas suponen transferir a las células de la planta diana ADN heterólogo (p. ej., embriones inmaduros o maduros, cultivos en suspensión, callos indiferenciados, protoplastos, etc.), seguido de la aplicación de un nivel de umbral máximo de selección adecuada (dependiendo del gen marcador seleccionable) para recuperar las células vegetales transformadas a partir de un grupo de masa celular no transformada. Normalmente los explantes se transfieren al mismo medio recién preparado y se cultivan de forma rutinaria. Posteriormente, las células transformadas se diferencian en brotes después de colocarlas en medio de regeneración suplementado con un nivel umbral máximo del agente de selección (es decir, temperatura y/o herbicida). A continuación, los brotes se transfieren a un medio de enraizamiento selectivo para recuperar los brotes o plántulas con raíces. Después la plántula transgénica se convierte en una planta madura y produce semillas fértiles (p. ej., Hiei y col., *Plant J.*, 1994, 6:271-282; Ishida y col., *Nat. Biotechnol.*, 1996, 14:745-750). Una descripción general de las técnicas y procedimientos para la generación de plantas transgénicas se encuentra en Ayres y col., *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, 1994, 13:219-239 y Bommineni y col., *Maydica*, 1997, 42:107-120. Puesto que el material transformado contiene muchas células, en cualquier fragmento de callo diana en cuestión o tejido o grupo de células aparecen tanto células transformadas como no transformadas. La capacidad para eliminar células no transformadas y permitir que las células transformadas proliferen tiene como resultado cultivos de plantas transformadas. A menudo la capacidad para eliminar células no transformadas es una limitación para la rápida recuperación de células vegetales transformadas y para la generación con éxito de plantas transgénicas. A continuación pueden usarse procedimientos moleculares y bioquímicos para confirmar la presencia de los nucleótidos de interés integrados en el genoma de la planta transgénica.

**[0075]** La generación de plantas transgénicas puede realizarse mediante uno de los diversos procedimientos entre los que se incluyen, pero sin limitaciones, la introducción de ADN heterólogo mediante *Agrobacterium* en las células vegetales (transformación mediada por *Agrobacterium*), bombardeo de las células vegetales con ADN heterólogo extraño adherido a partículas y diversos otros procedimientos directos no mediados por partículas (p.

ej., Hiei y col., *Plant J.*, 1994, 6:271-282; Ishida y col., *Nat. Biotechnol.*, 1996, 14:745-750; Ayres y col., *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, 1994, 13:219-239; Bommineni y col., *Maydica*, 1997, 42:107-120) para transferir el ADN.

**[0076]** Existe tres procedimientos habituales para transformar células vegetales con *Agrobacterium*. El primer procedimiento es el cocultivo de *Agrobacterium* con protoplastos aislados cultivados. Este procedimiento requiere un sistema de cultivo establecido que permite cultivar protoplastos y la regeneración de plantas a partir de protoplastos cultivados. El segundo procedimiento es la transformación de células o tejidos con *Agrobacterium*. Este procedimiento requiere a) que las células o tejidos vegetales puedan transformarse con *Agrobacterium* y b) que pueda inducirse a las células o tejidos transformados a regenerarse en plantas completas. El tercer procedimiento es la transformación de semillas, ápices o meristemas con *Agrobacterium*. Este procedimiento requiere de micropropagación.

**[0077]** La eficiencia de la transformación mediante *Agrobacterium* puede potenciarse usando varios procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se ha demostrado que la inclusión de una molécula natural de respuesta a heridas como la acetosiringona (AS) en el medio de cultivo de *Agrobacterium* potencia la eficacia de la transformación con *Agrobacterium tumefaciens* (Shahla y col., *Plant Molec. Biol.*, 1987, 8:291-298). Alternativamente, la eficiencia de transformación puede potenciarse lacerando el tejido diana que se va a transformar. La laceración del tejido vegetal puede conseguirse, por ejemplo, mediante perforación, maceración, bombardeo con microproyectiles, etc. Véase, por ejemplo, Bidney y col., *Plant Molec. Biol.*, 1992, 18:301-313.

**[0078]** En otro aspecto de la invención, las células vegetales se transfectan con vectores mediante bombardeo de partículas (es decir, con una pistola de genes). Los procedimientos de transferencia de genes mediada por partículas son conocidos en la técnica, están disponibles en el mercado e incluyen, pero sin limitaciones, el apartado de administración de genes dirigido por gas descrito en la patente de EE. UU. N.º 5.584.807. Este procedimiento supone recubrir partículas de metal pesado con la secuencia polinucleotídica y acelerar las partículas recubiertas mediante la presión de gas comprimido para su administración al tejido diana.

**[0079]** También están disponibles otros procedimientos de bombardeo de partículas para la introducción de secuencias polinucleotídicas heterólogas en las células de la planta. En general, estos procedimientos suponen el depósito de la secuencia polinucleotídica de interés sobre la superficie de partículas pequeñas y densas de un material como oro, platino o tungsteno. A continuación, las partículas recubiertas se colocan recubriendo ellas mismas una superficie rígida, como una placa metálica o una lámina portadora hecha de un material frágil como el tereftalato de polietileno. La lámina recubierta se acelera después hacia el tejido biológico diana. El uso de la lámina plana genera una propagación uniforme de las partículas aceleradas que maximiza el número de células que reciben partículas en condiciones uniformes, lo que tiene como resultado la introducción de la muestra de polinucleótido en el tejido diana.

**[0080]** También pueden usarse señales de iniciación específicas para lograr una traducción más eficaz de las secuencias que codifican el polipéptido de interés. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. En los casos en los que las secuencias que codifican el polipéptido de interés, su codón de iniciación y las secuencias antes del extremo 5' están insertadas en el vector de expresión adecuado, puede que no se necesiten señales de control de la transcripción o de la traducción adicionales. Sin embargo, en los casos en los que solo se inserta la secuencia codificadora, o una porción de la misma, deberán proporcionarse señales exógenas de control de la traducción, incluyendo el codón de iniciación ATG. Además, el codón de iniciación debería estar en el marco de lectura correcto para asegurar la traducción de la inserción completa. Los elementos exógenos de traducción y los codones de iniciación pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de potenciadores que sean apropiados para el sistema celular en particular que se usa, como los descritos en la literatura (Scharf y col., *Results Probl. Cell Differ.*, 1994, 20:125).

**[0081]** En otro aspecto de la presente invención se modifica al menos una copia genómica correspondiente a una secuencia nucleotídica de la presente invención en el genoma de la planta mediante recombinación homóloga como se muestra con más detalle en Paszkowski y col., *EMBO Journal* 1988, 7:4021-26. Esta técnica utiliza la propiedad de las secuencias homólogas para reconocerse entre sí e intercambiar secuencias de nucleótidos entre cada una mediante un proceso conocidos en la técnica como recombinación homóloga. La recombinación homóloga puede producirse entre la copia cromosómica de una secuencia de nucleótidos en una célula y una copia entrante de la secuencia de nucleótidos introducida en la célula mediante transformación. Por tanto, se introducen modificaciones específicas con exactitud en la copia cromosómica de la secuencia de nucleótidos. En un aspecto, los elementos reguladores de la secuencia de nucleótidos de la presente invención están modificados. Estos

elementos reguladores se obtienen fácilmente mediante análisis de una biblioteca genómica usando la secuencia de nucleótidos de la presente invención, o una porción de la misma, como sonda. Los elementos reguladores existentes se sustituyen por elementos reguladores diferentes alterando de este modo la expresión de la secuencia de nucleótidos.

5

**[0082]** Las células que han sido transformadas pueden crecer en plantas según maneras convencionales. Véase, por ejemplo, McCormick y col., Plant Cell Rep., 1986, 5:81-84. Estas plantas pueden crecer a continuación y pueden polinizarse con la misma variedad transformada o con variedades diferentes, y el híbrido resultante tendrá la expresión constitutiva de la característica fenotípica deseada identificada. Pueden crearse dos o más generaciones para confirmar que la expresión de la característica fenotípica deseada se mantiene y se hereda de forma estable y, a continuación, se recolectan las semillas para confirmar que se ha conseguido la expresión de la característica fenotípica deseada. De esta forma, la presente invención proporciona semillas transformadas (denominadas también semillas transgénicas) que tienen un polinucleótido de la descripción, por ejemplo, un casete de expresión de la descripción, incorporado de forma estable en su genoma.

10

15

**[0083]** Las plantas transgénicas de la invención pueden ser homocigotas para los polinucleótidos añadidos, es decir, una planta transgénica que contiene dos secuencias añadidas, una secuencia en el mismo locus de cada cromosoma de una pareja de cromosomas. Una planta transgénica homocigota puede obtener mediante apareamiento sexual (autopolinización) de una planta transgénica segregadora independiente que contiene las secuencias añadidas según la invención, germinación de algunas de las semillas producidas y análisis de las plantas resultantes para potenciar la actividad enzimática (es decir, resistencia a herbicidas) y/o aumento del rendimiento de la planta en relación con un control (nativo, no transgénico) o una planta transgénica segregadora independiente.

20

**[0084]** Se entenderá que también pueden aparearse dos plantas transgénicas diferentes para obtener descendencia que contenga dos polinucleótidos exógenos añadidos que se segreguen independientemente. La autopolinización de la progenie apropiada puede producir plantas que son homocigotas para todos los polinucleótidos exógenos añadidos que codifican un polipéptido de la presente descripción. También se contemplan el retrocruzamiento con una planta parental y la alofecundación con una planta no transgénica.

25

**[0085]** Tras la introducción del ADN en las células vegetales, la transformación o integración del polinucleótido en el genoma de la planta se confirma mediante diversos procedimientos como el análisis de polinucleótidos, polipéptidos y metabolitos asociados con la secuencia integrada.

30

#### IV. Ligandos de unión y activadores de OsENOD93

35

**[0086]** La presente descripción además describe ensayos para identificar los ligandos de unión a OsENOD93 y activadores de OsENOD93. Los activadores de OsENOD93 son agentes que alteran las actividades o propiedades químicas y biológicas de una proteína OsENOD93. Entre estas actividades y propiedades químicas y biológicas se pueden incluir, pero sin limitaciones, los niveles de expresión de ácidos nucleicos OsENOD93 y los niveles de expresión de ácidos nucleicos sujetos a regulación de OsENOD93. Los procedimientos de identificación de activadores implican analizar un nivel o cualidad potenciada de la función de OsENOD93 en presencia de uno o más agentes de ensayo. Entre los activadores de OsENOD93 representativos se incluyen moléculas pequeñas como entidades biológicas, como se describe a continuación en este documento.

40

**[0087]** Un nivel o atributo control de la actividad de OsENOD93 se refiere a un nivel o atributo de la actividad OsENOD93 de tipo silvestre, por ejemplo, cuando se usa un sistema de expresión recombinante que comprende la expresión de la SEQ ID NO: 3. Cuando se evalúa la capacidad activadora de un agente de ensayo, un nivel o atributo control de la actividad OsENOD93 comprende un nivel o cualidad de la actividad en ausencia del agente de ensayo.

45

**[0088]** Cambio significativo en la actividad de una proteína OsENOD93 se refiere a un cambio cuantificable en un atributo mensurable que es mayor que el margen de error inherente en la técnica de medición. Por ejemplo, inhibición significativa se refiere a la actividad OsENOD93 que se reduce en aproximadamente 2 veces o más en relación con una medición control o una reducción de 5 veces o más, o una reducción de aproximadamente 10 veces o más. Una inhibición significativa se refiere a la actividad OsENOD93 que aumenta en aproximadamente 2 veces o más en relación con una medición control o una reducción de 5 veces o más, o una reducción de aproximadamente 10 veces o más.

50

**[0089]** Un ensayo de la función de OsENOD93 puede comprender determinar el nivel de expresión génica de

OsENOD93, determinar la actividad de unión a ADN de una proteína OsENOD93 expresada mediante tecnología recombinante, determinar una conformación activa de una proteína OsENOD93 o determinar la activación de los eventos de señalización en respuesta a la unión de un activador de OsENOD93 (p. ej., aumento de la expresión de transportadores de nitrato, aumento del contenido de nitrato, aumento del contenido de aminoácidos, aumento de la captación de nitrato, aumento de la germinación de las raíces laterales y/o aumento de la biomasa). Por ejemplo, un procedimiento de identificación de un activador de OsENOD93 comprende a) proporcionar una célula que exprese una proteína OsENOD93; b) poner en contacto la célula con uno o más agentes de ensayo o un agente de control; c) analizar la expresión de un ácido nucleico que codifique la proteína OsENOD93 y d) seleccionar un agente de ensayo que induzca la elevación de la expresión del ácido nucleico cuando se pone en contacto con el agente de ensayo cuando se compara con el agente de control.

**[0090]** Según la presente descripción también se proporciona un procedimiento de selección rápido y de alto rendimiento que depende de los procedimientos descritos en este documento. Este procedimiento de selección comprende poner en contacto independientemente una proteína OsENOD93 con diversos agentes de ensayo. En este procedimiento de ensayo la diversidad de los agentes de ensayo puede comprender más de aproximadamente  $10^4$  muestras o más de aproximadamente  $10^5$  muestras, o más de aproximadamente  $10^6$  muestras.

**[0091]** Los ensayos *in vitro* y celulares de la descripción puede comprender ensayos solubles o puede comprender adicionalmente un sustrato en fase sólida para inmovilizar uno o más componentes del ensayo. Por ejemplo, una proteína OsENOD93, o una célula que exprese una proteína OsENOD93, puede estar unida directamente a un componente en estado sólido a través de un enlace covalente o no covalente. Opcionalmente, la unión puede incluir una molécula enlazadora o una etiqueta que medie en la unión indirecta de una proteína OsENOD93 a un sustrato.

#### 25 IV.A. Agentes de ensayo

**[0092]** La expresión agente de ensayo se refiere a cualquier agente que potencialmente interacciona con un ácido nucleico o proteína OsENOD93, incluyendo cualquier producto sintético, recombinante o natural. Un agente de ensayo que se sospecha interacciona con una proteína puede evaluarse usando los procedimientos descritos en este documento.

**[0093]** Entre los agentes de ensayo representativos se incluyen, pero sin limitaciones péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, moléculas pequeñas (p. ej., compuestos químicos orgánicos e inorgánicos), anticuerpos o fragmentos de los mismos, moléculas de fusión ácido nucleico-proteína, cualquier otro agente de afinidad y sus combinaciones. Un agente de ensayo que se va a analizar puede ser una molécula purificada, una muestra homogénea o una mezcla de moléculas o compuestos.

**[0094]** La expresión una molécula pequeña se refiere a un compuesto, por ejemplo un compuesto orgánico, con un peso molecular menor de aproximadamente 1.000 daltons, más preferiblemente menor de aproximadamente 750 daltons, aún más preferiblemente menor de aproximadamente 600 daltons y aun más preferiblemente menor de aproximadamente 500 daltons. Una molécula pequeña también tiene preferiblemente un coeficiente de reparto octanol-agua registrado en el intervalo de aproximadamente -4 a aproximadamente +14, más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente -2 a aproximadamente +7,5.

**[0095]** Los agentes de ensayo pueden obtenerse o prepararse como una biblioteca o colección de moléculas. Una biblioteca puede contener algunas o una gran cantidad de moléculas diferentes, variando de aproximadamente 10 moléculas a varios miles de millones de moléculas o más. Una molécula puede comprender una molécula natural, una molécula recombinante o una molécula sintética. Los diversos agentes de ensayo de una biblioteca pueden analizarse simultáneamente. De forma opcional, los agentes de ensayo derivados de diferentes bibliotecas pueden agruparse para una evaluación simultánea.

**[0096]** Entre las bibliotecas representativas se incluyen, pero sin limitaciones, una biblioteca de péptidos (patentes de EE. UU. N.º 6.156.511, 6.107.059, 5.922.545 y 5.223.409), una biblioteca de oligómeros (patentes de EE. UU. N.º 5.650.489 y 5.858.670), una biblioteca de aptámeros (patentes de EE. UU. N.º 7.338.762; 7.329.742; 6.949.379; 6.180.348 y 5.756.291), una biblioteca de moléculas pequeñas (patentes de EE. UU. N.º 6.168.912 y 5.738.996), una biblioteca de anticuerpos o de fragmentos de anticuerpo (patentes de EE. UU. N.º 6.174.708, 6.057.098, 5.922.254, 5.840.479, 5.780.225, 5.702.892 y 5.667.988), una biblioteca de moléculas de fusión ácido nucleico-proteína (patente de EE. UU. N.º 6.214.553) y una biblioteca de cualquier otro agente de afinidad que pueda unirse potencialmente a una proteína OsENOD93.

**[0097]** Una biblioteca puede comprender una colección aleatoria de moléculas. Alternativamente, una biblioteca puede comprender una colección de moléculas que tienen una preferencia por una secuencia, estructura o conformación en particular, por ejemplo, por ácidos nucleicos inhibidores. Véanse por ejemplo las patentes de EE. UU. N.º 5.264.563 y 5.824.483. Se conocen en la técnica procedimientos para preparar bibliotecas que contengan poblaciones diversas de diversos tipos de moléculas, por ejemplo como se describe en las patentes de EE. UU. citadas anteriormente en este documento. Muchas bibliotecas también están disponibles en el mercado.

#### IV.B. Ensayos de unión

10

**[0098]** En otro aspecto de la descripción, un procedimiento de identificación de un activador de OsENOD93 comprende determinar la unión específica de un agente de ensayo a una proteína OsENOD93. Por ejemplo, un procedimiento de identificación de ligando de unión de OsENOD93 puede comprender: a) proporcionar una proteína OsENOD93 de SEQ ID NO: 3; b) poner en contacto la proteína OsENOD93 con uno o más agentes de ensayo en condiciones suficientes para la unión, c) analizar la unión de un agente de ensayo a la proteína OsENOD93 aislada y d) seleccionar un agente de ensayo que muestre una unión específica a la proteína OsENOD93. La unión específica también puede abarcar una cualidad o estado de acción mutua de modo que la unión de un agente de ensayo a la proteína OsENOD93 sea inhibitoria o inductora.

15

**[0099]** El término unión específica se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y de otros materiales biológicos. La unión de un agente de ensayo a una proteína OsENOD93 puede considerarse específica si la afinidad de unión es de aproximadamente  $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  a aproximadamente  $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  o superior. Unión específica también hace referencia a una unión saturable. Para demostrar la unión saturable de un agente de ensayo a una proteína OsENOD93, puede realizarse un análisis de Scatchard como se describe, por ejemplo, en Mak y col., J. Biol. Chem., 1989, 264:21613-21618

20

**[0100]** Pueden usarse varias técnicas para detectar las interacciones entre una proteína OsENOD93 y un agente de ensayo sin emplear un inhibidor competitivo conocido. Entre los procedimientos representativos se incluyen, pero sin limitaciones, espectroscopía de correlación de fluorescencia, desorción/ionización láser inducida en superficie, espectroscopía de tiempo de vuelo y tecnología BIACORE<sup>®</sup>, descrita cada una de ellas a continuación en este documento. Estos procedimientos puede adaptarse a un análisis automático de alto rendimiento.

30

**[0101]** La espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS, por sus siglas en inglés) mide la tasa de difusión media de una molécula fluorescente dentro de un pequeño volumen de muestra. El tamaño de la muestra puede ser de tan solo  $10^3$  moléculas fluorescentes y el volumen de muestra de tan solo el citoplasma de una única bacteria. La tasa de difusión es una función de la masa de la molécula y disminuye cuando la masa aumenta. Por tanto, la FCS puede aplicarse al análisis de la interacción proteína-ligando midiendo el cambio en la masa y, en consecuencia, en la tasa de difusión de una molécula tras la unión. En un experimento típico, la diana analizada (p. ej., una proteína OsENOD93) se expresa como una proteína recombinante con una secuencia etiqueta, como una secuencia polihistidina, insertada en el extremo N-terminal o C-terminal. La expresión está mediada en una célula huésped, como *E. coli*, levadura, oocitos de *Xenopus* o células de mamífero. La proteína se purifica utilizando procedimientos cromatográficos. Por ejemplo, puede utilizarse la etiqueta de polihistidina para unir la proteína expresada a una columna con un metal quelante como  $\text{Ni}^{2+}$  quelado sobre una agarosa con ácido iminodiacético. A continuación, la proteína se marca con una etiqueta fluorescente como carboxitetrametilrodamina o reactivo BODIPY<sup>TM</sup> (disponible en Molecular Probes de Eugene, Oregón). Después, la proteína se expone en solución al posible ligando y se determina su tasa de difusión mediante FCS usando la instrumentación disponible de Carl Zeiss, Inc. (Thomwood of New York, Nueva York). La unión al ligando se determina por los cambios en la tasa de difusión de la proteína.

35

40

45

**[0102]** La desorción/ionización por láser inducida en superficie (SELDI) fue desarrollada por Hutchens y Yip, Rapid Commun. Mass Spectrom., 1993, 7:576-580. Cuando se acopla a un espectro de masa de tiempo de vuelo (TOF), SELDI proporciona una técnica para analizar rápidamente las moléculas retenidas en un chip. Puede aplicarse al análisis de la interacción ligando-proteína mediante la unión covalente a la proteína diana, o a una porción de la misma, sobre el chip y analizar mediante espectrometría de masa las moléculas pequeñas que se unen a esta proteína (Worrall y col., Anal Chem., 1998, 70(4):750-756). En un experimento típico, se expresa de forma recombinante y se purifica una proteína diana (p. ej., una proteína OsENOD93). La proteína diana se une a un chip de SELDI utilizando una etiqueta polihistidina o mediante otra interacción como intercambio iónico o interacción hidrófoba. Un chip preparado de este modo, se expone a continuación al posible ligando a través, por ejemplo, de un sistema de administración capaz de pipetear los ligandos de forma secuencial (automuestreador). Después el chip

50

55

se lava en soluciones de rigurosidad creciente, por ejemplo, una serie de lavados con soluciones tampón de fuerza iónica creciente. Tras cada lavado, el material unido se analiza enviando el chip al SELDI-TOF. Los ligandos unidos específicamente a una proteína diana se identifican mediante la rigurosidad del lavado necesaria para eluirlos.

5 **[0103]** BIACORE® depende de los cambios en el índice de refracción de la capa superficial tras la unión de un ligando a una proteína diana (p. ej., una proteína OsENOD93) inmovilizada sobre la capa. En este sistema se inyecta de forma secuencial una serie de pequeños ligandos en una célula de 2-5 microlitros, en la que la proteína diana está inmovilizada dentro de la célula. La unión se detecta mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) registrando la refracción de la luz láser a partir de la superficie. En general, el cambio del índice de refracción para  
10 un cambio determinado de concentración de masa en la capa superficial es prácticamente la misma para todas las proteínas y péptidos, lo que permite que un único procedimiento puede aplicarse a cualquier proteína. En un experimento típico, una proteína diana se expresa mediante tecnología recombinante, se purifica y se une a un chip BIACORE®. La unión puede facilitarse utilizando una etiqueta de polihistidina o mediante otra interacción, como intercambio iónico o interacción hidrófoba. A continuación, un chip preparado de este modo se expone a uno o más  
15 posibles ligandos mediante el sistema de administración incorporado en los instrumentos comercializados por Biacore (Uppsala, Suecia) para pipetear los ligandos de forma secuencial (automuestreador). La señal SPR del chip se registra y los cambios en el índice de refracción indican una interacción entre la diana inmovilizada y el ligando. El análisis de la cinética de la señal de asociación y disociación permiten la discriminación entre una interacción específica e inespecífica. Véase también Homola y col., *Sensors and Actuators*, 1999, 54:3-15 y las referencias  
20 incluidas en ese documento.

#### IV.C. Ensayo conformacional

**[0104]** La presente descripción también proporciona procedimientos para identificar ligandos de unión y  
25 activadores de OsENOD93 que dependen de un cambio conformacional de una proteína OsENOD93 cuando se une, o interacciona de cualquier otra forma, con un agente de ensayo. Por ejemplo, la aplicación del dicroísmo circular a las soluciones de macromoléculas muestra los estados conformacionales de estas macromoléculas. La técnica puede distinguir entre los estados conformacionales de plegamiento aleatorio, hélice alfa y cadena beta.

30 **[0105]** Para identificar parejas de unión y activadores de una proteína OsENOD93, puede realizarse un análisis de dicroísmo circular usando una proteína ENOD93 expresada de forma recombinante. Una proteína OsENOD93 se purifica, por ejemplo, mediante intercambio iónico y cromatografía de exclusión molecular y se mezcla con un agente de ensayo. La mezcla se somete a dicroísmo circular. La conformación de una proteína OsENOD93 en presencia de un agente de ensayo se compara con la conformación de una proteína OsENOD93 en  
35 ausencia del agente de ensayo. Un cambio en el estado conformacional de una proteína OsENOD93 en presencia de un agente de ensayo identifica un ligando de unión o activador de OsENOD93. En las patentes de EE. UU. N.º 5.776.859 y 5.780.242 se describen procedimientos representativos. La actividad del ligando de unión o activador puede evaluarse usando ensayos funcionales; entre estos ensayos se incluyen contenido de nitrato, captación de nitrato, crecimiento lateral de las raíces, rendimiento de semillas, contenido de aminoácidos o biomasa de la planta  
40 como se describe en este documento.

#### IV.D. Ensayos funcionales

**[0106]** En otro aspecto de la descripción, el procedimiento de identificación de un activador de OsENOD93  
45 emplea una proteína OsENOD93 funcional como se muestra, por ejemplo, en la SEQ ID NO: 2. Entre los procedimientos representativos para determinar la función de OsENOD93 se incluyen ensayos de cambios fisiológicos inducidos por la actividad OsENOD93, por ejemplo, potenciación del crecimiento lateral de las raíces, aumento de la captación de nitrato, aumento del contenido de nitrato, aumento del rendimiento de semillas, aumento del contenido de aminoácidos y/o aumento de la biomasa de la planta (véanse los ejemplos 1, 3-6, 10 y 12).

50 **[0107]** Por ejemplo, un procedimiento de identificación de un activador de OsENOD93 puede comprender a) proporcionar una célula que exprese una proteína OsENOD93, b) poner en contacto la célula con uno o más agentes de ensayo o un agente de control; c) analizar la expresión de un gen OsENOD93 diana y d) seleccionar un agente de ensayo que induzca la elevación de la expresión del gen diana OsENOD93, cuyo gen normalmente está  
55 sometido a inducción por OsENOD93 (p. ej., genes del metabolismo del nitrógeno, genes del metabolismo del carbono y genes transportadores de fosfosintetasas) cuando se pone en contacto con el agente de ensayo en comparación con el agente de control. Según los procedimientos descritos, las células que expresan OsENOD93 pueden proporcionarse en forma de kit útil para realizar un ensayo de función de OsENOD93. Por ejemplo, un kit de ensayo para detectar un activador de OsENOD93 puede incluir células transfectadas con ADN que codifique una

proteína OsENOD93 de longitud completa y un medio para el crecimiento de las células.

5 **[0108]** El ensayo de actividad de OsENOD93 que emplea células transfectadas de forma transitoria puede incluir un marcador que distinga entre las células transfectadas y las no transfectadas. El marcador puede estar codificado por, o asociado de cualquier otra forma, con una construcción para la expresión de OsENOD93, de modo que las células se transfecten de forma simultánea con una molécula de ácido nucleico que codifica OsENOD93 y el marcador. Entre las moléculas detectables representativas que son útiles como marcadores se incluyen, pero sin limitaciones, un ácido nucleico heterólogo, una proteína codificada por una construcción transfectada (p. ej., una enzima o una proteína fluorescente), una proteína de unión y un antígeno.

10 **[0109]** Un procedimiento para identificar un activador de OsENOD93 también puede incluir a) proporcionar una planta que exprese una proteína OsENOD93; b) poner en contacto la planta con uno o más agentes de ensayo o un agente de control; c) analizar i) el contenido de nitrato, ii) la captación de nitrato, iii) el contenido de aminoácidos, iv) el rendimiento de semilla o v) la biomasa y d) seleccionar un agente de ensayo que induzca i) aumento del contenido de nitrato, ii) aumento de la captación de nitrato, iii) aumento del contenido de aminoácidos, iv) aumento del rendimiento de semillas o v) aumento de la biomasa.

20 **[0110]** En los ensayos que emplean células que expresan OsENOD93 recombinante o plantas que expresan OsENOD93 pueden emplearse adicionalmente células o plantas control que carezcan sustancialmente de OsENOD93 nativa y, opcionalmente, de proteínas sustancialmente similares a una proteína OsENOD93. Cuando se usan células transfectadas de forma transitoria, una célula control puede comprender, por ejemplo, una célula huésped no transfectada. Cuando se usa una línea celular estable que expresa una proteína OsENOD93, una célula control puede comprender, por ejemplo, la línea celular parental usada para derivar la línea celular que expresa OsENOD93. Cuando se utilizan plantas, una planta control puede incluir una planta que sobreexpresa OsENOD93. En este caso, un activador de OsENOD93 muestra induce un fenotipo similar a una planta que sobreexpresa OsENOD93.

#### IV.E. Diseño racional

30 **[0111]** El conocimiento de la estructura de una proteína OsENOD93 nativa proporciona una estrategia para el diseño racional de activadores de OsENOD93. Brevemente, la estructura de una proteína OsENOD93 puede determinarse mediante cristalografía de rayos X y/o algoritmos informáticos que generan representaciones tridimensionales. Véase Saqi y col., *Bioinformatics*, 1999, 15:521-522; Huang y col., *Pac. Symp. Biocomput.*, 2000, 230-241 y la publicación internacional PCT N.º WO 99/26966. Alternativamente, un modelo de trabajo de la estructura de una proteína ENOD93 puede derivarse mediante modelado por homología (Maalouf y col., *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 1998, 158(5):841-851). Los modelos de ordenador pueden además predecir la unión de una estructura proteica de diversas moléculas sustrato que pueden sintetizarse y probarse usando los ensayos descritos anteriormente en este documento. En las patentes de EE. UU. N.º 5.834.228 y 5.872.011 se describen técnicas de diseño de compuestos adicionales .

40 **[0112]** Una proteína OsENOD93 es una proteína soluble que puede purificarse y concentrarse mediante cristalización. La proteína OsENOD93 purificada puede cristalizarse en condiciones variables de al menos una de entre las siguientes: pH, tipo de tampón, concentración de tampón, tipo de sal, tipo de polímero, concentración de polímero, otros ligando precipitantes y concentración de OsENOD93 purificada. Los procedimientos para generar una proteína cristalina se conocen en la técnica y puede adaptarse razonablemente para la determinación de una proteína OsENOD93 según se describe en este documento. Véase por ejemplo, Deisenhofer y col., *J. Mol. Biol.*, 1984, 180:385-398; Weiss y col., *FEBS Lett.*, 1990, 267:268-272 o los procedimientos proporcionados en un kit comercial, como el kit CRYSTAL SCREEN™ (disponible en Hampton Research of Riverside, California, EE. UU.).

50 **[0113]** En una proteína OsENOD93 cristalizada puede analizarse su actividad funcional y la idoneidad de cristales con diferentes tamaños y formas puede analizarse adicionalmente mediante difracción de rayos X. En general, los cristales más grandes proporcionar una mejor cristalografía que los más pequeños, y los cristales más gruesos proporcionan una mejor cristalografía que los más delgados. Preferiblemente, el tamaño de los cristales de OsENOD93 oscila de 0,1 a 1,5 mm. Estos cristales difractan los rayos X a una resolución de al menos 10 Å, como por ejemplo entre 1,5 y 10,0 Å o cualquier intervalo de valores entre estos, como 1,5; 1,6; 1,7; 1,8; 1,9; 2,0; 2,1; 2,2; 2,3; 2,4; 2,5; 2,6; 2,7; 2,8; 2,9; 3,0; 3,1; 3,2; 3,3; 3,4; 3,5 o 3, prefiriéndose 3,5 Å o menos para la resolución más alta.

#### IV.F. Anticuerpos OsENOD93

**[0114]** En otro aspecto de la descripción, se proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo que se una específicamente a una proteína OsENOD93. Según el procedimiento, se formula una proteína OsENOD93 recombinante de longitud completa de modo que pueda utilizarse como inmunógeno eficaz y se usa para inmunizar a un animal de manera que se genere una respuesta inmune en el animal. La respuesta inmune se caracteriza por la producción de anticuerpos que pueden obtenerse a partir del suero sanguíneo del animal.

**[0115]** Un anticuerpo es una proteína inmunoglobulina, o fragmentos de anticuerpo que contienen un sitio de unión al antígeno (p. ej., fragmentos Fab, Fab modificados, Fab', F(ab')<sub>2</sub> o Fv, o una proteína que tiene al menos una región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina o al menos una región de la cadena pesada de la inmunoglobulina). Entre los anticuerpos de la descripción se incluyen dianticuerpos, anticuerpos tetraméricos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos tetravalentes, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos) y anticuerpos específicos de dominio que reconocen un epítipo en particular. Las líneas celulares que producen anticuerpos frente a OsENOD93 también están incluidas en la descripción.

**[0116]** La unión específica de un anticuerpo a una proteína OsENOD93 se refiere a la unión preferencial por una proteína OsENOD93 en una muestra heterogénea que comprende múltiples antígenos diferentes. El término carencia sustancial de unión describe la unión de un anticuerpo a una proteína o muestra control, es decir, un nivel de unión caracterizado por unión inespecífica o de fondo. La unión de un anticuerpo a un antígeno es específica si la afinidad de unión es de al menos aproximadamente 10<sup>-7</sup> M o superior, tal como al menos aproximadamente 10<sup>-8</sup> M o superior, incluyendo al menos aproximadamente 10<sup>-9</sup> M o superior, al menos aproximadamente 10<sup>-11</sup> M o superior, o al menos aproximadamente 10<sup>-12</sup> M o superior.

**[0117]** Los anticuerpos frente a OsENOD93 preparados como se describe en este documento pueden usarse en procedimientos conocidos en la técnica relacionados con la expresión y actividad de las proteínas OsENOD93, por ejemplo, para la clonación de ácidos nucleicos que codifican una proteína OsENOD93, inmunopurificación de una proteína OsENOD93 y para detectar una proteína OsENOD93 en una muestra de la planta y medir los niveles de una proteína OsENOD93 en muestras de la planta. Para realizar estos procedimientos, un anticuerpo de la presente descripción puede además comprender un marcaje detectable, incluyendo, pero sin limitaciones, un marcaje radioactivo, un marcaje fluorescente, un marcaje de epítipo y un marcaje que pueda detectarse *in vivo*. Los procedimientos para la selección de un marcaje adecuado para una técnica de detección en particular y los procedimientos para conjugar o asociar de cualquier otro modo un marcador detectable con un anticuerpo son conocidos por el experto en la materia.

#### 35 V. Sobreexpresión de OsENOD93

**[0118]** Los ligandos de unión de OsENOD93 y los activadores de OsENOD93 son útiles tanto para aplicaciones *in vitro* como *in vivo* relacionadas en general con la evaluación de respuestas a los niveles de nitrógeno y para favorecer el uso eficiente del nitrógeno. En particular, pueden usarse activadores de OsENOD93 para inducir la transcripción de OsENOD93, para aumentar el contenido de nitrato en las plantas, para aumentar la captación de nitrato a través de las raíces de la planta, para aumentar el rendimiento de semillas en plantas, para aumentar el contenido de aminoácidos en plantas y para aumentar la biomasa de plantas.

**[0119]** La presente descripción proporciona que se administre una cantidad eficaz de un activador de OsENOD93 a una planta, es decir, una cantidad suficiente para obtener una respuesta biológica deseada. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un activador de OsENOD93 puede comprender una cantidad suficiente para inducir una expresión elevada de OsENOD93, los genes normalmente sometidos a la inducción de OsENOD93 (p. ej., genes del metabolismo del nitrógeno, genes del metabolismo del carbono y genes transportadores de fosfosintetasas), aumento del contenido de nitrato en las raíces de la planta, aumento de la captación de nitrato en las raíces de la planta, aumento de la germinación de las raíces laterales, aumento del rendimiento de semillas, aumento del contenido de aminoácidos y aumento de la biomasa.

**[0120]** Entre las plantas que pueden beneficiarse de la activación de OsENOD93 se incluyen, pero sin limitaciones, maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, patata, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada y colza, *Brassica sp.*, alfalfa, centeno, mijo, alazor, cacahuetes, boniato, mandioca, café, coco, piña, árboles de cítricos, cacao, té, plátano, aguacate, higo, guayaba, mango, aceituna, papaya, anacardo, nueces de macadamia, almendras, avena, verduras, plantas ornamentales y coníferas. Entre los vegetales representativos se incluyen tomates, lechuga, judías verdes, frijoles, guisantes, batata, cebolla y miembros del género *Curcumis* como pepino, melón y sandía. Entre las plantas ornamentales representativas se incluyen, pero

sin limitaciones, azalea, hortensia, hibisco, rosas, tulipanes, narcisos, petunias, clavel, flor de pascua y crisantemo. Cualquier de las plantas mencionadas anteriormente puede ser de tipo silvestre, endogámica o transgénica, por ejemplo, variedades de plantas y plantas modificadas genéticamente como las que se utilizan en la agricultura.

- 5 **[0121]** Las plantas tratadas con un activador de OsENOD93 pueden ser transgénicas, es decir, genéticamente modificadas en *OsENOD93* o en un locus diferente a *OsENOD93*, para conferir una mejora del uso eficiente del nitrógeno u otra característica de interés. Entre las características deseadas representativas se incluyen la mejora del rendimiento de las cosechas, mejora del rendimiento de semillas, aumento del contenido de aminoácidos, aumento del contenido de nitrato, aumento de la tolerancia al estrés, resistencia a insectos, tolerancia a herbicidas
- 10 de amplio espectro, resistencia a enfermedades causadas por virus, bacterias, hongos y helmintos, y potenciamiento de los mecanismos de protección frente a presiones medioambientales como calor, frío, sequía y alta concentración salina. Entre las características deseadas adicionales se incluyen características fenotípicas que benefician a los consumidores, por ejemplo, alimentos nutricionalmente enriquecidos que contiene más almidón o proteínas, más vitaminas, más antioxidantes y/o menos ácidos grasos trans; alimentos con mejor sabor, aumento de la durabilidad y
- 15 mejores características de maduración; árboles que facilitan la producción de papel con menos perjuicio para el medio ambiente, tabaco sin nicotina, flores ornamentales con nuevos colores, fragancias y aumento de su duración, etc. Aún adicionalmente, entre las características deseadas que pueden utilizarse según la descripción se incluyen productos génicos producidos en plantas como medio de fabricación, por ejemplo, de proteínas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades y de vacunas; fibras textiles; plásticos biodegradables, aceites utilizados en pinturas,
- 20 detergentes y lubricantes, etc. En el caso de las modificaciones genéticas que confieren características asociadas con una alteración de la expresión génica, el contenido de nitrato, captación de nitrato, crecimiento lateral de las raíces, rendimiento de semillas, contenido de aminoácidos o biomasa de la planta, la combinación de tratamiento con un activador de OsENOD93 y una modificación genética puede producir un efecto sinérgico, es decir, un cambio en la expresión génica, el contenido de nitrato, la captación de nitrato, el crecimiento lateral de las raíces, el
- 25 rendimiento de semillas, el contenido de aminoácidos o la biomasa de la planta que sea mayor que el cambio inducido por cada modificación genética por separado.

#### EJEMPLOS

- 30 **[0122]** Los ejemplos siguientes se han incluido para ilustrar los modos de la invención. Determinados aspectos de los ejemplos siguientes se describen en términos de técnicas y procedimientos encontrados o contemplados por los presentes coinventores para trabajar bien en la práctica de la invención. A la vista de la presente descripción y el nivel general de destreza en la técnica, los expertos apreciarán que los siguientes ejemplos pretenden ser tan solo eso y que pueden emplearse numerosos cambios, modificaciones y alteraciones sin
- 35 apartarse del alcance de la invención.

#### Ejemplo 1. Cambios en la biomasa de plantas expuestas a diferentes niveles de nitrógeno.

- [0123]** Se crecieron plantas de *Oryza sativa* var. Japonica cv. Donjin de tipo silvestre en una mezcla de musgo de turbera y vermiculita (1:4) (SunGro Horticulture Canada Ltd. BC, Canadá) con la adición de una solución de nutrientes con una cantidad diferente de nitrato una vez a la semana hasta su recolección. La solución de nutrientes contenía MgSO<sub>4</sub> 4 mM, KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, Fe-EDTA 0,1 mM, MES 0,5 mM (pH 6,0), MnSO<sub>4</sub> 9 μM, ZnSO<sub>4</sub> 0,7 μM, CuSO<sub>4</sub> 0,3 μM, NaB<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 46 μM y (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>2</sub> 0,2 μM. Se usó nitrato 10 mM como condición de concentración alta de nitrógeno, nitrato 5 mM como concentración media de nitrógeno y nitrato 1 mM como
- 45 concentración baja de nitrógeno. Las plantas se cultivaron en una sala de cultivo con 16 horas de luz (~400 μmolm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) a 28-30°C y 8 horas de oscuridad a 22-24°C durante cuatro semanas. Los brotes y las raíces se recogieron por separado y se evaluaron las diferencias de biomasa como marcador de crecimiento.

- [0124]** Con una concentración media de nitrógeno (nitrato 5 mM) el crecimiento de la planta medido por la biomasa de los brotes se redujo aproximadamente al 70% del de la concentración alta de nitrógeno (nitrato 10 mM) (73% del peso seco) y con la concentración baja de nitrógeno (nitrato 1 mM), adicionalmente, el crecimiento de la planta medido por la biomasa de los brotes se redujo aproximadamente al 30% del de la concentración alta de nitrógeno (nitrato 10 mM) (33% del peso seco) (figura 1A). La reducción de la biomasa de las raíces en las dos concentraciones de nitrógeno limitantes era ligeramente mayor que la de los brotes, ya que era del 69% y el 25% del
- 50 peso seco, respectivamente (figura 1B), lo que daba lugar a un aumento de la relación brote/raíz con un aumento en el estrés de nitrógeno (figura 1C).

#### Ejemplo 2. Respuesta a la deficiencia de nitrógeno

**[0125]** Se crecieron plantas de *Oryza sativa* var. Japonica cv. Donjin de tipo silvestre como se describe en el ejemplo 1. La clorosis de las hojas y la presencia del flavonoide púrpura antocianina son algunas de las respuestas típicas que las plantas tienen ante la deficiencia de N (Diaz U., y col., Plant and Cell Physiology, 2006, 47: 74-83). El contenido relativo de antocianina se analizó según el procedimiento descrito por Neff y Chory (Neff MM y Chory J, Plant Physiol, 1998, 118: 27-35). La clorofila total se midió usando el medidor de clorofila SPAD 502DL de Minolta (Tokio, Japón) o se extrajo con etanol y se midió en el espectrofotómetro según Kirk (Kirk, JTO, Planta, Berl., 1968, 78:200). Tanto los niveles de clorofila como los de antocianina en las hojas eran similares en las condiciones de concentraciones alta y media de nitrógeno. En condiciones de concentración baja de nitrógeno no era tan obvio el color amarillo o púrpura en las plantas aunque la reducción de la clorofila y el aumento de la antocianina eran significativos cuando se comparaba con las condiciones de concentración alta y media de nitrógeno (figuras 1D y 1E).

### **Ejemplo 3. Cambios en el contenido de nitrato libre en plantas expuestas a diferentes concentraciones de nitrógeno**

**[0126]** Se crecieron plantas de *Oryza sativa* var. Japonica cv. Donjin de tipo silvestre como se describe en el ejemplo 1. Se usaron tejidos de brotes y de raíz congelados para determinar las diferencias en el contenido de nitrato en las diferentes condiciones de nitrógeno. El contenido de nitrato se analizó mediante ensayo colorimétrico según Cataldo DA, y col., Commun. Soil Sci. Plant Anal 1975, 6: 71-80.

**[0127]** El contenido de nitrato libre en los brotes con una concentración media de nitrógeno (nitrato 5 mM) se redujo al 70% del de la concentración alta de nitrógeno (nitrato 10 mM) (3,35 mg/g de peso congelado (PC) frente a 4,55 mg/g de PC) y no se observó mucha más reducción con la concentración baja de nitrógeno (nitrato 1 mM) (2,85 mg/g de PC frente a 4,55 mg/g de PC) (figura 2A). El contenido de nitrato libre en las raíces se redujo aproximadamente a la mitad (4,8 mg/g de PC frente a 9,9 mg/g de PC) con concentración media de nitrógeno (nitrato 5 mM) en comparación con concentración alta de nitrógeno (nitrato 10 mM) y se observó una reducción de al menos 20 veces a la concentración baja de nitrógeno (nitrato 1 mM) (0,45 mg/g de PC frente a 9,9 mg/g de PC) en comparación con la concentración alta de nitrógeno (nitrato 10 mM) (figura 2B).

### **Ejemplo 4. Cambios en el contenido de aminoácidos en plantas expuestas a diferentes concentraciones de nitrógeno**

**[0128]** Se crecieron plantas de *Oryza sativa* var. Japonica cv. Donjin de tipo silvestre como se describe en el ejemplo 1. Se usaron tejidos de brotes y de raíz congelados para determinar las diferencias en el contenido de aminoácidos en las diferentes condiciones de nitrógeno. Los aminoácidos totales se extrajeron sucesivamente con etanol al 80%, 50% y 0% en tampón HEPES-KOH 10 mM (pH 7,4), los sobrenadantes se agruparon y el contenido de aminoácidos totales se analizó según Rosen H, Arch. Biochem. Biophys. 1957, 67: 10-15.

**[0129]** El contenido total de aminoácidos en los brotes a la concentración media de nitrógeno (nitrato 5 mM) se redujo al 77% del de la concentración alta de nitrógeno (nitrato 10 mM) y a la concentración baja de nitrógeno (nitrato 1 mM) se redujo al 35% del de la concentración alta de nitrógeno (nitrato 10 mM) (figura 2C). Se observó una reducción similar en las raíces (figura 2D).

### **Ejemplo 5. Cambios en el contenido de proteína soluble en plantas expuestas a diferentes concentraciones de nitrógeno**

**[0130]** Se crecieron plantas de *Oryza sativa* var. Japonica cv. Donjin de tipo silvestre como se describe en el ejemplo 1. Se usaron tejidos de brotes y de raíz congelados para determinar las diferencias en el contenido de proteína soluble en las diferentes condiciones de nitrógeno. La proteína soluble total se extrajo con tampón que contenía HEPES-KOH 100 mM, pH 7,5 y Tritón X-100 al 0,1% y se analizó usando el kit de ensayo de proteínas Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc. California, EE. UU.).

**[0131]** El contenido de proteína total soluble en los brotes con la concentración media de nitrógeno (nitrato 5 mM) era similar al nivel observado en los brotes de plantas crecidas con concentración alta de nitrógeno (10 mM) aunque era significativamente inferior al observado con la concentración baja de nitrógeno (1 mM) (figura 2E). Se observó un resultado similar en las raíces crecidas en las mismas condiciones (figura 2F).

### **Ejemplo 6. Cambios en el contenido de nitrógeno total en plantas expuestas a diferentes concentraciones de nitrógeno**

**[0132]** Se crecieron plantas de *Oryza sativa* var. Japonica cv. Donjin de tipo silvestre como se describe en el ejemplo 1. Se usaron tejidos de brotes y de raíz congelados para determinar las diferencias en el contenido de nitrógeno total en las diferentes condiciones de nitrógeno. El porcentaje de nitrógeno total en los tejidos secos se midió mediante el procedimiento de análisis de combustión de Micro-Dumas usando un analizador NA1500 C/N de Carlo Erba (Carlo Erba Strumentazione, Milán, Italia).

**[0133]** El porcentaje de nitrógeno total en los brotes con la concentración media de nitrógeno (nitrato 5 mM) era similar al nivel observado en los brotes de plantas crecidas con concentración alta de nitrógeno (10 mM), aunque era significativamente inferior al observado con concentración baja de nitrógeno (1 mM) (figura 2G). Se observó un resultado similar en las raíces crecidas en las mismas condiciones (figura 2H).

#### **Ejemplo 7. Identificación de genes expresados de forma diferencial en plantas expuestas a diferentes concentraciones de nitrógeno**

**[0134]** Se crecieron plantas de *Oryza sativa* var. Japonica cv. Donjin de tipo silvestre como se describe en el ejemplo 1. Se recogieron brotes y raíces de plantas silvestres de arroz de 4 semanas cultivadas con concentración alta de nitrógeno (nitrato 10 mM), concentración media de nitrógeno (nitrato 5 mM) y concentración baja de nitrógeno (nitrato 1 mM) para comparar los niveles de expresión génica basales a concentraciones diferentes pero estables de nitrógeno. Se hicieron tres replicados biológicos para cada concentración de nitrógeno. Adicionalmente, 2 horas antes de la recogida, se transfirieron algunas plantas cultivadas con concentración baja de nitrógeno (nitrato 1 mM) a concentración alta de nitrógeno (nitrato 10 mM) para evaluar los cambios en la expresión génica en respuesta a 2 horas de inducción con nitrógeno. Otras plantas cultivadas con concentración alta de nitrógeno (nitrato 10 mM) se transfirieron a concentración baja de nitrógeno (nitrato 1 mM) para evaluar los cambios en la expresión génica en respuesta a 2 horas de reducción de nitrógeno. Todas las muestras se obtuvieron a mitad del día para minimizar los cambios diurnos en el metabolismo del carbono y del nitrógeno. Se obtuvieron tres replicados biológicos para cada punto temporal.

**[0135]** Se usaron 5 µg de ARN total de cada muestra para sintetizar ADNc de cadena doble. El ARN complementario marcado, sintetizado a partir del ADNc se hibridó con una matriz de genoma completo GENECHIP<sup>®</sup> de arroz con diseño personalizado (Zhu T, Current Opinion in Plant Biology 2003, 6: 418-425). La señal de hibridación de la matriz se adquirió mediante el escáner 3000 de GENECHIP<sup>®</sup> y se cuantificó mediante MAS 5.0 (Affymetrix, California, EE. UU.). La medida del conjunto de sondas se resumió como valor de la media ponderada de todas las sondas en un conjunto, restando el 5% de fondo de la intensidad media de la matriz completa usando un algoritmo personalizado. La intensidad global de todos los conjuntos de sondas de cada matriz se elevó además a una intensidad objetivo de 100 para poder realizar una comparación directa.

**[0136]** Se realizaron 8 comparaciones entre las muestras siguientes (cuatro de cada para brotes y raíces): 1) concentración alta de nitrógeno frente a concentración media de nitrógeno (nitrato 10 mM a nitrato 5 mM); 2) concentración alta de nitrógeno frente a concentración baja de nitrógeno (nitrato 10 mM a nitrato 1 mM); 3) concentración baja de nitrógeno (nitrato 1 mM) frente a concentración de baja a alta de nitrógeno (inducción de nitrógeno de 2 horas) y 4) concentración alta de nitrógeno (nitrato 10 mM) frente a concentración de alta a baja de nitrógeno (reducción de nitrógeno de 2 horas).

**[0137]** Los datos recogidos se analizaron usando GeneSpring (Agilent, California, EE. UU.). Los datos se normalizaron usando la configuración predeterminada del programa, seguido del filtrado de genes, lo que requería que cada gen debería tener una etiqueta «P» o «M» en los tres replicados de la muestra. A esto le siguió un segundo paso de filtrado que requería que al menos una de las tres muestras tuviera una etiqueta «P». Esto garantizaba esencialmente que cada gen que permaneciera en un grupo pudiera ser «PMM», «PPM» o «PPP» entre los tres replicados. Para las comparaciones de los grupos por pares, se identificaron en primer lugar genes que se expresaban el doble y, a continuación, se usó ANOVA para identificar genes significativos (punto de corte del valor de  $p$  de la prueba de la  $t$  de Welch: 0,05).

**[0138]** Para confirmar los resultados del análisis de micromatrices, la expresión de ocho genes significativos a partir de diferentes grupos de comparación se analizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se aisló el ARN total de los tejidos de la planta usando reactivo TRIZOL (Invitrogen, California, EE. UU.). Para eliminar cualquier ADN genómico residual, el ARN total se trató con ADNasa sin ARNasa RQ1 (Promega, Wisconsin, EE. UU.). El ADNc de la primera cadena se sintetizó a partir de ARN total usando el kit del Sistema de Transcripción Inversa (Promega). El software PRIMER EXPRESS<sup>®</sup> 2.0 (Applied Biosystems, California, EE. UU.) se usó para diseñar los

cebadores. La PCR en tiempo real se realizó esencialmente según Kant S, y col., Plant Cell Environ., 2006, 29: 1220-1234. Los valores de cuantificación relativa (CR) para cada gen diana se calcularon mediante el procedimiento  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak KJ, Schmittgen TD, Methods, 2001, 25: 402-408) usando *ACTIN2* como gen de referencia interna para comparar los datos de los diferentes procedimientos de PCR o muestras de ADNc. Para confirmar la validez del procedimiento  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , se usaron diluciones seriadas 1:2 de ADNc de plantas control de *Thellungiella* y *Arabidopsis* para crear curvas patrón y se demostró que las eficiencias de la amplificación de los genes diana y de referencia eran aproximadamente iguales (Livak y Schmittgen, 2001). Los resultados del nivel relativo de expresión concordaban bastante con los datos de la micromatriz. Los niveles de expresión basales de todos los genes permanecieron similares entre las muestras crecidas con concentraciones altas y medias, tanto en el caso de los brotes como en el de las raíces (tabla 1). Sin embargo, el cambio transcripcional entre raíces y brotes con concentración baja de nitrógeno era diferentes ya que 59 genes significativos eran idénticos en las muestras de raíces (27 regulados por incremento y 32 regulados por disminución) pero ninguno en la muestra de brotes (tabla 1).

Tabla 1

Tratamiento con nitrógeno	Brote		Raíz	
	Incremento	Disminución	Incremento	Disminución
Alta frente a media	0	0	0	0
Alta frente a baja	0	0	27	32
Baja frente a inducción	0	0	273	22
Alta frente a reducción	0	0	339	62

#### Ejemplo 8. Respuesta en plantas sometidas a cambios transitorios en las concentraciones de nitrógeno

**[0139]** Se crecieron plantas de *Oryza sativa* var. Japonica cv. Donjin de tipo silvestre como se describe en el ejemplo 1 y se sometieron a cambios transitorios en la concentración de nitrógeno descrito en el ejemplo 7, es decir, una inducción con nitrógeno de 2 horas (concentración baja de nitrógeno (nitrato 1 mM) a concentración alta de nitrógeno (nitrato 10 mM) y una reducción de nitrógeno de 2 horas (concentración alta de nitrógeno (nitrato 10 mM) a concentración baja de nitrógeno (nitrato 1 mM)). El contenido de nitrato se determinó en raíces y brotes como se describe en el ejemplo 3 y la expresión génica diferencial se determinó como se describe en el ejemplo 7.

**[0140]** Después de 2 horas de inducción con nitrógeno, los niveles de nitrato en los brotes aumentaron de 2,85 mg/g de PC a 32 mg/g de PC, un cambio del 11% (figura 3A) y no se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión de diversos genes. En las raíces, los niveles de nitrato aumentaron de 0,45 mg/g de PC a 0,85 mg/g de PC después de una inducción con nitrógeno de 2 horas, un cambio de aproximadamente el 90% (figura 3B) y se identificaron 295 genes significativos (273 regulados por incremento y 22 regulados por disminución) (tabla 2).

**[0141]** Después de 2 horas de reducción de nitrógeno, los niveles de nitrato en los brotes disminuyeron de 4,55 mg/g de PC a 3,95 mg/g de PC, un cambio del 12% (figura 3C) y no se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión de diversos genes. En las raíces, los niveles de nitrato disminuyeron de 9,9 mg/g de PC a 8,2 mg/g de PC después de una reducción de nitrógeno de 2 horas, un cambio de aproximadamente el 18% (figura 3D) y se identificaron 401 genes significativos (339 regulados por incremento y 62 regulados por disminución) (tabla 2).

**[0142]** Entre los 295 genes que respondían a la inducción con nitrógeno y los 401 genes que respondían a la reducción de nitrógeno, 170 genes eran solapantes, 125 genes respondieron específicamente a la inducción con nitrógeno y 231 genes respondieron específicamente a la reducción de nitrógeno. De los 125 genes que respondieron a la inducción con nitrógeno, 107 estaban regulados por incremento y 18 regulados por disminución. De los 231 genes que respondieron específicamente a la reducción de nitrógeno, 174 estaban regulados por incremento y 57 regulados por disminución.

#### Ejemplo 9. Generación y selección de plantas transgénicas de arroz que sobreexpresan genes candidatos para UEN

**[0143]** Los genes que se identificaron en los ejemplos 7 y 8 como regulados por incremento y disminución se clasificaron funcionalmente y se seleccionaron aproximadamente 50 genes que respondía a una concentración baja de nitrógeno estable, a la inducción con nitrógeno, a la reducción de nitrógeno o tanto a la inducción como a la reducción como genes candidatos para UEN. La mayoría de los genes seleccionados pertenecían a tres grupos funcionales principales: metabolismo del nitrógeno, metabolismo del carbono y aquellos con posibles funciones

reguladoras (factores de transcripción y proteína quinasas). Los ADNc de longitud completa de todos los genes seleccionados se amplificaron y clonaron en un vector binario. Las plantas transgénicas de arroz se generaron mediante transformación mediada por *Agrobacterium* de *Oryza sativa* «Javanica» transformable que pertenece a la especie *Japonica* para sobreexpresar constitutivamente estos genes UEN. Se generaron de 5 a 10 eventos independientes para cada construcción. Los niveles de expresión de transgenes se analizaron mediante RT-PCR semicuantitativa usando tubulina como control interno.

**[0144]** Las plantas transgénicas se crecieron en una mezcla de musgo de turbera y vermiculita (1:4) (SunGro Horticulture Canada Ltd. BC, Canadá) con la adición de una solución de nutrientes con una cantidad diferente de nitrato una vez a la semana. La solución de nutrientes contenía MgSO<sub>4</sub> 4 mM, KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, Fe-EDTA 0,1 mM, MES 0,5 mM (pH 6,0), MnSO<sub>4</sub> 9 μM, ZnSO<sub>4</sub> 0,7 μM, CuSO<sub>4</sub> 0,3 μM, NaB<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 46 μM y (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>2</sub> 0,2 μM. Para el análisis durante la fase vegetativa, se usó la concentración baja de nitrógeno (nitrato 1 mM) una vez a la semana durante 4 semanas. Para el análisis al final de la fase reproductiva, se usó una concentración baja-media de nitrógeno (nitrato 3 mM) una vez a la semana hasta la recogida. Las plantas se crecieron en una sala de cultivo con 16 h de luz (aproximadamente 400 μmolm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) a 28-30°C y 8 h de oscuridad a 22-24°C durante las primeras cuatro semanas, después, una semana de tratamiento de día corto (10 h de luz/14 h de oscuridad) para promover la floración y, a continuación, de vuelta a día largo hasta la recogida.

**[0145]** La generación de plantas T1 se analizaron obteniendo 5 eventos transgénicos por construcción y aproximadamente 16 plantas por evento. Se usaron las pruebas de la fosfomanosa isomerasa (PMI) para realizar el genotipado para detectar el marcador PMI seleccionable (Negrotto D, y col., Plant Cell Reports, 2000, 19: 798-803; Reed J, y col., In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 2001, 37: 127-132; Wright M, y col., Plant Cell Reports, 2001, 20: 429-436). Brevemente, las muestras de hojas se molieron en 300 μl de tampón de muestra TraitCheck (Strategic Diagnostics Inc., Delaware, EE. UU.) y se colocaron en un tubo eppendorf. Se insertó una tira reactiva SeedCheck PMI (Strategic Diagnostics Inc. Part, Delaware, EE. UU.) en el tubo de eppendorf durante aproximadamente 15 minutos, tiempo durante el cual las líneas marcadoras de la tira reactiva se aclararon. La aparición de una línea roja (control) en la tira indica un resultado negativo. La aparición de dos líneas rojas (control y problema) en la tira indica un resultado positivo. Los datos de las plantas PMI positivas se promediaron para compararlos con los datos de plantas PMI negativas, así como con las plantas control de tipo silvestre.

**[0146]** El análisis del fenotipo de las plantas de la generación T1 supuso evaluar el UEN. El UEN puede dividirse en dos partes, siendo una la asimilación eficiente que se produce principalmente en la fase vegetativa; mientras que la otra es la utilización eficiente que supone principalmente el reciclaje del nitrógeno en la fase reproductiva (Good AG, y col., Trends Plant Sci., 2004, 9: 597-605). Para el análisis de las plantas en la fase vegetativa, estas se crecieron con concentración baja de nitrógeno (nitrato 1 mM) durante 4 semanas para examinar la tasa de crecimiento, la biomasa de brotes y raíces de las líneas transgénicas y las plantas control de tipo silvestre. Para el análisis de las plantas en la fase reproductiva, estas se crecieron con concentración baja-media de nitrógeno (nitrato 3 mM) hasta el final de la fase reproductiva para evaluar el número de hijuelos y panículas, la biomasa de los brotes y el rendimiento de semillas. Las construcciones con al menos dos eventos a partir de la generación T1 que mostraban una mejora en el fenotipo UEN se seleccionaron para un análisis adicional en la generación T2. Aproximadamente el 6% de estas construcciones se seleccionaron para análisis adicionales a partir de cada tipo de la selección; sin ningún solapamiento. De estos, aproximadamente el 50% mostraron el mismo fenotipo en la generación T2 como habían mostrado en la generación T1.

**45 Ejemplo 10. Arroz transgénico que sobreexpresa un gen de nodulina precoz (LOC\_Os06g05010), mayor número de panículas mostradas, biomasa seca de los brotes y rendimiento de semillas en condiciones limitantes de nitrógeno**

**[0147]** Se generó una planta de arroz transgénica que sobreexpresa un gen de nodulina precoz (LOC\_Os06g05010) y se seleccionó como se establece en el ejemplo 9. El gen de nodulina precoz respondía a la inducción de nitrógeno o a la reducción de nitrógeno en un experimento de perfil de expresión en micromatrices, como se describe en el ejemplo 7 (fig. 4a). Los cinco eventos de la generación T1 de este arroz transgénico mostraron un rendimiento de semillas mayor en plantas PMI positivas en comparación con las plantas PMI negativas. Se analizó en cuatro líneas de la generación T2 (a partir de dos eventos diferentes) el UEN tanto en la fase vegetativa como en la reproductiva cultivadas en las condiciones descritas en el ejemplo 9 (se analizaron un total de 10 plantas para cada línea de la generación T2 y los resultados presentados son los valores medios de días tras la siembra). Las plantas transgénicas de arroz no mostraron diferencias significativas en la fase vegetativa en comparación con las plantas de arroz de tipo silvestre. Parecía que las plantas transgénicas crecían ligeramente más despacio que las plantas de tipo silvestre 21 días después de la siembra, pero parecía que crecían más

rápidamente a los 35 días y tenían un número de hojas y de retoños ligeramente superior que las plantas de tipo silvestre 42 días después de la siembra (tabla 2). Al final de la fase reproductiva, las plantas transgénicas tenían un número similar de retoños, pero con un aumento de la biomasa seca de los brotes, aumento del número de espigas y espiguillas, y un aumento en el rendimiento de semillas en comparación con el tipo silvestre (tabla 3). Estas plantas 5 progenie se sometieron a una prueba de generación T3 en condiciones tanto de concentración limitante de nitrógeno (3 mM) como de concentración alta de nitrógeno (10 mM). Se observó la misma tendencia para estas plantas T3, ya que las plantas transgénicas presentaron un aumento de la biomasa seca de los brotes, del número de espigas y espiguillas y del rendimiento de semillas en comparación con el tipo silvestre, no solo a la concentración limitante de nitrógeno sino también a la concentración alta de nitrógeno (tabla 4) (los datos representan la media  $\pm$  DT (n = 10 10 plantas)).

Tabla 2

	Número de hojas				Número de retoños			
	21 días	28 días	35 días	42 días	21 días	28 días	35 días	42 días
OX-02N.º3	15,8	20	24,8	26,8	3	4,5	5,3	6
OX-02N.º15	12,7	17,5	23,2	25,6	4	4	5	5,5
OX-03N.º2	13,5	19	23,2	26,4	3,2	4,2	5,4	5,8
OX-03N.º3	13	19,5	22,4	25,5	3,1	4,3	5,4	5,7
Tipo silvestre	16	20	22,2	25,3	3,5	4,5	5,2	5,4

15

Tabla 3

	Retoños totales	Peso seco de brotes (g)	Espigas	Espiguillas	Rendimiento de semillas (g)
OX-02N.º3	6,8	9,9	5	510	8,9
OX-02N.º15	7	9,9	4,7	502	8,6
OX-03N.º2	6,9	10	5	484	8,8
OX-03N.º3	7	10,1	4,9	476	8,7
Tipo silvestre	6,9	9,1	4	403	7,9

Tabla 4

	Retoños totales	Peso seco de brotes (g)	Espigas	Espiguillas	Rendimiento de semillas (g)
<b>Nitrato 3 mM</b>					
OX-1	5,5 $\pm$ 0,4	5,1 $\pm$ 0,6	3,2 $\pm$ 0,2	203 $\pm$ 23	3,8 $\pm$ 0,4
OX-2	5,5 $\pm$ 0,4	5,1 $\pm$ 0,6	3,1 $\pm$ 0,3	197 $\pm$ 18	3,7 $\pm$ 0,3
Tipo silvestre	5,2 $\pm$ 0,5	4,4 $\pm$ 0,4	2,7 $\pm$ 0,2	173 $\pm$ 18	3,1 $\pm$ 0,4
<b>Nitrato 10 mM</b>					
OX-1	7,0 $\pm$ 0,6	10 $\pm$ 0,9	4,8 $\pm$ 0,4	465 $\pm$ 41	8,7 $\pm$ 0,9
OX-2	6,9 $\pm$ 0,5	9,8 $\pm$ 1,0	4,9 $\pm$ 0,5	475 $\pm$ 44	8,8 $\pm$ 0,8
Tipo silvestre	6,7 $\pm$ 0,6	8,9 $\pm$ 1,1	4,1 $\pm$ 0,5	395 $\pm$ 32	7,7 $\pm$ 0,8

20

**Ejemplo 11. El gen de nodulina precoz (LOC\_Os06g05010) (*Osenod93*) codifica una proteína que se expresa en raíces a un nivel más alto que en los brotes y responde a la concentración de nitrógeno**

**[0148]** El gen de nodulina precoz (LOC-Os06g05010) así como otros genes que muestran similitud de 25 secuencia en arroz se han denominado nodulina precoz 93 de expresión putativa (anotación del genoma del arroz en la base de datos TIGR). En el genoma del arroz existen 5 genes nodulina precoz 93 más localizados en la misma región, con un peso molecular y pl similares y se prevé que todos ellos estén localizados en la mitocondria excepto *Os06g04940* (tabla 5). Este gen de nodulina precoz (LOC\_Os06g05010) (*OsENOD93*) consta de tres exones y dos intrones y codifica una proteína de 116 aminoácidos (figuras 6C, 6D y 6E) con un peso molecular de 12.424 Da y un 30 pl de 10,95 (Tabla 5). La expresión de este gen de nodulina precoz en diferentes partes de la planta en las diferentes fases de crecimiento se determinó como se describe en el ejemplo 7. El perfil de expresión en diferentes partes de la planta en las diversas fases de crecimiento muestra que este gen de nodulina precoz se expresa a alto nivel en raíces, especialmente en la fase de aparición de panículas (figura 4B). También, el nivel de expresión de este gen de nodulina precoz en las raíces de plantas de tipo silvestre de 4 semanas era 50 veces superior al

observado en los brotes (figura 4C). Las plantas transgénicas que sobreexpresaban de forma constitutiva este gen de nodulina precoz tenían niveles de transcritos varias veces superiores a las plantas de tipo silvestre, con niveles de transcritos prácticamente similares en brotes y raíces (figura 4D). Las plantas cultivadas a concentraciones más altas de nitrógeno mostraron un aumento de la expresión de este gen de nodulina precoz en comparación con las plantas cultivadas a concentraciones más bajas de nitrógeno (figuras 4C y 4D).

**[0149]** La expresión del gen de nodulina precoz a diferentes concentraciones de nitrógeno se examinó a 30 y 60 días después de la siembra mediante PCR cuantitativa en tiempo real como se describe en el ejemplo 7, normalizándose la expresión génica para cada tratamiento de nitrato con respecto a los brotes de tipo silvestre cultivados en nitrato 1 mM, 30 días después de la siembra. Los resultados muestran que el gen de nodulina precoz en plantas de tipo silvestre se expresa en la raíz a niveles más altos que en otras partes de la planta y que tanto en plantas de tipo silvestre como transgénicas, el nivel de expresión del gen de nodulina precoz aumenta con el aumento de la concentración de nitrógeno (tabla 6). Aunque las plantas transgénicas presentaban un alto nivel de expresión en las hojas, el estado de N en los brotes era similar entre las plantas de tipo silvestre y transgénicas (datos no mostrados), lo que sugería que probablemente son necesarios otros ligandos en los brotes para completar la función de OsENOD93.

Tabla 5

Gen	Similitud con proteína	Aminoácidos	Masa molecular	pl	Localización <sup>a</sup>	Dominio ENOD93 <sup>b</sup>
Os06g05010	ENOD93	116	12.424	10,95	Mitocondria	12....90
Os06g04990	ENOD93	115	12.307	10,95	Mitocondria	11....89
Os06g05020	ENOD93	115	12.277	10,95	Mitocondria	11....89
Os06g04950	ENOD93	115	12.233	10,29	Mitocondria	11....89
Os06g05000	ENOD93	115	12.167	10,35	Mitocondria	11....89
Os06g04940	ENOD93	139	14.897	9,98	Cloroplasto	3....113

<sup>a</sup>PSORT (Horton y col., *Nucleic Acids Res.*, 2007, 35:W585-W587)/TargetP1.1 (Emanuelsson y col., *J. Mol. Biol.*, 2000, 300:1005-16).

<sup>b</sup>Pfam 22.0 (Finn y col., *Nucleic Acids Res.*, 2008, Database Issue 36:D281-D288).

20

Tabla 6

	30 días después de la siembra			60 días después de la siembra			
	Hoja	Raíz	Inflorescencia	Hoja bandera	Hoja	Tallo	Raíz
<b>Nitrato 1 mM</b>							
TS	1	50	5,7	3,8	1,6	8,2	105
OX <sup>a</sup>	2.050	1.245	292	2.496	3.674	395	2.648
<b>Nitrato 3 mM</b>							
TS	1,5	92	9,5	6,3	2,7	15,6	218
OX <sup>a</sup>	3.640	2.217	368	4.125	5.163	504	3.441
<b>Nitrato 10 mM</b>							
TS	2,8	145	21	9,7	3,9	34,4	342
OX <sup>a</sup>	5.100	3.142	456	6.184	6.842	595	4.217

<sup>a</sup>planta transgénica que sobreexpresa el gen de nodulina precoz

**Ejemplo 12. Las raíces de plantas transgénicas que sobreexpresan el gen de nodulina precoz (LOC\_Os06g05010) presentan un aumento del contenido de aminoácidos y de nitrógeno total**

**[0150]** Se cultivaron plantas transgénicas que sobreexpresaban el gen de nodulina precoz (LOC\_Os06g05010) (*OsENOD93*) como se describe en el ejemplo 9 y se determinó el contenido de aminoácidos y el contenido total de nitrógeno de las raíces y brotes como se describe en los ejemplos 4 y 6. Las raíces de plantas transgénicas que sobreexpresaban el gen de nodulina precoz (LOC\_Os06g05010) (*OsENOD93*) presentaban un contenido de aminoácidos totales (figura 5A) y de nitrógeno total (figura 5B) mayor que las plantas de tipo silvestre, específicamente cuando el nitrógeno era limitante. Los contenidos de aminoácidos y nitrógeno en los brotes eran similares entre plantas silvestres y transgénicas. El contenido de nitrato tanto en brotes como en raíces era similar en plantas transgénicas y de tipo silvestre.

**Ejemplo 13. El aumento en el contenido de aminoácidos totales y de nitrógeno total observado a los 30 días después de la siembra (DDS) era más pronunciado a los 60 DDS**

5 **[0151]** Se cultivaron plantas transgénicas que sobreexpresaban el gen de nodulina precoz (LOC\_Os06g05010) (*OsENOD93*) como se describe en el ejemplo 9 y se determinó el contenido de aminoácidos totales y el contenido de nitrógeno total de las raíces como se describe en los ejemplos 4 y 6. Las raíces de plantas transgénicas que sobreexpresaban el gen de nodulina precoz (LOC\_Os06g05010) (*OsENOD93*) presentaban un contenido de aminoácidos totales (figura 5C) y de nitrógeno total (figura 5B) mayor que las plantas de tipo silvestre, específicamente cuando el nitrógeno era limitante. Este contenido de aminoácidos totales y de nitrógeno total más alto era más pronunciado a los 60 DDS (figuras 5C y 5D) que a los 30 DDS (figuras 5A y 5B).

15 **Ejemplo 14. Las plantas de arroz transgénicas que sobreexpresaban el gen *OsENOD93* mostraron un aumento en el contenido de aminoácidos en las raíces y la sabia del xilema en condiciones limitantes de nitrógeno**

20 **[0152]** Se generaron plantas transgénicas de arroz y se seleccionaron a través de transformación mediada por *Agrobacterium* como se describe en el ejemplo 9. Debido a que la expresión de *OsENOD93* era alta, y la acumulación de aminoácidos era mayor en las raíces transgénicas, se determinó el contenido de aminoácidos en la sabia del xilema. La sabia del xilema se obtuvo según Shi, y col. (Shi y col., *The Plant Cell*, 2002, 14: 465-477. Dicha sabia se diluyó con agua destilada y los aminoácidos totales se analizaron según Rosen (Rosen, *Biochemistry and Biophysics*, 1957, 67: 10-15). Se determinó que las plantas transgénicas que sobreexpresaban el gen *OsENOD93* presentaban un contenido de aminoácidos totales aproximadamente el 15% superior en la sabia del xilema en comparación con el tipo silvestre, específicamente cuando el nitrógeno era limitante. (Véase la figura 7).

25 **Ejemplo 15. El gen de nodulina precoz (*OsENOD93*) codifica un transcripto que se expresa en haces vasculares, epidermis y endodermis**

30 **[0153]** Para caracterizar adicionalmente la expresión de *OsENOD93*, se analizó la abundancia de su transcripto mediante hibridación *in situ*. Para los análisis de hibridación *in situ*, se obtuvieron muestras a partir de raíces de arroz de tipo silvestre de 4 semanas. Estas muestras se cortaron en secciones de 0,5 a 1,0 cm y se fijaron en formaldehído al 4%. A continuación, los tejidos se deshidrataron e incluyeron en parafina. Los cortes de tejido de 8 micras de espesor se obtuvieron usando un microtomo y se montaron sobre portas para microscopio recubiertos de polilisina (Biolabs). Tras el tratamiento con xileno para eliminar la parafina, los cortes se trataron durante treinta minutos con proteinasa K (10 microgramos/mililitro). La hibridación *in situ* se realizó como se describió previamente (Komminoth, *Diagnostic Molecular Pathology*, 1992, 1: 142-150), usando sondas de ARN sentido y complementarias específicas de *OsENOD93* marcadas con digoxigenina (Roche Diagnostics, Penzenberg, Alemania). Los cortes se fotografiaron usando un microscopio DMIR2 (Leica, Alemania) y una cámara DC500 (Leica, Alemania). La expresión, determinada mediante la presencia de transcriptos, se detectó en los haces vasculares, la epidermis y la endodermis. El patrón de expresión de *OsENOD93* sugiere su participación en el transporte de compuestos, incluso de las raíces a los brotes.

45 **Ejemplo 16. La generación y selección de cebollas transgénicas que expresan la proteína *OsENOD* demuestra que *OsENOD93* se localiza conjuntamente con una conocida proteína marcador mitocondrial**

50 **[0154]** Para entender mejor la localización subcelular de la proteína *OsENOD93*, se amplificó mediante PCR un polinucleótido que codifica *OsENOD93* y se clonó en un vector pEarlyGate 101 compatible con la tecnología Gateway con el gen indicador de la proteína fluorescente amarilla (YFP, por sus siglas en inglés) C-terminal (Earley, y col., *The Plant Journal*, 2006, 45: 616-629). Las construcciones de la proteína de fusión *OsENOD93*-YFP y el control  $\beta$ -ATPasa-RFP (N.º de acceso a Genbank: P17614) se transformaron mediante biobalística en células epidérmicas de cebolla. Las imágenes de las células que contenían proteína fluorescente se obtuvieron veinte horas después del bombardeo mediante un microscopio de epifluorescencia. Después de un periodo de tiempo suficiente para la expresión génica y la clasificación de las células, las imágenes obtenidas confirmaron una localización conjunta clara de *OsENOD93* con  $\beta$ -ATPasa-RFP, una conocida proteína marcador mitocondrial. Las localizaciones 55 conjuntas de las proteínas, si se producían, aparecían como una señal naranja debido al solapamiento de los dos fluoróforos (rojo y verde) en la misma célula. Como se muestra en la tabla 5, el genoma del arroz contiene cinco de estos genes *ENOD93* localizados en la misma región del cromosoma. Estos genes *ENOD93* del arroz tienen pesos moleculares similares, pl similares, se prevé que contienen dos dominios transmembrana así como que estén localizados en la membrana mitocondrial.

LISTADO DE SECUENCIAS

**[0155]**

- 5 <110> UNIVERSIDAD DE GUELPH  
 SYNGENTA PARTICIPATIONS AG  
 Bi, Yong-Mei  
 Rothstein, Steven  
 10 Kant, Surya  
 Clarke, Joseph  
 <120> GEN DE NODULINA PRECOZ SENSIBLE A NITRÓGENO  
 15 <130> 072377-0382384  
 <160> 3  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 20 <210> 1  
 <211> 575  
 <212> ADN  
 <213> *Oryza sativa* var. Japonica cv. Donjin  
 25 <400> 1

<b>atgtcgacga cggtgaccg tgctcacctg gagcagagggc tcgccctcgc caagcgtg</b>	<b>60</b>
<b>tcccggggta cgtacgcacg cacactaaac caccatgttt aatctcgctt tgtcttgc</b>	<b>120</b>
<b>tccatggcgc taataactga atatatacaa actgatgtat gcttcgtcga tctgcagagg</b>	<b>180</b>
<b>cgaaccttgc aggggttaag gcggtgctg tcgcgaccat cgcctctgcc gttccaaccg</b>	<b>240</b>
<b>tgagtgtgct cagatgctac tagcttcttc taattcctcc ttgtgttgat tcttcagcag</b>	<b>300</b>
<b>agagtaggtg tactaactta ttagctgcat atgtgtgttg tttcatcgat cagctggcga</b>	<b>360</b>
<b>gcgtgaggat gctgccatgg gcgaaggcca acatcaacc cgcggggcag gcgctgatca</b>	<b>420</b>
<b>tctgcacggc ggccgggatg gcataacttcg tcgccgccga caagaagatc ctctcgetgg</b>	<b>480</b>
<b>ccaggaggca ctcttcgag aacgcacctg aacacctcaa gaacacctcc ttccagggca</b>	<b>540</b>
<b>ccggccgcc tcacctgcc ttcttcagggc catga</b>	<b>575</b>

- 30 <210> 2  
 <211> 351  
 <212> ADN  
 <213> *Oryza sativa* var. Japonica cv. Donjin  
 35 <400> 2

atgtcgacga cggtgaccog tgctcacctg gagcagaggc tcgccctcgc caagcgctgc 60  
 tccccgggagg cgaacottgc aggggttaag gcggtgctg tcgcgaccat cgcctctgcc 120  
 gttccaaccc tggcgagcgt gaggatgctg ccatgggcga aggccaacat caacccgacg 180  
 gggcagggcg tgatcatctg cacggcggcc gggatggcat acttcgtcgc cgccgacaag 240  
 aagatcctct cgctggccag gaggcactcc ttcgagaacg cacctgaaca cctcaagaac 300  
 acctccttcc agggcaccgg ccgccctcac cctgccttct tcaggccatg a 351

<210> 3

<211> 116

5 <212> PROT

<213> *Oryza sativa* var. Japonica cv. Donjin

<400> 3

Met Ser Thr Thr Val Thr Arg Ala His Leu Glu Gln Arg Leu Ala Leu  
 1 5 10 15

Ala Lys Arg Cys Ser Arg Glu Ala Asn Leu Ala Gly Val Lys Ala Ala  
 20 25 30

Ala Val Ala Thr Ile Ala Ser Ala Val Pro Thr Leu Ala Ser Val Arg  
 35 40 45

Met Leu Pro Trp Ala Lys Ala Asn Ile Asn Pro Thr Gly Gln Ala Leu  
 50 55 60

Ile Ile Cys Thr Ala Ala Gly Met Ala Tyr Phe Val Ala Ala Asp Lys  
 65 70 75 80

Lys Ile Leu Ser Leu Ala Arg Arg His Ser Phe Glu Asn Ala Pro Glu  
 85 90 95

His Leu Lys Asn Thr Ser Phe Gln Gly Thr Gly Arg Pro His Pro Ala  
 100 105 110

Phe Phe Arg Pro  
 115

10

**REIVINDICACIONES**

1. Una planta transgénica, una semilla de planta transgénica o una célula vegetal transgénica que comprenden un ácido nucleico recombinante que codifica una proteína OsENOD93 funcional, en el que el ácido nucleico recombinante comprende:
- 5
- a) una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO: 1;
  - b) un ácido nucleico que hibrida específicamente con la secuencia complementaria de SEQ ID NO: 1 en condiciones de hibridación rigurosas;
  - 10
  - c) una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO: 2;
  - d) un ácido nucleico que hibrida específicamente con la secuencia complementaria de SEQ ID NO: 2 en condiciones de hibridación rigurosas o
  - 15
  - e) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteínas OsENOD93 que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 3.
- 20 2. La planta transgénica, semilla de planta transgénica o célula vegetal transgénica de la reivindicación 1, en la que la planta transgénica, semilla de planta transgénica o célula vegetal transgénica es una monocotiledónea.
3. La planta transgénica, semilla de planta transgénica o célula vegetal transgénica de la reivindicación 2, en la que la planta transgénica, semilla de planta transgénica o célula vegetal transgénica es maíz.
- 25 4. La planta transgénica, semilla de planta transgénica o célula vegetal transgénica de la reivindicación 2, en la que la planta transgénica, semilla de planta transgénica o célula vegetal transgénica es arroz.
5. La planta transgénica, semilla de planta transgénica o célula vegetal transgénica de la reivindicación 1, en la que la planta transgénica, semilla de planta transgénica o célula vegetal transgénica es una dicotiledónea.
- 30 6. Un procedimiento para producir una célula vegetal transgénica, que comprende:
- introducir un ácido nucleico recombinante que codifica una proteína OsENOD93 funcional en una célula vegetal para producir una célula de una planta transgénica, en el que el ácido nucleico recombinante comprende:
- 35
- a) una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO: 1;
  - b) un ácido nucleico que hibrida específicamente con la secuencia complementaria de SEQ ID NO: 1 en condiciones de hibridación rigurosas;
  - 40
  - c) una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO: 2;
  - d) un ácido nucleico que hibrida específicamente con la secuencia complementaria de SEQ ID NO: 2 en condiciones de hibridación rigurosas o
  - 45
  - e) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteínas OsENOD93 que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 3.
- 50 7. Un procedimiento para producir una planta transgénica, que comprende:
- producir una célula vegetal transgénica según el procedimiento de la reivindicación 6, y regenerar la planta transgénica a partir de la célula vegetal transgénica.
- 55 8. Un procedimiento para aumentar o mejorar el uso eficiente del nitrógeno, los niveles de nitrato, el crecimiento lateral de las raíces, el rendimiento de semillas, la tolerancia al estrés, los niveles de aminoácidos y/o biomasa en una planta transgénica, una semilla de planta transgénica o una célula vegetal transgénica, que comprende:

expresar en la planta transgénica, semilla de planta transgénica o célula vegetal transgénica un ácido nucleico recombinante que codifica una proteína OsENOD93 funcional, en el que el ácido nucleico recombinante comprende:

- 5 a) una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO: 1;
- b) un ácido nucleico que hibrida específicamente con la secuencia complementaria de SEQ ID NO: 1 en condiciones de hibridación rigurosas;
- 10 c) una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO: 2;
- d) un ácido nucleico que hibrida específicamente con la secuencia complementaria de SEQ ID NO: 2 en condiciones de hibridación rigurosas o
- 15 e) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteínas OsENOD93 que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 3.
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el ácido nucleico recombinante se expresa de forma constitutiva en la planta transgénica, semilla de la planta transgénica o célula de la planta transgénica.
- 20 10. El procedimiento de la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en el que la planta transgénica, la semilla de planta transgénica o la célula de la planta transgénica muestra un aumento del rendimiento de semillas, de los niveles de aminoácidos o/y de la biomasa.
- 25 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la planta transgénica, la semilla de planta transgénica o la célula vegetal transgénica muestra un aumento del uso eficiente del nitrógeno.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en el que la planta transgénica, la semilla de planta transgénica o la célula vegetal transgénica es una monocotiledónea.
- 30 13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la planta transgénica, la semilla de planta transgénica o la célula vegetal transgénica es maíz.
14. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la planta transgénica, la semilla de planta transgénica o la célula vegetal transgénica es arroz.
- 35 15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en el que la planta transgénica, la semilla de planta transgénica o la célula vegetal transgénica es una dicotiledónea.

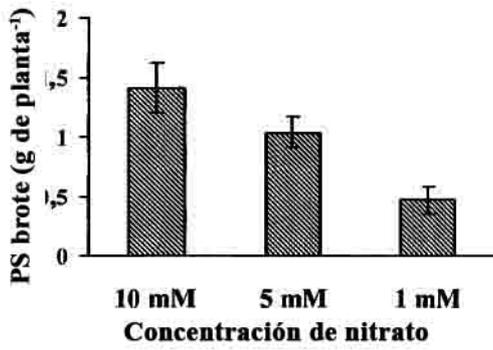


FIG. 1A

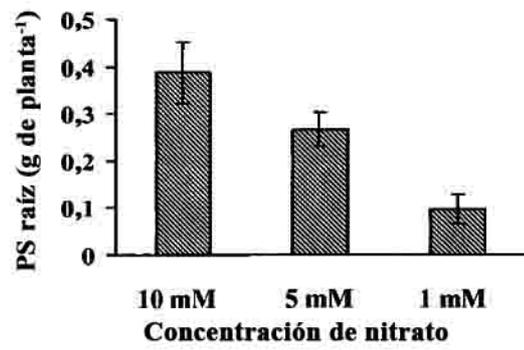


FIG. 1B

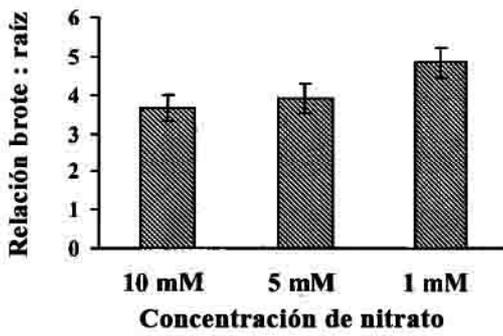


FIG. 1C

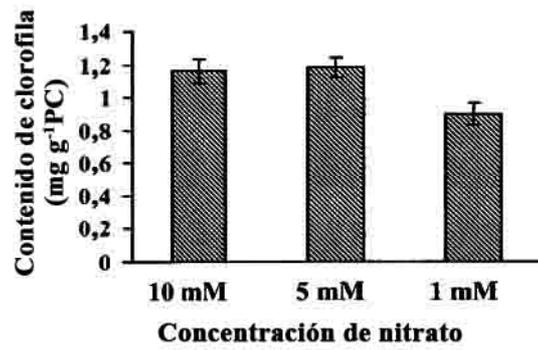


FIG. 1D

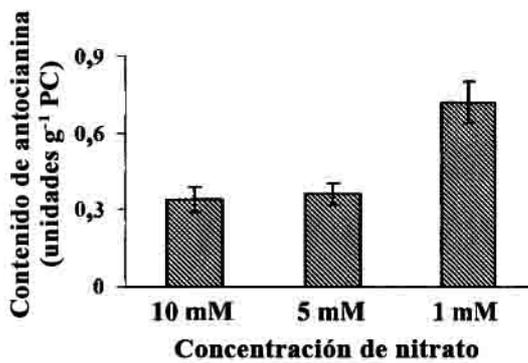


FIG. 1E

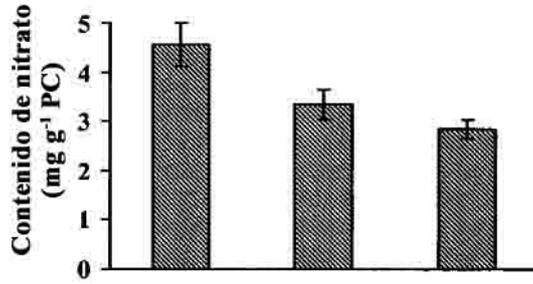


FIG. 2A

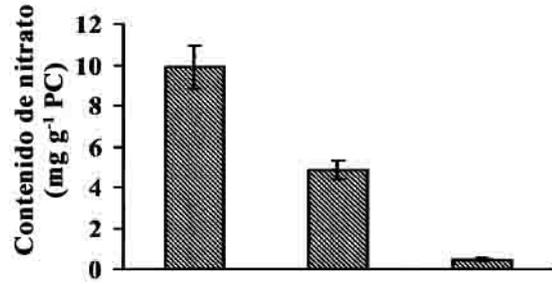


FIG. 2B

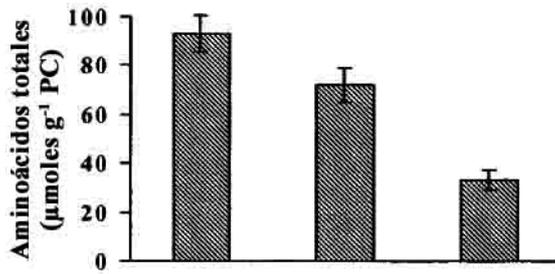


FIG. 2C

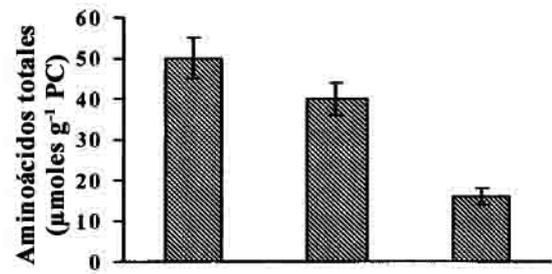


FIG. 2D

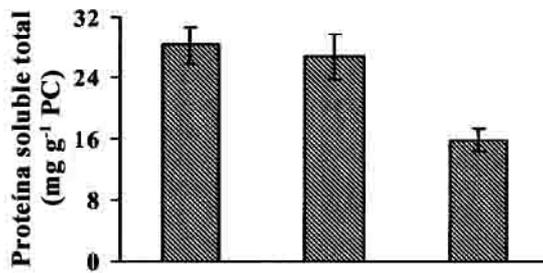


FIG. 2E

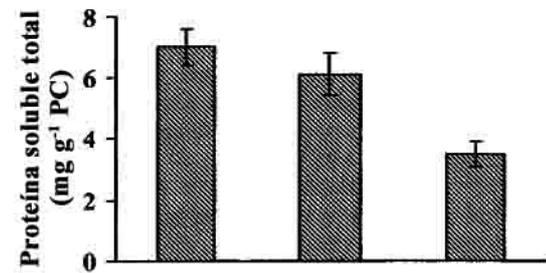


FIG. 2F

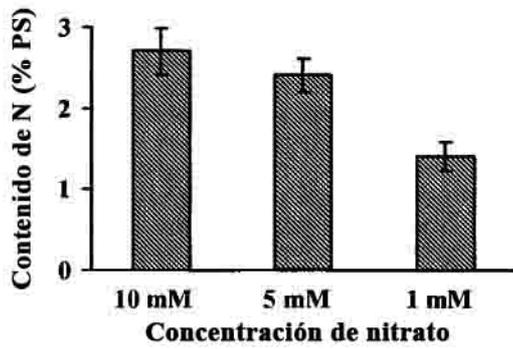


FIG. 2G

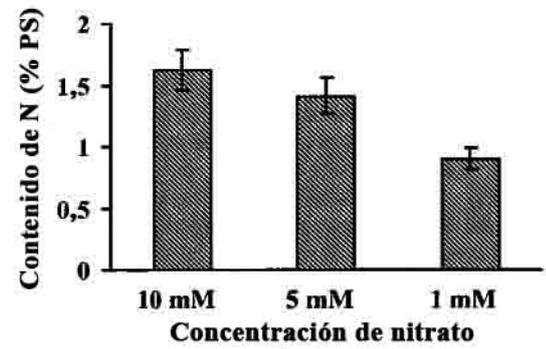
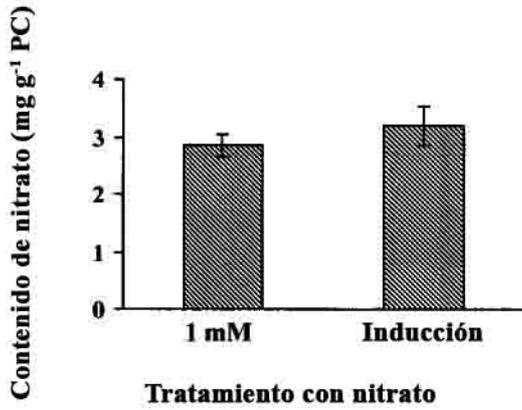
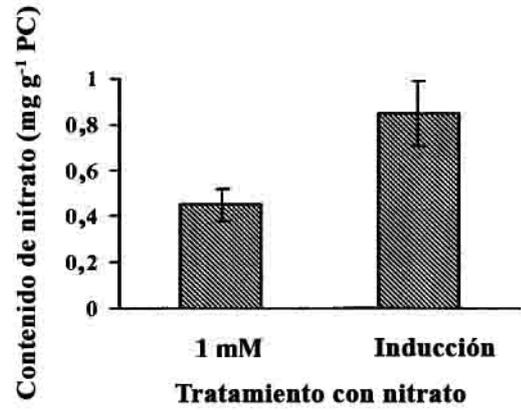


FIG. 2H



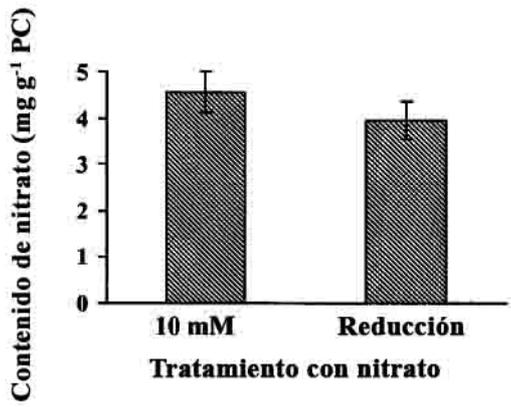
Tratamiento con nitrato

FIG. 3A



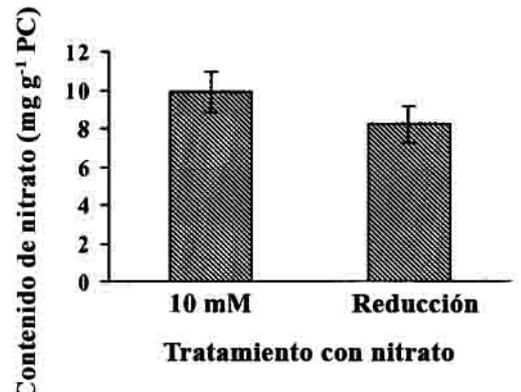
Tratamiento con nitrato

FIG. 3B



Tratamiento con nitrato

FIG. 3C



Tratamiento con nitrato

FIG. 3D

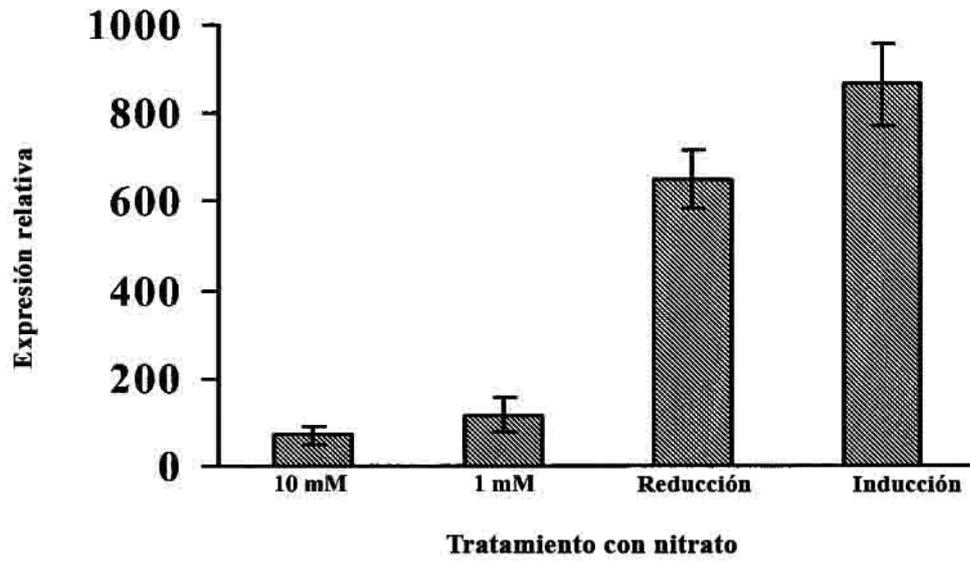


FIG. 4A

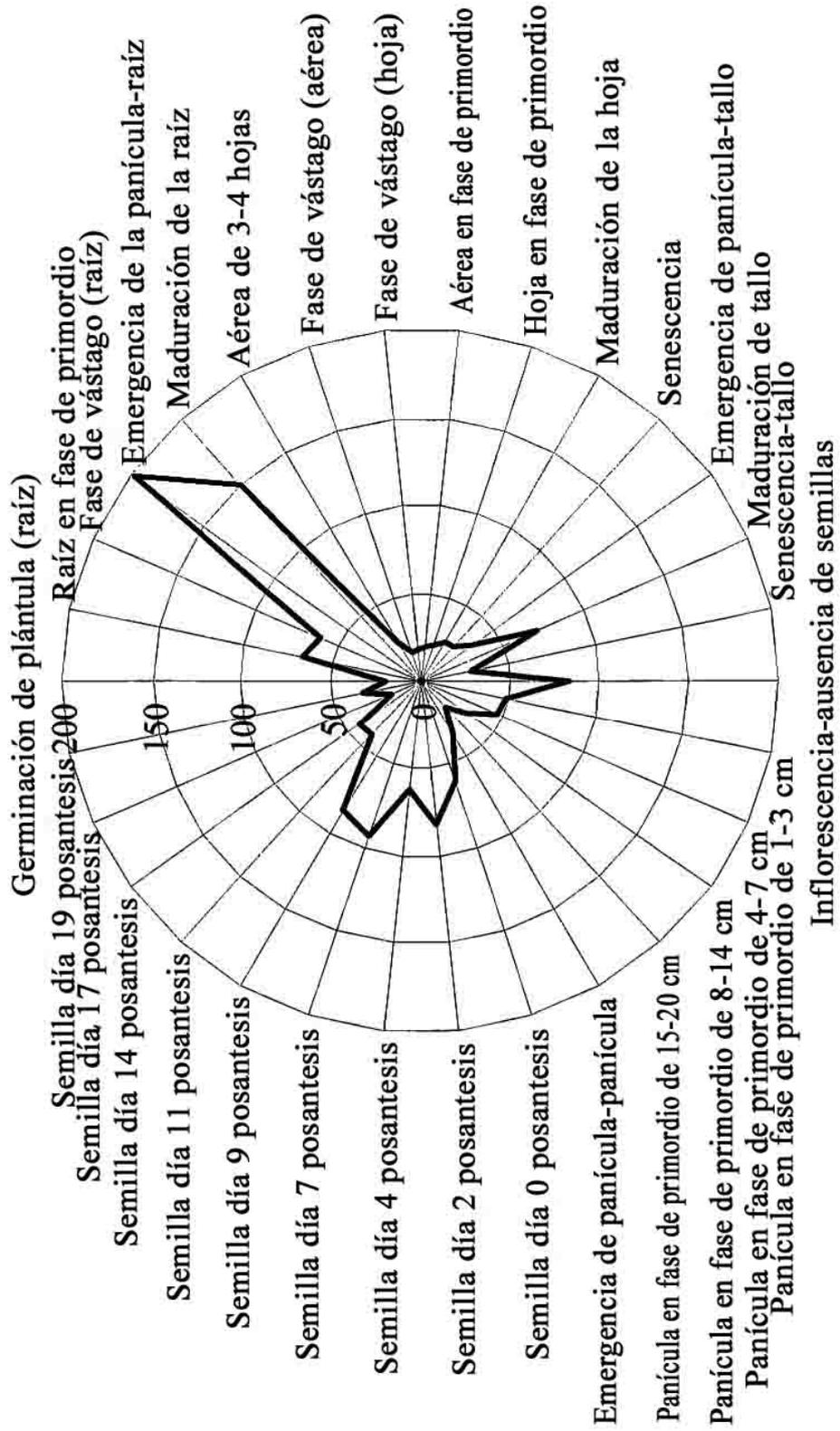
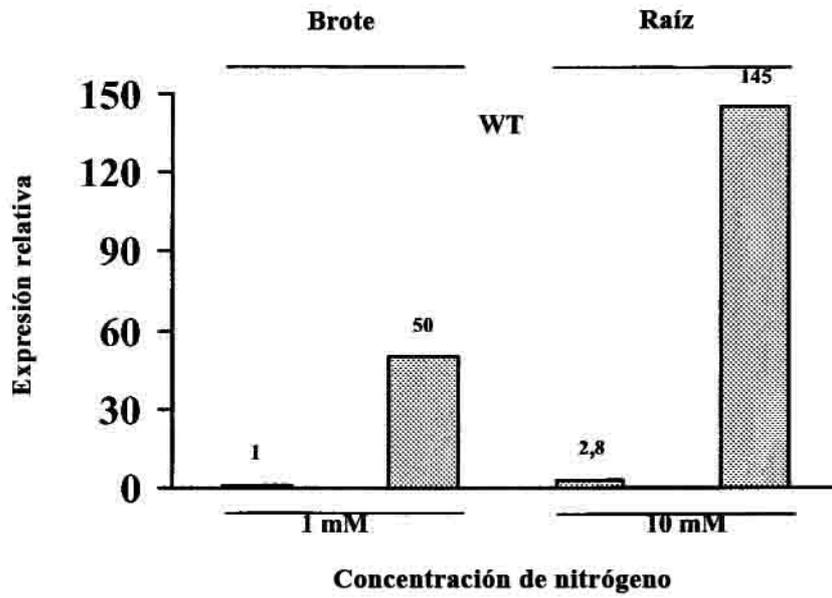
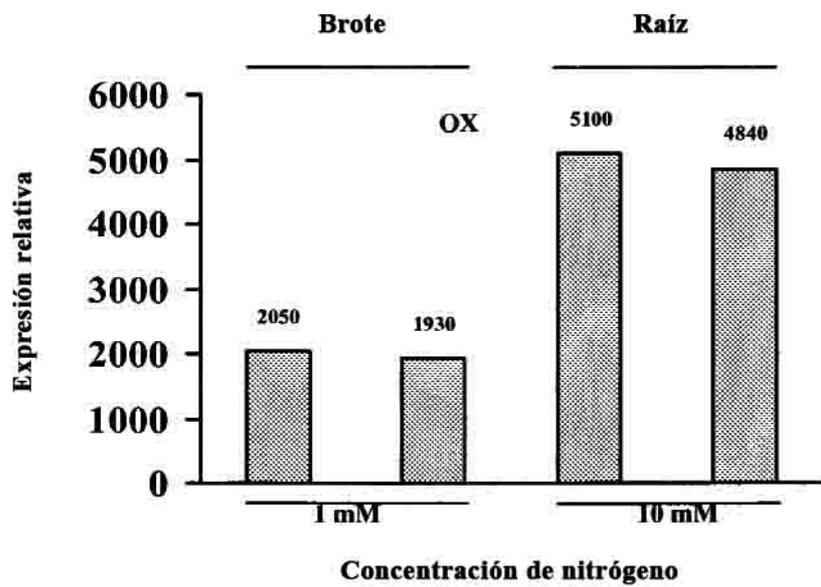


FIG. 4B



**FIG. 4C**



**FIG. 4D**

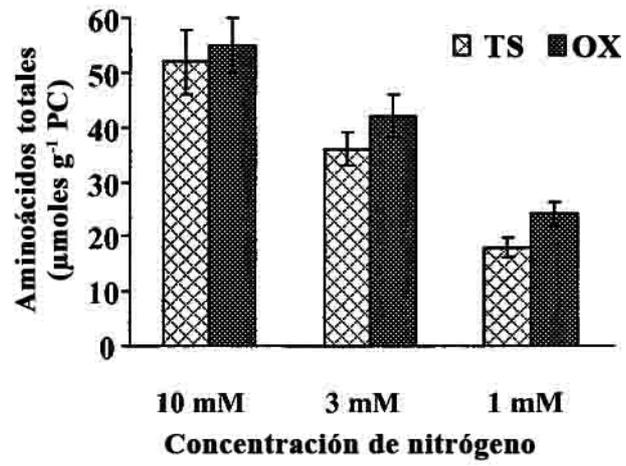


FIG. 5A

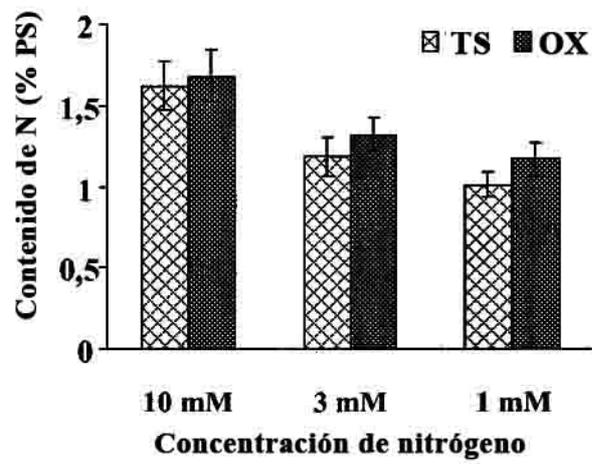


FIG. 5B

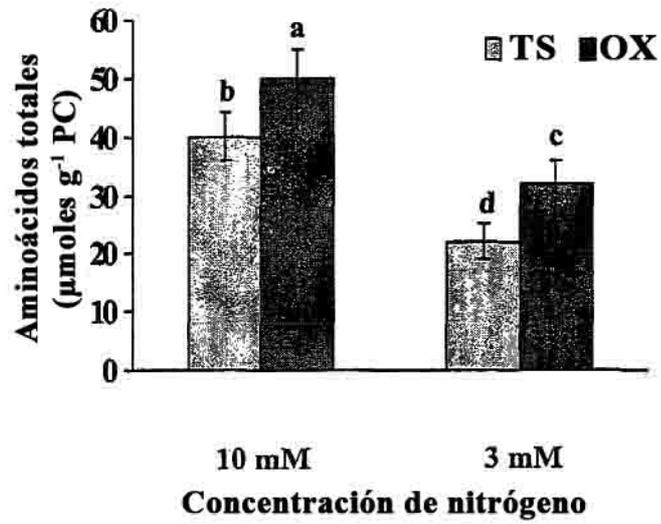


FIG. 5C

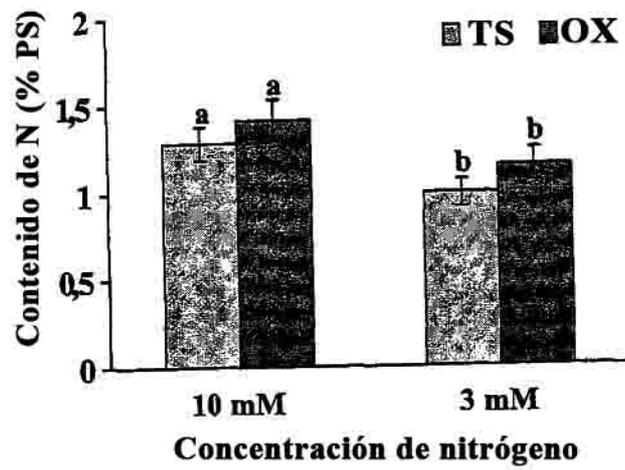


FIG. 5D

atgtcgacga cggtgaccog tgctcacctg gagcagagggc tcgccctcgc caagcgctgc 60  
 tcccggggta cgtacgcacg cacactaaac caccatgttt aatctcgttt tgtcttgcac 120  
 tccatggcgc taataactga atatatacaa actgatgtat gcttcgtcga tctgcagagg 180  
 cgaacottgc aggggttaag gcggctgctg tcgcgaccat cgcctctgcc gttccaaccg 240  
 tgagtgtgct cagatgctac tagcttcttc taattcctcc ttgtgttgat tcttcagcag 300  
 agagtaggtg tactaactta ttagctgcat atgtgtgttg tttcatcgat cagctggcga 360  
 gcgtgaggat gctgccatgg gcgaaggcca acatcaaccg gacggggcag gcgctgatca 420  
 tctgcacggc ggccgggatg gcatacttcg tcgccgccga caagaagatc ctctcgtcgg 480  
 ccaggaggca ctcttcgag aacgcacctg aacacctcaa gaacacctcc ttccagggca 540  
 ccggccgcc taccctgcc ttcttcaggc catga 575

**FIG. 6A**

atgtcgacga cggtgaccog tgctcacctg gagcagagggc tcgccctcgc caagcgctgc 60  
 tcccggggagg cgaacottgc aggggttaag gcggctgctg tcgcgaccat cgcctctgcc 120  
 gttccaaccg tggcgagcgt gaggatgctg ccatggggcga aggccaacat caaccgcagc 180  
 gggcaggcgc tgatcatctg cacggcggcc gggatggcat acttcgtcgc cgccgacaag 240  
 aagatcctct cgctggccag gaggcactcc ttcgagaacg cacctgaaca cctcaagaac 300  
 acctcctcc agggcaccgg ccgcctcac cctgccttct tcaggccatg a 351

**FIG. 6B**

Met Ser Thr Thr Val Thr Arg Ala His Leu Glu Gln Arg Leu Ala Leu  
 1 5 10 15

Ala Lys Arg Cys Ser Arg Glu Ala Asn Leu Ala Gly Val Lys Ala Ala  
 20 25 30

Ala Val Ala Thr Ile Ala Ser Ala Val Pro Thr Leu Ala Ser Val Arg  
 35 40 45

Met Leu Pro Trp Ala Lys Ala Asn Ile Asn Pro Thr Gly Gln Ala Leu  
 50 55 60

Ile Ile Cys Thr Ala Ala Gly Met Ala Tyr Phe Val Ala Ala Asp Lys  
 65 70 75 80

Lys Ile Leu Ser Leu Ala Arg Arg His Ser Phe Glu Asn Ala Pro Glu  
 85 90 95

His Leu Lys Asn Thr Ser Phe Gln Gly Thr Gly Arg Pro His Pro Ala  
 100 105 110

Phe Phe Arg Pro  
 115

**FIG. 6C**

ATCTCATCTCATCTCGCTCAGCACTACTGATCCAACCAGTAGGCGATTCTCTCC  
ACCTCCCAGCTACTTCACTTCAGGACTAGTTTCTTCTCAGCTCCATCGATCTTG  
CTCGACAATGTCGACGACGGTGACCCGTGCTCACCTGGAGCAGAGGGCTCGCCC  
TGCCAAGCGCTGCTCCCGGGTACGTACGCACGCACACTAAACCACCATGTT  
TAATCTCGCTTTGCTTTCATTCCATGGCGCTAATAACTGAATATATACAACT  
GATGTATGCTTCGTCGATCTGCAGAGGGCGAACCTTGCAGGGGTAAAGGCGGCT  
GCTGTCCGACCATCGCCTCTGCCGTTCCAACCGTGAGTGTGCTCAGATGCTA  
CTAGCTTCTTCTAATTCCTCCTTGTGTTGATTCTTCAGCAGAGAGTAGGTGTAC  
TAACTTATTAGCTGCATATGTGTGTTGTTTCATCGATCAGCTGGCGAGCGTGA  
GGATGCTGCCATGGGCGAAGGCCAACATCAACCCGACGGGGCAGGCGCTGAT  
CATCTGCACGGCGCCGGGATGGCATACTTCGTCCGCCGCGACAAGAAGATCC  
TCTCGCTGGCCAGGAGGCACTCCTTCGAGAACGCACCTGAACACCTCAAGAAC  
ACCTCCTTCCAGGGCACCGGCCGCCCTCACCTGCCTTCTTCAGGCCATGATC  
AGCAAGCTAGTGCTGCTTGCAATCTGCTGCAGAAAGTAGCTAGTGTGTGTAC  
TTGGATGTAATACTGTATGCTCCAGCTTGTATTAATAAACAATCTTAATTTG  
ATGAACTCAAGAATGGATGCGGTGGTTCATGTGCACTGTAGTACATGTTTCTT  
GTTCTTGAACTCGAACGAATTTGAACTGCCTATACA

FIG. 6D

MSTTVTRAHLEQRLALAKRCSREANLAGVKAAAVATIASAVPTLASVRML  
PWAKANINPTGOALICTAAGMAYFVAADKKILSLARRHSFENAPEHLKN  
TSFQGTGRPHPAFFRP

FIG. 6E

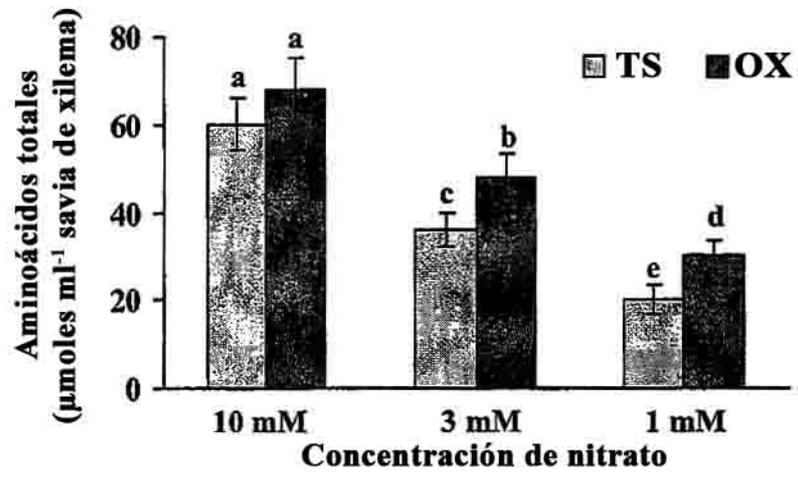


FIG. 7