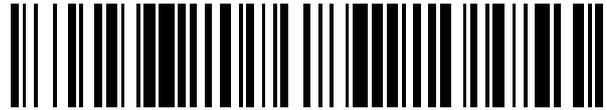


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 098**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2007 E 07849052 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2078088**

54 Título: **Mejora de la productividad de las cariósides de plantas por la modulación de la actividad de la glutamina-sintetasa**

30 Prioridad:

**09.10.2006 EP 06291570**

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

**31.03.2016**

73 Titular/es:

**GENOPLANTE-VALOR (100.0%)  
28, rue du Docteur Finlay  
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**HIREL, BERTRAND y  
PEREZ, PASCUAL**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 565 098 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).

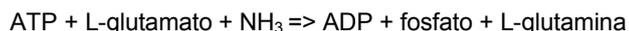
## DESCRIPCIÓN

Mejora de la productividad de las cariopsisides de plantas por la modulación de la actividad de la glutamina-sintetasa

La presente invención se refiere a métodos para controlar el rendimiento de las plantas, en particular cultivos de cereales, preferiblemente cultivos de maíz, por la modulación de la actividad de la glutamina-sintetasa (GS).

- 5 Los cereales, incluyendo el maíz, el trigo y el arroz, representan el 70% de la producción mundial de alimentos. Cuando estos cereales se cultivan para la obtención de proteínas, requieren grandes cantidades de fertilizantes nitrogenados para alcanzar rendimientos máximos. En los últimos años, ha habido un considerable interés en la eficiencia en el uso del nitrógeno (EUN), que se puede definir como el rendimiento de cariopsisides por unidad de nitrógeno (N) en el suelo y la eficiencia en la utilización de N (EutN), que es el rendimiento por absorción de N (Hirel and Lemaire, A. Basra, and S. Goyal, eds. (Haworth's Food Product Press. Binghamton, New-York), 15: 213-257, 2005). Se ha realizado una serie de estudios fisiológicos y agronómicos para identificar cuáles son las etapas limitantes en el control de la absorción, asimilación y reciclaje de N durante el crecimiento y desarrollo de las plantas (Jeuffroy et al., *J. Exp. Bot.*, 53: 809-823, 2002) incluyendo cereales, como el maíz (Hirel et al., *Physiol. Plant*, 124: 178-188, 2005b), el arroz (Yamaya et al., *J. Exp. Bot.*, 53: 917-925, 2002) y más recientemente el trigo (Kichey et al., *New Phytol.*, 169: 265-278, 2006). Usando maíz como cultivo modelo, Hirel et al. (antes citados, 2005b) han investigado los cambios en la concentración de metabolitos y actividades enzimáticas implicadas en el metabolismo del N dentro de una sola hoja, en diferentes etapas del crecimiento de las hojas y en diferentes períodos de desarrollo de la planta durante el período de llenado de las cariopsisides. Se llegó a la conclusión de que el N total, la clorofila, el contenido de proteínas solubles y la actividad de la GS están fuertemente interrelacionados y son indicadores que reflejan principalmente la actividad metabólica de las hojas individuales con respecto a la asimilación y el reciclaje del N, cualquiera que sea el nivel de fertilización con N.

La glutamina-sintetasa (GS; E.C.6.3.1.2) cataliza la conversión de nitrógeno inorgánico (amonio) en glutamina, de acuerdo con la siguiente reacción:



- 25 Todo el N de una planta, tanto si procede inicialmente de nitrato, iones amonio, fijación de N, o es generado por otras reacciones que liberan amonio dentro de la planta (descarboxilación de glicina durante la fotorrespiración, el metabolismo de los compuestos de transporte de N y la acción de la fenilalanina-amonio-liasa) se canaliza a través de las reacciones catalizadas por la GS. Por tanto, esta enzima es probable que sea un punto de control importante que controla el crecimiento y la productividad de las plantas (Mifflin and Habash, *J. Exp. Bot.*, 53(370): 979-87, 2002).
- 30 En el maíz, el supuesto papel de la GS para la productividad de las cariopsisides se ha resaltado también usando procedimientos genéticos cuantitativos. Se ha demostrado que los locus de rasgos cuantitativos (abreviadamente en lo sucesivo QTL, por la expresión inglesa *Quantitative Trait Loci*) para la actividad enzimática de las hojas coinciden con los QTL para el rendimiento (Hirel et al., *Plant Physiol.*, 125: 1258-1270, 2001), y se ha observado una correlación positiva entre el rendimiento de las cariopsisides y la actividad de la GS (Gallais and Hirel, *J. Exp. Bot.*, 55: 295-306, 2004). Se han identificado otros QTL para los locus de genes de la GS con relación a la removilización de N desde la hoja, el tallo y la planta completa, la absorción de N después de la anthesis (Gallais and Hirel, antes citados, 2004) y la eficiencia de germinación (Limami et al., *Plant Physiol.*, 130: 1860-1870, 2002). La importancia de la GS en el control de la productividad de cereales ha sido reforzada recientemente por un estudio realizado en arroz, en el que se observó una fuerte reducción tanto en la tasa de crecimiento como en el rendimiento de las cariopsisides en una planta mutante deficiente en GS citosólica (Tabuchi et al., *Plant J.*, 42: 641-655, 2005).

- La GS en las plantas superiores, incluyendo el maíz, se puede separar fácilmente por técnicas cromatográficas, localización y transferencia de Western estándares en formas citoplasmáticas (GS1) y plastídicas (GS2) (Hirel and Lea, en: *Plant Nitrogen*, P. J. Lea and J. F. Morot-Gaudry, eds (INRA, Springer), pp.79-99, 2001). Sin embargo, esta distinción no es tan simple como se pensó en el primer momento, ya que aunque se ha demostrado que sólo un gen codifica la forma plastídica, se sabe ahora que una pequeña familia de hasta cinco genes codifica la forma citoplasmática (Cren and Hirel, *Plant Cell Physiol.*, 40: 1187-1193, 1999). Los experimentos iniciales indicaron que los cinco genes de la GS citoplasmática se expresaban diferencialmente en las raíces, los tallos y las hojas de maíz (Sakakibara et al., *Plant Cell Physiol.*, 33: 1193-1198, 1992; *J. Biol. Chem.*, 271: 29561-29568, 1996; Li et al., *Plant Mol. Biol.*, 23: 401-440, 1993). La GS1-2, que es una isoenzima GS importante de la cariopsiside en desarrollo, es abundante en el pedúnculo y el pericarpio, pero se ha demostrado también que está presente en mazorcas inmaduras, anteras dehiscentes, glumas de las cariopsisides, cáscaras de mazorcas, mazorcas y tallos de las plantas de maíz (Muhitch et al., *Plant Sci.*, 163: 865-872, 2002; Muhitch, *J. Plant Physiol.*, 160: 601-605, 2003). En comparación con los otros cuatro genes que codifican la GS1, el gen *Gln1-5* se expresa en un nivel muy bajo en hojas, raíces y tallos (Sakakibara et al., antes citados, 1992; Li et al., antes citados, 1993). En un estudio más reciente de hojas de maíz llevado a cabo por Hirel et al. (antes citado, 2005b), se demostró que dos de los cinco genes que codifican la GS1 (*Gln1-3* y *Gln1-4*) se expresaba altamente con independencia de la edad de la hoja y el nivel de fertilización con N, aunque hubo un aumento en los transcritos de *Gln1-4* en las hojas más viejas. Se ha sugerido que *Gln1-4* codifica una isoforma de la GS que está implicada en la reasimilación del amonio liberado

- 5 durante la removilización de las proteínas de las hojas, mientras que *Gln1-3* codifica una isoforma de la GS, que desempeña un papel de organización durante el crecimiento de las plantas (Hirel et al., antes citado, 2005a). La GS plastídica (GS2) codificada por *Gln2* se expresó solamente en las primeras etapas del desarrollo de la planta, presumiblemente para reasimilar el amonio liberado durante la fotorrespiración, que está a una tasa mucho más baja en una planta C<sub>4</sub> en comparación con una planta C<sub>3</sub> (Ueno et al., *Ann. Bot.*, 96: 863-869, 2005).
- A pesar de la información disponible, como se indica anteriormente, con relación a la expresión de los cinco genes de la GS1 citosólica en el maíz y la evidencia de su importancia por la demostración de los QTL, no se conoce el efecto preciso de las isoenzimas individuales de la GS1 en el fenotipo de la planta y la producción de las carióspsides.
- 10 Los inventores han descubierto ahora la importancia funcional de los productos de las isoenzimas GS citosólicas de los genes *Gln1-3* y *Gln1-4* en el control del rendimiento de las carióspsides y sus componentes en el maíz.
- Los inventores han encontrado que *Gln1-3* desempeña un papel importante en el control del número de carióspsides, mientras que *Gln1-4* desempeña un papel importante en el control del tamaño de las carióspsides. Además, han observado que estos genes actúan específicamente en la producción de granos, sin afectar a la producción de la biomasa vegetativa.
- 15 El gen *Gln1-3* codifica la isoenzima GS citosólica GS1-3. La secuencia de cDNA del *Gln1-3* está disponible, por ejemplo, en la base de datos GenBank con el número de acceso X65928; la secuencia polipeptídica de la GS1-3 está disponible, por ejemplo, en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot con el número de acceso P38561. Una secuencia de cDNA del gen *Gln1-3* está representada también en la presente memoria como la SEQ ID NO: 1 y la secuencia polipeptídica deducida está representada como la SEQ ID NO: 2.
- 20 El gen *Gln1-4* codifica la isoenzima GS citosólica GS1-4. La secuencia de cDNA del *Gln1-4* está disponible, por ejemplo, en la base de datos GenBank con el número de acceso X65929; la secuencia polipeptídica de la GS1-4 está disponible, por ejemplo, en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot con el número de acceso P38562. Una secuencia de cDNA del *Gln1-4* está representada también en la presente memoria como la SEQ ID NO: 3 y la secuencia polipeptídica deducida está representada como la SEQ ID NO: 4.
- 25 La invención proporciona un método para mejorar la productividad de las carióspsides de una planta de maíz, en el que dicho método comprende sobreexpresar en dicha planta una isoenzima glutamina-sintetasa que tenga una identidad de al menos 95% con el polipéptido de la SEQ ID NO: 2.
- A menos que se especifique lo contrario, los porcentajes de identidad entre dos secuencias que se mencionan en la presente memoria se calculan a partir de una alineación de las dos secuencias en toda su longitud.
- 30 De acuerdo con una realización preferida de la invención, la productividad de las carióspsides se mejora aumentando el número de carióspsides, y dicha glutamina-sintetasa es una isoenzima GS1-3 que tiene una serina en la posición 41 y una arginina en la posición 278. Preferiblemente, dicha glutamina-sintetasa tiene la secuencia SEQ ID NO: 2.
- De acuerdo con otra realización preferida, la productividad de las carióspsides se mejora aumentando el tamaño de las carióspsides, y dicha glutamina-sintetasa es una isoenzima GS1-4 que tiene una prolina en la posición 41 y una lisina en la posición 278. Preferiblemente, dicha glutamina-sintetasa tiene la secuencia SEQ ID NO: 4.
- 35 Ventajosamente, un método de la invención comprende sobreexpresar tanto la isoenzima GS1-3 como la isoenzima GS1-4 en una misma planta, aumentando tanto el tamaño como el número de carióspsides.
- El término "sobreexpresar" una isoenzima glutamina-sintetasa en una planta, se refiere en la presente memoria a aumentar artificialmente la cantidad de dicha isoenzima GS activa producida en dicha planta en comparación con una planta de referencia.
- 40 Un método preferido para sobreexpresar una isoenzima glutamina-sintetasa comprende introducir en el genoma de dicha planta una construcción de DNA que comprenda una secuencia de nucleótidos que codifique dicha isoenzima glutamina-sintetasa, colocada bajo el control de un promotor.
- La presente invención proporciona también medios para realizar dicha sobreexpresión.
- 45 Esto incluye, en particular, construcciones de DNA recombinante para expresar un isoenzima GS1-3 y/o una isoenzima GS1-4 en una célula hospedante o un organismo hospedante, en particular una célula vegetal o una planta. Estas construcciones de DNA se pueden obtener e introducir en dicha célula u organismo hospedante por medio de técnicas bien conocidas de DNA recombinante e ingeniería genética.
- 50 Las construcciones de DNA recombinante de la invención incluyen, en particular, casetes de expresión, que comprenden un polinucleótido que codifica una isoenzima glutamina-sintetasa, como se ha definido anteriormente, bajo control de un promotor heterólogo.

De acuerdo con una realización particular, un casete de expresión de la invención puede comprender tanto un polinucleótido que codifica una isoenzima GS1-3 como un polinucleótido que codifica una isoenzima GS1-4.

5 El promotor heterólogo de la invención es cualquier promotor funcional en una célula vegetal, es decir, capaz de dirigir la transcripción de un polinucleótido que codifica una isoenzima glutamina-sintetasa, como se ha definido anteriormente, en una célula vegetal. La elección del promotor más apropiado puede depender, en particular, del órgano u órganos o del tejido o tejidos dianas para la expresión y del tipo de expresión (es decir, constitutiva o inducible) que se desea obtener.

10 En la técnica está disponible una amplia variedad de promotores adecuados para la expresión de genes heterólogos en las plantas, y en particular en el maíz. Se pueden obtener por ejemplo de plantas, virus de plantas o bacterias, tales como *Agrobacterium*. Incluyen promotores constitutivos, es decir, promotores que son activos en la mayoría de tejidos y células y bajo la mayoría de las condiciones ambientales, promotores específicos de tejidos o de células que sólo o principalmente son activos en ciertos tejidos o ciertos tipos de células y promotores inducibles que se activan por estímulos físicos o químicos.

15 Ejemplos no limitativos de promotores constitutivos que se utilizan comúnmente son el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el promotor de la nopalina-sintetasa (Nos), el promotor del virus del mosaico de las nervaduras de la mandioca (CsVMV) (Verdaguer et al., *Plant Mol. Biol.*, 6: 1129-39, 1996), el promotor de actina del arroz seguido por el intrón de actina del arroz (RAP-RAI) contenido en el plásmido pAct1-F4 (McElroy et al., *Mol. Gen. Genet.*, 231 (1): 150-160, 1991).

20 Ejemplos no limitativos de promotores específicos de órganos o tejidos que se pueden utilizar en la presente invención incluyen, por ejemplo, promotor de alto peso molecular (HMW), que es específico de las cariósides (Thomas and Flavell, *Plant Cell*, 2: 1171-80, 1990) o los promotores específicos de las hojas como el promotor de pPEPc (Jeanneau et al., *Biochimie*, 84: 1127-1135, 2002) o el promotor de la subunidad pequeña de Rubisco (rbcS) (Katayama et al., *Plant Mol. Biol.*, 44: 99-106, 2000) que es específico de la vaina del haz.

25 Los promotores inducibles incluyen, por ejemplo, promotores sensibles al estrés por sequía, tal como el promotor de rd29A que comprende un elemento sensible a la deshidratación (Kasuga et al., *Nature Biotech.*, 17: 287-291, 1999; Narusaka et al., *Plant J.*, 34: 137-148, 2003) o el promotor de SAG12 específico de la senescencia (Noh and Amasino, *Plant Mol. Biol.*, 41(2): 181-194, 1999).

30 Los casetes de expresión también incluyen generalmente un terminador de la transcripción, tal como el terminador de la transcripción 35S o el terminador Nos (Depicker et al., *J. Mol. Appl. Genet.*, 1: 561-73, 1982). También pueden incluir otras secuencias reguladoras, tales como las secuencias potenciadoras de la transcripción.

35 Las construcciones de DNA recombinante de la invención también incluyen vectores recombinantes que contienen un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica una isoenzima glutamina-sintetasa, como se ha definido anteriormente, bajo el control transcripcional de un promotor adecuado. Dicho casete de expresión puede ser un casete de expresión recombinante de la invención o un casete en el que el polinucleótido que codifica una glutamina-sintetasa está bajo control de su promotor endógeno.

40 Un vector recombinante de la invención puede incluir tanto un polinucleótido que codifica una isoenzima GS1-3 como un polinucleótido que codifica una isoenzima GS1-4. Estos polinucleótidos estarán situados ventajosamente en casetes de expresión separados bajo el control de diferentes promotores; por ejemplo, un polinucleótido que codifica una isoenzima GS1-3 puede estar situado bajo el control del promotor de CsVMV y un polinucleótido que codifica una isoenzima GS1-4 puede estar situado bajo el control del promotor de rbcS.

Los vectores recombinantes de la invención también pueden incluir otras secuencias de interés, tales como, por ejemplo, uno o más genes marcadores, que permitan la selección de hospedantes transformados.

45 Ventajosamente, el gen marcador seleccionable está comprendido entre dos elementos Ds (es decir, transposones) para su eliminación en una etapa posterior por interacción con la transposasa Ac. Este sistema de eliminación es conocido por los expertos en la técnica. A modo de ejemplo, ha sido descrito por Goldsbrough et al. (*Biotechnology*, 11: 1286-1292, 1993).

50 La selección de vectores adecuados y los métodos para insertar las construcciones de DNA en los mismos son muy conocidos por los expertos habituales en la técnica. La elección del vector depende del hospedante previsto y del método previsto de transformación de dicho hospedante. Una variedad de técnicas para la transformación genética de células vegetales o plantas están disponibles en la técnica para muchas especies de plantas. Como ejemplos no limitativos, se pueden mencionar la transformación mediada por virus, la transformación por microinyección, por electroporación, la transformación mediada por microproyectiles, la transformación mediada por *Agrobacterium* (Ishida et al., *Nat. Biotechnol.*, 14: 745-750, 1996), y similares.

El término "planta" como se usa en la presente memoria, incluye dicotiledóneas así como monocotiledóneas y en particular las de interés agronómico, como los cultivos de cereales, tales como la planta del trigo o la planta del arroz, preferiblemente la planta del maíz.

5 La invención comprende también células hospedante que contienen una construcción de DNA recombinante de la invención. Estas células hospedantes pueden ser células procariotas o células eucariotas, en particular células vegetales, y preferiblemente células de maíz.

10 La invención proporciona también un método para producir una planta transgénica, en particular una planta de maíz, que tenga mejor productividad de las cariopsis. Dicho método comprende transformar una célula vegetal (por ejemplo, una célula de maíz) por una construcción de DNA de la invención y regenerar a partir de dicha célula vegetal (por ejemplo, una célula de maíz) una planta transgénica (por ejemplo, una planta de maíz) que sobreexpresa una isoenzima GS1-3 y/o una isoenzima GS1-4.

15 De acuerdo con una realización preferida o el método de la invención, comprende transformar una célula vegetal, en particular una célula de maíz, por un vector recombinante de la invención que comprende un polinucleótido que codifica una isoenzima GS1-3 y por un vector recombinante de la invención que comprende un polinucleótido que codifica una isoenzima GS1-4, y regenerar a partir de dicha célula vegetal (por ejemplo, una célula de maíz) una planta transgénica (por ejemplo, una planta de maíz) que sobreexpresa una isoenzima GS1-3 y una isoenzima GS1-4.

20 De acuerdo con otra realización preferida o el método de la invención, comprende transformar una célula vegetal, en particular una célula de maíz, por un vector recombinante de la invención que comprende un polinucleótido que codifica una isoenzima GS1-3 y un polinucleótido que codifica una isoenzima GS1-4 y regenerar a partir de dicha célula vegetal (por ejemplo, una célula de maíz) una planta transgénica (por ejemplo, una planta de maíz) que sobreexpresa una isoenzima GS1-3 y una isoenzima GS1-4.

25 La invención comprende también plantas transformadas genéticamente por una construcción de DNA recombinante de la invención, y que sobreexpresa una isoenzima GS1-3 y/o una isoenzima GS1-4. Preferiblemente, dichas plantas son plantas de maíz transgénicas, que se pueden obtener por un método de la invención, que sobreexpresan una isoenzima GS1-3 y/o una isoenzima GS1-4. En dichas plantas transgénicas, una construcción de DNA de la invención está comprendida en un transgén integrado (es decir, integrado establemente) en el genoma de la planta, de modo que pasa en sucesivas generaciones de plantas. Así, las plantas transgénicas de la invención incluyen no sólo las plantas que resultan de la transgénesis inicial, sino también sus descendientes, siempre que contengan una construcción de DNA recombinante de la invención. La sobreexpresión de una isoenzima glutamina-sintetasa GS1-3 y/o GS1-4 en dichas plantas les proporciona una mejor productividad de las cariopsis, cuando se compara con una planta carente de dicho o dichos transgenes.

30 Por consiguiente, la invención proporciona una planta transgénica o uno de sus órganos o tejidos aislados que comprende, integrado establemente en su genoma, un casete de expresión recombinante que comprende un polinucleótido que codifica una isoenzima GS1-3, como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, y/o un polinucleótido que codifica una isoenzima GS1-4, como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5.

La invención abarca también los órganos o tejidos aislados de dichas plantas transgénicas (tales como semillas, hojas, flores, raíces, tallos, mazorcas) que contienen un casete de expresión recombinante de la invención.

40 Otros objetos y ventajas anteriores de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y los dibujos que se acompañan. Se ha de entender sin embargo que esta descripción detallada anterior es solamente ilustrativa y no es limitativa de la invención.

#### **Ejemplo 1: Características de los episodios de inserción *Mu* en *Gln1-3*:: y *Gln1-4*::**

45 Se aislaron mutantes inactivados de los genes *Gln1-3* y *Gln1-4* utilizando el sistema Mutator (*Mu*) del maíz (Hanley et al., *Plant J.*, 23: 557-566, 2000). Las líneas de inserción de *Gln1-3*::*Mu* y *Gln1-4*::*Mu* experimentaron un amplio retrocruzamiento con la línea de tipo natural (abreviadamente en lo sucesivo WT, por la expresión inglesa *Wild Type*) *no-Mu* y se obtuvieron líneas mutantes homocigóticas, heterocigóticas y nulas. Además, se produjo un mutante doble (*gln1-3/gln1-4*) de los genes *Gln1-3* y *Gln1-4*.

La posición de los elementos *Mutator* insertados dentro de los genes *Gln1-3* y *Gln1-4* se muestra en la Figura 1.

50 Para mayor claridad y puesto que los genes *Gln1-3* y *Gln1-4* muestran una alta similitud de secuencias, se muestran como una sola estructura. La estructura de los genes *Gln1-3* y *Gln1-4* y los tamaños de los exones se determinaron por secuenciación de productos de DNA genómico obtenidos por PCR usando cebadores diseñados a partir de las secuencias de cDNA correspondientes (Li et al., antes citados, 1993); las secuencias de inserción *Mu* y el clon genómico del arroz AC105364.

Los genes *Gln1-3* y *Gln1-4* del maíz constan de 10 exones (flechas negras), que varían en tamaño desde 40 pb hasta 252 pb, y 9 intrones (líneas negras). El tamaño del último exón era 150 pb en *Gln1-3* y 147 pb en *Gln1-4*. La estructura de intrones y exones está dibujada a escala. La numeración de genes comienza con el codón ATG (1 pb) y continúa hasta el codón de parada (posición 3857 pb).

5 Los dos episodios de inserción *Mu* se indican con triángulos (no a escala).

También se muestra la posición relativa de la signatura del sitio de unión a GS-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y la signatura de la región de unión a GS-ATP.

10 El análisis de secuencias de las regiones flanqueantes que rodean los elementos *Mu* indicaba que en el caso de *Gln1-3::Mu1* la inserción se había producido dentro del exón 8 y en el caso de *Gln1-4::Mu5* la inserción se había producido dentro del intrón que separa el exón 7 y el exón 8.

## Ejemplo 2: Expresión y actividad de la glutamina-sintetasa en *Gln1-3*, *Gln1-4* y mutantes dobles

### Material vegetal

15 Semillas de los tres plantas mutantes deficientes en GS1, o del tipo natural (WT) correspondiente, se sembraron en primer lugar en arena gruesa y después de 1 semana, cuando habían brotado de 2 a 3 hojas, se transfirieron bien a un cultivo hidropónico para la recolección de las raíces o bien a tierra para la recolección de las hojas. Para el cultivo hidropónico, 12 plantas (3 del WT y 3 para cada mutante) se colocaron aleatoriamente en una unidad de cultivo aireada de 130 litros. El experimento se realizó por triplicado para cada línea y las plantas se cultivaron durante 18 días en una cámara de crecimiento con un periodo de luz/oscuridad de 16/8. Lámparas de haluros metálicos proporcionaron una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . La humedad relativa se mantuvo al 60% de saturación. Las plantas se recolectaron en la etapa de 10-11 hojas entre las 9 y las 12 am y se separaron en hojas jóvenes (3 hojas más jóvenes) y raíces. Las muestras de raíces se colocaron inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido y después se conservaron a -80°C hasta su análisis posterior.

25 Tres plantas de las tres mutantes se transfirieron a macetas (diámetro y altura de 30 cm) que contenían suelo franco arcilloso y en la etapa de 10-11 hojas, se recogieron las 3 hojas más jóvenes completamente expandidas y se agruparon para las muestras de la etapa vegetativa (EV). Se recogió la hoja debajo de la mazorca en las últimas etapas del desarrollo de la planta incluyendo 15 días después de la formación de barbas (15DAS) (correspondiendo DAS a la expresión inglesa *Days After Silking*) y 55 días después de la formación de barbas (55DAS). Se seleccionó la hoja, debajo de la mazorca, ya que se ha demostrado que proporciona una buena indicación de la transición del sumidero de la fuente durante el llenado del grano (Hirel et al., antes citados, 2005a,b; Martin et al., *New Phytol.*, 167: 483-492, 2005). No se observaron variaciones importantes en el contenido de metabolito en N y de la actividad enzimática dentro de una sola lámina de la hoja hasta las últimas etapas del desarrollo de las hojas. Por tanto, se llegó a la conclusión de que toda la lámina de la hoja se puede utilizar para la medición de los rasgos fisiológicos relacionados con el metabolismo de N (Hirel et al., antes citados, 2005b). Se recogieron muestras de hojas entre las 9 am y las 12 am y se congelaron en N<sub>2</sub> líquido, se trituraron hasta un polvo homogéneo y se conservaron a -80°C para su uso en los análisis posteriores de RNA, proteínas y metabolitos.

40 En el cultivo hidropónico, las plantas se dejaron crecer en una solución nutriente completa que contenía NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 10 mM como la única fuente de N (Coïc and Lesaint, *Hortic. Française*, 8: 11-14, 1971). La solución nutriente se reemplazó diariamente. En el invernadero, las plantas se regaron diariamente con una solución nutriente completa que contenía NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 10 mM como la única fuente de N (Coïc and Lesaint, antes citados, 1971). Para ambos métodos de cultivo, la solución nutriente completa contenía K<sup>+</sup> 1,25 mM, Ca<sup>2+</sup> 0,25 mM, Mg<sup>2+</sup> 0,25 mM, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> 1,25 mM, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 0,75 mM, Fe<sup>2+</sup> 21,5  $\mu\text{M}$  (Sequestrene; Ciba-Geigy, Basilea, Suiza), B<sup>3+</sup> 23  $\mu\text{M}$ , Mn<sup>2+</sup> 9  $\mu\text{M}$ , Mo<sup>2+</sup> 0,3  $\mu\text{M}$ , Cu<sup>2+</sup> 0,95  $\mu\text{M}$  y Zn<sup>2+</sup> 3,5  $\mu\text{M}$ .

### Expresión de la proteína glutamina-sintetasa

45 El contenido de la proteína isoenzima GS de las raíces y hojas de la planta WT y de las tres mutantes se examinó por electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida y análisis de transferencia de Western, usando anticuerpos producidos contra GS2 y GS1. Esta técnica proporciona un método fiable de estimación de las cantidades relativas tanto de GS1 como de GS2 en un extracto de proteínas en bruto de hojas y raíces de maíz (Becker et al., *Planta*, 211: 800-806, 2000).

50 Las proteínas se extrajeron de polvo congelado de hojas y raíces obtenido como se ha descrito antes, en tampón de extracción en frío que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, 0,5% (p/v) de PVP, 0,1% (v/v) de 2-mercaptoetanol y leupeptina 4 mM y se separaron por SDS-PAGE (Laemmli, *Nature*, 227: 680-685, 1970). El porcentaje de poliacrilamida en los geles fue 10% y en cada pista se cargaron cantidades iguales de proteína (10  $\mu\text{g}$ ). Las proteínas se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa para análisis de transferencia de Western. Los polipéptidos GS1 y GS2 se detectaron utilizando antisueros policlonales producidos bien contra GS2 de tabaco (Hirel et al., *Plant Physiol.*, 74: 448-450, 1984) o bien contra GS1 de nódulos de las raíces de *Phaseolus vulgaris* (Cullimore and Mifflin, *J. Exp. Bot.*, 35: 581-587, 1984). La proteína soluble se determinó usando

un kit disponible comercialmente (reactivo de ensayo de proteínas Coomassie, Biorad, Munich, Alemania) usando seroalbúmina bovina como patrón.

Los resultados se muestran en la Figura 2.

Leyenda de la Figura 2:

- 5 Análisis de transferencia de Western de la composición de la subunidad de GS de hojas recolectadas en la EV, usando anticuerpos de la GS del tabaco (A), de hojas recolectadas en la EV, usando anticuerpos de la GS de *Phaseolus vulgaris* (B), de hojas recolectadas a 55DAS, utilizando anticuerpos de la GS del tabaco (C) y de raíces recolectadas en la EV, utilizando anticuerpos de la GS del tabaco (D).

En el lado derecho de los paneles se muestra la posición de los marcadores de la masa molecular de las proteínas.

- 10 WT = tipo natural

*gln1-3* = mutante deficiente en *gln1-3*

*gln1-4* = mutante deficiente en *gln1-4*

*gln1-3/1-4* = mutante deficiente en *gln1-3* y *gln1-4*

- 15 En las hojas de las plantas WT en la EV, se detectaron dos polipéptidos de abundancia relativa similar, usando los anticuerpos de la GS del tabaco. El polipéptido de 44 kD corresponde a la forma plastídica de la GS (GS2) mientras que el polipéptido de 40 kD corresponde a la forma citosólica de la GS (GS1). En los mutantes *gln1-3* y *gln1-4*, se observó una disminución en la cantidad de proteína GS1, que fue más pronunciada en los primeros. En el *gln1-3/gln1-4*, la proteína GS1 era apenas detectable. Cantidades similares de la proteína GS2 eran visibles en la planta WT y en las tres mutantes (Figura 2A). La disminución del contenido de la proteína GS1 de los mutantes *gln1-3*,  
20 *gln1-4* y *gln1-3/gln1-4* en la EV, se confirmó usando anticuerpos producidos contra la GS del nódulo de la raíz de *Phaseolus vulgaris*. Sin embargo, puesto que esta preparación de anticuerpos es aparentemente más específica para la GS citosólica (GS1), la proteína GS2 era menos fácilmente visible en la transferencia de Western (Figura 2B). Cuando se analizaron las proteínas GS en las hojas a 55DAS, utilizando los anticuerpos de tabaco, se obtuvo un patrón similar de disminución en el contenido de la proteína GS1 en los mutantes. Sin embargo, en esta etapa posterior de desarrollo de la planta, la cantidad de proteína GS2 aislada de las cuatro líneas era mucho menor (Figura 2C).

- 25 En el tejido de la raíz de las plantas WT, fueron detectados dos polipéptidos de 38 y 40 kD que correspondían a dos formas citosólicas de GS (GSr y GS1, respectivamente) (Figura 2D). Como ya han descrito Sakakibara et al. (antes citados, 1992), la banda superior corresponde a una proteína GS1 de un tamaño similar a la encontrada en las  
30 hojas, mientras que la banda inferior es una GS citosólica específica de la raíz (GSr). Una pequeña disminución en la cantidad del polipéptido GS1 (40 kD) era solo visible en el mutante *gln1-4*, mientras que una disminución considerable era claramente detectable en el mutante *gln1-3*. En el doble mutante *gln1-3/gln1-4*, no se detectó el polipéptido GS1 (40 kD). Se detectaron cantidades similares del polipéptido GSr (38 kD) en la planta WT y en las tres mutantes (Figura 2D).

### 35 **Actividad de la proteína glutamina-sintetasa**

El contenido de actividad de la isoenzima GS (las proporciones relativas de las actividades plastídica y citosólica de la GS) de la planta WT y de las tres mutantes se examinó por cromatografía de intercambio iónico y ensayos enzimáticos, usando plantas en la EV.

- 40 Las proteínas se extrajeron de polvo congelado de hojas y raíces obtenido como se describe en el Ejemplo 1, en tampón de extracción en frío que contenía TEA 100 mM, EDTA 1 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, ácido glutámico 5 mM, 10% (v/v) de etilenglicol, DTT 6 mM, pH 7,6. A continuación se centrifugaron los extractos a 10.000 g durante 15 minutos a 4°C. La separación en una columna de intercambio aniónico Mono Q (Amersham Pharmacia Biotech) unida a un cromatógrafo de HPLC (DX 500; Dionex (UK) Ltd. Camberley, Surrey, Reino Unido) se realizó como han descrito  
45 Habash et al. (*Ann. Appl. Biol.*, 138: 83-89, 2001), excepto que se utilizó un gradiente lineal de NaCl 0,1-0,7 M para la elución y se recogieron fracciones de 1 mL.

Se midió la actividad de la glutamina-sintetasa (GS) de acuerdo con el método de Lea et al. (1999) para la reacción de transferasa y el de O'Neal and Joy (*Archiv. Biochem. Biophys*, 159: 113-122, 1973) para la reacción de la sintetasa.

Los resultados obtenidos del material de las hojas con tres extracciones independientes se muestran en la Figura 3.

- 50 Leyenda de la Figura 3:

Cromatografía de intercambio iónico de la actividad de la GS en extractos de hojas de plantas WT (A), *gln1-4* (B), *gln1-3* (C) y *gln1-3/gln1-4* (D). El primer pico de la actividad de la GS corresponde a la GS citosólica (GS1) y el segundo pico a la GS plastídica (GS2).

5 Las cantidades relativas de la actividad de GS1 y GS2 indicadas entre paréntesis se calcularon utilizando, como máximo, el valor medido para la cantidad de actividades de GS1 y GS2 en la planta WT.

En comparación con la planta WT (Figura 3A), se observó una disminución del 16% en la actividad de la GS1 en la planta mutante *gln1-4* (Figura 3B). La disminución de la actividad de la GS1 fue mayor en la planta mutante *gln1-3* (45%) (Figura 3C). Sólo se mantuvo el 26% de la actividad de la GS1 de la planta WT en la mutante *gln1-3/gln1-4* (Figura 3D). Curiosamente, se observó un aumento en la actividad de la GS2 que variaba desde 11 hasta 47% en las tres mutantes (Figura 3B-D).

En comparación con la planta WT, las actividades de la GS de las raíces en las tres mutantes medidas utilizando la reacción de sintetasa en la EV fueron similares ( $3,2 \pm 0,06 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de peso en seco para la planta WT,  $3,4 \pm 0,3$  para la mutante *gln1-4*,  $2,8 \pm 0,05$  para la mutante *gln1-3* y  $3,1 \pm 0,05$  para la mutante *gln1-3/gln1-4*). Este resultado indica que la actividad de la GS de las raíces está representada principalmente por la proteína GSr que está codificada por el gen *Gln1-1*, cuyo mRNA se expresa más abundantemente en las raíces.

### Identificación de secuencias de la proteína GS

Usando plantas recolectadas en la EV, proteínas de las hojas extraídas de la planta WT, las mutantes *gln1-3*, *gln1-4* y *gln1-3/gln1-4* como se han descrito anteriormente, se separaron por electroforesis bidimensional (2-D) en gel.

El gel 2-D de las proteínas extraídas de las hojas de la planta WT se muestra en la Figura 4A.

20 Para demostrar de forma inequívoca que la proteína GS correspondiente estaba ausente en las mutantes *gln1-3*, *gln1-4* y *gln1-3/gln1-4*, se analizaron treinta y seis manchas de proteínas en el intervalo del pI y la masa molecular (MM) de la GS en dicha región, por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Los resultados se muestran en la Figura 4B.

25 La identificación de las proteínas reveló que de estas 36 manchas, cuatro de ellas (las manchas 8, 9, 14 y 38) contenían una proteína GS.

En comparación con el perfil de proteínas de la planta WT, se observó que la mutante *gln1-3* y la mutante *gln1-4* carecían de las manchas 8 y 9, respectivamente, y que ambas estaban ausentes en la mutante *gln1-3/gln1-4*. Las manchas 8 y 9 estaban muy próximas entre sí y presentaban un solapamiento parcial. Tenían el mismo pI aparente, pero se diferenciaban ligeramente por su MM aparente.

30 Este hallazgo no es sorprendente, porque de acuerdo con las secuencias de los genes aislados por Li et al. (antes citados, 1993), las proteínas GS1-3 y GS1-4 tienen el mismo pI y presentan sólo una diferencia de 188 D en su masa. Ambos productos de las formas alélicas aisladas por Sakakibara et al., (antes citados, 1992) (respectivamente GS112 y GS107 para GS1-3 y GS1-4), tienen un aminoácido básico más y por tanto también presentan pI similar.

35 Se utilizaron dos sitios de polimorfismo de secuencias para distinguir entre sí las proteínas GS1-3 y GS1-4. Los resultados se muestran en la Figura 4C.

Leyenda de la Figura 4C:

40 Se dan los nombres de entradas de la secuencia en la base de datos UNIPROT. La Ref 2 de GS1-3 y GS1-4 se refiere a la forma alélica secuenciada por Sakakibara et al. (antes citados, 1992). Las posiciones son con relación a la primera metionina para todas las GS excepto para la GS2, que es con relación al primer aminoácido después del péptido de señal. El fondo sombreado muestra las diferencias entre GS1-3 y GS1-4 y entre las formas alélicas de GS1-3. Las diferencias entre GS1-3 y GS1-4 a un lado y el resto de las proteínas GS al otro lado están subrayadas.

45 El alineamiento de secuencias muestra que el aminoácido en la posición 41 es una serina en GS1-3 y una prolina en GS1-4, y el aminoácido en la posición 278 es una arginina en GS1-3 y una lisina en GS1-4. Se identificaron péptidos que contenían estos sitios de polimorfismo: el TLSPVTDPSK (SEQ ID NO: 5) (y el TLSPVTDPSKLPK mal escindido (SEQ ID NO: 6)) permitió la identificación de GS1-3, mientras que el TLPVTDPSK (SEQ ID NO: 7) (y el TLPVTDPSKLPK (SEQ ID NO: 8)) permitió la identificación de GS1-4 de acuerdo con el polimorfismo S/P en la posición 41, y el HREHIAAYGEGNER (SEQ ID NO: 9) y el HKEHIAAYGEGNER (SEQ ID NO: 10) permitieron la identificación de las proteínas GS1-3 y GS1-4 respectivamente de acuerdo con el polimorfismo R/K en la posición 278. Debe observarse que el péptido HREHIAAYGEGNER (SEQ ID NO: 9) es similar a la forma alélica de GS1-3 secuenciada por Sakakibara et al. (antes citados, 1992), pero no a la secuenciada por Li et al. (antes citados, 1993), en la que los dos últimos aminoácidos del péptido, ER, están sustituidos por DG.

### Ejemplo 3: Fenotipo y producción de cariósides de las plantas mutantes deficientes en GS1

El rendimiento de cariósides, sus componentes y el contenido de N de las diferentes partes de la planta en las etapas de desarrollo desde la formación de barbas hasta la madurez se determinaron de acuerdo con el método descrito por Martin et al. (antes citados, 2005).

- 5 Para determinar el impacto de las mutaciones sobre el fenotipo de la planta y la producción de cariósides, las plantas se cultivaron en un invernadero en suelo y se regaron diariamente con una solución nutriente que contenía  $\text{NO}_3^-$  10 mM (condiciones subóptimas de N) descrita por Coïc and Lesaint (antes citados, 1971). Las plantas se recolectaron en su madurez y el contenido total de N se midió usando el método de combustión de Dumas.

**Acumulación de brotes y mazorcas en peso en seco en plantas mutantes deficientes en GS1**

- 10 El peso en seco total de las parte vegetativas de los brotes (A) y el peso en seco total de la mazorca (B) de la planta WT, *gln1-3*, *gln1-4* y *gln1-3/gln1-4* se muestran en la Figura 5.

Leyenda de la Figura 5:

Ordenadas = Peso en seco en gramos (g)

Los valores son la media  $\pm$  error típico de tres plantas individuales.

- 15 No se observaron diferencias significativas en la producción de materia seca de las partes vegetativas del brote (Figura 5A). En contraste, se observó una importante disminución en el contenido de materia seca de la mazorca, que en comparación con la planta WT era 68% para la mutante *gln1-3*, 48% para la mutante *gln1-4* y 84% para la mutante *gln1-3/gln1-4*. Se observó una reducción del tamaño de la mazorca en las mutantes *gln1-3* y *gln1-4*, e incluso fue más grave en la mutante *gln1-3/gln1-4* (Figura 5B)

**Fenotipo de la mazorca en plantas mutantes deficientes en GS1**

- 20 Mazorcas de de plantas WT *gln1-4*, *gln1-3* y *gln1-3/gln1-4* de maíz (línea B73) se muestran en la Figura 6.

En ambas plantas mutantes *gln1-3* y *gln1-4* se observó una fuerte reducción en el rendimiento de las cariósides, que era más importante en la primera, confirmando de este modo el fenotipo mostrado en la Figura 6.

Los principales componentes del rendimiento de las cariósides para las tres plantas con mutantes de GS cultivadas bajo condiciones subóptimas de N se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1				
	Rendimiento de los granos (g)	Número de granos	Peso de mil cariósides (g)	Contenido en N de los granos (% en peso seco)
WT (línea B73)	117 $\pm$ 15 (100)	464 $\pm$ 63 (100)	252 $\pm$ 12 (100)	2,10 $\pm$ 0,12 (100)
<i>gln1-4</i>	59 $\pm$ 4,5 (50) <sup>a</sup>	331 $\pm$ 25 (71) <sup>a</sup>	178 $\pm$ 11 (70) <sup>a</sup>	2,49 $\pm$ 0,04 (118) <sup>a</sup>
<i>gln1-3</i>	27 $\pm$ 9,5 (23) <sup>a</sup>	120 $\pm$ 43 (26) <sup>a</sup>	220 $\pm$ 5 (87) <sup>a</sup>	2,66 $\pm$ 0,07 (126) <sup>a</sup>
<i>gln1-3/1-4</i>	14 $\pm$ 8 (12) <sup>a</sup>	89 $\pm$ 51 (19) <sup>a</sup>	158 $\pm$ 4 (63) <sup>a</sup>	2,48 $\pm$ 0,08 (118) <sup>a</sup>

Cada valor es la media  $\pm$  error típico obtenido a partir de tres plantas individuales.

Los valores indicados entre paréntesis se expresan como porcentaje del valor en la planta WT.

<sup>a</sup>Significativamente diferente de la planta WT en el nivel de probabilidad de 0,05.

- 25
- 30 En la planta mutante *gln1-3/gln1-4*, se redujo el rendimiento de las cariósides hasta sólo 12% del de la planta de tipo natural. En la planta mutante *gln1-4*, hubo una mayor reducción en el peso de las cariósides, pero un mayor número de cariósides, en comparación con la planta mutante *gln1-3*. En la planta mutante *gln1-3/gln1-4*, ambos componentes del rendimiento estaban fuertemente reducidos en comparación con la planta WT y las dos plantas mutantes individuales. En comparación con la planta WT, se observó en las tres plantas mutantes un aumento de aproximadamente 20% en el contenido de N en las cariósides

**Ejemplo 4: Fisiología de las plantas mutantes deficientes en GS1**

El efecto de disminución de los niveles de actividad de GS1 en marcadores representativos del metabolismo de N y C de la hoja (Hirel et al., antes citados, 2005b), se examinó en tres mutantes de maíz.

**Extracción de metabolitos y análisis**

- 5 Se cuantificaron los metabolitos en plantas de maíz en la EV. Se usó material vegetal liofilizado para la extracción de los metabolitos. El  $\text{NH}_4^+$  y los aminoácidos se extrajeron con ácido 5-sulfosalicílico al 2% (10 mg de peso en seco,  $\text{mL}^{-1}$ ; Ferrario-Méry et al., *Plant Physiol* 117: 293-302, 1998). El contenido total de aminoácidos y la composición de los aminoácidos individuales se determinó por cromatografía de intercambio iónico en muestras reunidas extraídas de pesos secos iguales. Los aminoácidos libres totales se determinaron por el método colorimétrico de Rosen, utilizando leucina como patrón (Rosen, *Arch. Biochem. Biophys.*, 67(1): 10-15, 1957). La composición de los aminoácidos individuales se determinó por cromatografía de intercambio iónico seguida por la detección con ninhidrina utilizando el analizador de aminoácidos *AminoTac JLC-500V* de acuerdo con las instrucciones del fabricante (JEOL [Europe], Croissy-sur-Seine, Francia). El  $\text{NH}_4^+$  libre se determinó por el ensayo del hipoclorito de fenol (reacción de Berthelot), que proporciona datos fiables para estudios comparativos cuando la concentración de  $\text{NH}_4^+$  es baja, aunque se puede obtener una cuantificación más precisa por otros métodos (Husted et al., *Physiol. Plant*, 109: 167-179, 2000). Se extrajeron sacarosa, glucosa, fructosa y almidón con  $\text{HClO}_4$  1M (1 mL por 5 a 10 mg en peso seco de material vegetal) como ha descrito Ferrario-Méry et al., (antes citados, 1998). Los azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) se midieron enzimáticamente usando un ensayo con un kit disponible comercialmente (Boehringer Mannheim, Alemania).
- 10
- 15
- 20 Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.				
Concentración de metabolitos ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ en peso seco) y N total (%)				
Metabolitos	WT	<i>gln1-4</i>	<i>gln1-3</i>	<i>gln1-3/1-4</i>
$\text{NH}_4^+$	24,22 $\pm$ 1,9	41,5 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup>	43,6 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>	99,15 $\pm$ 11,4 <sup>a</sup>
$\text{NO}_3^-$	64 $\pm$ 2,5	57,3 $\pm$ 11,4	61,5 $\pm$ 6,7	64 $\pm$ 2,1
Azúcares solubles	2350 $\pm$ 110	1930 $\pm$ 220	1980 $\pm$ 410	2030 $\pm$ 306
Aminoácidos	73,20 $\pm$ 17	93,03 $\pm$ 6.5	83,1 $\pm$ 3	98,9 $\pm$ 30
N total	4,36 $\pm$ 0,08	4,31 $\pm$ 0,1	4,28 $\pm$ 0,1	4,42 $\pm$ 0,3
<sup>a</sup> Los valores son la media de tres plantas $\pm$ desviación típica. Para los azúcares solubles la sacarosa representó 98% del total.				
<sup>a</sup> Cambios significativos en el nivel de probabilidad de 0,05 en comparación con la planta WT				

- La Tabla 2 muestra que la reducción de la actividad de la GS1 en las plantas mutantes *gln1-3* y *gln1-4* dieron como resultado un aumento de casi 2 veces la cantidad de  $\text{NH}_4^+$  libre en las hojas, mientras que en la planta mutante *gln1-3/gln1-4*, esta cantidad era aproximadamente cuatro veces mayor en comparación con la planta de tipo natural. En la EV, no se observaron diferencias significativas en el  $\text{NO}_3^-$ , azúcares solubles, aminoácidos libres (tanto cualitativa como cuantitativamente) y el contenido total de N de las hojas entre la planta WT y las tres plantas mutantes. Aunque menos marcado, se observó todavía un aumento en la cantidad de  $\text{NH}_4^+$  libre en los 15DAS en las tres plantas con mutantes de GS. En esta etapa de desarrollo de las plantas, las concentraciones relativas de  $\text{NO}_3^-$ , aminoácidos y azúcares solubles estaban también reducidas, pero no se detectaron cambios significativos entre la planta WT y las plantas mutantes (datos no mostrados). Como ya se informó anteriormente (Hirel et al., antes citados, 2005b), las cantidades de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , y azúcares solubles en las hojas a los 55DAS eran al menos cuatro veces menores tanto en la planta WT como en las tres mutantes de GS. Sin embargo, no se observaron diferencias marcadas entre la planta WT y las tres plantas mutantes.
- 25
- 30

En la etapa de 55DAS, se investigó el efecto de la reducción de la actividad de GS1 sobre los niveles de aminoácidos y N. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3				
Concentración de aminoácidos ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ de peso seco) y proporciones (%) <sup>a</sup>				
Aminoácidos	WT	<i>gln1-4</i>	<i>gln1-3</i>	<i>gln1-3/1-4</i>
Asp	1,85 $\pm$ 0,52 (11)	4,19 $\pm$ 1,24 (10)	1,61 $\pm$ 0,31 (6)	1,07 $\pm$ 0,24 (3)
Asn	0,58 $\pm$ 0,07 (3)	6,18 $\pm$ 1,61 (15) <sup>b</sup>	1,58 $\pm$ 0,10 (6) <sup>b</sup>	11,91 $\pm$ 1,60 (29) <sup>b</sup>
Glu	1,03 $\pm$ 0,15 (6)	2,27 $\pm$ 0,22 (5) <sup>b</sup>	3,56 $\pm$ 0,55 (14) <sup>b</sup>	9,57 $\pm$ 3,88 (23) <sup>b</sup>
Gln	3,56 $\pm$ 1,01 (21)	6,85 $\pm$ 1,63 (16) <sup>c</sup>	3,57 $\pm$ 0,10 (14) <sup>c</sup>	1,96 $\pm$ 0,44 (5) <sup>c</sup>
Ala	4,80 $\pm$ 1,41 (29)	10,40 $\pm$ 1,58 (25)	4,02 $\pm$ 0,12 (16)	4,61 $\pm$ 1,59 (11)
GABA	0,11 $\pm$ 0,02 (1)	0,15 $\pm$ 0,04 (1)	0,21 $\pm$ 0,02 (1)	0,30 $\pm$ 0,08 (1)
Pro	0,86 $\pm$ 0,32 (5)	1,25 $\pm$ 0,46 (3)	1,17 $\pm$ 0,22 (5)	0,64 $\pm$ 0,09 (2)
Otros	3,88 $\pm$ 0,67 (23)	10,63 $\pm$ 1,61 (25)	9,50 $\pm$ 0,51 (37)	10,90 $\pm$ (27)
Total	16,67 $\pm$ 3,66 (100)	41,92 $\pm$ 7,20 (100)	25,22 $\pm$ 0,6 (100) <sup>b</sup>	40,96 $\pm$ 4,73 (100) <sup>b</sup>
N total (%)	2,43 $\pm$ 0,16	2,84 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>	2,80 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	2,77 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Los valores son la media de tres plantas  $\pm$  desviación típica. Las proporciones relativas de aminoácidos se dan entre paréntesis.

<sup>b</sup>Cambios significativos en el contenido de aminoácidos y el contenido de N en comparación con la planta WT en el nivel de probabilidad 0,05.

<sup>c</sup>No hay cambios significativos en comparación con la planta WT

5 En contraste con la EV, en la etapa de 55DAS de desarrollo de la planta, hubo un marcado aumento en el contenido total de aminoácidos de las hojas de las tres plantas mutantes. Este aumento se debe en parte a un aumento en el contenido de Asn y Glu, que eran hasta 20 y 10 veces mayores, respectivamente, en la planta mutante *gln1-3/gln1-4*.

También se observó en las hojas de las tres plantas mutantes un aumento en la cantidad de N total.

#### Recogida de savia del xilema y floema.

10 Se obtuvieron exudados de floema utilizando la técnica descrita por King and Zeevaart (*Plant. Physiol.*, 53: 96-103, 1974). Se cortaron hojas y se recortaron bajo agua antes de la rápida inmersión en el tampón de recogida. Para cada experimento, las hojas completamente extendidas de tres plantas individuales (una WT y las tres mutantes) se colocaron por separado en una solución de Hepes 10 mM, EDTA 10 mM (ajustado a pH 7,5 con NaOH), en una cámara húmeda (humedad relativa >90 %) y en la oscuridad. Se recogieron los exudados durante 6 horas desde las 10 am hasta las 4 pm. Se midieron luego los pesos frescos de las hojas y los exudados se conservaron a -80°C. Los exudados del floema (en la solución de EDTA) se ajustaron a pH 2,1 y se centrifugaron para eliminar los residuos y el EDTA, que precipitan a ese pH.

Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4.				
Concentración de aminoácidos ( $\mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1}$ ) y proporciones (%) <sup>a</sup>				
Aminoácidos	WT	<i>gln1-4</i>	<i>gln1-3</i>	<i>gln1-3/1-4</i>
Asp	81,1 $\pm$ 10,1 (10)	43,9 $\pm$ 8,4 (13) <sup>b</sup>	60,5 $\pm$ 6,8 (16) <sup>b</sup>	46,9 $\pm$ 4,6 (14) <sup>b</sup>
Asn	21,2 $\pm$ 10,5 (3)	5,2 $\pm$ 1,3 (2) <sup>b</sup>	2,6 $\pm$ 0,4 (1) <sup>b</sup>	4,3 $\pm$ 0,4 (1) <sup>b</sup>
Glu	79,5 $\pm$ 15,1 (10) <sup>c</sup>	46,8 $\pm$ 9,5 (14) <sup>c</sup>	79,5 $\pm$ 13 (21) <sup>c</sup>	56,3 $\pm$ 6,2 (17) <sup>c</sup>
Gln	159,8 $\pm$ 42,5 (19)	70,5 $\pm$ 19,4 (21) <sup>b</sup>	66 $\pm$ 32 (18) <sup>b</sup>	67,1 $\pm$ 6,6 (20) <sup>b</sup>
Ala	85,6 $\pm$ 1,4 (4,6)	22,1 $\pm$ 4,5 (7) <sup>b</sup>	10,9 $\pm$ 12 (3) <sup>b</sup>	18,3 $\pm$ 1,2 (5) <sup>b</sup>
GABA	48,0 $\pm$ 29,1 (6)	9,2 $\pm$ 5,3 (3)	4,9 $\pm$ 2,4 (1)	4,5 $\pm$ 1,1 (1)
Pro	9,9 $\pm$ 2,1 (1)	5,2 $\pm$ 0,9 (2) <sup>b</sup>	2,8 $\pm$ 0,6 (2) <sup>b</sup>	2,8 $\pm$ 2,8 (1) <sup>b</sup>
Otros	289,7 $\pm$ 24,7 (35)	116,3 $\pm$ 9,3 (35)	136,4 $\pm$ 10,8 (38)	126,8 $\pm$ 26 (37)
Total	825 $\pm$ 28,2 (100)	329 $\pm$ 64 <sup>b</sup>	367 $\pm$ 54 (100) <sup>b</sup>	335 $\pm$ 24 (100) <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Los valores son la media de tres plantas  $\pm$  desviación típica. Las proporciones relativas de aminoácidos se dan entre paréntesis.

<sup>b</sup>Cambios significativos en el contenido de aminoácidos en comparación con la planta WT en el nivel de probabilidad 0,05.

<sup>c</sup>No hay cambios significativos en comparación con la planta WT

- 5 El análisis de la composición de la savia del floema en la EV reveló que en las tres plantas mutantes hubo una disminución general en la concentración de todos los principales aminoácidos excepto Glu. Esta disminución fue de aproximadamente 2 veces para Asp, Gln, Pro y al menos 4 veces para Asn y Ala. Sin embargo, las proporciones relativas de los aminoácidos no se modificaron marcadamente, excepto para Glu, para el que se observó un ligero aumento. No se observaron cambios marcados en el contenido de los aminoácidos libres de las cariópsides, excepto una disminución de 2 veces en Asn en las plantas mutantes, lo que representaba alrededor de 14% del total en la planta WT (datos no mostrados).
- 10 Con el fin de determinar si las raíces fueron capaces de proporcionar suficiente N que se asimilara a los brotes en las tres plantas mutantes, se analizó la composición de aminoácidos de la savia del xilema. Para la recogida de la savia del xilema, se cortaron tallos de plantas a 2 cm por encima del sistema de la raíz, y el tallo cortado se lavó con agua y se secó con papel secante. La savia que sangra por presión de la raíz (alrededor de 200 a 400  $\mu\text{L}$  por planta) se recogió con una micropipeta y las muestras se conservaron inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se realizó un análisis de
- 15 aminoácidos como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5				
Concentración de aminoácidos ( $\mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1}$ ) y proporciones (%) <sup>a</sup>				
Aminoácidos	WT	<i>gln1-4</i>	<i>gln1-3</i>	<i>gln1-3/1-4</i>
Asp	13,8 $\pm$ 7,8 (7,8)	n/d <sup>c</sup>	19,8 $\pm$ 2,8 (17,1)	13,6 $\pm$ 7,0 (9,1)
Asn	57,0 $\pm$ 18,5 (32,1)		18,0 $\pm$ 4,2 (15,5) <sup>b</sup>	38 $\pm$ 13,6 (25,5) <sup>b</sup>
Glu	5,6 $\pm$ 2,5 (3,1)		2,2 $\pm$ 0,4 (1,8) <sup>b</sup>	4,6 $\pm$ 1,8 (3,0) <sup>b</sup>
Gln	42,4 $\pm$ 8,5 (23,9)		32,6 $\pm$ 3,2 (28,1) <sup>b</sup>	35,6 $\pm$ 1,6 (23,8) <sup>b</sup>
Ala	8,2 $\pm$ 1,4 (4,6)		1,0 $\pm$ 2 (0,8)	9,2 $\pm$ 2,8 (6,1)
GABA	1,0 $\pm$ 0,6 (0,5)		0,2 $\pm$ 0,4 (0,2)	1,4 $\pm$ 1,0 (0,9)
Pro	0 $\pm$ (0)		0 $\pm$ (0)	0 $\pm$ (0)
Otros	49,4 $\pm$ 11,4 (28)		42,4 $\pm$ 4,4 (36,5)	46,6 $\pm$ (31,6)
Total	177,4 $\pm$ 8,9 (100)		116,2 $\pm$ 2,0 (100)	149,0 $\pm$ 7,3 (100)

<sup>a</sup>Los valores son la media de tres plantas  $\pm$  desviación típica. Las proporciones relativas de aminoácidos se dan entre paréntesis.

<sup>b</sup>No hay cambios significativos en el contenido de aminoácidos en comparación con la planta WT en el nivel de probabilidad 0,05

<sup>c</sup>No disponible

5 Se observó una ligera disminución en la concentración total de aminoácidos de la savia del xilema en la EV en particular en la planta mutante *gln1-3*, principalmente debido a una disminución de Asn, el aminoácido más abundante en la savia del xilema. Sin embargo, esta disminución no fue significativa. Curiosamente, la cantidad de Gln, que es casi tan abundante como Asn, no se modificó significativa en las plantas mutantes en comparación con la planta WT.

### Ejemplo 5: Sobreexpresión de GS1

#### Transformación, regeneración y caracterización de plantas

10 La transformación de maíz de la línea endógama A188 con *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 que aloja un plásmido superbinario se realizó esencialmente como ha sido descrito por Ishida et al. (*Nat. Biotechnol.*, 14: 745-750, 1996). En particular, la composición de todos los medios citados de aquí en adelante se detalla en esta referencia. El protocolo se modificó ligeramente en relación con el marcador selectivo, que era el gen NPTII en lugar del gen *bar*.

#### Plásmido superbinario pRec 445

15 El plásmido superbinario usado para la transformación fue el resultado de una recombinación entre el plásmido pBIOS 445 y el plásmido pSB1 (que aloja los genes *virB* y *virG* aislados de la cepa A281 supervirulenta) dentro de la cepa de *Agrobacterium* LBA4404 (pSB1) (Komari et al., *Plant J.*, 10: 165-74, 1996) que forma el plásmido pRec 445. El pBIOS 445 es un derivado de pSB11 (Komari et al., antes citados, 1996) que aloja entre los bordes del T-DNA, un casete de resistencia a la neomicina (gen NPTII) (Bevan et al., *Biotechnol.*, 24: 367-70, 1992; Berg and Berg, *Biotechnol.*, 1: 417-435, 1983) flanqueado por un promotor de actina (McElroy et al., *Plant Cell*, 2(2): 163, 1990) y el terminador 3'Nos (Depicker et al., *J. Mol. Appl. Genet.*, 1: 561-73, 1982) y el cDNA de *Gln1-3* (Sakakibara et al., antes citados, 1992) flanqueado por el promotor del virus del mosaico de las nervaduras de la mandioca (pCsVMV) (Verdaguer et al., *Plant. Mol. Biol.*, 6: 1129-1139, 1996) unido a un intrón de actina (McElroy et al., antes citados,

1990), y el terminador 3'Nos. La cepa de *Agrobacterium* resultante utilizada para la transformación fue LB4404 (pRec 445).

pRec 445 está esquematizado en la Figura 7:

- RB y LB representan los bordes derecho e izquierdo del T-DNA.
- 5     – *Ds(3'Ac)* y *Ds(5'Ac)* representan el elemento transponible *Ds* utilizado para eliminar adicionalmente el marcador de selección que confiere resistencia a la kanamicina.
- *NptII* es el gen de neomicina-fosfotransferasa con el promotor de actina y el intrón de *actina* y el terminador de la nopalina-sintetasa (3'Nos) que confiere resistencia a la kanamicina.
- 10    – Un intrón de actina está colocado entre el cDNA de *Gln1-3* de maíz y el promotor de CsVMV. Los bordes extras LB y RB, el 3'Nos, el *Gln1-3* y el intrón de actina se utilizaron como sondas para determinar el patrón de los episodios de inserción de la construcción en las líneas de maíz transgénicas.

### Plantas transgénicas

La transformación de plantas se realizó utilizando embriones de maíz inmaduros aislados a los 10 días después de la polinización. Los embriones inmaduros se incubaron durante 5 minutos con *A. tumefaciens* y se cultivaron durante 15 3 días en un medio LSA sin selección de antibióticos, en la oscuridad a 25°C. Después de la transferencia al medio LSD5, se contra-seleccionó *A. tumefaciens* por la presencia de 250 mg  $\mu\text{L}^{-1}$  de cefotaxima, y los callos transformados se seleccionaron por la presencia de 50 mg  $\mu\text{L}^{-1}$  de kanamicina. Después de 2 semanas de cultivo, los callos en desarrollo se transfirieron a medio LSD10 que contenía 50 mg  $\mu\text{L}^{-1}$  de kanamicina y se dejaron crecer durante 3 semanas. Los callos de tipo I se extirparon y se cultivaron durante otras 3 semanas en kanamicina. Para la 20 regeneración, los callos de tipo I bien desarrollados se cultivaron en un medio LSZ a 22°C bajo presión selectiva continua y en kanamicina. Después de 2 semanas, los callos que llevaban brotes se transfirieron a medio RMG2 y se cultivaron otras 2 semanas para permitir el desarrollo de las raíces antes de la transferencia de las plántulas al suelo y la aclimatación gradual a la humedad ambiental. Las plantas se cultivaron luego en un invernadero (18°C-24°C) y se autofecundaron o polinizaron con la línea A188 para producir semillas.

25 Se seleccionó un número de líneas transgénicas y se analizó el patrón de inserción de la construcción pCsVMV-Gln1-3. Después de la digestión del DNA genómico con NcoI, se realizó la hibridación con: cDNA de Gln1-3, intrón de actina y sondas 3'Nos con el fin de determinar el número de copias de T-DNA. Además, se diseñaron dos sondas en el plásmido pRec 445 solapando cada una los dos bordes RB y LB del T-DNA con el fin de comprobar la 30 eventual presencia de la secuencia del plásmido externa al T-DNA (véase la Figura 7 para la posición de las sondas). En dos transformantes primarios (línea 1 y línea 9), se detectó un único episodio de inserción sin la presencia de secuencias de T-DNA adicionales, aparte de las que flanquean el inserto que contiene el pCsVMV-Gln1-3 y las construcciones quiméricas pActina-NPTII (datos no mostrados). Estos dos transformantes primarios se cruzaron con la línea FV2, que contenía el alelo desfavorable para Gln1-3 (Hirel et al., antes citados, 2001). Los transformantes T1 se seleccionaron luego y se retro-cruzaron tres veces con la línea FV2. En la generación T4 que 35 contenía 50% de transgénicos, se utilizaron 50% de segregantes nulos para las líneas 1 y la línea 9 como plantas de control no transformadas y se denominaron WT1 y WT9 respectivamente.

El cDNA que codifica *Gln1-3* se hizo constitutivo fusionándolo con el promotor CsVMV. Después de selección y regeneración, seguidas de tres retro-cruzamientos con la línea FV2, se seleccionaron para su posterior análisis dos 40 plantas transgénicas T4 (línea 1 y línea 9) que sobreexpresaban *Gln1-3* y los segregantes nulos correspondientes (WT1 y WT9).

Estas plantas de maíz fueron cultivadas bajo condiciones subóptimas de N en una solución nutriente que contenía  $\text{NO}_3^-$  10 mM y se recolectaron en su madurez. Las mazorcas de segregantes nulos sin transformar de plantas WT (WT1 y WT9) y las líneas transgénicas de T4 (línea 1 y línea 9) que sobreexpresaban el cDNA de *Gln1-3* se muestran en la Figura 8.

45 Debe observarse que las mazorcas de las plantas WT no transformadas eran menores en comparación con las de los segregantes nulos no transformados (WT) que se muestran en la Figura 6, para comparar el fenotipo de las plantas mutantes debido a que la línea FV2 Europea produce menos cariósides que la línea B73 norteamericana, utilizadas para la generación de plantas de maíz transgénicas.

### Caracterización de las plantas transgénicas

50 El impacto de la sobreexpresión de *Gln1-3* sobre el fenotipo de la planta y la producción de cariósides se determinó sobre plantas cultivadas en un invernadero hasta la madurez en condiciones de alimentación de N subóptimas.

### Composición de la subunidad de GS

La composición de la subunidad de GS de hojas en la EV de los dos segregantes nulos no transformados (WT1 y WT9) y las dos líneas transgénicas (línea 1 y línea 9) se examinó por análisis de transferencia de Western usando los anticuerpos del tabaco que reconocen la GS1 y la GS2. Los resultados se muestran en la Figura 9.

Leyenda de la figura 9:

- 5 La banda superior (masa molecular 44 kD) corresponde a la subunidad de GS plastídica (GS2) y la banda inferior (masa molecular 39 kD) corresponde a la subunidad de la GS citosólica (GS1).

Un aumento en la cantidad de la proteína GS1 fue claramente visible en los extractos proteicos de las dos plantas transformadas, siendo notablemente mayor la de la línea 9. Cuando las proteínas GS se analizaron en las hojas a los 55DAS, se obtuvo un patrón similar de aumento en el contenido de proteína GS1 (datos no mostrados).

10 **Rendimiento de brotes y granos en relación con la actividad de la GS**

Se determinó el rendimiento de brotes y granos en relación con la actividad de la GS de los dos segregantes nulos no transformados (WT1 y WT9) y las dos líneas transgénicas (línea 1 y línea 9). Los resultados se muestran en la Figura 10.

Leyenda de la figura 10:

- 15 A = actividad total de la GS en las hojas

B = rendimiento de las cariósides

C = peso en seco total de las partes vegetativas de los brotes

D = diagramas de dispersión entre la actividad de la GS en las hojas (abscisas) y rendimiento de las cariósides (ordenadas)

20

En comparación con los dos segregantes nulos no transformados, se observó un aumento de dos y tres veces de la actividad total de la GS en las hojas en las líneas 1 y 9, respectivamente (Figura 10A).

- 25 Se observó un aumento significativo en el rendimiento de las cariósides, que cuando se comparaba con las dos plantas WT de control correspondientes fue aproximadamente 30%, tanto para la línea 1 como para la línea la 9 (Figura 10B), confirmando de este modo el fenotipo mostrado en la Figura 8. El número de cariósides fue el componente del rendimiento que era principalmente responsable del aumento en la producción de cariósides, como se muestra a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6				
	Rendimiento de granos (g)	Número de granos	Peso de mil cariósides (g)	Contenido en N de los granos (% en peso seco)
WT (línea F2)	26,05 ± 3,5 (100)	102,5 ± 17,4 (100)	259,9 ± 8,2 (100)	2,16 ± 0,02 (100)
CsVMV-Gln1-3	36,9 ± 3,8 (142) <sup>a</sup>	127,9 ± 13,6 (125) <sup>a</sup>	276,9 ± 6,7 (106)	2,19 ± 0,06 (101)

Cada valor es la media ± error típico obtenido a partir de seis plantas individuales.

Los valores indicados entre paréntesis se expresan como porcentaje del valor en la planta WT (la media de las dos líneas transgénicas y de los segregantes nulos correspondientes)

- 30 Se calcularon la regresión lineal y el coeficiente de correlación resultante para el nivel de actividad de la GS en las hojas frente al rendimiento de los granos en los dos segregantes nulos no transformados y las dos líneas transgénicas. La Figura 10D muestra que hay una fuerte relación entre la actividad de la GS en las hojas y el rendimiento de los granos ( $r^2$  0,91), lo que indica que el aumento en el rendimiento es proporcional al aumento de la actividad de la enzima.

En contraste, no se observaron diferencias significativas en la producción de materia seca de los brotes entre las dos plantas WT de control y las dos líneas transgénicas (Figura 10C).

**Ejemplo 6: Sobreexpresión de la GS1 en las células de la vaina del haz y del mesófilo de las hojas.**

5 Como se describe en el ejemplo 5, la expresión de GS1-3 a partir del promotor pCsVMV da como resultado un aumento significativo de la actividad de la GS en plantas transformadas y mejora el rendimiento agronómico. Sin embargo, la expresión de pCsVMV está confinada en gran parte a las células del mesófilo, por lo tanto la expresión de la GS-1 en las hojas de plantas de maíz transformadas puede ser optimizada aún más por el uso de promotores que dirigen la expresión de alto nivel, tanto en las células del mesófilo como de la vaina del haz. Una estrategia alternativa, descrita a continuación, consiste en transformar el maíz con un T-DNA que expresa GS1-3 bajo el control del promotor pCsVMV, junto con GS1-4 bajo el control de un promotor específico de las células de la vaina del haz, tal como el promotor *rbcS* de maíz (Katayama et al., antes citados, 2000), con el fin de obtener plantas de maíz transgénicas que expresan la GS1-3 en el mesófilo y la GS1-4 en las células de la vaina del haz. Se espera que los rendimientos de granos se mejoren en dichas plantas transgénicas, tanto en condiciones limitantes como no limitantes de N.

15 **Transformación, regeneración y caracterización de plantas**

La transformación de maíz de la línea endógama A188 con *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 que aloja un plásmido superbinario se realizó esencialmente como se ha descrito por Ishida et al. (antes citados, 1996). En particular, la composición de todos los medios citados de aquí en adelante está detallada en esta referencia. La única modificación se refiere el marcador selectivo, que es el gen NPTII en el presente ejemplo, en lugar del gen *bar* utilizado por Ishida et al.

**Plásmido superbinario pRec 445+**

25 El plásmido superbinario usado para la transformación es el resultado de una recombinación entre el plásmido pBIOS 445+ y el plásmido pSB1 (que aloja los genes *virB* y *virG* aislados de la cepa A281 supervirulenta) dentro de la cepa LBA4404 de *Agrobacterium* (pSB1) (Komari et al., antes citados, 1996) que forma el plásmido pRec 445. El pBIOS 445+ es idéntico a pBIOS 445 (ejemplo 5), excepto que también contiene entre los bordes del T-DNA, un promotor *rbcS* del maíz (Katayama et al., antes citados, 2000) unido al cDNA de la *Gln1-4* y a un terminador Nos. La cepa de *Agrobacterium* resultante utilizada para la transformación fue LB4404 (pRec 445+).

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> GENOPLANTE-VALOR HIREL, Bertrand PEREZ, Pascual	
	<120> Mejora de la productividad de los cariósides de plantas por la modulación de la actividad de la glutamina-sintetasa	
10	<130> MJP/XRN/mad1516-31-WO	
	<150> EP 06 291 570.7 <151> 09-10-2006	
15	<160> 10	
	<170> PatentIn versión 3.3	
20	<210> 1 <211> 1317 <212> DNA <213> Zea mays	
25	<220> <221> CDS <222> (63)..(1133)	
	<400> 1	
	caatcccaca ccaccaccac ctctctccggt ccccaacccc tgtcgcaccg cagccgcccg	60
	cc atg gcc tgc ctc acc gac ctc gtc aac ctc aac ctc tgc gac acc	107
	Met Ala Cys Leu Thr Asp Leu Val Asn Leu Asn Leu Ser Asp Thr	
	1 5 10 15	
	acc gag aag atc atc gcg gaa tac ata tgg atc ggt gga tct ggc atg	155
	Thr Glu Lys Ile Ile Ala Glu Tyr Ile Trp Ile Gly Gly Ser Gly Met	
	20 25 30	
	gat ctc agg agc aaa gca agg acc ctc tcc ggc ccg gtg acc gat ccc	203
	Asp Leu Arg Ser Lys Ala Arg Thr Leu Ser Gly Pro Val Thr Asp Pro	
	35 40 45	
	agc aag ctg ccc aag tgg aac tac gac ggc tcc agc acg ggc cag gcc	251
	Ser Lys Leu Pro Lys Trp Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Gly Gln Ala	
	50 55 60	
	ccc ggc gag gac agc gag gtc atc ctg tac ccg cag gcc atc ttc aag	299
	Pro Gly Glu Asp Ser Glu Val Ile Leu Tyr Pro Gln Ala Ile Phe Lys	
	65 70 75	
	gac cca ttc agg agg ggc aac aac atc ctt gtg atg tgc gat tgc tac	347
	Asp Pro Phe Arg Arg Gly Asn Asn Ile Leu Val Met Cys Asp Cys Tyr	
	80 85 90 95	
	acc cca gcc ggc gag cca atc ccc acc aac aag agg tac aac gcc gcc	395
	Thr Pro Ala Gly Glu Pro Ile Pro Thr Asn Lys Arg Tyr Asn Ala Ala	
	100 105 110	
30	aag atc ttc agc agc cct gag gtc gcc gcc gag gag ccg tgg tat ggt	443
	Lys Ile Phe Ser Ser Pro Glu Val Ala Ala Glu Glu Pro Trp Tyr Gly	

ES 2 565 098 T3

	115		120		125		
att gag cag gag tac acc ctc ctc cag aag gac acc aac tgg ccc ctt							491
Ile Glu Gln Glu Tyr Thr Leu Leu Gln Lys Asp Thr Asn Trp Pro Leu	130		135		140		
ggg tgg ccc atc ggt ggc ttc ccc ggc cct cag ggt cct tac tac tgt							539
Gly Trp Pro Ile Gly Gly Phe Pro Gly Pro Gln Gly Pro Tyr Tyr Cys	145		150		155		
gga atc ggc gcc gaa aag tcg ttc ggc cgc gac atc gtg gac gcc cac							587
Gly Ile Gly Ala Glu Lys Ser Phe Gly Arg Asp Ile Val Asp Ala His	160		165		170		175
tac aag gcc tgc ttg tat gcg ggc atc aac atc agt ggc atc aac ggg							635
Tyr Lys Ala Cys Leu Tyr Ala Gly Ile Asn Ile Ser Gly Ile Asn Gly	180		185		190		
gag gtg atg cca ggg cag tgg gag ttc caa gtc ggg cct tcc gtg ggt							683
Glu Val Met Pro Gly Gln Trp Glu Phe Gln Val Gly Pro Ser Val Gly	195		200		205		
att tct tca ggc gac cag gtc tgg gtc gct cgc tac att ctt gag agg							731
Ile Ser Ser Gly Asp Gln Val Trp Val Ala Arg Tyr Ile Leu Glu Arg	210		215		220		
atc acg gag atc gcc ggt gtg gtg gtg acg ttc gac ccg aag ccg atc							779
Ile Thr Glu Ile Ala Gly Val Val Val Thr Phe Asp Pro Lys Pro Ile	225		230		235		
ccg ggc gac tgg aac ggc gcc ggc gcg cac acc aac tac agc acg gag							827
Pro Gly Asp Trp Asn Gly Ala Gly Ala His Thr Asn Tyr Ser Thr Glu	240		245		250		255
tcg atg agg aag gag ggc ggg tac gag gtg atc aag gcg gcc atc gag							875
Ser Met Arg Lys Glu Gly Gly Tyr Glu Val Ile Lys Ala Ala Ile Glu	260		265		270		
aag ctg aag ctg cgg cac agg gag cac atc gcg gcc tac ggc gag ggc							923
Lys Leu Lys Leu Arg His Arg Glu His Ile Ala Ala Tyr Gly Glu Gly	275		280		285		
aac gac ggc cgg ctc acc ggc agg cac gag acc gcc gac atc aac acg							971
Asn Asp Gly Arg Leu Thr Gly Arg His Glu Thr Ala Asp Ile Asn Thr	290		295		300		
ttc agc tgg ggc gtg gcc aac cgc ggc gcg tcg gtg cgc gtg ggc cgg							1019
Phe Ser Trp Gly Val Ala Asn Arg Gly Ala Ser Val Arg Val Gly Arg	305		310		315		
gag acg gag cag aac ggc aag ggc tac ttc gag gac cgc cgc ccg gcg							1067
Glu Thr Glu Gln Asn Gly Lys Gly Tyr Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ala	320		325		330		335
tcc aac atg gac ccc tac gtg gtc acc tcc atg atc gcc gag acc acc							1115
Ser Asn Met Asp Pro Tyr Val Val Thr Ser Met Ile Ala Glu Thr Thr	340		345		350		
atc atc tgg aag ccc tga gcgcgcggc cgttgcttg caggggtcccc							1163
Ile Ile Trp Lys Pro	355						
gaagcgattg caaagccact gttccttccg ttctgtttgc ttattattgt tattatctag							1223
ctagatcctc cggggtcagg tcgtcgtggt gtgccaaaac agaacacaga aagaggaaga							1283
agaaaaaaaa aacaagacgt gtggcgttta tggt							1317

ES 2 565 098 T3

<210> 2  
 <211> 356  
 <212> PRT  
 <213> Zea mays

5

<400> 2  
 Met Ala Cys Leu Thr Asp Leu Val Asn Leu Asn Leu Ser Asp Thr Thr  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Ile Ile Ala Glu Tyr Ile Trp Ile Gly Gly Ser Gly Met Asp  
 20 25 30  
 Leu Arg Ser Lys Ala Arg Thr Leu Ser Gly Pro Val Thr Asp Pro Ser  
 35 40 45  
 Lys Leu Pro Lys Trp Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Gly Gln Ala Pro  
 50 55 60  
 Gly Glu Asp Ser Glu Val Ile Leu Tyr Pro Gln Ala Ile Phe Lys Asp  
 65 70 75 80  
 Pro Phe Arg Arg Gly Asn Asn Ile Leu Val Met Cys Asp Cys Tyr Thr  
 85 90 95  
 Pro Ala Gly Glu Pro Ile Pro Thr Asn Lys Arg Tyr Asn Ala Ala Lys  
 100 105 110  
 Ile Phe Ser Ser Pro Glu Val Ala Ala Glu Glu Pro Trp Tyr Gly Ile  
 115 120 125  
 Glu Gln Glu Tyr Thr Leu Leu Gln Lys Asp Thr Asn Trp Pro Leu Gly  
 130 135 140  
 Trp Pro Ile Gly Gly Phe Pro Gly Pro Gln Gly Pro Tyr Tyr Cys Gly  
 145 150 155 160  
 Ile Gly Ala Glu Lys Ser Phe Gly Arg Asp Ile Val Asp Ala His Tyr  
 165 170 175  
 Lys Ala Cys Leu Tyr Ala Gly Ile Asn Ile Ser Gly Ile Asn Gly Glu  
 180 185 190  
 Val Met Pro Gly Gln Trp Glu Phe Gln Val Gly Pro Ser Val Gly Ile  
 195 200 205  
 Ser Ser Gly Asp Gln Val Trp Val Ala Arg Tyr Ile Leu Glu Arg Ile  
 210 215 220  
 Thr Glu Ile Ala Gly Val Val Val Thr Phe Asp Pro Lys Pro Ile Pro  
 225 230 235 240

ES 2 565 098 T3

Gly Asp Trp Asn Gly Ala Gly Ala His Thr Asn Tyr Ser Thr Glu Ser  
 245 250 255  
 Met Arg Lys Glu Gly Gly Tyr Glu Val Ile Lys Ala Ala Ile Glu Lys  
 260 265 270  
 Leu Lys Leu Arg His Arg Glu His Ile Ala Ala Tyr Gly Glu Gly Asn  
 275 280 285  
 Asp Gly Arg Leu Thr Gly Arg His Glu Thr Ala Asp Ile Asn Thr Phe  
 290 295 300  
 Ser Trp Gly Val Ala Asn Arg Gly Ala Ser Val Arg Val Gly Arg Glu  
 305 310 315 320  
 Thr Glu Gln Asn Gly Lys Gly Tyr Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ala Ser  
 325 330 335  
 Asn Met Asp Pro Tyr Val Val Thr Ser Met Ile Ala Glu Thr Thr Ile  
 340 345 350  
 Ile Trp Lys Pro  
 355

5 <210> 3  
 <211> 1490  
 <212> DNA  
 <213> Zea mays

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (85)..(1152)

<400> 3  
 ccacatcctc cctcattcc tccttgggtt ccagcccgt gcgcccgcc tgtgcagtg 60  
 ccagtcgctc cgcagccgcc ggcc atg gcc tgc ctc acc gac ctc gtc aac 111  
 Met Ala Cys Leu Thr Asp Leu Val Asn  
 1 5  
 ctc aac ctc tcg gac acc aca gag aag atc atc gcc gag tac ata tgg 159  
 Leu Asn Leu Ser Asp Thr Thr Glu Lys Ile Ile Ala Glu Tyr Ile Trp  
 10 15 20 25  
 atc ggt gga tct ggc atg gat ctc agg agc aaa gcc agg acc ctc ccg 207  
 Ile Gly Gly Ser Gly Met Asp Leu Arg Ser Lys Ala Arg Thr Leu Pro  
 30 35 40  
 ggc ccg gtg acc gat ccc agc aag ctg ccc aag tgg aac tac gac ggc 255  
 Gly Pro Val Thr Asp Pro Ser Lys Leu Pro Lys Trp Asn Tyr Asp Gly  
 45 50 55  
 tcc agc acc ggc cag gcc ccc ggc gag gac agc gag gtc atc ctg tac 303  
 Ser Ser Thr Gly Gln Ala Pro Gly Glu Asp Ser Glu Val Ile Leu Tyr  
 60 65 70  
 ccg cag gcc atc ttc aag gac cca ttc agg agg ggc aac aac atc ctt 351  
 Pro Gln Ala Ile Phe Lys Asp Pro Phe Arg Arg Gly Asn Asn Ile Leu  
 75 80 85

15

ES 2 565 098 T3

gtc atg tgc gat tgc tac acc cca gct ggc gag cca att ccc acc aac	399
Val Met Cys Asp Cys Tyr Thr Pro Ala Gly Glu Pro Ile Pro Thr Asn	
90 95 100 105	
aag agg tac agc gcc gcc aag atc ttc agc agc cct gag gtc gct gcc	447
Lys Arg Tyr Ser Ala Ala Lys Ile Phe Ser Ser Pro Glu Val Ala Ala	
110 115 120	
gag gag ccc tgg tat ggt atc gag cag gag tac acc ctc ctt cag aag	495
Glu Glu Pro Trp Tyr Gly Ile Glu Gln Glu Tyr Thr Leu Leu Gln Lys	
125 130 135	
gac acc aac tgg ccc ctc ggg tgg cct att ggc ggc ttc cct gcc cct	543
Asp Thr Asn Trp Pro Leu Gly Trp Pro Ile Gly Gly Phe Pro Gly Pro	
140 145 150	
cag ggt cct tac tac tgt gga atc ggc gcg gag aaa tcg ttc ggg cgt	591
Gln Gly Pro Tyr Tyr Cys Gly Ile Gly Ala Glu Lys Ser Phe Gly Arg	
155 160 165	
gac ata gtc gac gcc cac tac aag gcc tgc ctg tac gca gcc atc aac	639
Asp Ile Val Asp Ala His Tyr Lys Ala Cys Leu Tyr Ala Gly Ile Asn	
170 175 180 185	
atc agt ggc atc aac ggg gag gtc atg ccg ggg cag tgg gag ttc cag	687
Ile Ser Gly Ile Asn Gly Glu Val Met Pro Gly Gln Trp Glu Phe Gln	
190 195 200	
gtc gga ccg tcc gtc ggc atc tct tcg ggc gat cag gtg tgg gtt gct	735
Val Gly Pro Ser Val Gly Ile Ser Ser Gly Asp Gln Val Trp Val Ala	
205 210 215	
cgc tac att ctt gag agg atc acc gag atc gcc ggc gtg gtg gtg acg	783
Arg Tyr Ile Leu Glu Arg Ile Thr Glu Ile Ala Gly Val Val Val Thr	
220 225 230	
ttc gac ccg aag ccg atc ccg ggc gac tgg aac ggc gcg gcc gcc cac	831
Phe Asp Pro Lys Pro Ile Pro Gly Asp Trp Asn Gly Ala Gly Ala His	
235 240 245	
acc aac tac agc acc gag tcc atg agg aag gag ggc ggg tac gag gtg	879
Thr Asn Tyr Ser Thr Glu Ser Met Arg Lys Glu Gly Gly Tyr Glu Val	
250 255 260 265	
atc aag gcg gcc atc gag aag ctg aag ctg ccg cac aag gag cac atc	927
Ile Lys Ala Ala Ile Glu Lys Leu Lys Leu Arg His Lys Glu His Ile	
270 275 280	
gcg gcc tac ggc gag ggc aac gag cgc ccg ctc acc gcc agg cac gag	975
Ala Ala Tyr Gly Glu Gly Asn Glu Arg Arg Leu Thr Gly Arg His Glu	
285 290 295	
acc gcc gac atc aac acc ttc agc tgg gga gtc gcc aac cgt gcc gcg	1023
Thr Ala Asp Ile Asn Thr Phe Ser Trp Gly Val Ala Asn Arg Gly Ala	
300 305 310	
tcg gtg gcc gtg ggc cag acg gag cag aac gcc aag gcc tac ttc gag	1071
Ser Val Ala Val Gly Gln Thr Glu Gln Asn Gly Lys Gly Tyr Phe Glu	
315 320 325	

ES 2 565 098 T3

gac cgc cgg ccg gcg tcc aac atg gat ccc tac gtg gtc acc tcc atg 1119  
 Asp Arg Arg Pro Ala Ser Asn Met Asp Pro Tyr Val Val Thr Ser Met  
 330 335 340 345

atc gcc gag acc acc atc gtc tgg aag ccc tga ggcaccccggt ggccgtgtcg 1172  
 Ile Ala Glu Thr Thr Ile Val Trp Lys Pro  
 350 355

tgtcggtttg ctccgcgtac ggcgctggcc gttgcatcgc agggcccagc ggttgcgcaa 1232

ctattttccc ttccccgttc cgtttgcttg tactactact ctaccgctag tcttgcatag 1292

cattttagct agaacacaac aacagccaaa aaaaaacatt gttgcttgct tcgacttcga 1352

cgcttcccac cactagtctc attccatgcc gtccgtccac ttccttctg tgtaatcctc 1412

ctccaataat agacgtgtca tgctgcatcc tctgcattgt ataaaagaaa gtgggtgtaat 1472

ccttttgctg gcgcctcc 1490

<210> 4

<211> 355

<212> PRT

<213> Zea mays

5

<400> 4

Met Ala Cys Leu Thr Asp Leu Val Asn Leu Asn Leu Ser Asp Thr Thr  
 1 5 10 15

Glu Lys Ile Ile Ala Glu Tyr Ile Trp Ile Gly Gly Ser Gly Met Asp  
 20 25 30

Leu Arg Ser Lys Ala Arg Thr Leu Pro Gly Pro Val Thr Asp Pro Ser  
 35 40 45

Lys Leu Pro Lys Trp Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Gly Gln Ala Pro  
 50 55 60

Gly Glu Asp Ser Glu Val Ile Leu Tyr Pro Gln Ala Ile Phe Lys Asp  
 65 70 75 80

Pro Phe Arg Arg Gly Asn Asn Ile Leu Val Met Cys Asp Cys Tyr Thr  
 85 90 95

Pro Ala Gly Glu Pro Ile Pro Thr Asn Lys Arg Tyr Ser Ala Ala Lys  
 100 105 110

Ile Phe Ser Ser Pro Glu Val Ala Ala Glu Glu Pro Trp Tyr Gly Ile  
 115 120 125

Glu Gln Glu Tyr Thr Leu Leu Gln Lys Asp Thr Asn Trp Pro Leu Gly  
 130 135 140

Trp Pro Ile Gly Gly Phe Pro Gly Pro Gln Gly Pro Tyr Tyr Cys Gly  
 145 150 155 160

Ile Gly Ala Glu Lys Ser Phe Gly Arg Asp Ile Val Asp Ala His Tyr  
 165 170 175

ES 2 565 098 T3

Lys Ala Cys Leu Tyr Ala Gly Ile Asn Ile Ser Gly Ile Asn Gly Glu  
 180 185 190

Val Met Pro Gly Gln Trp Glu Phe Gln Val Gly Pro Ser Val Gly Ile  
 195 200 205

Ser Ser Gly Asp Gln Val Trp Val Ala Arg Tyr Ile Leu Glu Arg Ile  
 210 215 220

Thr Glu Ile Ala Gly Val Val Val Thr Phe Asp Pro Lys Pro Ile Pro  
 225 230 235 240

Gly Asp Trp Asn Gly Ala Gly Ala His Thr Asn Tyr Ser Thr Glu Ser  
 245 250 255

Met Arg Lys Glu Gly Gly Tyr Glu Val Ile Lys Ala Ala Ile Glu Lys  
 260 265 270

Leu Lys Leu Arg His Lys Glu His Ile Ala Ala Tyr Gly Glu Gly Asn  
 275 280 285

Glu Arg Arg Leu Thr Gly Arg His Glu Thr Ala Asp Ile Asn Thr Phe  
 290 295 300

Ser Trp Gly Val Ala Asn Arg Gly Ala Ser Val Ala Val Gly Gln Thr  
 305 310 315 320

Glu Gln Asn Gly Lys Gly Tyr Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ala Ser Asn  
 325 330 335

Met Asp Pro Tyr Val Val Thr Ser Met Ile Ala Glu Thr Thr Ile Val  
 340 345 350

Trp Lys Pro  
 355

5 <210> 5  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Zea mays

10 <400> 5  
 Thr Leu Ser Gly Pro Val Thr Asp Pro Ser Lys  
 1 5 10

15 <210> 6  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Zea mays

20 <400> 6  
 Thr Leu Ser Gly Pro Val Thr Asp Pro Ser Lys Leu Pro Lys  
 1 5 10

25 <210> 7  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Zea mays

30 <400> 7  
 Thr Leu Pro Gly Pro Val Thr Asp Pro Ser Lys  
 1 5 10

<210> 8  
 <211> 14

ES 2 565 098 T3

<212> PRT  
<213> Zea mays

<400> 8  
5 Thr Leu Pro Gly Pro Val Thr Asp Pro Ser Lys Leu Pro Lys  
1 5 10

<210> 9  
<211> 14  
10 <212> PRT  
<213> Zea mays

<400> 9  
His Arg Glu His Ile Ala Ala Tyr Gly Glu Gly Asn Glu Arg  
1 5 10

15 <210> 10  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Zea mays

20 <400> 10  
His Lys Glu His Ile Ala Ala Tyr Gly Glu Gly Asn Glu Arg  
1 5 10

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para mejorar la productividad de las cariósides de una planta de maíz, en el que dicho método comprende sobreexpresar en dicha planta una isoenzima glutamina-sintetasa activa que tiene al menos 95% de identidad con el polipéptido de la SEQ ID NO: 2.
- 5 2. El método de la reivindicación 1, en el que la productividad de las cariósides se mejora aumentando el número de cariósides, y dicha glutamina-sintetasa es una isoenzima GS1-3 que tiene una serina en la posición 41 y una arginina en la posición 278.
3. El método de la reivindicación 2, en el que dicha glutamina-sintetasa tiene la secuencia SEQ ID NO: 2.
- 10 4. El método de la reivindicación 1, en el que la productividad de las cariósides se mejora aumentando el tamaño de las cariósides, y dicha glutamina-sintetasa es una isoenzima GS1-4 que tiene una prolina en la posición 41 y una lisina en la posición 278.
5. El método de la reivindicación 4, en el que dicha glutamina-sintetasa tiene la secuencia SEQ ID NO: 4.
- 15 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la productividad de las cariósides se mejora sobre-expresando tanto la isoenzima GS1-3 como la isoenzima GS1-4 en una misma planta, para aumentar tanto el tamaño como el número de cariósides.
7. Un casete de expresión recombinante que comprende un polinucleótido que codifica una isoenzima glutamina-sintetasa de la SEQ ID NO: 2 como se define en la reivindicación 3, o un polinucleótido que codifica una isoenzima glutamina-sintetasa de la SEQ ID NO: 4, como se define en la reivindicación 5, bajo control de un promotor heterólogo funcional en una célula vegetal.
- 20 8. Un casete de expresión recombinante, que comprende un polinucleótido que codifica una isoenzima GS1-3 activa como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, y un polinucleótido que codifica una isoenzima GS1-4 activa como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5
9. Un vector recombinante que contiene un casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8.
- 25 10. Un vector recombinante de la reivindicación 9, que comprende un polinucleótido que codifica una isoenzima GS1-3 como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, y un polinucleótido que codifica una isoenzima GS1-4 como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5.
11. Una célula hospedante que contiene un casete de expresión recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 o un vector recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10.
12. Una célula hospedante de la reivindicación 11, que es una célula vegetal, preferiblemente una célula de cereal.
- 30 13. Una célula hospedante de la reivindicación 12, que es una célula de maíz.
14. Un método para producir una planta transgénica que tiene una mejor productividad de cariósides, en el que dicho método comprende:
  - 35 - proporcionar una célula vegetal que contiene un casete de expresión recombinante que comprende un polinucleótido que codifica una isoenzima glutamina-sintetasa activa como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 bajo control de un promotor heterólogo funcional en dicha célula vegetal; y
  - regenerar a partir de dicha célula vegetal una planta transgénica que sobreexpresa dicha isoenzima-glutamina-sintetasa activa.
- 40 15. Un método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la planta transgénica es una planta de cereales transgénica, preferiblemente, una planta de trigo transgénica, una planta de arroz transgénica o una planta de maíz transgénica.
16. Una planta transgénica que sobreexpresa una isoenzima GS1-3 y/o una isoenzima GS1-4, que comprende en un transgén integrado en el genoma de la planta un casete de expresión recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8.
- 45 17. La planta transgénica de la reivindicación 16, que sobreexpresa tanto la isoenzima GS1-3 como la isoenzima GS1-4.
18. Una planta transgénica o uno de sus órganos o tejidos aislados, que comprende, integrado de manera estable en su genoma, un casete de expresión recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8.

19. La planta transgénica de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, que es una planta de maíz transgénica.

20. Semillas que contienen un casete de expresión recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, obtenidas de una planta transgénica de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19.

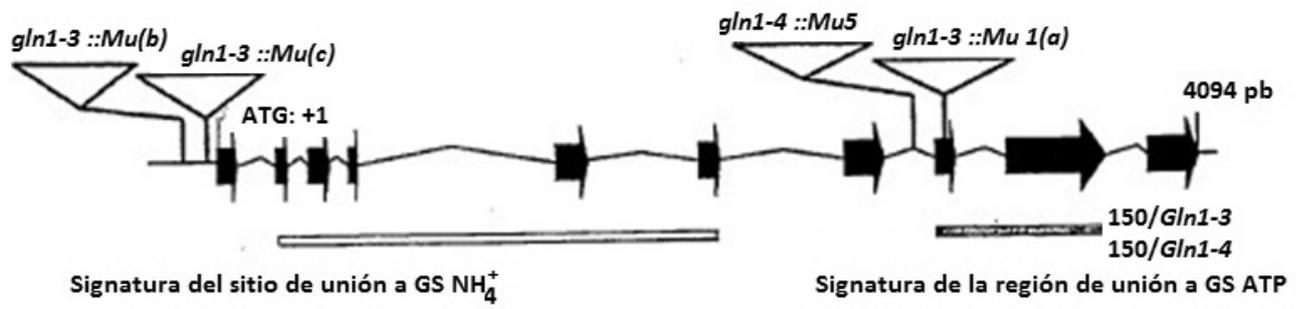


FIGURA 1

WT *gln1-4* *gln1-3* *gln1-3/1-4*

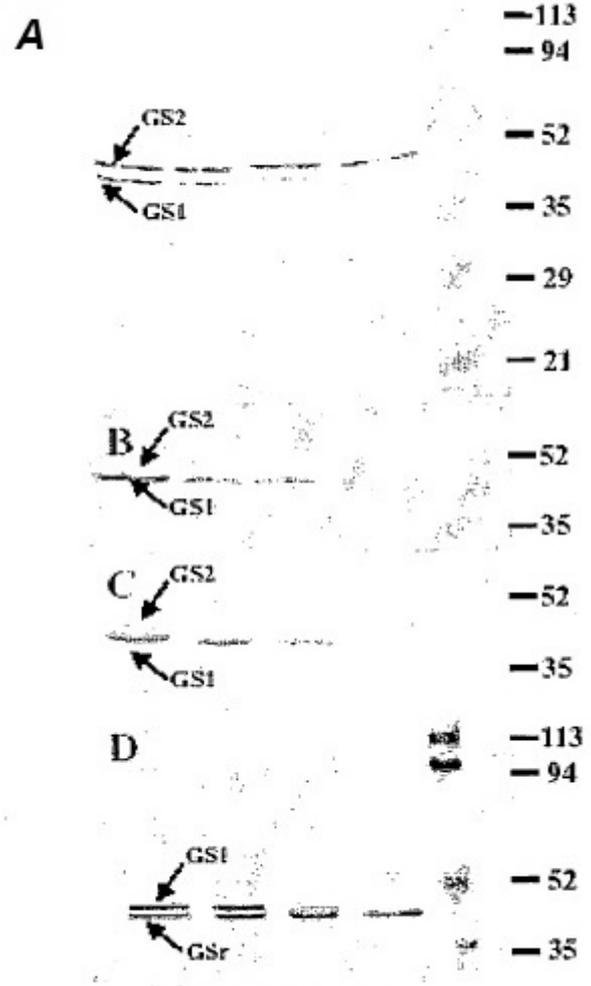
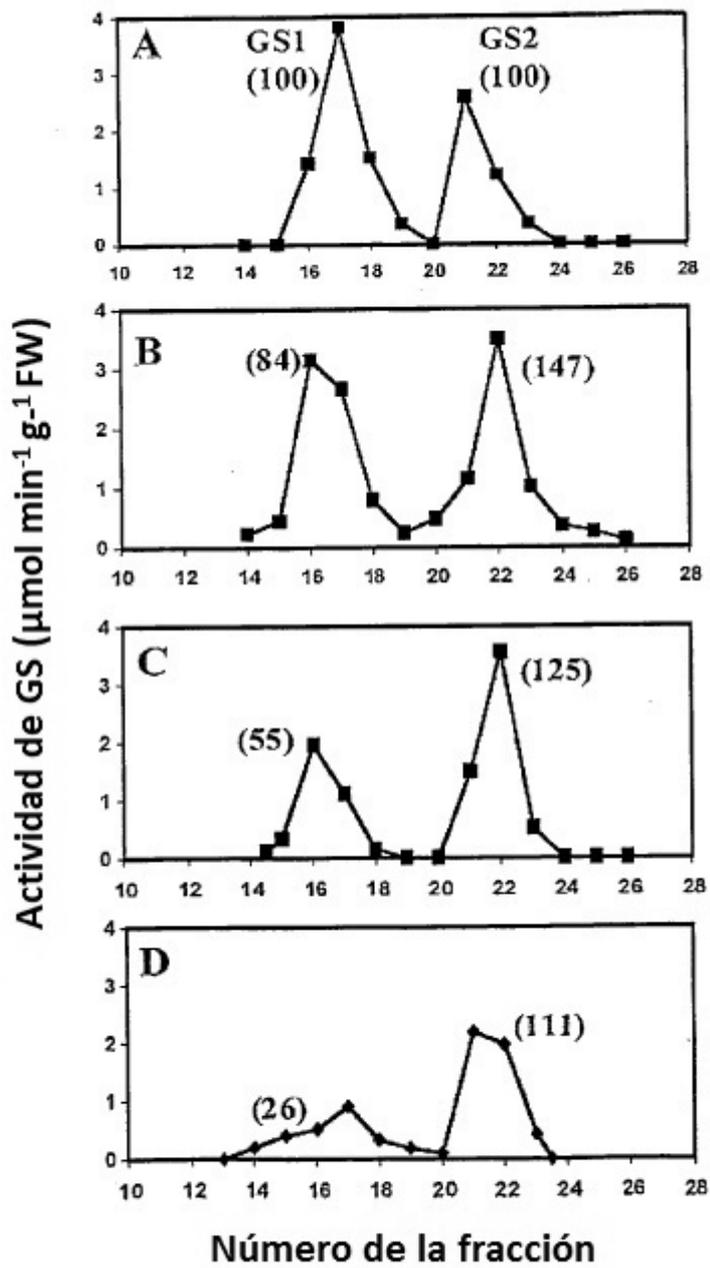


FIGURA 2



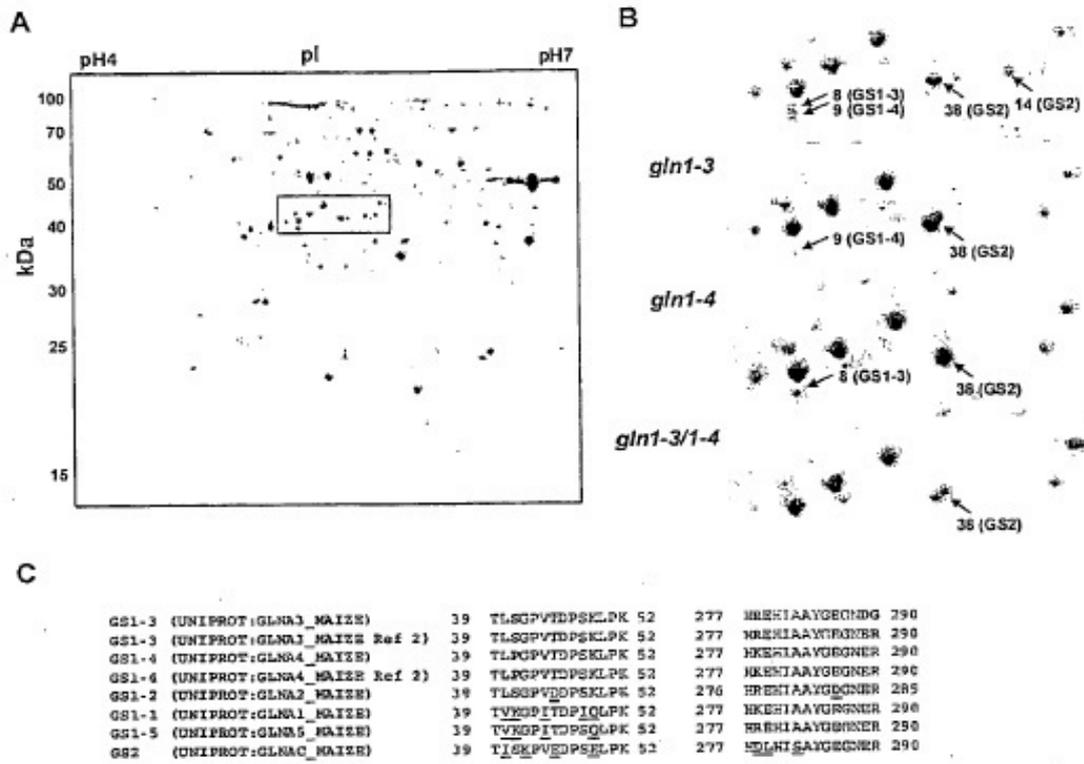


FIGURA 4

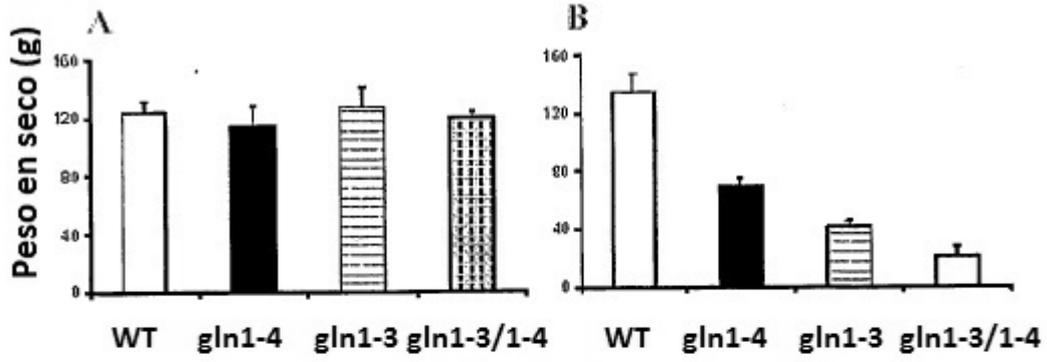


FIGURA 5

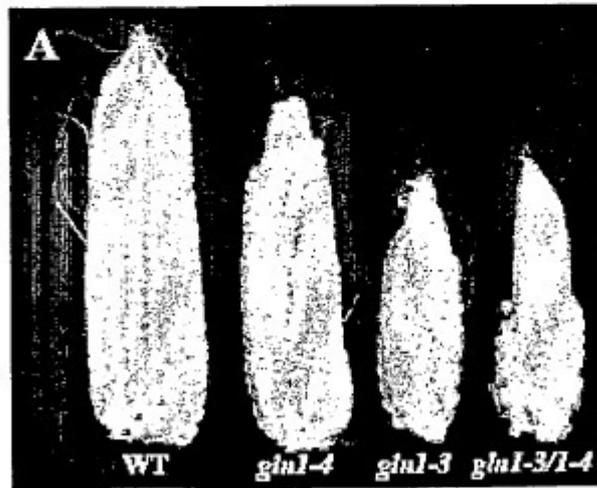


FIGURA 6

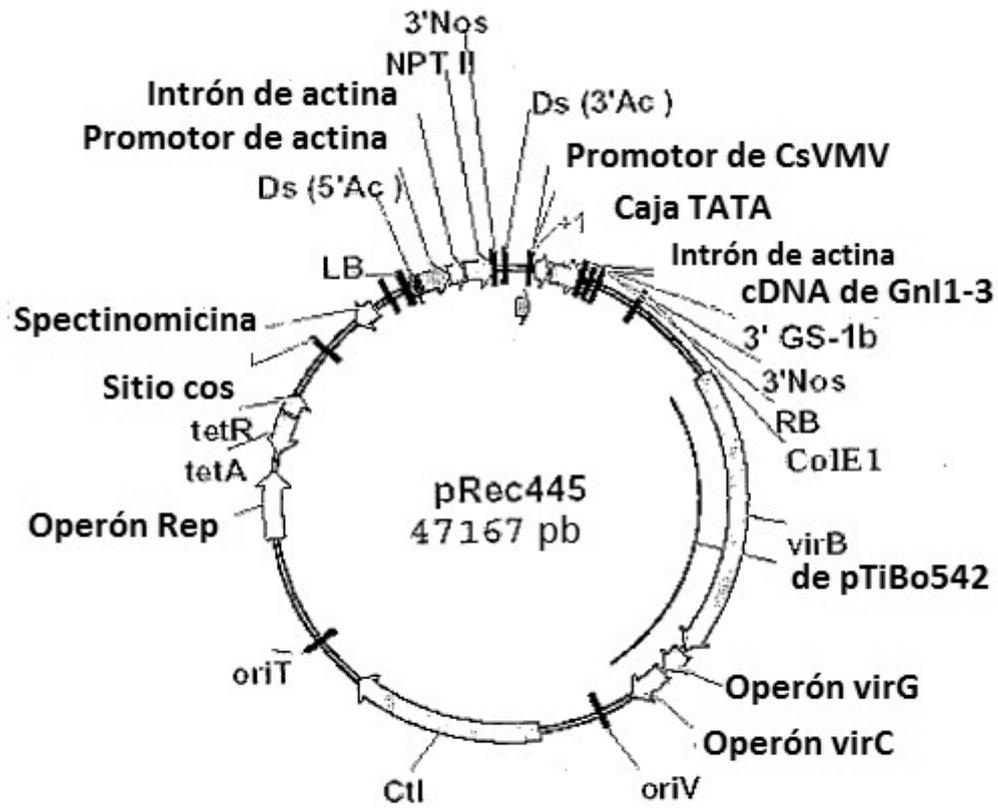


FIGURA 7

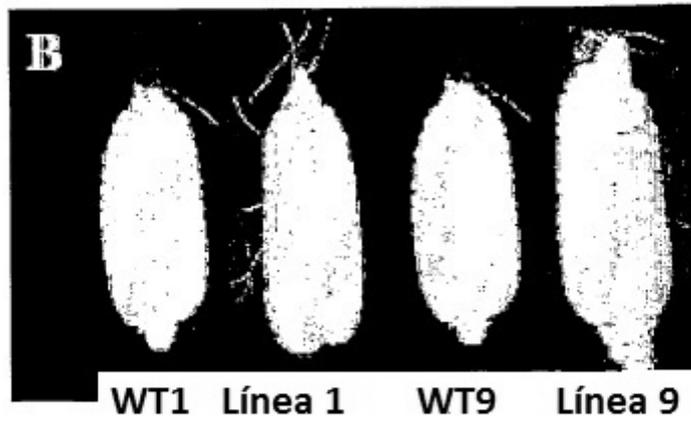


FIGURA 8

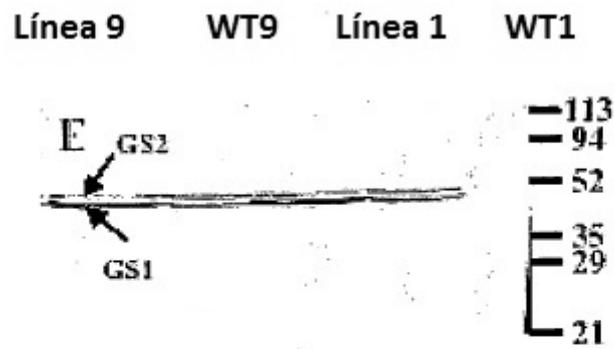


FIGURA 9

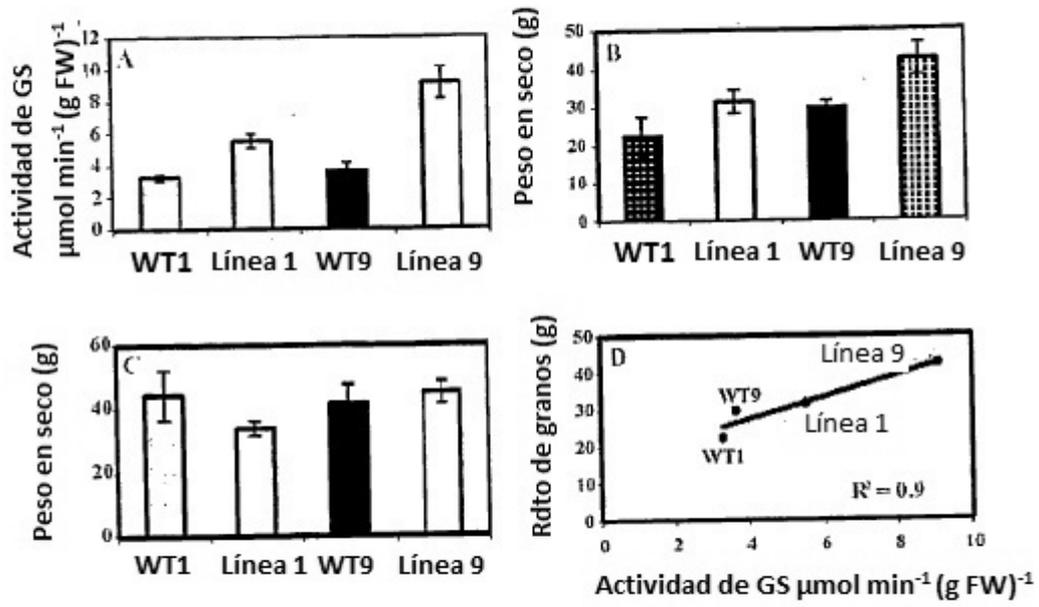


FIGURA 10