

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 710**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2010** **E 10828962 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016** **EP 2496071**

54 Título: **Plantas con mejor utilización de nitrógeno y tolerancia al estrés**

30 Prioridad:

04.11.2009 US 258075 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.05.2016

73 Titular/es:

IOWA CORN PROMOTION BOARD (100.0%)
5505 NW 88th Street Suite 100
Johnston, IA 50131, US

72 Inventor/es:

MCLAREN, JAMES;
DUCK, NICHOLAS;
HAMMER, PHILIP;
VANDE BERG, BRIAN y
SCHOUTEN, LAURA

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 571 710 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

Plantas con mejor utilización de nitrógeno y tolerancia al estrés

Campo de la invención

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente estadounidense serie No. 61/258,075 presentada el 4 de noviembre de 2009.

La invención se relaciona en términos generales con plantas que tienen mejor utilización de nitrógeno y tolerancia al estrés, más específicamente a la expresión heteróloga de una enzima de N-acetil glutamato cinasa (NAGK) insensible a arginina en plantas, lo cual incluye la sobreexpresión y caracterización enzimática de una NAGK insensible a arginina, codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1 y aislada de una cepa bacteriana que mejora la tolerancia al estrés y la captación de nitrógeno, el metabolismo, o ambos.

Antecedentes de la invención

Las plantas requieren nitrógeno durante sus fases de crecimiento vegetativo y reproductivo. El nitrógeno se hace disponible para la planta a través de mineralización del suelo, la aplicación de fertilizante de nitrógeno, o ambas. Sin embargo, se ha estimado que entre 50 y 70 por ciento de nitrógeno aplicado a los cultivos se pierde del sistema planta-suelo [Peoples, M.B. et al., "Minimizing Gaseous Losses of Nitrogen" in Nitrogen Fertilizer in the Environment (Bacon, P.E., ed.) Marcel Dekker, pp. 565-606 (1995)]. El nitrógeno es uno de los nutrientes de plantas más caro de suministrar; el fertilizante de nitrógeno no siempre está disponible a un coste razonable y una excesiva aplicación de fertilizante de nitrógeno puede dar lugar a problemas ambientales. El maíz es un ejemplo de una planta importante desde el punto de vista agronómico que requiere con frecuencia fertilizantes de nitrógeno para realizarse a su potencial genético.

En células vegetales, NAGK (N-acetil glutamato cinasa) realiza el segundo paso en una ruta biosintética que conduce a la producción de arginina. De modo importante, varias enzimas NAGK vegetales y bacterianas son conocidas por inhibirse a altas concentraciones de arginina (Bourrellier, 2009; Llacer, 2008; Lohmeier-Vogel, 2005; Fernandez-Murga, 2004), lo cual sugiere que NAGK desempeña un papel en la regulación de arginina en las plantas. De modo adicional se ha demostrado que la proteína vegetal P-II puede mitigar la inhibición con base en arginina de NAGK. P-II es conocida por desempeñar un papel clave en la regulación del flujo de carbono y de nitrógeno en las plantas (Bourrellier, 2009; Llacer, 2008).

Una estrategia para regular por incremento la ruta biosintética de arginina en plantas es reducir o eliminar la inhibición de NAGK mediante arginina. Esto puede lograrse mediante expresión heteróloga de una enzima NAGK insensible a arginina en las plantas. En este caso, describimos la sobreexpresión y caracterización enzimática de una NAGK insensible a arginina, codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:1 aislada de una cepa bacteriana.

WO 00/04168A1 divulga células vegetales transformadas con genes de NAGK exógenos; EP 1801206 A1 divulga una NAGK insensible a arginina, útil en mejorar la eficiencia de uso de nitrógeno.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a plantas transgénicas que tienen una eficiencia incrementada del uso de nitrógeno, tolerancia al estrés, o ambas, las cuales han sido transformadas usando un constructo de vector novedoso que incluye una secuencia de ácido nucleico de NAGK insensible a arginina que modula el uso de nitrógeno en plantas. La invención también se refiere a vectores aislados para transformar plantas y a anticuerpos para detectar la expresión de la secuencia de nucleótidos de interés en las plantas transformadas. La invención también se refiere a métodos de expresión en plantas de las moléculas de ácido nucleico correspondientes a las secuencias de ácido nucleico que modulan el uso de nitrógeno en plantas.

La invención se refiere a una planta, en cuyo caso dicha planta se transforma con al menos una primera secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo consistente en:

a) la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1;

b) una secuencia de nucleótidos que es idéntica en al menos 85% de secuencia a la secuencia SEQ ID NO: 1, en cuyo caso dicha secuencia de nucleótidos incrementa el uso de nitrógeno en una planta;

c) la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y

d) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos la cual es idéntica en al menos 85% de secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en cuyo caso dicha secuencia de nucleótidos incrementa el uso de nitrógeno en una planta.

La invención se refiere además a un constructo de vector que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionadas del grupo consistente en:

- a) la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1;
 - 5 b) una secuencia de nucleótidos que es idéntica en al menos 85% de secuencia a la secuencia SEQ ID NO: 1, en cuyo caso dicha secuencia de nucleótidos incrementa el uso de nitrógeno en una planta;
 - c) la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y
 - d) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos 85% de secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en cuyo caso dicha secuencia de nucleótidos incrementa el uso de nitrógeno en una planta.
- 10 Específicamente, los vectores para transformar células vegetales y bacterianas han sido construidos usando la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1, así como variantes, fragmentos y complementos de la misma. Estos vectores incluyen una secuencia promotora de 5' ADN y una secuencia 3' terminadora, en cuyo caso la secuencia de ácido nucleico, la secuencia promotora de ADN y la secuencia terminadora se acoplan de modo operativo para permitir la transcripción de la secuencia de nucleótidos. En algunas modalidades la secuencia promotora puede ser un promotor vegetal constitutivo un promotor específico de tejido.
- 15

La invención también incluye anticuerpos policlonales que comprenden anticuerpos policlonales a un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1.

- La invención también incluye plantas transformadas con una secuencia de nucleótidos seleccionada SEQ ID NO: 1, así como también variantes y fragmentos de la misma. La planta se selecciona del grupo consistente en maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, patata, algodón, arroz, soja, remolacha, caña de azúcar, tabaco, cebada y colza de semilla de aceite, *Brassica sp.*, alfalfa, centeno, mijo, cártamo, cacahuetes, batata dulce, mandioca, café, coco, piña, árboles cítricos, cacao, té, banana o plátano, aguacate, higo, guayaba, mango, olivo, papaya, anacardo o marañón, macadamia, almendra, avena, vegetales, hierbas (tales como hierbas de césped, hierbas de forraje o hierbas de pastizales), plantas ornamentales, árboles (tales como árboles frutales, árboles de nueces, árboles de pulpa, palmas de aceite) y coníferas. La invención también incluye una parte componente de tales plantas y una semilla de planta producida a partir de dichas plantas y una semilla de planta transformada con un constructo de vector de la presente invención.
- 20
- 25

La invención también incluye una célula hospedera transformada con una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1. La célula hospedera puede ser una célula bacteriana o una célula vegetal.

- La invención también incluye un método para expresar una molécula de ácido nucleico que modula el nitrógeno en una planta; dicho método comprende los pasos de proporcionar una planta transgénica o semilla de planta transformada con un constructo de vector de acuerdo con la presente invención, y cultivar la planta transgénica o una planta cultivada a partir de la semilla de planta transgénica en condiciones efectivas para expresar la molécula de ácido nucleico en dicha planta transgénica o dicha planta cultivada a partir de la semilla de planta transgénica. El cultivo de la planta transgénica es efectivo para incrementar la captación de nitrógeno de dicha planta transgénica o de dicha planta cultivada a partir de la semilla de planta transgénica, y/o para incrementar la eficiencia de utilización de nitrógeno de dicha planta transgénica o de dicha planta cultivada a partir de la semilla de planta transgénica, y/o para reducir una limitación tal que el rendimiento aumente en dicha planta transgénica o dicha planta se cultive a partir de la semilla de planta transgénica. La invención también incluye los métodos precedentes en los cuales se proporciona una planta transgénica o se proporciona una semilla transgénica. La invención también incluye el método precedente en el cual la planta se selecciona del grupo consistente en maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, producidas, pimientos, patata, algodón, arroz, soja, remolacha, caña de azúcar, tabaco, cebada y colza de semilla de aceite, *Brassica sp.*, alfalfa, centeno, mijo, cártamo, cacahuate, batata dulce, mandioca, café, coco, piña, árboles cítricos, cacao, té, banana o plátano, aguacate, higo, guayaba, mango, olivo, papaya, anacardo o marañón, macadamia, almendra, avena, vegetales, hierbas (tales como hierbas de césped, hierbas de forraje o hierbas de pastizales), plantas ornamentales, árboles (tales como árboles frutales, árboles de nueces, árboles de pulpa, palma de aceite) y coníferas.
- 30
- 35
- 40
- 45

- La invención también incluye un método para mejorar la tolerancia al estrés de una planta al expresar una molécula de ácido nucleico modulada por nitrógeno en una planta y dicho método comprende los pasos de proporcionar una planta transgénica o una semilla de planta transformada con un vector de constructo de acuerdo con la presente invención y cultivar la planta transgénica o una planta cultivada a partir de la semilla de planta transgénica en condiciones efectivas para expresar la molécula de ácido nucleico en dicha planta transgénica o dicha planta cultivada a partir de la semilla de planta transgénica.
- 50

- La invención también incluye un método para alterar la morfología de una planta expresando una molécula de ácido nucleico modulada por nitrógeno en una planta y dicho método comprende los pasos de proporcionar una planta transgénica o una semilla de planta transformada con un constructo de vector de acuerdo con la presente invención y
- 55

cultivar la planta transgénica o una planta cultivada a partir de la semilla de planta transgénica en condiciones efectivas para expresar la molécula de ácido nucleico en dicha planta transgénica o dicha planta cultivada a partir de la semilla de planta transgénica.

5 La invención también incluye un constructo de vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de NAGK SEQ ID NO: 2, una secuencia promotora de ADN 5', y una secuencia terminadora 3', en cuyo caso la secuencia de nucleótidos, la secuencia promotora de ADN y la secuencia terminadora se acoplan de modo operativo para permitir la transcripción de la secuencia de nucleótidos.

10 La invención también incluye un constructo de vector que comprende una secuencia de nucleótidos que modula el nitrógeno en una planta, en cuyo caso dicha secuencia de nucleótidos es de SEQ ID NO: 1; una secuencia de nucleótidos que es idéntica en al menos 85% de la secuencia a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, en cuyo caso dicha secuencia de nucleótidos modula el nitrógeno en una planta; una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de NAGK SEQ ID NO: 2; y una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos 85% de la secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en cuyo caso dicha secuencia de nucleótidos modula el nitrógeno en una planta, en cuyo caso dicho constructo comprende además una secuencia promotora de ADN 5' y una secuencia terminadora 3', en cuyo caso la secuencia de nucleótidos, la secuencia promotora de ADN, y la secuencia terminadora se acoplan de modo operativo para permitir la transcripción de la secuencia de nucleótidos.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un mapa de vector para pAX4389.

20 La figura 2 es un gráfico de un ensayo de enzima in vitro de NAGK; titulación con la enzima. La adición de la enzima NAGK al sustrato (NAG) conduce a la formación de producto de una manera dependiente de la enzima.

La figura 3 es un gráfico de un ensayo de enzima NAGK in vitro; titulación con sustrato. La adición de la enzima NAGK a concentraciones de sustrato (NAG) que varían conduce a la formación de producto de una manera dependiente de sustrato.

25 La figura 4 es un gráfico de un ensayo de encima NAGK in vitro; titulación con arginina. La formación de producto mediante la enzima NAGK fue insensible a la presencia de arginina en el intervalo de concentraciones ensayadas.

Descripción detallada de las modalidades preferidas

30 El desarrollo de variedades de plantas que utilizan nitrógeno más eficientemente reducirá la necesidad de aportes excesivos de nitrógeno, ahorrará costes de producción para los granjeros, beneficiará a los granjeros en los países en desarrollo que no tengan acceso a aportes de fertilizante y reducirá la contaminación asociada con la aplicación de fertilizantes de nitrógeno en exceso. Una estrategia que se ha utilizado en el desarrollo de variedades de plantas con utilización de nitrógeno mejorada depende de técnicas convencionales de reproducción de plantas. Sin embargo, tales estrategias han tenido éxito variable debido a la falta de especificación en la recombinación genética.

35 Existe una necesidad de desarrollar variedades de cultivo de plantas que absorban y usen el nitrógeno de manera más eficiente. Los científicos en el campo de las plantas han adoptado el término abreviado "eficiencia de uso de nitrógeno" (NUE), y han desarrollado una variedad de métodos de medición y evaluación de NUE [Craswell, E.T. y Godwin, D.C. (1984) The efficiency of nitrogen fertilizers applied to cereals grown in different climates (La eficiencia de fertilizantes de nitrógeno aplicados a cereales cultivados en diferentes climas). En *Advances in Plant Nutrition* (Vol. 1) (Tinker, P.B. y Lauchli, A., eds), pp. 1-55, Praeger Publishers; Steenbjerg, F. y Jakobsen, S.T. (1963) Plant nutrition and yield curves. *Soil Sci.* 95, 69-90; Siddiqi, M.Y. y Glass, D.M. (1981) Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants (Índice de utilización: una estrategia modificada para estimar y comparar la eficiencia de utilización de nutrientes en plantas). *J. Plant Nutr.* 4, 289-302; Moll, R.H. et al. (1982) Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. *Agron. J.* 74, 562-564]. Existen diferencias en las definiciones específicas y el contexto de uso. Por ejemplo, algunas definiciones se basan en biomasa total mientras que otras se basan en el peso del grano producido. Otro conjunto de definiciones usa la eficiencia de extracción de nitrógeno del suelo. La eficiencia con la cual el nitrógeno aplicado se utiliza para mejorar el rendimiento de grano puede medirse mediante la eficiencia agronómica (AE), el producto de eficiencia fisiológica y eficiencia de utilización o NUEg que es el producto de eficiencia de captación y eficiencia de utilización. Otras definiciones toman en cuenta factores fisiológicos.

50 Tal como se usa en esta especificación, el término eficiencia de uso de nitrógeno, o NUE, se define para incluir un cambio medible en cualquiera de los tamaños principales de acumulación metabólica de nitrógeno en las rutas de asimilación (por ejemplo, puede incluir un cambio medible en uno o más de los siguientes: nitrato, nitrito, amoníaco, ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina, asparagina, lisina, leucina, treonina, metionina, glicerina, triptófano, tirosina, contenido de proteína total de una parte de la planta, contenido de nitrógeno total de una parte de la planta y/o contenido de clorofila), o donde se muestra que la planta proporciona la misma biomasa o una biomasa elevada o un

rendimiento cosechable a niveles de fertilización de nitrógeno más bajos, o donde se muestra que la planta proporciona biomasa elevada o rendimientos cosechables a los mismos niveles de fertilización de nitrógeno cuando se compara con una planta que no ha sido transformada con un constructor de ácido nucleico de modulación de nitrógeno de la invención. Un "cambio medible" puede incluir un incremento o una disminución en la cantidad de cualquier componente ("acumulación metabólica") de la ruta de asimilación de nitrógeno. Un cambio puede incluir una disminución o un incremento en una o más de las acumulaciones metabólicas en la ruta, o una disminución en una o más acumulaciones con un incremento concomitante en una o más de otras acumulaciones, tal como cuando un intermediario en la ruta de asimilación de nitrógeno se está utilizando para el propósito de generar otro intermediario o producto de la ruta. Por ejemplo, en la conversión de glutamato a glutamina, el nivel de glutamato puede disminuirse mientras que el nivel de glutamina puede incrementarse. Por lo tanto, sin vincularse a ninguna teoría o mecanismo en particular, cualquier cambio en una o más de estas acumulaciones indica que el nitrógeno está siendo utilizado más eficientemente por la planta.

Un incremento en la eficiencia de utilización de nitrógeno puede asociarse con aproximadamente un 5%, aproximadamente un 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, aproximadamente un 200% o más de cambio medible en cualquiera de los tamaños principales de acumulación metabólica de nitrógeno en la ruta de asimilación. En una modalidad, las plantas transgénicas de la invención tienen una captación incrementada del nitrógeno del ambiente al compararse con una planta que no contiene una secuencia de modulación de nitrógeno según la invención. "Secuencia de modulación de nitrógeno" tiene como propósito dar entender una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos que modulan NUE; a manera de ejemplo no limitante: ya sea generando una enzima que impacta NUE, o generando una proteína que interactúa con los componentes involucrados en NUE, o generando una proteína que impacta la cascada de señal homeostática interna que regula NUE, o mediante una combinación de estos mecanismos. Además, la presente invención proporciona un método para mejorar la tolerancia al estrés en una planta expresando una o más secuencias de nucleótidos de modulación de nitrógeno dentro de la planta. En una modalidad, la secuencia de nucleótidos de modulación de nitrógeno es SEQ ID NO: 1, o variantes y fragmentos de la misma. En otra modalidad, la secuencia de nucleótidos de modulación de nitrógeno es una secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO: 2, o variantes y fragmentos de la misma.

Tal como se usa en la presente, el término "estrés" o "condición de estrés" se refiere a la exposición de una planta, célula vegetal o similar a una condición o agente físico, ambiental, biológico o químico que tiene un efecto adverso sobre el metabolismo, el crecimiento, el desarrollo, la propagación y/o la supervivencia de la planta (colectivamente "cultivo"). Un estrés puede imponerse en una planta debido, por ejemplo, a un factor ambiental tal como el agua (por ejemplo, inundación, sequía, deshidratación), condiciones anaeróbicas (por ejemplo, un bajo nivel de oxígeno), condiciones osmóticas anormales, salinidad o temperatura (por ejemplo, caliente/calor, frío, helada, escarcha), una deficiencia de nutrientes tales como nitrógeno, fosfato, potasio, azufre, nutriente, o una exposición a contaminantes, o por una hormona, segundo mensajero u otra molécula. El estrés anaeróbico se debe, por ejemplo, a una reducción en los niveles de oxígeno (hipoxia o anoxia), suficiente para producir una respuesta al estrés. Un estrés por inundación puede deberse a la inmersión prolongada o transitoria de una planta, parte de una planta, tejido o célula aislada en un medio líquido tal como ocurre durante el monzón, la estación húmeda, la inundación instantánea o el riego excesivo de plantas o similares. Un estrés por frío o estrés por calor puede ocurrir debido a una disminución o un incremento, respectivamente, en la temperatura del intervalo óptimo de temperaturas de cultivo para una especie vegetal particular. Tales intervalos de temperatura de cultivo óptimo se determinan fácilmente o son conocidos por aquellos expertos en la materia. El estrés por deshidratación puede inducirse por la pérdida de agua, turgencia reducida o contenido reducido de agua de una célula, tejido, órgano o la planta completa. El estrés por sequía puede inducirse por o asociarse con la privación de agua o suministro reducido de agua a una célula, tejido, órgano u organismo. El estrés salino (estrés por sal) puede asociarse con o inducirse por una perturbación en el potencial osmótico del ambiente intracelular o extracelular de una célula. El estrés osmótico también puede asociarse con o inducirse por un cambio, por ejemplo, en la concentración de moléculas en el ambiente intracelular o extracelular de una célula vegetal, particularmente cuando las moléculas no pueden dividirse a través de la membrana de la célula vegetal.

Un mejoramiento en la tolerancia al estrés puede evaluarse mediante cualquier medida, cuantitativa o cualitativa, del desempeño de la planta en una condición de estrés dada y es relativa al desempeño de una planta cultivada en las mismas condiciones de estrés, que no haya sido transformada con una secuencia de modulación de nitrógeno de la invención. Por lo tanto, las plantas pueden exhibir contenidos mejorados de nitrógeno, composiciones alteradas de aminoácidos o de proteínas, composición alterada de carbohidrato, composición alterada de aceite, características de crecimiento vigoroso, rendimientos vegetativos incrementados o mejores rendimientos y calidades de la semilla. Estas plantas pueden identificarse examinando cualquiera de los siguientes parámetros: 1) la velocidad de crecimiento, medida en términos de velocidad de incremento en el peso fresco o seco; 2) rendimiento vegetativo de la planta madura, en términos de peso fresco o seco; 3) el rendimiento de semilla o de fruto; 4) el peso de semilla o de fruto; 5) el contenido total de nitrógeno de la planta; 6) el contenido total de nitrógeno del fruto o de la semilla; 7) el contenido de aminoácido libre de la planta; 8) el contenido de aminoácido libre del fruto o de semilla; 9) el contenido de proteína total de la planta; 10) el contenido de proteína total del fruto o de la semilla; 11) el cambio medible en carbohidratos o aceites. Los procedimientos y métodos para examinar estos parámetros son bien conocidos por los expertos en la materia. Estos métodos pueden involucrar ensayos enzimáticos e inmunoensayos para medir los niveles de enzimas/proteína; ensayos para medir la composición de aminoácido, la acumulación de aminoácido libre o el contenido total de nitrógeno

de varios tejidos vegetales; medición de velocidades de crecimiento en términos de ganancia de peso fresco en el tiempo; o medición del rendimiento de la planta en términos del peso seco total y/o peso de semilla total.

Transformación de células bacterianas o vegetales

5 En la presente se proporcionan secuencias de nucleótidos novedosas que modulan la eficiencia de utilización de nitrógeno en plantas. También se proporcionan secuencias de aminoácidos de las proteínas de la invención que pueden ser de modulación de nitrógeno o pueden modularse por la concentración de nitrógeno.

10 Las secuencias de nucleótidos de modulación de nitrógeno según la invención pueden modificarse para obtener o aumentar la expresión en células vegetales. Las secuencias de modulación de nitrógeno según la invención pueden proporcionarse en casetes de expresión para expresión en la planta de interés. "Casete de expresión de planta" incluye constructos de ADN que son capaces de dar lugar a la expresión de una proteína a partir de un marco de lectura abierto en una célula vegetal. El casete incluirá en la dirección 5'-3' de la transcripción una región de iniciación transcripcional (es decir promotora) enlazada de modo operable a una secuencia de ADN de la invención y una región de terminación transcripcional y translacional (es decir una región de terminación) funcional en plantas. El casete puede contener
15 adicionalmente al menos un gen adicional para ser co-transformado en el organismo, tal como un gen marcador seleccionable o un gen apilado de función diferente. Como alternativa, el gen adicional o los genes adicionales pueden suministrarse en múltiples casetes de expresión. Tal casete de expresión se proporciona con una pluralidad de sitios de restricción para la inserción de la secuencia de modulación de nitrógeno que va a estar bajo la regulación transcripcional de las regiones reguladoras.

20 "Promotor" tiene el propósito de significar una secuencia de ácido nucleico que funciona para dirigir la transcripción de una secuencia de codificación en dirección descendente. El promotor, junto con otras secuencias de ácido nucleico reguladoras transcripcionales y translacionales (llamadas también "secuencias de control"), es necesario para la expresión de una secuencia de ADN de interés. Preferiblemente, el promotor es conocido por estimular la transcripción en el organismo al cual está siendo introducida la secuencia de nucleótidos de la invención.

25 El promotor puede ser nativo o análogo, o foráneo o heterólogo al hospedero vegetal y/o a la secuencia de ADN de la invención. Adicionalmente, el promotor puede ser la secuencia natural o, de modo alternativo, una secuencia sintética. Cuando el promotor es "nativo" u "homólogo" al hospedero vegetal, se tiene previsto que el promotor se encuentre en la planta nativa a la cual se introduce el promotor. Cuando el promotor es "foráneo" o "heterólogo" a la secuencia de ADN de la invención, el propósito es que el promotor no sea el promotor nativo o de existencia natural para la secuencia de ADN, enlazada de modo operable, de la invención. "Heterólogo" generalmente se refiere a las secuencias de ácido
30 nucleico que no son endógenas a la célula o parte del genoma nativo en el cual están presentes, y han sido adicionadas a la célula mediante infección, transfección, microinyección, electroporación, microproyección o similares. Por "enlazado de modo operable" se prevé un enlazamiento funcional entre un promotor y una segunda secuencia, en cuyo caso la secuencia promotora inicia y media la transcripción de la secuencia de ADN correspondiente a la segunda secuencia. En términos generales, "enlazado de modo operable" significa que las secuencias de ácido nucleico que se están enlazando son contiguas, incluyendo exones e intrones, y cuando es necesario unen dos regiones de codificación de proteína, contiguas y en el mismo marco de lectura.

35 En una modalidad, el promotor es un promotor constitutivo. Los promotores constitutivos adecuados para el uso en plantas incluyen: los promotores de virus vegetales, tal como el promotor de caulimovirus rayado clorótico de cacahuete (PC1SV) (patente estadounidense No. 5,850,019); el promotor 35S del virus mosaico de coliflor (CaMV) (Odell et al. (1985) Nature 313:810-812); promotores de genes de transferasa del virus Chlorella (patente estadounidense No. 5,563,328) y el promotor transcrito de longitud completa del virus de mosaico de escrofularia (FMV) (patente estadounidense No. 5,378,619); los promotores de tales genes como actina de arroz (McElroy et al. (1990) Plant Cell 2:163-171); ubiquitina (Christensen et al. (1989) Plant Mol. Biol. 12:619-632 y Christensen et al. (1992) Plant Mol. Biol. 18:675-689), incluyendo el promotor TrpPro5 (solicitud de patente estadounidense No. 10/377,318; presentada el 16 de
40 marzo de 2005); pEMU (Last et al. (1991) Theor. Appl. Genet. 81:581-588); MAS (Velten et al. (1984) EMBO J. 3:2723-2730); histona H3 de maíz (Lepetit et al. (1992) Mol. Gen. Genet. 231:276-285 y Atanassova et al. (1992) Plant J. 2(3):291-300); ALS3 de nabo *Brassica* (solicitud PCT WO 97/41228); y promotores de diversos genes de *Agrobacterium* (véanse las patentes estadounidenses Nos. 4,771,002; 5,102,796; 5,182,200; y 5,428,147).

45 En otra modalidad, el promotor es un promotor específico de tejido. Una lista de promotores específicos de tejido comúnmente utilizados puede encontrarse en Reviewed in Moore et al. (2006) Plant J. 45(4):651-683, la cual se incorpora en su totalidad a la presente mediante referencia.

55 Con frecuencia, tales constructos también contendrán regiones no traducidas 5' y 3'. Tales constructos pueden contener una "secuencia de señal" o "secuencia de guía" para facilitar el transporte co-translacional o post-translacional del péptido de interés a determinadas estructuras intracelulares tales como el cloroplasto (u otro plástido), retículo endoplasmático o aparato de Golgi, o para ser secretados. Por ejemplo, el gen puede diseñarse para contener un péptido de señal para facilitar la transferencia del péptido al retículo endoplasmático. Por "secuencia de señal" se quiere decir una secuencia que se conoce o de la cual se sospecha que da lugar a un transporte de péptido cotranslacional o post-translacional a través de la membrana celular. En eucariotas, esto normalmente involucra secreción al aparato de

- 5 Golgi, con alguna glicosilación resultante. "Secuencia guía" quiere decir cualquier secuencia que cuando está traducida da lugar a una secuencia de aminoácidos suficiente para activar el transporte co-traslacional de la cadena de péptidos a una organela subcelular. Por lo tanto, esto incluye secuencias guía que tienen como objetivo el transporte y/o la glicosilación mediante el pasaje al retículo endoplásmico, pasaje a vacuolas, plástidos que incluyen cloroplastos, mitocondrias y similares. También puede ser preferible diseñar el casete de expresión de la planta para contener un intrón, de tal modo que se requiera en el procesamiento de ARNm del intrón para la expresión.
- 10 "Región no traducida 3'" quiere decir una secuencia de nucleótidos localizada en dirección descendente de una secuencia de codificación. Las secuencias de señal de poliadenilación y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar la adición de trectos de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor de ARNm son regiones no traducidas 3'. "Región no traducida 5'" quiere decir una secuencia de nucleótidos localizada en dirección ascendente de una secuencia de codificación.
- 15 Otros elementos no traducidos en dirección ascendente o descendente incluyen potenciadores. Los potenciadores son secuencias de nucleótidos que actúan para incrementar la expresión de una región promotora. Los potenciadores son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no están limitados a, la región potenciadora SV40 y el elemento potenciador 35S.
- 20 La región de terminación puede ser nativa con la región de iniciación transcripcional, puede ser nativa con la secuencia de modulación de nitrógeno de la presente invención o puede derivarse de otra fuente. Las regiones convenientes de terminación se encuentran disponibles en el plásmido Ti de *A. tumefaciens*, tales como las regiones de terminación de octopina sintasa y nopalina sintasa, o la secuencia del inhibidor II de proteinasa de patata (PinII), tal como se describe por Liu et al. (2004) en Acta Biochim Biophys Sin 36(8):553-558. Véase también Guerineau et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 262:141-144; Proudfoot (1991) Cell 64:671-674; Sanfacon et al. (1991) Genes Dev. 5:141-149; Mogen et al. (1990) Plant Cell 2:1261-1272; Munroe et al. (1990) Gene 91:151-158; Ballas et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17:7891-7903; y Joshi et al. (1987) Nucleic Acid Res. 15:9627-9639.
- 25 Cuando sea apropiado, el o los genes pueden optimizarse mediante expresión incrementada en la célula hospedera transformada. Es decir, los genes pueden sintetizarse usando codones preferidos de la célula hospedera para la expresión mejorada, o pueden sintetizarse utilizando codones en una frecuencia de utilización de codón preferida por el hospedero. Por lo general, el contenido de GC del gen será incrementado. Véase, por ejemplo, Campbell y Gowri (1990) Plant Physiol. 92:1-11 para una discusión del uso de codón preferido por hospedero. Los métodos son conocidos en la técnica para sintetizar genes preferidos por el hospedero. Véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 6,320,100; 6,075,185; 5,380,831; y 5,436,391, las solicitudes estadounidenses de patentes publicadas Nos. 20040005600 y 20010003849, y Murray et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17:477-498, incorporadas a la presente por referenci.
- 30 En una modalidad, los ácidos nucleicos de interés se dirigen al cloroplasto para expresión. De esta manera, cuando el ácido nucleico de interés no se inserta directamente en el cloroplasto, el casete de expresión contendrá adicionalmente un ácido nucleico que codifique un péptido de tránsito para dirigir el producto génico de interés a los cloroplastos. Tales péptidos de tránsito son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Von Heijne et al. (1991) Plant Mol. Biol. Rep. 9:104-126; Clark et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:17544-17550; Della-Cioppa et al. (1987) Plant Physiol. 84:965-968; Romer et al. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 196:1414-1421; y Shah et al. (1986) Science 233:478-481.
- 35 Los ácidos nucleicos de interés que son dirigidos al cloroplasto pueden optimizarse para la expresión en el cloroplasto y para justificar las diferencias en el uso de codón entre el núcleo vegetal y esta organela. De esta manera, los ácidos nucleicos de interés pueden sintetizarse utilizando codones preferidos de cloroplasto. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 5,380,831, incorporada a la presente por referencia.
- 40 Normalmente este "casete de expresión de planta" será insertado en un "vector de transformación de planta". "Vector de transformación" significa una molécula de ADN que es necesaria para la transformación eficiente en una célula. Tal molécula puede consistir en uno o más cassettes de expresión y puede organizarse en más de una molécula de ADN de "vector". Por ejemplo, los vectores binarios son vectores de transformación de planta que utilizan dos vectores de ADN no contiguos para codificar todas las funciones que actúan como cis y trans necesarias para la transformación de células vegetales (Hellens y Mullineaux (2000) Trends in Plant Science 5:446-451). "Vector" se refiere a un constructo de ácido nucleico diseñado para la transferencia entre diferentes células hospederas. "Vector de expresión" se refiere a un vector que tiene la habilidad de incorporar, integrar y expresar secuencias heterólogas de ADN o fragmentos en una célula foránea.
- 45 Este vector de transformación de planta puede estar comprendido por uno o más vectores de ADN necesarios para lograr la transformación de planta. Por ejemplo, es una práctica común en la técnica utilizar vectores de transformación de planta que están comprendidos por más de un segmento contiguo de ADN. Estos vectores con frecuencia se denominan en la técnica "vectores binarios". Los vectores binarios, así como los vectores con plásmidos ayudantes, se utilizan con la mayor frecuencia para la transformación mediada por *Agrobacterium*, cuando el tamaño y la complejidad de los fragmentos de ADN necesarios para lograr la transformación eficiente son muy grandes y es ventajoso separar las funciones en moléculas separadas de ADN. Los vectores binarios normalmente contienen un vector de plásmido que
- 55

5 contiene la secuencia de acción cis requerida para la transferencia de ADN-T (tal como el límite izquierdo y el límite derecho), un marcador seleccionable que está diseñado para poder expresarse en una célula vegetal, y una "secuencia de nucleótidos de interés" (una secuencia de nucleótidos diseñada para poder expresarse en una célula vegetal para la cual se desea la generación de plantas transgénicas). También se encuentran presentes en este vector de plásmido las secuencias requeridas para la replicación bacteriana. Las secuencias de acción cis están dispuestas de una manera que permiten la transferencia eficiente a células vegetales y la expresión en las mismas. Por ejemplo, el gen marcador seleccionable y el gen de interés están localizados entre los límites izquierdo y derecho. Con frecuencia, un segundo vector de plásmido contiene los factores de acción trans que median la transferencia de ADN-T de *Agrobacterium* a las células vegetales. Este plásmido con frecuencia contiene las funciones de virulencia (genes vir) que permiten la infección de células vegetales por *Agrobacterium*, y la transferencia de ADN por disociación en secuencias de límite y transferencia de ADN mediada por vir, tal como se entiende en la técnica (Hellens y Mullineaux (2000) Trends in Plant Science, 5:446-451). Varios tipos de cepas de *Agrobacterium* (por ejemplo, LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105, etc.) pueden usarse en para la transformación de planta. El segundo vector de plásmido no es necesario para transformar las plantas mediante otros métodos tales como microproyección, microinyección, electro por acción, polietilenglicol, etcétera.

Variantes alteradas o mejoradas, útiles en los constructos de la invención

Se reconoce que las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos útiles en la presente invención pueden alterarse mediante diversos métodos y que estas alteraciones pueden dar lugar a secuencias que codifican proteínas con secuencias de aminoácidos diferentes de aquellas codificadas por las secuencias de modulación de nitrógeno divulgadas en la presente.

Las secuencias de nucleótidos útiles en la presente invención son las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 1, y variantes, fragmentos y complementos de las mismas. Tal como se usa en la presente, el término "secuencia de nucleótidos" o "molécula de ácido nucleico" tiene el propósito de incluir moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm) y análogos del ADN o ARN generados utilizando análogos de nucleótidos. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser monocatenarias o bicatenarias, pero preferiblemente son ADN bicatenario. Por "complemento" se entiende una secuencia de nucleótidos que es suficientemente complementaria a una secuencia de nucleótidos dada de modo que pueda hibridar a la secuencia de nucleótidos dada para que se forme de esta manera un dúplex estable. Las secuencias de aminoácidos correspondientes para las proteínas de modulación de nitrógeno codificadas por estas secuencias de nucleótidos se exponen en SEQ ID NO: 2, así como también variantes y fragmentos de las mismas. La invención también comprende el uso de moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican proteínas de modulación de nitrógeno de longitud parcial y complementos de las mismas.

Las moléculas de ácido nucleico que son fragmentos de estas secuencias de nucleótidos de modulación de nitrógeno también son útiles en la presente invención. Por "fragmento" se entiende una porción de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de modulación de nitrógeno. Un fragmento de una secuencia de nucleótidos puede codificar una porción biológicamente activa de una proteína de modulación de nitrógeno, o puede ser un fragmento que puede usarse como una sonda de hibridación o cebador de PCR usando los métodos divulgados más adelante. Las moléculas de ácido nucleico que son fragmentos de una secuencia de nucleótidos de modulación de nitrógeno comprenden al menos aproximadamente 15, 20, 50, 75, 100, 200, 300, 350, o al menos aproximadamente 400 nucleótidos contiguos o hasta el número de nucleótidos presentes en una secuencia de nucleótidos de modulación de nitrógeno de longitud completa, divulgada en la presente dependiendo del uso destinado. Por nucleótidos "contiguos" se entienden residuos de nucleótidos que están adyacentes de modo inmediato uno al otro.

Los polipéptidos que son fragmentos de estos polipéptidos de modulación de nitrógeno también son útiles en la presente invención. Por "fragmento" se entiende una porción de una secuencia de aminoácidos que codifica una proteína de modulación de nitrógeno tal como está expuesta en SEQ ID NO: 2, y que retiene la eficiencia de utilización de nitrógeno. Una porción biológicamente activa de una proteína de modulación de nitrógeno puede ser un péptido que tiene, por ejemplo, 10, 25, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400 o más aminoácidos de longitud. Tales porciones biológicamente activas pueden prepararse mediante técnicas recombinantes y evaluarse para eficiencia de utilización de nitrógeno. Tal como se usa aquí, un fragmento comprende al menos 8 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 2. Sin embargo, la invención abarca otros fragmentos, tal como cualquier fragmento en la proteína mayor que aproximadamente 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, o 400 aminoácidos.

La invención también abarca el uso de moléculas de ácido nucleico variante, o secuencias de aminoácidos variantes, en los métodos y composiciones de la invención. "Variantes" de las secuencias de nucleótidos de modulación de nitrógeno incluyen aquellas secuencias que codifican una proteína de modulación de nitrógeno divulgada en la presente pero que difieren de manera conservadora debido a la degeneración del código genético, así como aquellas que son suficientemente idénticas tal como se discutió anteriormente. Las variantes alélicas que existen de modo natural pueden identificarse con el uso de las técnicas de biología molecular bien conocidas, tal como la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y las técnicas de hibridación tal como se resumen a continuación. Las secuencias de nucleótidos variantes también incluyen secuencias de nucleótidos derivadas sintéticamente que se han generado, por ejemplo,

usando mutagénesis dirigida al sitio pero que aún codifican las proteínas de modulación de nitrógeno divulgadas en la presente, tal como se discute más adelante. Las proteínas variantes útiles de la presente invención son biológicamente activas; es decir que retienen la actividad biológica deseada de la proteína nativa, es decir la eficiencia de utilización de nitrógeno y/o la tolerancia mejorada al estrés.

- 5 Por "variantes" se entienden proteínas o polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos 85 % a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Las variantes también incluyen polipéptidos codificados por una molécula de ácido nucleico que híbrida a la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1, o a un complemento de la misma, en condiciones severas. Las variantes incluyen polipéptidos que difieren en secuencia de aminoácidos debido a mutagénesis. Las proteínas variantes comprendidas por la presente invención son biológicamente activas, es
10 decir continúan teniendo la actividad biológica deseada de la proteína nativa, es decir que retienen la eficiencia de utilización de nitrógeno y/o la tolerancia mejorada al estrés.

- Las proteínas de modulación de nitrógeno preferidas, útiles en la presente invención, son codificadas por una secuencia de nucleótidos suficientemente idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1. El término "suficientemente idéntica" significa una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que es idéntica en al menos 85% de la secuencia en
15 comparación con una secuencia de referencia usando uno de los programas de alineamiento descritos en la presente usando parámetros estándar. Alguien con habilidad en la técnica reconocerá que estos valores pueden ajustarse de modo apropiado para determinar la identidad correspondiente de proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos tomando en cuenta la degeneración de codón, la similitud de aminoácidos, el posicionamiento de marco de lectura y similares.

- 20 Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de los ácidos nucleicos, se alinean las secuencias para propósitos de comparación óptima. El porcentaje de identidad de las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir que el porcentaje de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (por ejemplo, posiciones que se solapan) x 100). En una modalidad, las dos secuencias tienen la misma longitud. El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede determinarse utilizando
25 técnicas similares a aquéllas descritas más adelante, permitiendo o no espacios libres. Al calcular el porcentaje de identidad normalmente se cuentan las coincidencias exactas.

- La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede realizarse utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264, modificado en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci.
30 USA 90:5873-5877. Un algoritmo de este tipo se encuentre incorporado a los programas BLASTN y BLASTX de Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403. Las búsquedas de nucleótidos BLAST pueden realizarse con el programa, marcador = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de modulación de nitrógeno de la invención. Las búsquedas de proteína BLAST pueden realizarse con el programa BLASTX, marcador = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas
35 de proteínas de modulación de nitrógeno de la invención.

- Para obtener alineaciones con espacios libres para propósitos de comparación puede utilizarse Gapped BLAST tal como se describe en en Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389. De modo alternativo, puede utilizarse PSI-Blast para realizar una búsqueda repetida que detecta las relaciones distantes en las moléculas. Véase Altschul et al. (1997) *supra*. Al utilizar los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, pueden utilizarse los parámetros estándar
40 de los programas respectivos (por ejemplo, BLASTX y BLASTN). Véase www.ncbi.nlm.nih.gov. Otro ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo ClustalW (Higgins et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22:4673-4680). ClustalW compara las secuencias y alinea la totalidad de la secuencia de aminoácidos o secuencia de ADN, y de esta manera puede proporcionar datos acerca de la conservación de secuencia de toda la secuencia de aminoácidos. El algoritmo ClustalW se usa en varios paquetes de software de análisis de ADN/aminoácido que se encuentran disponibles en el comercio, tal como el módulo ALIGNX del Vector NTI Program Suite (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Después de la alineación de las secuencias de aminoácidos con ClustalW, puede evaluarse el porcentaje de identidad de aminoácido. Un ejemplo no limitante de un programa de software útil para
45 el análisis de alineaciones ClustalW es GENEDOC™. GENEDOC™ (Karl Nicholas) que permite la evaluación de la similitud de aminoácidos (o de ADN) y la identidad entre múltiples proteínas. Otro ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller (1988) CABIOS 4:11-17. Un algoritmo de este tipo se incorpora al programa ALIGN (versión 2.0), el cual es parte del paquete de software de alineación de secuencia GCG (disponible en Accelrys, Inc., 9865 Scranton Rd., San Diego, California, Estados Unidos). Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, puede utilizarse una tabla de residuos de ponderación de PAM120, una penalidad de longitud de espacio libre de 12 y una penalidad de espacio libre de 4.

- 55 Un programa preferido es la versión 10 de GAP, que utilizó el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453. La versión 10 de GAP puede usarse con los siguientes parámetros: % de identidad y % de similitud para una secuencia de aminoácidos utilizando una ponderación de GAP de 50 y ponderación de longitud de 3, y la matriz de calificación BLOSUM62. También pueden usarse programas equivalentes. Por "programa equivalente" se entiende cualquier programa de comparación de secuencias que para cualquiera de dos secuencias en cuestión genera una

alineación que tiene coincidencias de residuos de nucleótidos o de aminoácidos idénticos y un porcentaje de identidad de secuencia idéntica al comparar con la alineación correspondiente generada por la versión 10 de GAP.

El experto en la materia apreciará además que pueden introducirse cambios mediante la mutación en la secuencia de aminoácidos de la invención para conducir de esta manera a cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína de modulación de nitrógeno codificada, sin alterar la actividad biológica de la proteína. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas variantes pueden crearse introduciendo una o más sustituciones, adiciones o supresiones de nucleótidos a la correspondiente secuencia de nucleótidos divulgada en la presente, de tal modo que se introducen una o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos a la proteína codificada. Pueden introducirse mutaciones mediante técnicas estándar, tales como la mutagénesis dirigida al sitio y la mutagénesis mediada por PCR. Tales secuencias de nucleótidos variantes también están abarcadas por la presente invención.

Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos conservadoras pueden hacerse en uno o más residuos de aminoácidos predichos, preferiblemente no esenciales. Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que puede alterarse a partir de la secuencia de tipo silvestre de una proteína de modulación de nitrógeno sin alterar la actividad biológica, mientras que un residuo de aminoácido "esencial" se requiere para actividad biológica. Una "sustitución de aminoácido conservadora" es una en la cual el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica han sido definidas familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Pueden hacerse sustituciones de aminoácido en regiones no conservadas que retienen la función. En términos generales, tales sustituciones no serían hechas para residuos de aminoácidos conservados o para residuos de aminoácidos que reciben dentro de una porción conservada, donde tales residuos son esenciales para la actividad de la proteína. Sin embargo, alguien con habilidad en la técnica entendería que las variantes funcionales pueden tener alteraciones conservadas o no conservadas menores en los residuos conservados. Ejemplos de residuos que son conservados que pueden ser esenciales para la actividad de la proteína incluyen, por ejemplo, residuos que son idénticos entre todas las proteínas contenidas en una alineación de secuencias similares o relacionadas, conocidas por estar involucradas en la asimilación de nitrógeno. Ejemplos de residuos que se conservan pero que pueden permitir sustituciones conservadoras de aminoácidos y aún retienen la actividad incluyen, por ejemplo, residuos que sólo tienen sustituciones conservadoras entre todas las proteínas contenidas en una alineación de secuencias similares o relacionadas, conocidas por estar involucradas en la asimilación de nitrógeno.

De modo alternativo, las secuencias de nucleótidos variantes pueden hacerse introduciendo mutaciones de manera aleatoria a lo largo de toda o parte de la secuencia de codificación, por ejemplo mediante mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden cribarse para habilidad de conferir eficiencia de utilización de nitrógeno para identificar mutantes que retienen la actividad. Después de la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse de modo recombinante y la actividad de la proteína puede determinarse utilizando técnicas de ensayo estándar.

Usando métodos tales como PCR, hibridación y similares, pueden identificarse las secuencias de modulación de nitrógeno correspondientes; tales secuencias tienen identidad sustancial a la secuencia de la invención. Véase, por ejemplo, Sambrook J., y Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) e Innis, et al. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods y Applications* (Academic Press, NY). En un método de hibridación, toda o parte de la secuencia de nucleótidos de modulación de nitrógeno puede usarse para cribar ADNc o bibliotecas genómicas. Los métodos para construcción de tales bibliotecas de ADNc y genómicas son conocidos en la técnica en términos generales y se divulgan en Sambrook y Russell, 2001, *supra*.

Las variantes y fragmentos de las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos de la presente invención generalmente codificarán fragmentos de proteína que retienen la actividad biológica de la proteína de modulación de nitrógeno de longitud completa; es decir, retienen la eficiencia de utilización de nitrógeno. Por la expresión "retienen la eficiencia de utilización de nitrógeno" se entiende que la variante o fragmento tendrá por lo menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 70% o al menos aproximadamente 80% de la eficiencia de utilización de nitrógeno y/o tolerancia al estrés de la proteína de modulación de nitrógeno de longitud completa divulgada en la presente como SEQ ID NO: 2, una secuencia de nucleótidos que modula nitrógeno de longitud completa, divulgada en la presente como SEQ ID NO: 1. Los métodos para monitorear la eficiencia de utilización de nitrógeno incluyen detectar un cambio en cualquiera de los tamaños principales de acumulación metabólica de nitrógeno en la ruta de asimilación (por ejemplo, un cambio medible en nitrato, nitrito, amoníaco, ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina, asparagina, lisina, leucina, treonina, metionina, glicina, triptófano, tirosina, contenido de proteína total de parte de planta, contenido de nitrógeno total de una parte de planta y/o contenido de clorofila) o detectar la capacidad de una planta para proporcionar el mismo rendimiento o un rendimiento elevado a niveles de fertilización de nitrógeno más bajos, o la capacidad de una planta para proporcionar rendimientos elevados a los mismos niveles de fertilización de nitrógeno al compararse con una planta que no contiene o no expresa una secuencia de modulación de nitrógeno según la invención. La designación de niveles de fertilización de nitrógeno como "mismos" o "más bajos" se refiere a los

niveles de nitrógeno generalmente aplicados a una planta que no expresa una secuencia de modulación de nitrógeno de la invención. Los niveles de nitrógeno suficientes son conocidos en la técnica para la mayoría, sino es que para todas, las variedades de plantas de interés. Pueden encontrarse guías adicionales, por ejemplo, en Hewitt (1966) *Sand and Water Culture Methods Used in the Study of Plant Nutrition*, segunda edición, Farnham Royal (Bucks), Commonwealth Agricultural Bureaux; y, Hewitt (1975) *Plant Mineral Nutrition*, Londres, English University Press.

Las secuencias de polipéptido útiles en la presente invención pueden alterarse de diversas maneras que incluyen sustituciones, supresiones, truncamientos o inserciones de aminoácidos. En la técnica, en términos generales se conocen métodos para tales manipulaciones. Por ejemplo, las variantes de secuencias de aminoácidos de las proteínas de modulación de nitrógeno, divulgadas en la presente, pueden prepararse mediante mutaciones en las secuencias de nucleótidos. Esto también puede realizarse mediante una o varias formas de mutagénesis y/o en evolución dirigida. En algunos aspectos, los cambios codificados en la secuencia de aminoácidos no afectará sustancialmente la función de la proteína. Tales variantes poseerán la eficiencia de utilización de nitrógeno deseada. Sin embargo, se entiende que la habilidad de las secuencias de modulación de nitrógeno de la invención para alterar o mejorar la utilización de nitrógeno puede mejorarse aún más mediante el uso de tales técnicas en las composiciones de esta invención. Por ejemplo, pueden expresarse secuencias divulgadas en la presente en células hospederas que exhiben altas velocidades de incorporación errónea de bases durante la replicación de ADN, tal como XL-1 Red (Stratagene, La Jolla, CA). Después de la propagación en tales cepas puede aislarse el ADN (por ejemplo, preparando ADN de plásmido o amplificando mediante PCR y clonando el fragmento resultante de PCR a un vector), transformarlo en plantas, tal como se describe en la presente en otro sitio, y medir la eficiencia de utilización de nitrógeno.

De manera alternativa, pueden hacerse alteraciones a la secuencia de proteína de muchas proteínas en el terminal amino o carboxi sin afectar sustancialmente la actividad. Esto puede incluir inserciones, supresiones o alteraciones introducidas mediante métodos moleculares modernos, tal como PCR, incluyendo amplificaciones de PCR que alteran o extienden la secuencia de codificación de proteína en virtud de la inclusión de secuencias de codificación de aminoácidos en los oligonucleótidos utilizados en la amplificación de PCR. De modo alternativo, las secuencias de proteína adicionadas pueden incluir secuencias completas de codificación de proteína, tales como aquellas utilizadas comúnmente en la técnica para generar fusiones de proteína. Tales proteínas de fusión se usan frecuentemente para (1) incrementar la expresión de una proteína de interés, (2) introducir un dominio de enlazamiento, actividad enzimática o epítopo para facilitar la purificación de proteína, detección de proteína u otros usos experimentales conocidos en el arte, o (3) dirigir secreción o traducción de una proteína a una organela subcelular, tal como el espacio periplásmico de bacterias gram-negativas, o el retículo endoplásmico de células eucariotas y este último con frecuencia da lugar a glicosilación de la proteína.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos variantes de la presente invención también abarcan secuencias derivadas de procedimientos mutagénicos y recombinogénicos, tal como el entremezclado de ADN. Con un procedimiento así, pueden usarse una o más regiones diferentes de codificación de proteína de modulación de nitrógeno para crear una nueva proteína de modulación de nitrógeno que posee las propiedades deseadas. De esta manera se generan librerías de polinucleótido recombinantes de una población de polinucleótidos de secuencia relacionada que comprende regiones de secuencia que tiene identidad de secuencia sustancial y pueden combinarse de manera homóloga *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, usando esta estrategia, los motivos de secuencia que codifican un dominio de interés pueden entremezclarse entre la secuencia de modulación de nitrógeno útil en la presente invención y otras secuencias conocidas de modulación de nitrógeno para obtener una nueva secuencia que codifica una proteína con una propiedad mejorada de interés, tal como la utilización mejorada de nitrógeno. En la técnica se conocen estrategias para un entremezclado de ADN de este tipo. Véase, por ejemplo, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391; Cramer et al. (1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Moore et al. (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Cramer et al. (1998) *Nature* 391:288-291; y patentes estadounidenses Nos. 5,605,793 y 5,837,458.

Transformación de planta

Los métodos de la invención involucran la introducción de una o más secuencias de nucleótidos de modulación de nitrógeno a una planta. En algunas modalidades, sólo una de las secuencias de modulación de nitrógeno divulgadas en la presente se introduce a la planta. En otras modalidades se introducen al menos 2, al menos 3, al menos 4, o más secuencias. Cuando se introducen múltiples secuencias, cada una de las secuencias de nucleótidos no es idéntica. Dos secuencias de nucleótidos se consideran no idénticas si difieren, por lo menos, en una porción de nucleótido. Por lo tanto, las secuencias de nucleótidos no idénticas incluyen dos o más secuencias diferentes de nucleótidos que codifican, cada una de ellas, la misma secuencia de aminoácidos (por ejemplo, una o más han sido optimizadas para expresión en la planta), así como también dos o más secuencias diferentes de nucleótidos que codifican al menos dos secuencias diferentes de aminoácidos.

Por "introducir" se entiende presentar a la planta uno o más constructos que comprenden una o más secuencias de modulación de nitrógeno de manera que el constructo o los constructos logren acceso al interior de una célula vegetal. Los métodos de la invención no requieren que se utilice un método particular para introducir un constructo de nucleótido a una planta, sólo que el o los constructos de nucleótidos logren el acceso al interior de por lo menos una célula vegetal.

En la técnica son conocidos métodos para introducir constructos de nucleótidos a plantas que incluyen, pero no se limitan a, métodos de transformación estable, métodos de transformación transitoria y métodos mediados por virus.

En general, los métodos de transformación de plantas incluyen transferir ADN heterólogo a células vegetales diana (por ejemplo, embriones inmaduros o maduros, cultivos de suspensión, callo no diferenciado, protoplastos, etcétera), seguido de la aplicación de un nivel de umbral máximo de selección apropiada (dependiendo del gen marcador seleccionable) para recuperar células de plantas transformadas de un grupo de masa celular no transformada. Las explantas normalmente se transfieren a un suministro fresco del mismo medio y se cultivan de manera rutinaria. A continuación, las células transformadas son diferenciadas en retoños después de colocar sobre un medio de regeneración, suplementado con un nivel de umbral máximo de agente de selección (es decir, antibióticos tales como espectinomycin y canamicina). Los retoños se transfieren luego a un medio selectivo de formación de raíces para recuperar el retoño o plántula enraizada. La plántula transgénica se cultiva luego para obtener una planta madura y producir semillas fértiles (por ejemplo Hiei et al. (1994) *The Plant Journal* 6:271-282; Ishida et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750). Las explantas normalmente se transfieren a un suministro fresco del mismo medio y se cultivan de modo rutinario. Una descripción general de las técnicas y métodos para generar plantas transgénicas se encuentra en Ayres y Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13:219-239 y Bommineni y Jauhar (1997) *Maydica* 42:107-120. Puesto que el material transformado contiene muchas células, las células transformadas y las no transformadas se encuentran presentes en cualquier pedazo de callo o tejido o grupo de células, dianas. La capacidad de exterminar células no transformadas y de permitir a las células transformadas proliferar da lugar a cultivos de plantas transformadas. La capacidad para retirar las células no transformadas es frecuentemente una limitación para la recuperación rápida de las células vegetales transformadas y la generación exitosa de plantas transgénicas. Luego, pueden usarse métodos moleculares y bioquímicos para confirmar la presencia del gen heterólogo integrado de interés al genoma de la planta transgénica.

La generación de plantas transgénicas puede realizarse mediante uno de varios métodos, que incluyen pero no se limitan a la introducción de ADN heterólogo mediante *Agrobacterium* a las células vegetales (transformación mediada por *Agrobacterium*), bombardeo de células vegetales con ADN foráneo heterólogo, adherido a partículas, y otros métodos diversos de mediación directa sin partículas (por ejemplo, Hiei et al. (1994) *The Plant Journal* 6:271-282; Ishida et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750; Ayres y Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13:219-239; Bommineni y Jauhar (1997) *Maydica* 42:107-120) para transferir ADN.

En la técnica son conocidos métodos para transformación de cloroplasto. Véase, por ejemplo, Svab et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8526-8530; Svab y Maliga (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:913-917; Svab y Maliga (1993) *EMBO J.* 12:601-606. El método depende del suministro de ADN, con pistola de partículas, el cual contiene un marcador seleccionable y direccionamiento del ADN al genoma de plástido por medio de recombinación homóloga. Adicionalmente, la transformación de plástido puede realizarse mediante la transactivación de un transgén silente, portado sobre plástido, mediante la expresión preferida de tejido de una polimerasa de ARN, codificada de modo nuclear y dirigida a plástido. Un sistema así ha sido reportado en McBride et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7301-7305.

La transformación de células bacterianas se realiza mediante una de varias técnicas conocidas en el arte, que incluyen pero no se limitan a electroporación o transformación química (véase, por ejemplo, Ausubel, ed. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., Indianapolis, IN). Los marcadores que confieren resistencia a sustancias tóxicas son útiles al identificar células transformadas (que han tomado y expresado el ADN de ensayo) de las células no transformadas (aquellas que no contienen o que no expresan el ADN de ensayo).

En un aspecto de la invención, las secuencias de nucleótidos de la invención son útiles como marcadores para estimar la transformación de células bacterianas o vegetales. De esta manera, la transformación se evalúa monitoreando la eficiencia de utilización de nitrógeno tal como se ha descrito antes.

La transformación de células vegetales puede realizarse de una manera similar. Por "planta" se entienden plantas completas o partes componentes que incluyen órganos de plantas (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas, células vegetales, propágulos, embriones y progenie de las mismas. Las células vegetales pueden ser diferenciadas o no diferenciadas (por ejemplo, callo, células de cultivo de suspensión, protoplastos, células de hoja, células de raíz, células de floema, polen). "Plantas transgénicas" o "plantas transformadas" o células o tejidos o plantas "transformadas establemente" se refieren a plantas que han incorporado o integrado secuencias de ácido nucleico exógeno o fragmentos de ADN a la célula vegetal. Por "transformación estable" se entiende que el constructor de nucleótidos introducidos a una planta se integra al genoma de la planta y es capaz de ser heredado por la progenie de la misma.

Las células que se han transformado pueden cultivarse en plantas de acuerdo con maneras convencionales. Véase, por ejemplo, McCormick et al. (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Estas plantas pueden cultivarse luego y polinizarse con la misma cepa transformada o con diferentes cepas, y puede identificarse el híbrido resultante que tiene la expresión consecutiva de la característica fenotípica deseada. Dos o más generaciones pueden cultivarse para asegurar que la expresión de la característica fenotípica deseada sea mantenida de modo estable y sea heredada, y luego que las semillas se cosechen para asegurar que se ha logrado la expresión de la característica fenotípica deseada. De esta

manera, la presente invención proporciona una semilla transformada (también denominada "semilla transgénica") que tiene un constructo de nucleótidos de la invención, por ejemplo, un casete de expresión de la invención, incorporado establemente a su genoma.

Métodos para incrementar el rendimiento de plantas modulando la utilización de nitrógeno

- 5 Se proporcionan métodos para incrementar el rendimiento de la planta. Los métodos comprenden introducir a una planta o célula vegetal una secuencia de nucleótidos de modulación de nitrógeno divulgada en la presente, de modo que un incremento en la eficiencia de utilización de nitrógeno corresponde a un incremento de rendimiento de la planta. Tal como se ha definido en la presente, el "rendimiento" de la planta se refiere a la calidad y/o cantidad de biomasa, y/o rendimiento cosechable, producido por la planta. Por "biomasa" se entiende cualquier producto medido de la planta (por ejemplo, cualquier parte componente de una planta tal como semilla, tallo, raíz, grano, hoja, etcétera). Un incremento en la producción de biomasa es cualquier mejoramiento en el rendimiento del producto medido de la planta. Un incremento en el rendimiento cosechable es un peso más alto de un componente de planta que fácilmente se recolecta utilizando métodos reconocidos para cosechar, o un incremento en la cantidad de composición de un compuesto de interés en la parte cosechada; un ejemplo no limitante es la cantidad de un aminoácido, tal como lisina, que se cosecha por unidad de área de tierra. El incremento del rendimiento de la planta o el rendimiento capaz de cosecharse tiene varias aplicaciones comerciales. Por ejemplo, el incremento de la biomasa de hoja de la planta puede incrementar el rendimiento de vegetales de hoja para el consumo humano o animal. Adicionalmente, el incremento de la biomasa de la hoja puede utilizarse para incrementar la producción de productos farmacéuticos o industriales derivados de plantas. Un incremento en el rendimiento puede comprender cualquier incremento estadísticamente significativo que incluya, pero no se limite a, al menos un incremento de 1%, al menos un incremento de 3%, al menos un incremento de 5%, al menos un incremento de 10%, al menos un incremento de 20%, al menos 30%, al menos 50%, al menos 70%, al menos 100% o un incremento mayor en el rendimiento de la planta, en comparación con el rendimiento de una planta a la cual no se ha introducido una secuencia de nucleótidos que modula el uso de nitrógeno según la invención.

Plantas

- 25 La presente invención puede utilizarse para la transformación de cualquier especie de planta, incluyendo sin limitar las monocotiledóneas y las dicotiledóneas. Ejemplos de plantas de interés incluyen, pero no se limitan a, maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, patata, algodón, arroz, soja, remolacha, caña de azúcar, tabaco, cebada y colza de semilla de aceite, *Brassica sp.*, alfalfa, centeno, mijo, cártamo, cacahuate, batata dulce, mandioca, café, coco, piña, árboles cítricos, cacao, té, plátano, aguacate, higo, guayaba, mango, olivo, papaya, anacardo o marañón, macadamia, almendra, avena, vegetales, hierbas (tales como hierbas de césped, hierbas de forraje o hierbas de pastizales), plantas ornamentales, árboles (tales como árboles frutales, árboles de nuez, árboles de pulpa, palma de aceite) y coníferas.

- 35 Los vegetales incluyen, pero no se limitan a, cebollas, tomates, lechugas, habichuelas verdes, habas, guisantes y miembros del género *Curcumis* tales como pepino, cantalupo (melón), y melón amarillo. Las plantas ornamentales incluyen, pero no se limitan a, azalea, hidrangea, hibisco, rosas, tulipanes, narcisos, tertulias, clavel, poinsetia y crisantemo. Preferiblemente, las plantas de la presente invención son plantas de cultivo (por ejemplo, maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, patata, algodón, arroz, soja, remolacha, caña de azúcar, tabaco, cebada, colza de semilla de aceite, etcétera).

- 40 Esta invención es particularmente adecuada para cualquier miembro de la familia de plantas monocotiledóneas que incluyen, pero no se limitan a, maíz, arroz, cebada, avena, trigo, sorgo, centeno, caña de azúcar, piña, hilazas, cebolla, banano o plátano, coco y dátiles.

Evaluación de la transformación de la planta

Después de la introducción del ADN foráneo, heterólogo a células vegetales, la transformación o integración del gen heterólogo al genoma de la planta se confirma mediante métodos diversos, tal como el análisis de ácido nucleico, proteínas y metabolitos asociados con el gen integrado.

- 45 El análisis de PCR es un método rápido para cribar o clasificar retoños, tejido o células transformadas por la presencia de secuencias de nucleótidos incorporadas en la etapa más temprana antes de trasplantar al suelo (Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). PCR se lleva a cabo utilizando cebadores de oligonucleótidos específicos para el gen de interés o el antecedente de vector de *Agrobacterium*, etc.
- 50 La transformación de plantas puede confirmarse mediante el análisis de Southern blot del ADN genómico (Sambrook y Russell, 2001, *supra*). En términos generales, el ADN total se extrae del transformante, se digiere con enzimas de restricción apropiadas, se fracciona con un gen de agarosa y se transfiere a una membrana de nitrocelulosa o de nailon. La membrana o "blot" se sondea luego, por ejemplo, con fragmentos de ADN diana, radio marcados con ³²P para confirmar la integración del gen introducido al genoma de la planta de acuerdo con técnicas estándar (Sambrook y Russell, 2001, *supra*).

En el análisis de Northern, se aísla ARN de los tejidos específicos del transformante, se fracciona en un gel de agarosa formaldehído, se mancha sobre un filtro de nailon de acuerdo con los procedimientos estándar que se utilizan rutinariamente en la técnica (Sambrook y Russell, 2001, *supra*). La expresión de ARN codificada por la secuencia de nucleótidos de la invención se ensaya luego hibridando el filtro con una sonda radioactiva derivada de un polinucleótido de la invención, mediante métodos conocidos en la técnica (Sambrook y Russell, 2001, *supra*).

En las plantas transgénicas pueden llevarse a cabo Western blot y ensayos bioquímicos y similares para determinar la presencia de proteína codificada por el gen de modulación de nitrógeno mediante procedimientos estándar (Sambrook y Russell, 2001, *supra*) usando anticuerpos que se enlazan a uno o más epítopes presentes en la proteína de modulación de nitrógeno. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales generados por los métodos de la presente invención pueden utilizarse para detectar la presencia de una proteína de modulación de nitrógeno.

Anticuerpos

Los anticuerpos a los polipéptidos útiles en la presente invención, o a variantes o a fragmentos de los mismos, también están abarcados. En la técnica se conocen bien los métodos para producir anticuerpos (véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; patente estadounidense No. 4,196,265).

Parte experimental

Materiales y métodos

Se generó un gen sintético que codifica una enzima NAGK (SEQ ID NO: 1). A fin de localizar la proteína NAGK en el cloroplasto, se adicionó un polinucleótido que codifica un péptido de tránsito de cloroplasto (SEQ ID NO: 3) al terminal N de la proteína.

Caracterización funcional de la proteína NAGK

Una cepa de supresión *argB* (codifica NAGK en *E. coli*) se construyó a partir de DH5 α de *E. coli* usando el método descrito por K.A. Datsenko y B.L. Wanner (One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS* 97(12):6640-6645. 2001.) Los cebadores de PCR descritos por Baba, et al. (T. Baba, T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K.A. Datsenko, M. Tomita, B.L. Wanner & H. Mori. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection *Molecular Systems Biology* 2:2006.0008) se usaron para crear una supresión en el marco del gen *argB*. Se seleccionaron mutantes sobre canamicina y se retiró a continuación el casete de resistencia mediante recombinasa FLP.

Esta cepa de supresión fue denominada DH5 α Δ *argB*. Un fragmento de ADN que abarca la supresión fue amplificado mediante PCR y el producto de PCR fue secuenciado, confirmando la estructura de la supresión. Esta cepa creció normalmente sobre medios ricos (por ejemplo, LB, TB) pero fue incapaz de crecer en el medio mínimo M63 a menos que el medio se suplementara con arginina u ornitina, tal como se esperaba para una cepa que carecía de una enzima NAGK funcional. Hemos generado un gen sintético que codifica NAGK para simplificar las etapas de clonación y mejorar la expresión de la proteína NAGK en el maíz. De modo adicional, hemos dirigido la localización de la enzima NAGK al cloroplasto de la planta utilizando el péptido de tránsito de cloroplasto (CTP) desde el extremo 5' del gen enolpiruvil shikimato fosfato sintasa (EPSPS) de las algas *Chlamydomonas reinhardtii*. Se transformaron diversos plásmidos que contienen el gen sintético, el cósmido que contiene el gen NAGK de la cepa bacteriana parental ATX16042 y un plásmido de control negativo que contiene un gen de glutamina sintetasa en una cepa de *E. coli* DH5 α Δ *argB*. La presencia y la identidad de los plásmidos se confirmaron mediante la digestión de miniprep de ADN y restricción. Las cepas que contienen plásmido se colocaron en rayas sobre el medio de agar M63 y se suplementaron sobre M63 con ornitina o arginina. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 2 días y se evaluó el crecimiento. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1 - Caracterización funcional del gen NAGK

Plásmido	Descripción	Cultivo sobre		
		M63	M63+orn	M63+arg
pAXX4371	Clon de plásmido que codifica NAGK de cepa ATX16042	++	++	++
pAXX4381	Vector pRSF1b que contiene gen glutamina sintetasa de maíz	-	++	++
pAXX4383	Vector pGA4 que contiene NAGK sintético	+	++	++
pAXX4389	Vector pRSF1b que contiene gen NAGK sintético	++	++	++
pAXX4395	Vector de transformación de palnata que contiene gen CTP-NAGK sintético	++	++	++

Sobreexpresión de proteína en maíz

El vector de transformación de la planta pAX4395 se construyó para dirigir la sobreexpresión de la proteína NAGK en maíz. El vector utiliza el promotor Scub4 y el terminador PinII para guiar la sobreexpresión de una proteína que comprende una guía de cloroplasto EPSPS de *Chlamydomonas* fusionada a NAGK. Un segundo casete en el vector guía la sobreexpresión del gen *dsdA1*, conduciendo a la acumulación de la proteína d-aminoácido oxidasa. Cada uno de los casetes de gen fue secuenciado completamente antes de la transformación de la planta.

Transformación de la planta

El vector pAX4395 se usó para llevar a cabo la transformación mediada por *Agrobacterium* de maíz. Después de la construcción del vector y la transformación de *Agrobacterium*, los vectores se confirmaron mediante el Southern blot por medio de métodos conocidos en la técnica. Las capas de *Agrobacterium* positivas que pasaron estas pruebas se cultivaron luego en un medio sólido para producir conteos de células para los experimentos de transformación a gran escala.

El vector pAX4395 se introdujo a una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* mediante electroporación. Esta cepa también contenía el vector pSB1, que permite que pSB1 y pAX4395 se recombinen *in vivo* para crear un vector que puede dirigir la inserción del casete NAGK al genoma de maíz. La formación del vector recombinante, pAG4395, fue confirmada mediante la hibridación de Southern blot de esta cepa de *Agrobacterium*.

La cepa de *Agrobacterium* que alberga el cointegrado puede usarse para transformar plantas, por ejemplo, mediante el método PureIntro (Japan Tobacco, Inc.). Después del co-cultivo, se cultivaron los embriones en el medio de selección que contiene d-serina para identificar el callo que había integrado el gen de *dsdA* del pAG4395 y expresado la proteína d-aminoácido oxidasa. Luego se movieron eventos individuales que sobrevivieron al crecimiento selectivo en presencia de serina al medio de regeneración y se cultivaron hasta la etapa de plántula usando métodos conocidos en la técnica.

Análisis Western Blot

La expresión de NAGK en estas plantas fue examinada generando anticuerpos que se enlazan específicamente a la proteína NAGK. Brevemente, el gen NAGK fue subclonado en el vector pRSF1b (Novagen) para permitir la sobreexpresión de la proteína NAGK en *E. coli* después de la inducción de IPTG. El vector también introduce una etiqueta 6xHis en el terminal N de la proteína. Después de la sobreexpresión de la proteína, la proteína NAGK fue purificada mediante cromatografía de columna de cobalto y se confirmó la identidad de la proteína purificada mediante secuenciación N-terminal. La proteína purificada se usó luego para inmunizar conejos, y la recolección de suero comenzó 42 días después de la inmunización.

A continuación, el antisuero de NAGK fue usado para evaluar la expresión de proteína en las plantas transgénicas de maíz mediante el análisis de Western blot. Se tomaron muestras de hojas de plantas individuales después de 4 semanas de cultivo en el invernadero y se prepararon extractos de proteína al moler el material vegetal en agua. La concentración de proteína en cada extracto fue determinada mediante el ensayo de Bradford, y se separaron 25 µg de cada extracto sobre geles de poliacrilamida con un gradiente de 4-12%. Las proteínas separadas se transfirieron a nitrocelulosa y luego se sondearon con el antisuero de conejo en una dilución de 1:5000. Después de las etapas de lavado, la nitrocelulosa se puso en contacto con anti-conejo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (dilución de 1:10,000) y los complejos de anticuerpo se visualizaron utilizando reactivos de detección ECL (GE Healthcare). Cuatro eventos transgénicos representativos (#8054, 8055, 8056, 8057) muestran cada uno una fuerte expresión de la proteína NAGK, mientras que una planta de control ("Hi-II") no mostró la presencia de la proteína. Es importante observar que el tamaño de la proteína detectada en el tejido vegetal (~29 kDa) es consistente con el tamaño de la NAGK después de procesar la guía de cloroplasto (tamaño predicho = 29.2 kDa) antes que la guía de cloroplasto no procesada - proteína de fusión NAGK (tamaño predicho = 36.9 kDa).

Análisis de nitrógeno de maíz

Ha sido desarrollada una serie de ensayos que cuantifican los intermediarios de nitrógeno en plantas. Estos métodos de ensayo de nitrógeno se describen en una solicitud de patente previa (WO 2008/051608 "Plants with improved nitrogen utilization and stress tolerance"). Estos ensayos se utilizaron aquí para analizar un total de 10 plantas transgénicas que contenían gen NAGK. Cada una de las plantas fue muestreada (hoja) después de 4 semanas de cultivo en el suelo en un invernadero. Estas muestras de hojas se procesaron para determinar su nitrato, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, amoníaco, aminoácido total, clorofila y niveles de proteína total. Al mismo tiempo, en el análisis se incluyeron plantas que fueron transformadas con un constructo que sólo contenía el marcador seleccionable *dsdAI* (sin NAGK). Estas plantas fueron muestreadas igualmente a las 4 semanas y se denominaron plantas "no-GOI". Los resultados de los ensayos de nitrógeno llevados a cabo en ambos tipos de plantas se muestran más adelante en la tabla 2.

Tabla 2 - Niveles de nitrógeno, eventos de maíz de NAGK vs. no-GOI, 4 semanas después de transferir al suelo

Planta #	GOI	Nitrato (µg /g)	Asparagina (µg /g)	Glutamina (µg /g)	Ácido aspártico (µg /g)	Ácido glutámico (µg /g)	Amoníaco (µg /g)	Aminoácidos totales (mg/g)	Proteína total (mg/g)	Clorofila total a+b (mg/g)
8054	NAGK	275	90	333	251	1875	289	173	9.5	0.070
8055	NAGK	782	73	287	298	2197	368	159	9.4	0.084
8056	NAGK	239	916	250	243	1765	355	174	11.1	0.138
8057	NAGK	437	240	319	630	3347	236	183	14.5	0.080
8570	NAGK	438	276	430	588	2170	229	169	10.6	0.077
8571	NAGK	373	237	516	418	2128	254	163	12.5	0.049
8572	NAGK	-	62	289	695	2640	183	143	9.8	0.069
8573	NAGK	363	177	434	704	2143	262	152	10.9	0.046
8643	NAGK	291	45	366	621	2123	132	122	10.9	0.031
8644	NAGK	694	55	218	-	2220	152	117	11.2	0.029
Avg		432	217	344	494	2281	246	155	11.0	0.061
StdDev		188	261	93	192	445	78	22	1.5	0.032
CV		0.43	1.20	0.27	0.39	0.20	0.32	0.14	0.14	0.47
8058	no-GOI	362	89	234	452	2540	201	115	8.04	0.053
8059	no-GOI	219	82	222	287	1687	227	122	11.41	0.081
8060	no-GOI	751	80	225	312	2083	276	142	10.58	0.099
Avg		444	84	227	351	2103	235	121	10.01	0.078
StdDev		275	5	6	89	427	38	14	1.76	0.023
CV		0.62	0.06	0.03	0.25	0.20	0.16	0.11	0.18	0.30

Estos datos demuestran que el gen sintético que hemos diseñado codifica una enzima NAGK funcional.

Construcción del vector de sobreexpresión de NAGK

La siguiente secuencia de ADN de NAGK (SEQ ID NO: 1) fue aislada de un aislado bacteriano de *Brevibacillus laterosporus*:

ATGCTGCATGAGGTGATGGTGAATCAAGTGCAGCGGCAGCATGCTGGAGCAGCTGCCGGAG
AGCTTCTACAACAAGCTGGCGACGCTGCAAGCAGAAGGAAGAAGCATCGTCATTGTTTCAT
GGAGGAGGGCCGGCCATCAACCAGATGCTGGAGCAGCTGAAGATTGAGCCAACCTTCTCA
AATGGGCTGAGGGTGACAGATGAGCCAACAATGCAAGCTGTGGAGATGGTGCTCTCAGGG
CCCATCAACAAGCTGGTGGTGAGGAAGCTGCTGCACGCCGGCGGCAAGGCATGGGGCCTC
AGCGGCGTGATGGAAGCCTGCTGCAAGCTGTTGAGAAGACTCAAGGCCTCGGCCTGGTG
GGCAGCATCACCGTGGTGGATCAAGCGCCGCTCCAGCTGCTGCTGAGCAATGGCTACATC
CCGGTGGTGTCTCCCATCGCCGTCTCAGAAGATGGAAGAACAAGATACAACCTGCAACGCC
GACACCGTCGCCGGCGCCATTGCTTCAGCTCTCGGCGCCAAGCAGCTGCTGATGCTCACT
GATGTTCTTGGCATCTGGGCAGAAAATGAGCTGGGAGAGAAGCAGCTGCTGCCGACGGTG
ACAACAGAAGATATTCAGCTGATGATGAAGAACCAGATCATCACCGGCGGCATGATCCCC
AAGGTGCAAGCGGCGCTGGATGCTCTAGCTCAAGGAGTTCAAGAAGTGGTGATCTGCAAA
GGAGAAGCTGAGACGCTGGACGGCGTGTTGAAGGGCATGGCCGTCGGCACCTCCATCTCC
GCCGAGATGAGCAGAGGACAAGATTCTCAAGCCTTCATCAGCAACAAGGTGTGAGG

5 La secuencia de ADN de NAGK mostrada anteriormente codifica la siguiente secuencia de proteína NAGK (SEQ ID NO:2):

MLHEVMVIKC	GGSMLEQLPE	SFYNKLATLQ	AEGRSIVIVH	GGGPAINQML
EQLKIEPTFS	NGLRVTDEPT	MQAVEMVLSG	PINKLVVRKL	LHAGGKAWGL
SGVDGSLLQA	VEKTQGLGLV	GSITVVDQAP	LQLLLSNGYI	PVVSPIAVSE
DGRTRYNCNA	DTVAGAIASA	LGAKQLLMLT	DVPGIWAENE	LGEKQLLPTV
TTEDIQLMMK	NQIITGGMIP	KVQAALDALA	QGVQEVVICK	GAEETLDGVV
KGMAVGT S I S	AEMSRGQDSQ	AFISNKV		

La secuencia de ADN fue clonada en el vector de expresión de *E. coli* pRSF-Ib (Novagen, Inc.) para crear el vector pAX4389. Este vector de expresión colocó una etiqueta de 6-histidina en el terminal N de la proteína y colocó la expresión del gen NAGK bajo el control del promotor T7 viral. El mapa de vector para pAX4389 se muestra en la Fig. 1.

10 Preparación del extracto de proteína NAGK

El vector de sobreexpresión pAX4389 de NAGK fue transformado en células de *E. coli* electrocompetentes (BL21 *DE3, Invitrogen) y se obtuvieron colonias individuales mediante la selección sobre el antibiótico canamicina. Luego se cultivó una colonia individual en el medio líquido (caldo LB) hasta que la absorbancia de cultivo (a 600 nm) alcanzó 0.6 y luego se adicionó IPTG 0.5 mM para inducir la expresión del promotor T7. La inducción se llevó a cabo durante la noche a 16 °C. Al siguiente día, se centrifugó el cultivo inducido y se congeló la pastilla durante dos horas a -20°C. Después de descongelar en hielo, la pastilla fue resuspendida en un volumen 1110 avo de amortiguador de lisis (Hepes 50mM, pH 7.0, NaCl 50mM), se trató con Lysozyme (Novagen) a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se aplicó energía de sonido para lisar las células. El material insoluble se separó del extracto de la proteína soluble por medio de centrifugación. Este extracto de proteínas se almacenó luego en una cubeta con hielo, y los ensayos de enzima NAGK fueron preparados un poco más tarde. Como control negativo se preparó al mismo tiempo un vector de control que dirigía la sobreexpresión de una enzima EPSPS bacteriana en el mismo vector de base (pRSF-1b). Este vector se transformó del mismo modo en la misma línea de células de *E. coli* y se seleccionó una colonia transformante para la sobreexpresión de proteína y se preparó un extracto de proteína al mismo tiempo que NAGK.

Ensayo de enzima NAGK -titulación con enzima

El ensayo de enzima NAGK fue adaptado del método de Denes (1970). La formación de producto fue cuantificada utilizando un espectrofotómetro Spectramax 190 a 540 nm.

Se preparó una mezcla maestra para la reacción in vitro de NAGK con los siguientes componentes: Tris 50 mM, pH 8.0; el pH final de la mezcla maestra fue 5.5; hidroxilamina (NH₂OH) 100 mM; MgCl₂ 10 mM; ATP 7 mM; glutamato de N-acetilo (NAG) 70 mM.

Esta mezcla maestra fue subdividida en pocillos individuales en una placa de 96 pocillos (200 µl/volumen final de pocillo), y luego se iniciaron las reacciones adicionando diversas concentraciones de extracto de proteína NAGK pocillos de muestra individuales. Después de 1 hora de incubación a 37 °C, fue cuantificada la absorbancia de cada muestra. La cantidad de proteína NAGK en el extracto fue estimada cargando diluciones del extracto sobre un gel de SDS-poliacrilamida junto con concentraciones conocidas de un estándar de albúmina de suero bovino, y luego tinturando el gel con tintura de proteína Coomassie (Simply Blue, Invitrogen).

Mediante este método se observó que la adición de extracto de proteína NAGK a concentraciones tan bajas como 1 ng/mL generaba un producto de absorbancia a 540 manómetros. La absorbancia resulta del producto de enzima (N-actilglutamil-5-fosfato) que reacciona con hidroxilamina para crear el compuesto absorbente N-acetilglutamil-5-hidroxiato. El gráfico (figura 1) y la tabla (tabla 3) muestran la absorbancia en cada una de las 6 concentraciones diferentes de proteína NAGK. La absorbancia de línea de base generada por un control de solución reguladora (A540 = 0.04) fue sustraída de cada valor de absorbancia de NAGK. La absorbancia generada por una alta concentración del extracto de control (EPSPS bacteriano) fue muy similar al control de solución reguladora (A540 = 0.042), lo cual demuestra que la formación de producto requiere la presencia de la enzima NAGK.

Tabla 3 - Datos de absorbancia primaria para el ensayo de enzima in vitro NAGK, mostrado en la figura 1. El valor de absorbancia para el control de solución reguladora (A540 = 0.040) ha sido sustraído de cada valor

NAGK (ng/mL)	A540 nm
1000	0.872
250	0.518
62.5	0.0159
15.6	0.039
3.9	0.002
1	0.001

Ensayo de enzima NAGK - Titulación con sustrato (NAG)

La siguiente mezcla maestra para ensayos de enzima in vitro NAGK fue preparada para el propósito de titular el sustrato (NAG) en la reacción: Tris 50 mM; pH final fue de 5.5; hidroxilamina (NH₂OH) 100 mM; MgCl₂ 10 mM; ATP 7 mM; enzima NAGK 1000 ng/mL (del extracto de proteína).

Esta mezcla maestra fue subdividida en pocillos individuales en una placa de 96 pocillos (200 µl/volumen final de pocillos), y la reacciones iniciaron luego, al adicionar varias concentraciones del NAG de sustrato a los pocillos de muestra individuales. Las concentraciones de NAG variaron desde 1.6 mM hasta 100 mM. Después de 1 hora de incubación a 37 °C, fue cuantificada la absorbancia de cada muestra. Se preparó y se analizó al mismo tiempo una reacción de control sin sustrato.

Mediante este método se observó que la formación del producto (mediante la enzima NAGK) era dependiente de la concentración de sustrato. En las concentraciones de sustrato ensayadas más bajas (NAG = 1.6 mM, 3.1 mM), la cantidad de producto generado fue aproximadamente proporcional a la concentración de sustrato. En las concentraciones de sustrato ensayadas más altas (NAGK = 50 mM, 100 mM), el sustrato estaba en exceso y sólo se observaron ligeras diferencias en la formación de productos. En la figura 3 se muestra un gráfico de estos datos y en la tabla 4 se muestran los valores numéricos de absorbancia.

Tabla 4 - Datos de absorbancia primaria para el ensayo de enzima in vitro NAGK, mostrado en la figura 3. El valor de absorbancia para la reacción de control sin sustrato (A540 = 0.041) ha sido sustraído de cada valor.

NAG (mM)	A540 nm
100	0.57
50	0.515
25	0.411
12.5	0.313
6.3	0.0212
3.1	0.13
1.6	0.07

10 Ensayo de enzima NAGK -Titulación con arginina

La siguiente mezcla maestra para los ensayos de enzima in vitro NAGK fue preparada para el propósito de determinar el efecto de arginina sobre la actividad de enzima NAGK: Tris 50 mM; pH final fue de 5.5; hidroxilamina (NH₂OH) 100 mM; MgCl₂ 10 mM; ATP 7 mM; NAG 70 mM.

15 Esta mezcla maestra fue subdividida en pocillos individuales en una placa de 96 pocillos (200 µl/volumen final de la cavidad), y luego se adicionaron concentraciones variantes de arginina (0.15 mM a 10 mM) a los pocillos individuales. Luego fueron iniciadas las reacciones de enzima mediante la adición de enzima NAGK (100 ng/mL). Después de 30 minutos de incubación a 37 °C, fue cuantificada la absorbancia de cada muestra. Fue preparada y analizada al mismo tiempo una reacción de control sin arginina.

20 Por medio de este método se observó que la formación de producto (por medio de la enzima NAGK) era insensible a la concentración de arginina en el intervalo de concentraciones ensayadas. Un gráfico de estos datos se muestra en la figura 4 y los valores numéricos de absorbancia se muestran en la tabla 5.

Tabla 5 - Datos de absorbancia primaria para el ensayo de enzima in vitro NAGK mostrado en la figura 4.

Arginina (mM)	A540 nm
10	0.287
5	0.266
2.5	0.257
1.25	0.237
0.63	0.263
0.31	0.259
0.16	0.291
0	0.284

Plantas de maíz que contienen el gen NAGK producen un número incrementado de granos por planta

25 Fueron plantadas semillas de un evento de maíz que contiene el gen NAGK (#8057) en un sitio de investigación al aire libre al mismo tiempo que controles negativos segregantes. Fue cultivado un total de 5 lotes (promedio de 55 plantas por lotes) tanto para la línea transgénica como para la línea de control. Las prácticas de campo típicas fueron utilizadas durante el cultivo de estas plantas, excepto que no se aplicó nitrógeno suplementario antes de plantar. Al final de la estación de cultivo, el rendimiento de grano total (ajustado a 15% de humedad del grano) fue medido para todas las plantas en cada lote.

30 Adicionalmente, fue registrado el número promedio de hileras de granos por mazorca (10 plantas por lotes) y el número promedio de granos por hilera (10 plantas por lote) y los datos se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Rendimiento de grano, hileras por mazorca, granos por hilera para el evento de NAGK 8057.

Genotipo	Rendimiento de grano (Bushels/Acre @ 15% humedad)(+/- desviación estándar)	Mazorcas por hilera (+/- desviación estándar)	Granos por hilera (+/- Desviación estándar)
NAGK	177.6 +/-30.4	13.8 +/-0.4	39.2 +/-2.4
Control	143.2 +/-19.3	13.3 +/-0.1	33.8 +/-1.7

Plantas de maíz que contienen el gen NAGK producen un número incrementado de mazorcas por planta

La mazorca de un evento de maíz T0 que contiene el gen NAGK (#8644) fue polinizada con una línea endogámica y fueron cosechadas las semillas T1. A continuación se cultivaron 4 plantas T1 segregantes positivas en condiciones de invernadero hasta la madurez. Fue registrado el número de mazorcas generadas por cada una de las plantas T1 y los datos se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Número de mazorcas por planta para el evento de NAGK 8644

Genotipo	Número de planta	Número de mazorcas en planta
NAGK	Planta TI #1	2
NAGK	Planta TI #2	3
NAGK	Planta TI #3	3
NAGK	Planta TI #4	3

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1

ATGCTGCATGAGGTGATGGTGTATCAAGTGCGGCGGCAGCATGCTGGAGCAGCTGCCGGAG
AGCTTCTACAACAAGCTGGCGACGCTGCAAGCAGAAGGAAGAAGCATCGTCATTGTTTCAT
GGAGGAGGGCCGGCCATCAACCAGATGCTGGAGCAGCTGAAGATTGAOCCAACCTTCTCA
AATGGGCTGAGGGTGACAGATGAGCCAACAATGCAAGCTGTGGAGATGGTGCTCTCAGGG
CCCATCAACAAGCTGGTGGTGAGGAAGCTGCTGCACGCCGGCGGCAAGGCATGGGGCCTC
AGCGGCGTGATGGAAGCCTGCTGCAAGCTGTTGAGAAGACTCAAGGCCTCGGCCTGGTG
GGCAGCATCACCGTGGTGGATCAAGCGCCGCTCCAGCTGCTGCTGAGCAATGGCTACATC
CCGGTGGTGTCTCCCATCGCCGTCTCAGAAGATGGAAGAACAAGATACAACCTGCAACGCC
GACACCGTCGCCGGCGCCATTGCTTCAGCTCTCGGCGCCAAGCAGCTGCTGATGCTCACT
GATGTTCTTGGCATCTGGGCAGAAAATGAGCTGGGAGAGAAGCAGCTGCTGCCGACGGTG
ACAACAGAAGATATTCAGCTGATGATGAAGAACCAGATCATCACCGGCGGCATGATCCCC
AAGGTGCAAGCGGCGCTGGATGCTCTAGCTCAAGGAGTTCAAGAAGTGGTGATCTGCAAA
GGAGAAGCTGAGACGCTGGACGGCGTGGTGAAGGGCATGGCCGTGGGCACCTCCATCTCC
GCCGAGATGAGCAGAGGACAAGATTCTCAAGCCTTCATCAGCAACAAGGTGTGAGG

SEQ ID NO: 2

ES 2 571 710 T3

MLHEVMVIKC GGSMLEQLPE SFYNKLATLQ AEGRSIVIVH GGGPAINQML
EQLKIEPTFS NGLRVTDEPT MQAVEMVLSG PINKLVVRKL LHAGGKAWGL
SGVDGSL LQA VEKTQGLGLV GSITVVDQAP LQLLLSNGYI PVVSPIAVSE
DGRTRYNCNA DTVAGAIASA LGAKQLLMLT DVPGIWAENE LGEKQLLPTV
TTEDIQLMMK NQIITGGMIP KVQAALDALA QGVQEVVICK GEAETLDGVV
KGMVAVGTSIS AEMSRGQDSQ AFISNKV

SEQ ID NO: 3

ATGCAGCTGCTCAACCAGCGGCAGGCGCTGCGGCTGGGAAGAAGCTCCGCCAGCAAGAAC
CAGCAGGTGGCGCCGCTGGCATCAAGGCCGGCAAGCAGCCTCTCCGTCTCCGCCTCCTCC
GTGGCGCCGGCGCCGGCCTGCTCGGCGCCGGCCGGCGCCGGCCGCGCCGCGCCGTGGTGGTG
CGCGCCTCCGCCACCAAGGAGAAGGTGGAGGAGCTCACCATCCAG

Reivindicaciones

1. Una planta, donde dicha planta se transforma con al menos una primera secuencia de nucleótidos seleccionadas del grupo consistente en:
 - a) la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1;
 - 5 b) una secuencia de nucleótidos que es idéntica en al menos 85% de secuencia a SEQ ID NO: 1, en cuyo caso dicha secuencia de nucleótidos incrementa el uso de nitrógeno en una planta;
 - c) la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y,
 - d) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos 85% de secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en cuyo caso dicha secuencia de nucleótidos incrementa el uso de nitrógeno en una planta.
- 10 2. Una planta de acuerdo con la reivindicación 1 o una parte componente de la misma o una semilla producida a partir de la misma, en cuyo caso la planta se selecciona del grupo consistente en maíz; sorgo; trigo; girasol; tomate; crucíferas; pimientos; patata; algodón; arroz; soja; remolacha; caña de azúcar; tabaco; cebada; y colza de semilla de aceite; *Brassica* sp.; alfalfa; centeno; mijo; cárcamos; cacahuetes; batata dulce; mandioca; café; coco; piña; cacao; té; plátano; aguacate; higo; guayaba; mango; olivo; papaya; anacardo o marañón; macadamia; almendra; avena; vegetales; hierbas; vegetales que incluyen pero no se limitan a cebollas, tomates, lechugas, habichuelas, habichuelas verdes, habas, guisantes y miembros del género *Curcumis* tal como pepino, cantalupo, y melón amarillo; plantas ornamentales que incluyen pero no se limitan a azalea, hidrangea, hibisco, rosas, tulipanes, narcisos, petunias, clavel, poinsetia y crisantemo; árboles de pulpa; palma de aceite; y coníferas.
- 15 3. Una planta de acuerdo con la reivindicación 1, o una célula vegetal, material vegetal o semilla de la misma, la cual comprende un gen NAGK insensible a arginina que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.
4. Una planta que ha sido regenerada a partir de una célula vegetal o semilla de acuerdo con la reivindicación 3 que comprende dicho gen NAGK.
- 25 5. Una planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 3 en cuyo caso la planta es maíz y la planta transformada tiene un número de granos incrementado en comparación con una planta de maíz que no comprende un gen NAGK que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.
6. Una planta de maíz transgénica tal como se define en la reivindicación 5, en cuyo caso el número incrementado de granos es el resultado de un número promedio incrementado de granos por mazorca o un número promedio incrementado de mazorcas por planta, o ambos.
- 30 7. Una secuencia de NAGK que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionadas del grupo consistente en:
 - a) la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1;
 - b) una secuencia de nucleótidos que es idéntica en al menos 85% de secuencia a SEQ ID NO: 1, en cuyo caso dicha secuencia de nucleótidos incrementa el uso de nitrógeno en una planta;
 - 35 c) la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y
 - d) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos 85% de secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en cuyo caso dicha secuencia de nucleótidos incrementa el uso de nitrógeno en una planta.
8. Un constructo de vector que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionadas del grupo consistente en:
 - 40 a) la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1;
 - b) una secuencia de nucleótidos que es idéntica en al menos 85% de secuencia a SEQ ID NO: 1, en cuyo caso dicha secuencia de nucleótidos incrementa el uso de nitrógeno en una planta;

- c) la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y
- d) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos 85% de secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en cuyo caso dicha secuencia de nucleótidos incrementa el uso de nitrógeno en una planta.
- 5 9. Un constructo de vector según la reivindicación 8, que comprende además una secuencia promotora de ADN 5', de modo que una secuencia promotora se selecciona del grupo consistente en promotores de planta constitutivos y promotores específicos de tejido, y una secuencia terminadora 3', en cuyo caso la secuencia de nucleótidos, la secuencia promotora de ADN y la secuencia terminadora se encuentran acopladas de manera operativa para permitir la transcripción de la secuencia de nucleótidos.
- 10 10. Un anticuerpo policlonal que comprende un anticuerpo policlonal a una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.
11. Una semilla de planta transformada con un constructo de vector según la reivindicación 8 o la reivindicación 9.
12. Una célula hospedera, en cuyo caso dicha célula hospedera se transforma con al menos una primera secuencia de nucleótidos seleccionadas del grupo consistente en:
- 15 a) la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1;
- b) una secuencia de nucleótidos que es idéntica en al menos 85% de secuencia a SEQ ID NO: 1, en cuyo caso dicha secuencia de nucleótidos incrementa el uso de nitrógeno en una planta;
- c) la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y,
- 20 d) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos 85% de secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en cuyo caso dicha secuencia de nucleótidos incrementa el uso de nitrógeno en una planta.
13. Una célula hospedera según la reivindicación 12, en cuyo caso la célula hospedera se selecciona del grupo consistente en células bacterianas y células vegetales.
- 25 14. Un método de expresión de una molécula de ácido nucleico que incrementa nitrógeno en una planta y dicho método comprende los pasos de proporcionar una planta transgénica o semilla de planta transformada con un constructo de vector según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, y cultivar la planta transgénica o una planta cultivada a partir de la semilla de planta transgénica en condiciones efectivas para expresar la molécula de ácido nucleico en dicha planta transgénica o dicha planta cultivada a partir de la semilla de planta transgénica.
- 30 15. Un método de acuerdo con la reivindicación 14, en cuyo caso la planta se selecciona del grupo consistente en maíz; sorgo; trigo; girasol; tomate; crucíferas; 500; patata; algodón; arroz; soja; remolacha; caña de azúcar; tabaco; cebada; y colza de semilla de aceite; *Brassica sp.*; alfalfa; centeno; mijo; cártamo; cacahuetes; batata dulce; mandioca; café; coco; piña; cacao; té; plátano; aguacate; higo; guayaba; mango; olivo; papaya; anacardo o marañón; macadamia; almendra; avena; vegetales; hierbas; vegetales que incluyen pero no se limitan a cebollas, tomates, lechugas, habichuelas verdes, habas, guisantes y miembros del género *Curcumis* tal como pepino, cantalupo, y melón amarillo; plantas ornamentales que
- 35 incluyen pero no se limitan a azalea, hidrangea, hibisco, rosas, tulipanes, narcisos, petunias, clavel, poinsetia, y crisantemo; árboles de pulpa; palma de aceite; y coníferas.
16. Un método según la reivindicación 14, en el cual la expresión de la molécula de ácido nucleico es efectiva al reducir una limitación de tal manera que el rendimiento se incremente o se incremente la eficiencia de utilización de nitrógeno o se mejore la tolerancia al estrés o se altere la morfología de dicha planta transgénica o dicha planta cultivada a partir de la
- 40 semilla de planta transgénica.
17. Un método para mejorar el número de granos de una planta de maíz que comprende los pasos de introducir al genoma de la planta un gen NAGK que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 que mejora la eficiencia de utilización de nitrógeno y cultivar la planta transformada para producir grano.

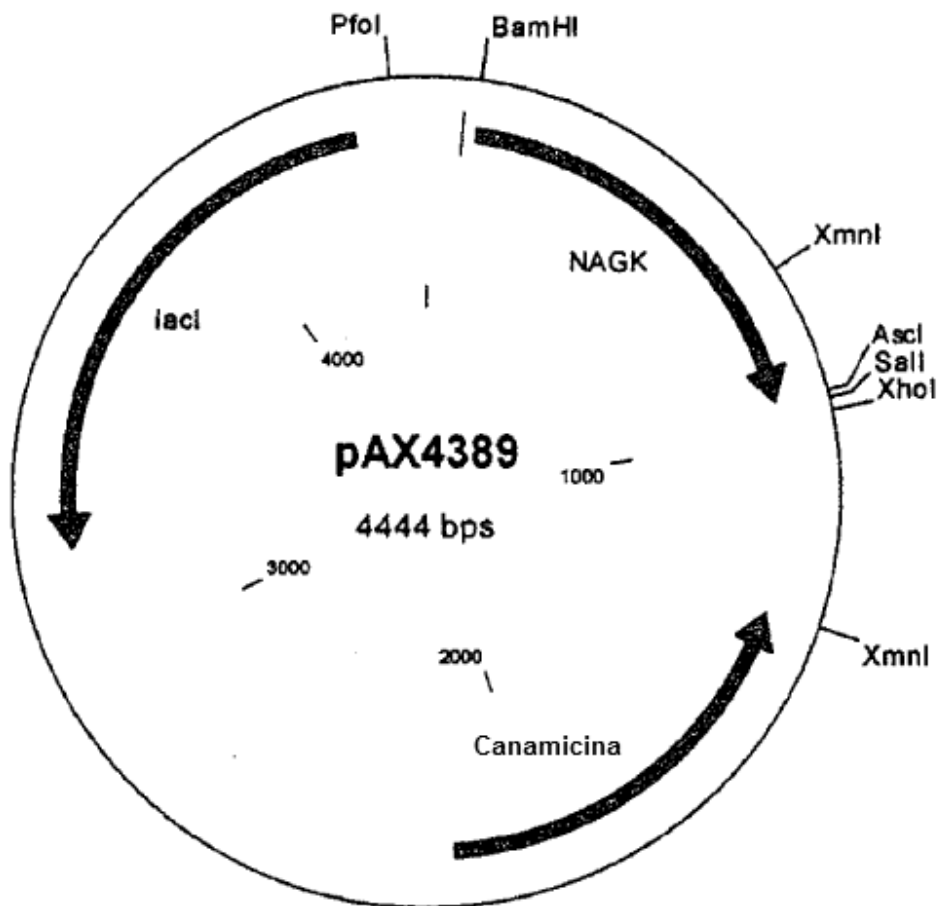


FIG. 1

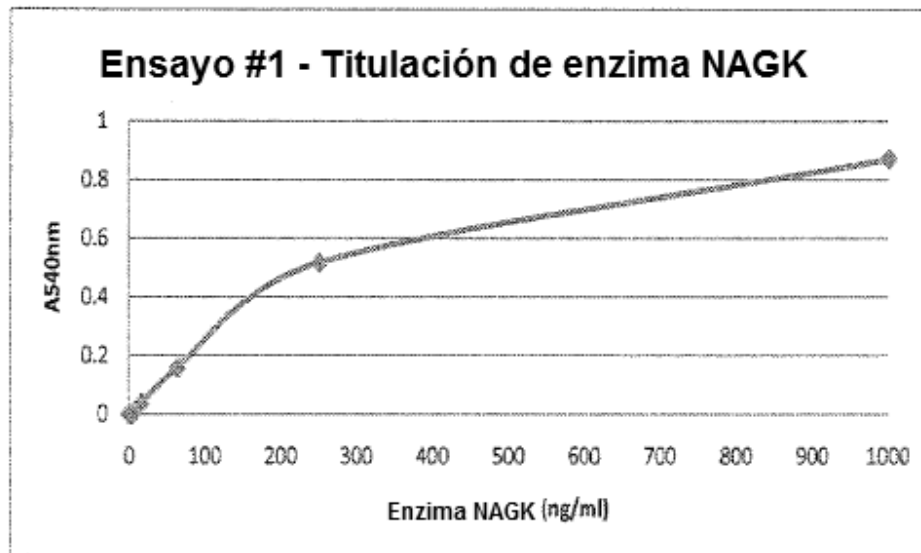


FIG. 2

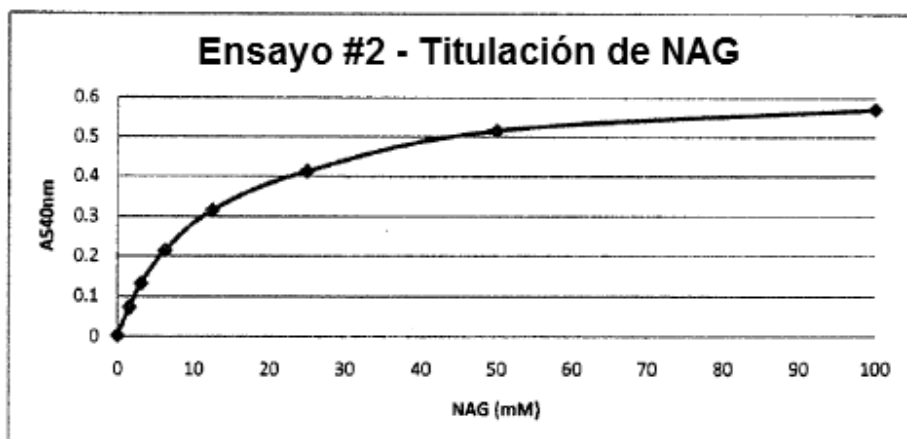


FIG. 3

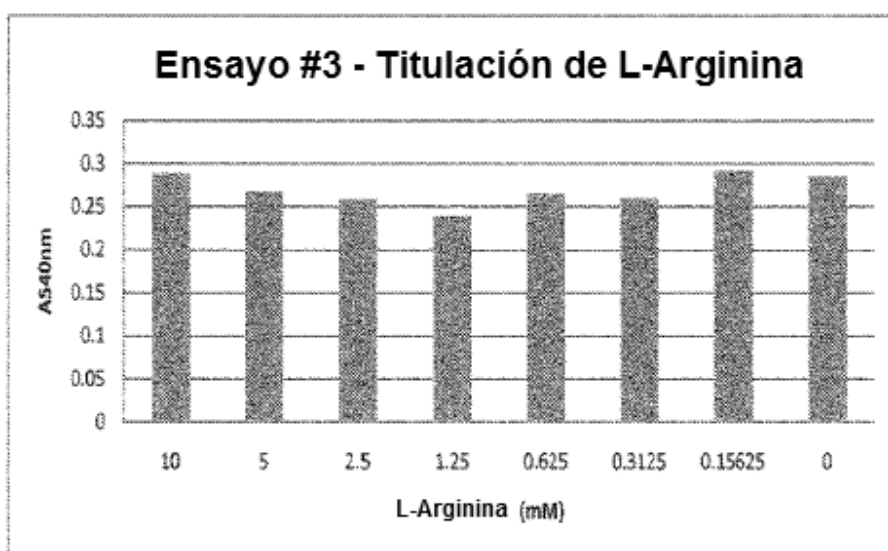


FIG. 4