

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 666**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2009 E 09705862 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2238254**

54 Título: **Método para la protección de plantas de estrés y la senescencia**

30 Prioridad:

31.01.2008 US 24930

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.09.2016

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.
(50.0%)
At the Weizmann Institute of Science P.O. Box 95
76100 Rehovot, IL y
BEN-GURION UNIVERSITY OF THE NEGEV
RESEARCH AND DEVELOPMENT AUTHORITY
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**FLUHR, ROBERT y
SAGI, MOSHE**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 582 666 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).

Método para la protección de plantas de estrés y la senescencia**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere al campo de la supervivencia de la planta y la adaptación al estrés ambiental, así como a la conservación de productos vegetales frescos. En particular, la presente invención se refiere al papel de la alantoína ureidos y alantoato en la protección de plantas y/o partes de la planta de los daños relacionados con el estrés.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] La nueva movilización de los recursos vegetales durante el estrés facilita la adaptación ambiental. El ejemplo definitivo de dicha reasignación de metabolito en una hoja está delineada por la senescencia foliar. Además del envejecimiento natural, muchos factores ambientales tales como la temperatura, la sequía, el suministro de nutrientes, ataque de patógenos y las condiciones de luz pueden acelerar la senescencia. Por ejemplo, estrés inducido por la oscuridad que se caracteriza por amarillamiento de las hojas, debido a la descomposición de la clorofila y cloruro y degradación general de cloroplast. Los cambios metabólicos durante la senescencia están asociados con la transición de la asimilación de nutrientes a la rotación de metabolito que se acelera por las actividades catabólicas. Por ejemplo, en las legumbres, los productos catabólicos de purina, los ureidos, pueden proporcionar la planta con metabolitos fácilmente transportables que sobresalen en una alta relación de nitrógeno a carbono. Se ha sugerido que la relación de nitrógeno de carbono generado en el catabolismo de la purina de conservación de energía puede ser crítico para la supervivencia de plantas en condiciones de estrés.

[0003] Se sabe poco sobre el control del catabolismo de las purinas en las hojas. catabolismo de las purinas comienza con la conversión de monofosfato de adenosina (AMP) para el monofosfato de inosina (IMP) por AMP desaminasa (AMPD, E.C.3.5.4.6) que se lleva por múltiples vías para la producción de oxipurinas tales como xantina e hipoxantina. Sin embargo, aún más la degradación de la xantina a urato requiere la actividad de la enzima fundamental, deshidrogenasa de xantina (XDH, EC 1.1.1.204). Urato se metaboliza más para el ureido, alantoína, a través de oxidasa de urato (UO) y la proteína similar a transtiretina (TLP). En Arabidopsis, la alantoinasa (ALN, E. C. 3.5.2.5.) convierte a la alantoína alantoato, seguido de alantoato amidinohidrolasa (AAH, E. C. 3.5.3.9.), que convierte a alantoato ureidoglicolato y amoniaco. Un ureidoglicolato liasa putativo convierte al ureidoglicolato en bloques de construcción básicos del metabolismo, glioxilato y urea.

[0004] XDH contiene cofactor de molibdeno (MoCo), FAD y dominios de unión a NADPH. El segundo de oxígeno en el mono-oxo-MoCo se sustituye por un ligando azufre. Cuando se utiliza la xantina/hipoxantina o NADH como sustratos de la forma sulfo MoCo de XDH puede generar radicales superóxido. En contraste, la forma desulfo-MoCo de XDH muestra la actividad dependiente solamente FAD y generats radical superóxido sólo en presencia de NADH.

[0005] Entre los dos genes que codifican XDH detectadas en el genoma de Arabidopsis (AtXDH1 y AtXDH2), solo AtXDH1 responde a los estímulos ambientales. Una función específica de XDH en el envejecimiento no está claro, aunque tanto en el corazón de los mamíferos y en las plantas la actividad de XDH se mejora con la edad.

[0006] Alamillo JM et al. ("Efectos de urato, un inhibidor natural de la toxicidad mediada por peroxinitrito, en la respuesta de Arabidopsis thaliana para Pseudomonas syringae del patógeno bacteriano", Plant JouARNI, marzo de 2001, Blackwell Publish. Ltd. GB, Vol. 25, nº. 5, páginas 529-540) describen los efectos del tratamiento de urato sobre la toxicidad de peroxinitrito mediada por la Arabidopsis thaliana. El urato se ha demostrado que actúan como un agente de barrido eficaz en las plantas, y para atenuar significativamente la muerte celular de las plantas de Arabidopsis en respuesta a una cepa no virulenta de Pseudomonas syringae.

[0007] El documento WO 02/16655 da a conocer los genes y las proteínas de estrés regulados en plantas y plantas transgénicas que comprenden tales genes. Uno de los genes codifica una deshidrogenasa de xantina (SEQ ID NO: 2642) y otro una proteína de xantina similar a dehidrogenasa (SEQ ID NO: 2643).

[0008] WO 2004/061018 se refiere también a los genes implicados en el estrés en las plantas de arroz y a las plantas transgénicas que comprenden estos genes. La proteína de arroz relacionada con estrés # 32 presenta una identidad de más de 68% en 1377 nucleótidos se solapan con AtXDH1.

[0009] Nakagawa Ayami et al. ("El silenciamiento mediado por ARNi de la deshidrogenasa de xantina perjudica el crecimiento y la fertilidad y acelerado y senescencia de las hojas en las plantas transgénicas de Arabidopsis", Pland y Fisiología Cell, Vol. 48, No. 10, 2007, páginas 1484-1495) describe que la actividad de la oxidasa de xantina es mejorada durante la senescencia de salida. Los autores concluyen que la función de la deshidrogenasa de xantina que juega un papel en el crecimiento y desarrollo de plantas de Arabidopsis es su actividad catabólica de purina con la producción de ácido úrico, y un eliminador de antioxidante eficaz.

[0010] La aplicación exógena de ureidos o el incremento de la acumulación endógena de ureidos para protección de las plantas y, por ejemplo, la extensión de la vida útil de los productos no se ha conocido o sugerido en la técnica anterior.

5 **SUMARIO DE LA INVENCION**

[0011] La presente invención proporciona métodos para la protección de plantas o partes de plantas a partir de un proceso relacionado con el estrés. La presente invención proporciona además plantas transgénicas que tienen una mayor tolerancia a un proceso relacionado con el estrés.

10 [0012] Se da a conocer ahora que niveles elevados de ureidos protegen a las plantas de los efectos deletéreos de la senescencia y el estrés. Sin desear estar ligado por ninguna teoría o mecanismo de acción, la protección es probable que resulte de aliviar estrés oxidativo por barrido de especies reactivas del oxígeno. La presente invención también identifica las enzimas y variantes de la enzima que regulan la producción de ureidos en las plantas.

15 [0013] La presente invención se basa en parte en el uso de modelos experimentales de la senescencia de planta y el estrés tales como el tratamiento oscuro extendido con el fin de inducir procesos de removilización de metabolitos. Ahora se da a conocer por primera vez que tanto el estrés inducido por la oscuridad y aumento de la edad indujeron la acumulación de los ureidos, incluyendo alantoína y alantoato, en las hojas de tipo silvestre. Por el contrario, en estas condiciones, en la deshidrogenasa de xantina-1 (XDH1) se observaron plantas en peligro, xantina pero no ureidos acumulados, y senescencia acelerada y tasas de mortalidad se observaron. Por lo tanto, se demostró un papel protector para la deshidrogenasa de xantina y ureidos en la senescencia.

20 [0014] Inesperadamente, esta protección puede también lograrse mediante la aplicación exógena de ureidos a las plantas o a partes de los mismos. En particular, la presente invención proporciona composiciones y métodos que comprenden ureidos exógenos para la protección después de la cosecha de productos de planta frescos de senescencia y senescencia prematura.

25 [0015] De acuerdo con los principios de la invención, es posible utilizar cualquier método que aumente ureidos celulares en momentos críticos y los niveles para producir plantas más resistentes. Las plantas sufren daños causados por el estrés oxidativo durante la sequía, el abuso del medio ambiente frío y otros. Sin desear estar ligado por ninguna teoría o mecanismo de acción se contempla que la mejora de las vías carroñero, específicamente a través de la presencia de niveles más altos de ureidos, produce plantas que están protegidas de daños tales como el daño causado por el estrés ambiental.

30 [0016] De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para proteger plantas o partes de plantas a partir de un proceso relacionado con el estrés, que comprende la aplicación a la planta o parte de planta de una composición que comprende una cantidad de al menos un ureido seleccionado del grupo que consiste de la alantoína y alantoato en una cantidad eficaz para disminuir o retrasar el proceso relacionado con el estrés, en donde dicho proceso relacionado con el estrés se selecciona del grupo que consiste en la degradación de la clorofila, el estrés oxidativo, la senescencia, la senescencia prematura o cualquier combinación de los mismos.

35 [0017] De acuerdo con ciertas realizaciones, la composición comprende 0,001-10mM ureido, típicamente ureido 0,01-10 mM, más típicamente ureido 0,1 mM-0,5 mM. La composición puede comprender ureido 0,1 mM o 0,5 mM ureido o cualquier cantidad en los intervalos especificados anteriormente.

40 [0018] De acuerdo con algunas realizaciones las partes de la planta se seleccionan a base de frutas, verduras, flores y ramas cortadas. Otras partes de plantas cosechadas también pueden ser tratadas. Las plantas pueden incluir, entre otros, legumbres, hierbas y hortalizas de raíz o de un producto de hoja (por ejemplo, el perejil). Tal como se utiliza aquí, el término "cosecha" se refiere a la recolección de productos de plantas agrícolas, incluyendo la recolección (por ejemplo, frutas), se separe de la tierra (por ejemplo, cultivos de hoja como la lechuga, la espinaca y el perejil), corte (por ejemplo, ramas, incluidas las sucursales ornamentales) y similares.

45 [0019] De acuerdo con algunas formas de realización la aplicación de la composición a las plantas incluye la pulverización de las plantas o partes de plantas con la composición. De acuerdo con otras realizaciones de aplicación incluye la adición de la composición a la raíz de la planta o medio rama de la planta. De acuerdo con otras realizaciones, la composición se aplica por inmersión al menos parcialmente de la parte de la planta o de la planta en la composición. Una combinación de métodos que aplican también se puede usar de acuerdo con realizaciones de la invención.

50 [0020] Cantidades de ureido elevadas dentro de una célula de planta se pueden conseguir mediante la selección de una planta de variante o manipulando genéticamente la planta para producir o acumular mayor concentración de ureido en comparación con una planta de tipo salvaje. Las plantas seleccionadas o modificadas pueden sobreexpresar enzimas que intervienen en el proceso de producción de ureidos, o han disminuido los niveles de expresión de las enzimas de utilización de ureido tal que el ureido se acumula. La selección para la planta puede incluir el uso de una sonda específica para al menos una enzima relacionada con la producción o acumulación de

ureidos y/o la selección de un mutante que tiene resultados de purina mejorados.

[0021] Por lo tanto, según otro aspecto, la presente invención proporciona una planta transgénica que comprende al menos una célula transformada con una deshidrogenasa polinucleótido que codifica la xantina (XDH) y al menos un polinucleótido adicional que codifica una enzima seleccionada del grupo que consiste en AMP desaminasa (AMPD), oxidasa de urato (UO) y proteína similar a transtiretina (TLP), en el que la planta transgénica comprende cantidad elevada de un ureido seleccionado del grupo que consiste de la alantoína y alantoato y tiene una mayor tolerancia a un proceso relacionado con el estrés seleccionado de entre el grupo que consiste en la degradación de la clorofila, el estrés oxidativo, la senescencia, la prematura de senescencia o cualquier combinación de los mismos en comparación con una planta no transgénica correspondiente.

[0022] De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona una planta transgénica que comprende al menos una célula transformada con un polinucleótido que reduce la expresión de una enzima endógena de la planta en la vía de la utilización de ureido seleccionado del grupo que consiste en alantoinasa (ALN) y alantoato amidinohidrolasa (AAH) en la que la planta transgénica comprende una cantidad elevada de un ureido seleccionado del grupo que consiste de la alantoína y alantoato y tiene una mayor tolerancia a un proceso relacionado con el estrés seleccionado de entre el grupo que consiste en la degradación de la clorofila, el estrés oxidativo, la senescencia, la senescencia prematura o cualquier combinación de los mismos en comparación con una planta transgénica no correspondiente.

[0023] Estas y otras realizaciones de la presente invención se harán evidentes en conjunción con las Fig.s, descripción y reivindicaciones que siguen.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIG.S

[0024]

FIG. 1 demuestra la expresión XDH de *Arabidopsis* de tipo salvaje y plantas modificadas *Atxdh1*. Fig. 1a muestra la expresión relativa de *Atxdh1* y *Atxdh2* monitoreados por análisis RT-PCR cuantitativa en tiempo real utilizando plantas de tipo silvestre (Col, panel izquierdo) y XDH comprometidas (KO, SALK_148364 *Atxdh1* línea de inserción de T-ADN, y Ri, tres líneas de interferencia de ARN *x dh*, panel derecho). Fig. 1b muestra XDH dependiente de oxidasa NADH y la Fig. 1c muestra actividades deshidrogenasa de hipoxantina/xantina dependiente de XDH de tipo silvestre (Col, panel izquierdo) y KO (plantas comprometidas XDH, panel derecho) extractos de hojas. El O_2^- generado en gel se midió utilizando NBT como aceptor de electrones y presenta con relación al día 0 o, durante el período de recuperación, con respecto al día 6 en la oscuridad. Cada carril contenía 200 μ g de proteínas solubles. Fig. 1d demuestra la actividad de generación de O_2^- de XDH en los extractos de hojas de tipo silvestre y plantas XDH comprometidas. Las plantas se trataron y se tomaron muestras como se describe anteriormente. La cinética se ensayó usando epinefrina como receptor de electrones e hipoxantina/xantina como sustrato siguiente por absorbancia de adenocroma. Los valores son medias \pm SE (n=6).

FIG. 2 demuestra las respuestas de tipo salvaje y plantas de *Arabidopsis* comprometidas por XDH al estrés oscuro. Fig. 2a muestra plantas de tipo silvestre (Col) y en peligro XDH (KO, SALK_148364; Ri, *x dh1* interferencia de ARN) durante 6 días de tratamiento oscuro y la posterior recuperación de 9 días. La Fig. 2b muestra las tasas de supervivencia de tipo silvestre y plantas en peligro XDH 15 días después de la exposición a las condiciones descritas en la Fig. 2a. Las barras de error indican SE (n=12). La Fig. 2c muestra hojas de control no tratadas y plantas oscuras tratadas y plantas en peligro XDH extirpados antes de la exposición a la oscuridad (0) y 6 días después (6). La Fig. 2d demuestra el nivel de daño de las hojas que se muestran en Fig. 2c calculado como se describe en los procedimientos experimentales. Las barras muestran los medios \pm SEM (n=6). FIG. 2e muestra el contenido de clorofila en las hojas muestreadas durante un tratamiento oscuro de 6 días. Las barras de error indican SE (n=6). La Fig. 2f muestra el contenido de proteína soluble total en las hojas muestreadas durante un tratamiento oscuro de 6 días. Las barras de error indican SE (n=6). Fig. 2g demuestra el progreso en la muerte celular durante un tratamiento oscuro 4 días como se indica por la tinción con azul de tripano. Al menos 8 hojas se examinaron para cada condición, y se muestran los campos representativos que tienen el mismo aumento.

FIG. 3 demuestra la transcripción de expresión relativa de los genes relacionados con la degradación de la clorofila y senescencia seleccionados. Las transcripciones fueron monitoreadas por análisis cuantitativa RT-PCR en tiempo real utilizando de tipo silvestre (Col) y XDH comprometieron plantas (KO, SALK_148364, *Atxdh1* línea de inserción de T-ADN y Ri, significan, de 3 líneas de interferencia independientes de ARN *x dh1*). Las plantas se muestrearon antes de ser colocadas en la oscuridad (0) y durante un período oscuro de seis días. Las expresiones de transcripción de cada línea tratada se comparó con la línea sin tratar después de la normalización para el producto del gen *Arabidopsis EF-1 α* (*At5g60390*) y presentados como expresión relativa. Los valores son medias \pm SEM (n=6).

FIG. 4 muestra tetrazolio de nitroazul (NBT) $-O_2^-$ generación en tipo silvestre (Col) y plantas *x dh1* de

interferencia de ARN (Ri) en respuesta al tratamiento oscuro. La Fig. 4a demuestra el nivel de superóxido como se visualizó por tinción con NBT de hojas en roseta en la ausencia o presencia de alopurinol (+Allo) o yodonio difenileno (+DPI). FIG. 4b muestra el análisis cuantitativo de la producción NBT-O₂ en las hojas en respuesta al tratamiento oscuro.

5 Generación de NBT-O₂ se cuantificó en hojas manchadas mediante escaneado. Inserto superior: generación total relativa NBT-O₂; inserción media: generación relativa NBT-O₂ por XDH obtenido restando +Allo a partir de valores de escaneo de hoja -Allo; inserción menor: generación relativa NBT-O₂ por fuente no XDH, obtenido restando +DPI de los valores de escaneo de la hoja +Allo. Los datos son medias 6 SE (n=8).

10 **FIG. 5** muestra el análisis de los metabolitos de la purina, xantina, alantoína y alantoato, en respuesta al estrés oscuro. Xantina (Fig. 5a), alantoína (Fig. 5b) y alantoato (Fig. 5c) se determinaron en hojas en roseta de tipo silvestre (Col) y plantas XDH1 (KO, SALK_148364; Ri, *xdh1* ARN de interferencia) comprometidas después de permanecer en la oscuridad durante 6 días y se transfirieron a 16 h luz/8 h oscuridad régimen de recuperación durante 9 días adicionales. Los valores son medias 6 SEM (n=6).

15 **FIG. 6** demuestra los niveles de transcripción de expresión de los genes de catabolismo de purina *Arabidopsis*, deaminasa AMP (*AMPD*), alantoinasa (*ALN*) y alantoato amidinohidrolasa (*AAH*) durante el estrés oscuro y periodo de recuperación posterior. El análisis cuantitativo de las transcripciones de tiempo real RT-PCR se realizó a través de tipo silvestre (Col) y plantas comprometidas XDH (KO, SALK_148364 *Atdxh1* línea inserción de T-ADN; Ri, a través de tres líneas de interferencia de ARN *xdh*) mantenidas en la oscuridad durante 6 días y se transfirieron a un régimen 16 h luz/8 h oscuridad para la recuperación durante 9 días adicionales. Las expresiones de cada línea tratada a oscuridad se comparó a la línea sin tratar después de la normalización para el producto del gen *Arabidopsis EF-1α* (*At5g60390*) y se presenta como la expresión relativa en el día 0 o, para el período de recuperación, en comparación con el valor de la línea tratada a la oscuridad después de 6 días de oscuridad. Los valores son medias ± SEM (n=3).

20 **FIG. 7** demuestra la influencia del envejecimiento sobre el fenotipo de la hoja, el nivel de metabolito de la purina y la expresión del transcrito de tipo salvaje y las plantas comprometidas XDH1. La Fig. 7a muestra un tipo silvestre de 75 días de edad (Col) y plantas de interferencia *xdh1* de ARN (Ri) y sus hojas representativas (los paneles izquierdo y central). La expresión del transcrito de *SAG12* medida por RT-PCR cuantitativo en tiempo real y normalizado a la transcripción *EF-1α* (*At5g60390*) se muestra en el panel derecho. Los valores son medias ± SEM (n=6). Los datos correspondientes a las líneas Ri son medias de 3 líneas independientes. La Fig. 7b muestra la concentración de la xantina de metabolitos de purina (panel izquierdo), alantoína (panel medio) y alantoato (panel derecho), medido en hojas de roseta, en respuesta a la edad de la planta. Los valores son medias 6 SEM (n=6). La Fig. 7c demuestra la expresión de transcripción de genes de catabolismo de purina de *Arabidopsis* utilizando plantas de tipo silvestre (Col) y tres plantas Ri independientes. Las expresiones de la transcripción son en relación con el nivel a 30 días y se normalizaron a la transcripción *EF-1α* (*At5g60390*). Los valores son medias 6 SEM (n=3).

25 **FIG. 8** demuestra las respuestas de plantas de interferencia de ARN *xdh* (Ri) de *Arabidopsis* de tipo silvestre (Col) y de la aplicación de los catabolitos de purina: xantina, alantoína y alantoato. Fig. 8a: xantina (1 mM) en presencia o ausencia de alopurinol (1 mM, +/- Allo), se aplicó durante 48 h a discos de hojas colocadas en la oscuridad y fotografiado 24 h después de haber sido transferido a 16 h luz/8 h régimen oscuro (panel superior izquierdo). Clorofila, xantina, alantoína y alantoato restantes se determinaron en discos de hojas de la muestra al comienzo del experimento (la luz) o después de 72 h (como se describe arriba) sin xantina (oscuro). Fig. 8b: alantoína o alantoato (0,1 mM) en presencia o ausencia de alopurinol (1 mM, +/- Allo) se aplicó a discos de hoja de 2 h en la oscuridad después de mantener los discos en la oscuridad durante 48 h. Los discos fueron fotografiados 24 h después de haber sido transferido a régimen de 16 h luz/8 h oscuridad (panel superior izquierdo). Los discos de hojas se lavaron dos veces antes de muestrear para determinación de xantina, alantoína y alantoato (derecha y paneles inferiores). Las barras muestran medias ± SEM (n=16).

30 **FIG. 9** muestra la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en la presencia de alantoína y alantoato en *Arabidopsis* de tipo silvestre (Col) y líneas de interferencia *xdh1* de ARN (Ri). FIG. 9a panel izquierdo: discos de hoja retirados de plantas Col colocadas durante 24 h en la oscuridad en la presencia o ausencia de la alantoína o alantoato (0,1 mM) y después se lavó y se trató con H₂O₂ (0, 20, 50 mM) para un adicional de 6 h en la oscuridad. Panel derecho: la clorofila queda determinada 24 horas después de que los discos se transfirieron a un régimen de 16 h luz/8 h oscuridad. Las barras muestran medias 6 SEM (n=16). FIG. 9b muestra la producción de H₂O₂ en discos de hojas de plantas Col y Ri tratados con alantoína o alantoato (0,1 mM) se visualizaron por tinción con 3,3'-diaminobencidina (DAB) (panel izquierdo). Producción relativa total H₂O₂ (inserto derecho) se cuantificó en discos de hojas de mantenerse en la oscuridad durante 24 horas y después se trataron con alantoína o alantoato durante 2 h adicionales en la oscuridad, utilizando DAB tinción Los resultados son de dos experimentos independientes. Las barras de error indican SE (n=16). Las letras minúsculas (a, b) indican p <0,001 para las diferencias dentro del tratamiento entre los ecotipos. Las letras mayúsculas (A, B) indican p <0,001 para las diferencias dentro de ecotipos entre los tratamientos. Fig. 9c demuestra la influencia de la alantoína o alantoato (0,1 mM) sobre la producción de O₂ en discos de

hojas de plantas Col y Ri. Los discos de hojas se trataron y analizaron como en la Fig. 9b anterior. La producción total de superóxido relativa se cuantificó en discos de hojas a partir de 2 experimentos independientes. Las barras de error indican SE (n=16).

5 **FIG. 10** muestra la expresión del transcrito del gen de senescencia asociada de proteasa Cys *Arabidopsis* 12 (SAG12), durante 6 días de estrés oscuro. El análisis cuantitativo de transcripción en tiempo real por RT-PCR se realizó usando tres líneas independientes de interferencia de ARN (Ri) y de tipo silvestre (Col). Se tomaron muestras de plantas antes de la aplicación oscura (0) y durante los seis días del período de oscuridad. Las expresiones de cada línea tratadas se compararon con los de la línea sin tratar después de la normalización para el producto del gen EF-1 α *Arabidopsis* (At5g60390) y los datos se presentan como expresión relativa. Los valores son medias \pm 6 SEM (n=6). Los datos correspondientes a las líneas Ri son medias de 3 líneas independientes.

15 **FIG. 11** muestra la expresión de la transcripción del gen de sulfurase de cofactor molibdeno *Arabidopsis*, ABA3, en las plantas de tipo silvestre (Col) después de la exposición al estrés oscuridad durante seis días. El Análisis de Transcripción se realizó como se describe en la Fig. 10 anterior.

20 **FIG. 12** muestra la expresión de transcripción de los genes de catabolismo de purina *Arabidopsis*, la codificación de oxidasa de urato (UO) y la proteína similar a transtiretina (TLP), es plantas de tipo silvestre (Col) expuestas al estrés oscuro de 6 días y el posterior periodo de recuperación de régimen de 16 h luz/8 h oscuridad durante 9 días. El análisis cuantitativo de las transcripciones se realizó en tiempo real por RT-PCR en comparación con la planta sin tratar después de la normalización para el producto del gen EF-1 α *Arabidopsis* (At5g60390). Los datos se presentan como la expresión relativa en comparación con días 0 o, para el período de recuperación, en comparación con el valor de la planta tratada oscura después de 6 días en la oscuridad. Los valores son medias \pm 6 SEM (n=3).

25 **FIG. 13** muestra fluctuaciones diurnas de la alantoína en hojas en roseta de plantas de tipo silvestre (Col) de *Arabidopsis*. Los valores son medias \pm SEM (n=6).

30 **FIG. 14** se refiere a la influencia de la aplicación de la alantoína en la senescencia en discos de hojas de perejil expuestas a estrés oscuro. Discos de hojas de perejil se mantuvieron durante 2 días a la luz y luego fueron trasladados a la oscuridad durante 2 días adicionales con o sin la adición de 0 a 10 mM alantoína. CL - control hojas no separadas a la luz.

35 **FIG. 15** demuestra la respuesta de tomate al estrés prolongado y la recuperación oscura a la luz a partir de entonces. Fig. 15a muestra el nivel de alantoína en la hoja 1^o, 3^o y 5^o de de las plantas de tomate de tipo salvaje en un período de 12 días en la oscuridad y 10 días de recuperación en la luz. FIG. 15b muestra que la aplicación de 0,1 mM y 0,5 mM alantoína retrasa la degradación de la clorofila en discos de hojas de tomate (tratadas como en la Fig. 14).

40

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

45 **[0025]** La presente invención proporciona métodos para la protección de plantas y sus partes de los procesos relacionados con el estrés. La presente invención proporciona además plantas transgénicas que tienen una mayor tolerancia a los procesos relacionados con el estrés. Sin desear estar ligado por ninguna teoría o mecanismo de acción, la extensión de la vida útil de los productos frescos de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención puede ser atribuida a la protección del material cosechado a partir de procesos tales como la senescencia, la senescencia prematura y los procesos relacionados con el estrés.

50 **[0026]** La presente invención se basa en parte en el uso de modelos experimentales de la senescencia planta y el estrés tales como el tratamiento oscuro extendido con el fin de inducir procesos de removilización de metabolitos. Ahora se da a conocer por primera vez que tanto el estrés inducido oscuro y aumento de la edad inducen acumulación de ureidos, incluyendo alantoína y alantoato, en las hojas de tipo silvestre. Por el contrario, en estas condiciones, en las plantas en peligro XDH1, se acumula xantina, pero no ureidos, y la senescencia acelerada y las tasas de mortalidad se observan. Por lo tanto, un papel protector para AtXDH1 y ureidos en senescencia queda demostrada.

55 **[0027]** Inesperadamente, esta protección puede también lograrse mediante la aplicación exógena de ureidos. En particular, la presente invención proporciona procedimientos que comprenden ureidos exógenos para la protección de productos agrícolas recogidos o cosechados de procesos tales como la senescencia y senescencia prematura.

60 **[0028]** De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para proteger plantas o partes de plantas a partir de un procedimiento relacionado con el estrés que comprende: la aplicación a la planta o parte de planta de una composición que comprende al menos un ureido seleccionado del grupo que consiste de la alantoína y alantoato en una cantidad eficaz para disminuir o retrasar el proceso relacionado con el estrés, en donde dicho proceso relacionado con el estrés se selecciona del grupo que consiste en la degradación de la clorofila, el

65

estrés oxidativo, la senescencia, la senescencia prematura o cualquier combinación de los mismos.

[0029] De acuerdo con una forma de realización plantas o partes de plantas pueden seleccionarse de hierbas, frutas, verduras y flores cosechadas.

[0030] En particular, la presente invención proporciona métodos para la protección de productos agrícolas recolectados de procesos típicamente relacionados con el estrés, tales como la senescencia y senescencia prematura. Flores escogidas y cultivos de hoja como la lechuga, la espinaca, el perejil y muchos otros típicamente comienzan a sufrir senescencia inmediatamente después de su recolección. Este proceso se acelera normalmente durante el almacenamiento de los productos de la planta. Por lo general, esto significa que los amarillos de tejido de hoja verde y su valor nutricional y la comercialización pueden disminuir. Las realizaciones de la presente invención por lo tanto dan a conocer que la aplicación exógena de ureidos ralentiza este progreso y se extiende la vida útil de productos de plantas.

[0031] Los métodos, de acuerdo con algunas realizaciones de la invención, pueden comprender la aplicación, como por ejemplo mediante la aplicación a la raíz o cortar ramas medianas o pulverización, una composición que incluye una cantidad apropiada de la alantoína ureidos o alantoato sobre el producto o inmersión o sumergiendo parcialmente el producto en una suspensión u otra forma apropiada de la composición que contiene dicho ureido. Cualquier método de aplicación adecuado, tal como, pero no limitado a, los métodos enumerados aquí, puede ser utilizado solo o en combinación. De acuerdo con algunas realizaciones, cualquier solución que comprende el ureido en el intervalo de 1 μ M-10 mM se puede usar. Típicamente se utiliza una solución en un intervalo de 0,01-10 mM, o 0.1-10mM. Cualquier concentración de ureidos en los intervalos especificados pueden ser utilizados. De acuerdo con una forma de realización 0,1 mM ureido, se pueden usar 0,5 mM ureido o cualquier concentración de ureidos en este rango. Las composiciones que tienen otras concentraciones también se pueden usar con las realizaciones de la invención.

[0032] Tal como se ejemplifica a continuación la aplicación de ureidos exógenos protege a las plantas y partes de plantas de procesos de senescencia y el estrés relacionado.

[0033] De acuerdo con otro aspecto de la acumulación de ureido de la invención puede ser reforzada en las plantas genéticamente modificadas. En la alternativa, las plantas pueden ser genéticamente modificadas para lograr una producción mejorada y óptima de ureido. La expresión de enzimas requeridas específicamente en la vía de la producción de ureido puede ser optimizada, con el fin de lograr la acumulación de ureido. De acuerdo con aspectos adicionales, la presente invención proporciona una planta transgénica que comprende al menos una célula transformada con un polinucleótido que codifica la deshidrogenasa de xantina (XDH) y al menos un polinucleótido adicional que codifica una enzima seleccionada del grupo que consiste en desaminasa de AMP (AMPD), oxidasa de urato (UO) y la proteína de transtiretina como (TLP), en el que la planta transgénica comprende una cantidad elevada de un ureido seleccionado del grupo que consiste de la alantoína y alantoato y tiene una mayor tolerancia a un proceso relacionado con el estrés seleccionado de entre el grupo que consiste en la degradación de la clorofila, el estrés oxidativo, la senescencia, la senescencia prematura o cualquier combinación de los mismos en comparación con una planta no transgénica correspondiente.

[0034] De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona una planta transgénica que comprende al menos una célula transformada con un polinucleótido que la reducción de la expresión de una enzima endógena de la planta en la vía de la utilización de ureido seleccionado del grupo que consiste en alantoinasa (ALN) y alantoato amidinohidrolasa (AAH) en la que la planta transgénica comprende cantidad elevada de un ureido seleccionado del grupo que consiste de la alantoína y alantoato y tiene una mayor tolerancia a un proceso relacionado con el estrés seleccionado de entre el grupo que consiste en la degradación de la clorofila, el estrés oxidativo, la senescencia, la senescencia prematura o cualquier combinación de los mismos en comparación con una planta transgénica no correspondiente.

[0035] Debe entenderse que los métodos de acuerdo con realizaciones de la invención se pueden usar solos o en combinación para lograr resultados de acuerdo con la invención. Por ejemplo, varias concentraciones diferentes y/o diferentes ureidos se pueden aplicar a las plantas, partes de plantas o cultivos, según las realizaciones de la invención. Métodos de ingeniería genética y/o de selección pueden ser utilizados en combinación con métodos de aplicación de ureidos a las plantas. Cualquier combinación de los métodos y/o compuestos descritos aquí, que logra la protección de las plantas a través de la vía metabólica ureido, se da a conocer en el presente documento.

[0036] La removilización de metabolitos durante el estrés y la senescencia juega un papel importante en la adaptación óptima de planta al medio ambiente. La planta de molibdeno de cofactor (MoCo) y enzima e3 flavina que contiene, deshidrogenasa de xantina (XDH; EC 1.2.1.37) son fundamentales para la removilización de purina y catalizan la conversión de la productos catabólicos de purina, hipoxantina y xantina en ácido úrico que se degrada posteriormente a la ureidos, alantoína y alantoato. La presente invención muestra ahora que en las plantas de tipo salvaje, condiciones de oscuridad prolongada o el aumento de la edad de la hoja causa la inducción de las transcripciones relacionadas con el catabolismo de las purinas, que a su vez generan una marcada acumulación de productos catabólicos de purina, alantoína y alantoato. En contraste, los mutantes de *Arabidopsis* de XDH, *Atxdh1*,

xantina acumulada y mostraron síntomas de senescencia prematura como se ejemplifica por la degradación de la clorofila mejorada, una extensa muerte celular y la regulación de las transcripciones relacionadas con la senescencia. Cuando las líneas mutantes tratadas con oscuridad fueron re-expuestas a la luz, que mostraron niveles elevados de especies reactivas del oxígeno (ROS) y una mayor tasa de mortalidad en comparación con las plantas de tipo silvestre. Inesperadamente, el nivel de ROS y la mortalidad podría ser atenuado por la adición de la alantoína y alantoato lo que sugiere que estos metabolitos pueden actuar como eliminadores de especies de oxígeno reactivo. La presente invención pone de relieve una necesidad todavía no reconocida para el mantenimiento controlado de los niveles de ureido, por ejemplo, como mediada por la actividad AtXDH1 durante el estrés y el envejecimiento oscuros y el punto a la doble funcionalidad de ureidos como tiendas eficientes de nitrógeno y como protectores celulares. Por lo tanto, la regulación de los niveles de ureido mediante la regulación de la expresión *Atdh1* tiene consecuencias generales para la supervivencia de la planta óptima durante la removilización de nutrientes, como ocurre durante el crecimiento normal, el estrés oscuro y senescencia.

Actividad XDH1 modera la senescencia prematura inducida por el estrés oscuro

[0037] Tratamiento extendido oscuro implica la falta completa de fotosíntesis nueva que impone un esfuerzo que requiere la nueva movilización de los recursos de la hoja. En este sentido, oscuridad extendida inicia eventos moleculares que son una reminiscencia de la senescencia foliar. La progresión de la senescencia debe ser ordenada de modo que se evita la acumulación de compuestos nocivos o estados fisiológicos de estado celular lábil mejorado. Se muestra aquí que la actividad XDH1 de removilización normal se requiere para tener éxito, ya que, en su ausencia, no sólo dirigirá que el catabolismo de las purinas se comprometa, pero la tasa de clorofila, la degradación de proteínas solubles (Fig. 2e y 2f) y la muerte celular todos se aceleran.

[0038] El valor de los tratamientos prolongados oscuros como señal que estimula la removilización metabólica sincronizada en la planta fue discernida mediante el examen de los perfiles de inducción de la transcripción de genes que se sabe que son inducidos durante la senescencia. Por ejemplo, el factor de transcripción *WRKY53* (que se muestra para controlar los eventos tempranos de la senescencia y la respuesta al estrés oxidativo (Miao Y. et al., 2004 Plant Mol Biol 55, 853-867). El regulador de proteasa, *Erd1* codifica la subunidad reguladora de proteasa caseinoltica, y pueden estar relacionados con los procesos de modificación postraduccional, tal como se demostró estar implicado en la degradación de proteínas de cloroplastos sometidas a la senescencia artificial relacionada con ABA, etileno y SO₂ (Brychkova G. et al., 2007 Plant J 50, 696-709 ; Weaver LM et al, 1998 Plant Mol Biol 37, 455-469). Del mismo modo, la degradación de la clorofila (Gepstein S. 2004 Genome Biology 5, 212; Pruzinska A. et al, 2005 Plant Physiol 139, 52-63) y la regulación ascendente de las transcripciones relacionadas, tales como *ACD1* y *SGN1* (Parque SY et al, 2007 Plant Cell 19, 1649-1664;. Tanaka R. et al, 2003 Plant Cell Physiol 44, 1266-1274.), durante el periodo de oscuridad prolongada son indicativos de la senescencia foliar. La sobreexpresión de la clorofila-degradación de las transcripciones relacionadas y la propia degradación de la clorofila es un sello distintivo de la actividad comprometida XDH1 (Fig. 2e y en la Fig. 3, paneles inferiores). Por lo tanto, como se indica por estos genes marcadores, la presencia de actividad XDH1 protege plantas de tipo silvestre desde el inicio del proceso similar al programa de muerte celular durante el estrés oscuro.

Actividad XDH en respuesta al estrés oscuro

[0039] XDH posee actividad generadora de O₂-xantina/hipoxantina MoCo sulfurado-dependiente y una actividad generada NADH-O₂ dependiente de FAD (Sagi M. et al, 1999 Plant Physiol 120, 571-578;. Sagi M. et al., 2002 Plant J 31, 305-317;. Yesbergenova Z. et al, 2005 Plant J 42, 862-876). La actividad de generación de superóxido xantina dependiente fue mejorado más en la oscuridad prolongada de la actividad dependiente de NADH (Fig.s 1b-1d y la Fig. 4b panel central). Esto indica que los procesos de modificación que implican el MoCo-dominio es probable que tienen lugar durante la removilización derivada de oscuridad. La diferencia entre MoCo y actividades dependientes de FAD XDH puede resultar de interconversión de las formas sulfo y desulfo-Moco de XDH. La etapa de sulfuración del terminal realizada por la enzimas MoCo-sulfurasa FLACCA en tomate y ABA3 en *Arabidopsis* se planteó la hipótesis de proporcionar un modo eficaz de regular las actividades XDH por sulfuración (Sagi et al, 1999, *ibid*;. Sagi et al, 2002 *ibid*). XDH comúnmente contiene una parte significativa de las formas desulfo-, las cuales, mientras estén inactivas en hipoxantina/oxidasa de xantina (Harrison R. 2002 Free Radic Biol Med 33, 774-797), son activas como oxidasas NADH (Yesbergenova et al., 2005, *ibid*). Por lo tanto, la mejora en la actividad oxidasa hipoxantina/xantina observada en el estrés inducido por la oscuridad puede resultar del estado de sulfuración mejorada del dominio XDH MoCo. De acuerdo con este escenario, se observa que el ABA3 transcrito fue significativamente mayor durante el estrés oscuro (alrededor de 3 veces; Fig. 11).

Papel de catabolismo de purinas en el estrés oscuro y recuperación

[0040] La mutación en *AtXDH1* o aplicación de alopurinol con las plantas naturales condujeron a la acumulación de xantina durante el estrés oscuro (Fig.s 5a y 8a, 8b). El grado de daño en el tejido que aparece en las plantas durante la oscuridad y, especialmente, durante el tratamiento con luz posterior puede ser debido a la sensibilidad directa o indirecta a un exceso de xantina, lo que lleva a la degradación de clorofila, especialmente en ausencia de *AtXDH1* activo en las hojas tratadas (Fig. 8a). Sin embargo, la mayor degradación de la clorofila que apareció en hojas mutantes que contengan un alto nivel de xantina se alivió de manera significativa por la adición de la alantoína y

alantoato lo que implica que hojas protegidas de ureidos de la degradación de clorofila inducida por oscuridad a pesar de la acumulación de xantina (Fig. 8b). Por lo tanto, la acumulación de ureidos puede contribuir a la patrón de crecimiento normal de las células a través de un estado fisiológico crítico traído por removilización de metabolitos. Por lo tanto, ureidos representa tanto una relación N-C favorable como moléculas con una capacidad intrínseca para obtener un exceso de ROS. Este exceso se puede encontrar durante la reexposición de las hojas a la luz en la que el desequilibrio de fotosistema puede ser el resultado final de recambio de proteínas mejorado que resulta en la producción de ROS dependiente de la luz transitoria.

[0041] Se detectó un aumento coordinado en el nivel de las transcripciones que participan en la producción ureido (AMPD, XDH1, UO y TLP) y una disminución concomitante en el nivel de las transcripciones de las enzimas que utilizan ureidos (ALN y AAH). Por lo tanto, la acumulación de ureidos de estrés oscuro es al menos en parte bajo el control de transcripción y es probable que el resultado de la diferencia en las actividades que intervienen en la formación de ureidos frente a las actividades que los procesan.

[0042] Los datos presentados en la presente invención han puesto de relieve una vía de removilización purina completa y funcional que se produce en ausencia prolongada de la luz, pero las consecuencias no se limitan a las condiciones de estrés ambiental. XDH1 rápida regulación hacia arriba (Fig.s 1a y 1c) y un leve aumento en los niveles de ureido en las transiciones normales de luz y oscuridad diurna (22%; Fig. 13) se observó. El ciclo diurno de los niveles de ureido indica que el tratamiento prolongado oscuro acentúa una respuesta normal. A este respecto, se muestran los componentes fisiológicos y moleculares del estrés oscuro inducido aquí para ser una reminiscencia de envejecimiento de la hoja normal y la senescencia. De hecho, en el estrés oscuro y la senescencia, niveles similares de acumulación de ureidos se demostró (Fig.s 5 y 7).

[0043] La senescencia y la senescencia inducida por la oscuridad están asociadas con la modulación de la producción de ROS (Guo F.Q. y Crawford N.M. 2005 Plant Cell 17, 3436 a 3450; Pastori G. M. y L. A. Del Rio 1997 Plant Physiol 113, 411-418). Así, sin desear estar ligado por ninguna teoría o mecanismo particular de acción, ureidos pueden servir una función dual en la senescencia como metabolitos transportables para otras vías biosintéticas y al mismo tiempo como protectores celulares de ROS. Los resultados muestran que en el presente documento catabolismo de las purinas, el envejecimiento y oscuridad extendida inducen programas similares de senescencia. En ambos casos, la transición de la asimilación de nutrientes a la rotación de metabolito se produce debido a la aceleración de las actividades de reciclaje catabólicos de purina en la que *AtXDH1* desempeña un papel fundamental.

[0044] Ejemplos de experimentos específicos llevados a cabo en plantas específicas se presentan en el presente documento con el fin de ilustrar más completamente ciertas realizaciones de la invención. Éstos no deben de ninguna manera, sin embargo, ser considerados como limitadores del amplio alcance de la invención.

EJEMPLOS

Procedimientos experimentales

Materiales de plantas, condiciones de crecimiento y tratamiento oscuro

[0045] *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia) y sus plantas isogénicas *Atxdh1* comprometidas se cultivaron en un cuarto de crecimiento de menos de 16 h luz/8 h de oscuridad, 22°C, 75-85% de humedad relativa, intensidad de luz de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ como se ha descrito antes (Brychkova G. et al., 2007, *ibid*). Plantas comprometidas por *Atxdh1* incluyen línea insertada T-ADN de homocigotos [SALK_148364 (obtenido del Centro de Investigaciones Biológicas de Arabidopsis, Columbus, Ohio, EE.UU.)] y 3 líneas de interferencia de ARN *xdh* homocigotos independientes descritos antes (Yesbergenova et al., 2005, *ibid*). Para el tratamiento oscuro, plantas de cuatro semanas de edad crecidas en la turba fueron transferidas desde la cámara de crecimiento a una habitación oscura. Las muestras se recogieron todos los días durante 15 minutos, con poca luz (40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), como una mezcla hojas completamente expandidas de roseta tomadas de 5 plantas. Después de 6 días en la oscuridad, las plantas fueron transferidas a la habitación de crecimiento y la tasa de supervivencia de las plantas se determinó 9 días más tarde. El promedio y S.E. de la tasa de supervivencia se calculó a partir de 12 experimentos independientes con al menos 30 plantas para cada tratamiento. Para el envejecimiento de las plantas de las mediciones se hicieron crecer en una cámara de crecimiento como se describió anteriormente y se recogieron muestras de plantas de 30, 45, 60 y 75 días como una mezcla de hojas completamente expandidas de roseta tomadas de 5 plantas.

Mediciones de muerte celular, la determinación del nivel de clorofila y daños en las hojas

[0046] La muerte celular se visualizó en las hojas de la muestra de plantas estresada por oscuridad y estresada por control, por tinción con lactofenoltrípán azul - seguido de decoloración se deben realizar en el hidrato de cloral saturado (Koch E. y A. Slusarenko 1990 Plant Cell 2, 437-445). El contenido total de clorofila se midió en los extractos de las hojas completamente expandidas como se ha descrito antes (Brychkova et al., 2007, *ibid*). Los valores para restante contenido de clorofila en discos de hojas se determinaron como la cantidad de clorofila por disco dividido por la cantidad de clorofila por control sin tratar y se expresan como un porcentaje. La gravedad de los

daños en las hojas después de estrés oscuro fue la siguiente: 1, sin daños; 2, <30%; 3, 30-50%; 4, > 50% del área foliar dañada. El daño foliar promedio se multiplicó por el número total de hojas dañadas para determinar el nivel de daño. Medios \pm SEM para cada tratamiento se presentan.

5 Preparación de ARN y RT-PCR cuantitativo en tiempo real

10 **[0047]** Para el análisis cuantitativo de la expresión de transcripciones, el ARN total, la reacción RT y reacciones de RT-PCR cuantitativas con cebadores específicos (véase la Tabla 1 más adelante) se realizaron como se describe en Brychkova et al. (2007, ibid). Las reacciones se normalizaron con UBQ10 (*At4g05320*) y el factor de elongación 1- α (*At5g60390*) como los genes de limpieza revelaron resultados similares y por lo tanto sólo los resultados en base a la limpieza de genes se presentan más adelante.

15 Tabla 1: Lista de los cebadores utilizados para PCR cuantitativo en tiempo real con *Arabidopsis thaliana*

Producto PCR	Cebador	Longitud de transcripción PCR
20 <i>SGN1</i> (<i>StayGreen1</i> ; <i>At4g22920</i>)	Delante GATTGTTCCCGTTGCAAGGTTGTTT (SEQ ID NO:1)	189
	Trasero TGCAACTGAGAGTTGTTTATGGATTGAG (SEQ ID NO:2)	
25 <i>SRG1</i> (gen relacionado con senescencia 1; <i>At1g17020</i>)	Delante AAGAGTGGGATTTTTCCAGCTTGT (SEQ ID NO:3)	191
	Trasero TGCCCAATCTAGTTTCTGATCTTCTGA (SEQ ID NO:4)	
30 <i>UBQ10</i> (Ubiquitina 10; <i>At4g05320</i>)	Delante TTTGTTAAGACTCTCACCGGAAAGACA (SEQ ID NO:5)	192
	Trasero GAGGGTGGATTCTTCTGGATATTGTA (SEQ ID NO:6)	
35 <i>UO</i> (oxidase de urato; <i>At2g26230</i>)	Delante CACTGTTTATGTGAAAGCCAAGGAATG (SEQ ID NO:7)	187
	Trasero CCCAAGCTTAAAACCATGTAAATGTGG (SEQ ID NO:8)	
40 <i>TLP</i> (proteína similar a transtiretina; <i>AT5g58220</i>)	Delante CCATGCGTTAAAGGAAAGGTATGAAAA (SEQ ID NO:9)	185
	Trasero TGATTCTCAGACGATCTTGAGGTTTTG (SEQ ID NO:10)	
45 <i>WRKY53</i> (<i>WRKY</i> proteína vinculada a ADN 53; <i>At4g23810</i>),	Delante TCAAAGAAAAGAAAGATGTTACCAAAGTGG (SEQ ID NO:11)	158
	Trasero GTGCATCTGTAATAACTCCTTGGGAAT (SEQ ID NO:12)	
50 <i>XDH1</i> (dehidrogenasa de xantina 1; <i>At4g34890</i>)	Delante TGATGTTGGACAAATAGAAGGAGCGTTT (SEQ ID NO:13)	200
	Trasero TATTCGGATTCCCCTTGAGAAGCGAAACA (SEQ ID NO:14)	
55 <i>XDH2</i> (dehidrogenasa de xantina 2; <i>At4g34900</i>)	Delante TGATATTGGACAAATAGAAGGAGCGTTT (SEQ ID NO:15)	202
	Trasero TGCATTTGGATTACCCTTGAGAAGAGAAA (SEQ ID NO:16)	
60 <i>XERO1/TAS14</i> (dehidrina; <i>At3g50980</i>)	Delante AGACTCACCAACAGCTTGACCAATTT (SEQ ID NO:17)	165
	Trasero CACCTAGTCCATCATCCGAGCTAGAG (SEQ ID NO:18)	
65 <i>SGN1</i> (<i>StayGreen1</i> ; <i>At4g22920</i>)	Delante GATTGTTCCCGTTGCAAGGTTGTTT (SEQ ID NO:19)	189
	Trasero TGCAACTGAGAGTTGTTTATGGATTGAG (SEQ ID NO:20)	

5	SRG1 (gen relacionado con senescencia 1; <i>Atlg17020</i>)	Delante AAGAGTGGGGATTTTTCCAGCTTGT (SEQ ID NO:21) Trasero TGCCCAATCTAGTTTCTGATCTTCTGA (SEQ ID NO:22)	191
10	UBQ10 (<i>Ubiquitina 10</i> ; <i>At4g05320</i>)	Delante TTTGTTAAGACTCTCACCGGAAAGACA (SEQ ID NO:23) Trasero GAGGGTGGATTCCCTTCTGGATATTGTA (SEQ ID NO:24)	192
15	UO (<i>oxidasa de urato</i> ; <i>At2g26230</i>)	Delante CACTGTTTATGTGAAAGCCAAGGAATG (SEQ ID NO:25) Trasero CCCAAGCTTAAAACCATGTAAATGTGG (SEQ ID NO:26)	187
20	TLP (<i>proteína similar a transtiretina</i> ; <i>AT5g58220</i>)	Delante CCATGCGTTAAAGGAAAGGTATGAAAA (SEQ ID NO:27) Trasero TGATTCTCAGACGATCTTGAGTTTTG (SEQ ID NO:28)	185
25	WRKY53 (<i>WRKY proteína vinculada a ADN 53</i> ; <i>At4g23810</i>),	Delante TCAAAGAAAAGAAAGATGTTACCAAAGTGG (SEQ ID NO:29) Trasero GTGCATCTGTAATAACTCCTTGGGAAT (SEQ ID NO:30)	158
30	XDH1 (<i>dehidrogenasa de xantina 1</i> ; <i>At4g34890</i>)	Delante TGATGTTGGACAAATAGAAGGAGCGTTT (SEQ ID NO:31) Trasero TATTCGGATTCCCCTTGAGAAGCGAAACA (SEQ ID NO:32)	200
35	XDH2 (<i>dehidrogenasa de xantina 2</i> ; <i>At4g34900</i>)	Delante TGATATTGGACAAATAGAAGGAGCGTTT (SEQ ID NO:33) Trasero TGCATTTGGATTACCCTTGAGAAGAGAAA (SEQ ID NO:34)	202
40	XERO1/TAS14 (<i>dehidrina</i> ; <i>At3g50980</i>)	Delante AGACTACCAACAGCTTGACCAATTT (SEQ ID NO:35) Trasero CACCTAGTCCATCATCCGAGCTAGAG (SEQ ID NO:36)	165

La tinción histoquímica para la detección de O₂ y H₂O₂

[0048] Tinción de O₂ de tetrazolio de nitroazul (NBT) de las hojas se llevó a cabo esencialmente de acuerdo con Jabs T. et al. (1996, Science 273, 1853-1856) y Fryer M. J. et al. (2002 J Exp Bot 53, 1249-1254). Las hojas se incubaron durante 10 h en la oscuridad durante la noche y después se colocó en 96% de etanol, se hirvieron durante 10 min y se fotografiaron. La aplicación de la alantoína y alantoato y medición O₂ y H₂O₂ se llevó a cabo sobre discos de hojas de 7 mm retirados de 4 semanas de edad de tipo salvaje Col y plantas mutantes *Atxdh1*. Los discos se colocaron en la oscuridad durante 24 h en los papeles de filtro humedecido. A partir de entonces, la alantoína 0,1 mM o alantoato en solución pH 7,5 se añadió a los papeles de filtro durante 2 h adicionales. Para la tinción NBT-O₂, discos de hojas se lavaron dos veces y se sumergieron en solución 0,8 mM NBT añadido a los papeles de filtro durante 2 h a la luz y luego se hierva en 96% de etanol durante 10 min y se fotografiaron. Para discos de hojas de tinción DAB-H₂O₂ sometidos al procedimiento descrito anteriormente para NBT se sumergieron en solución que contiene 1 mg ml⁻¹ de 3,3'-diaminobencidina (DAB) en pH 5,0, durante 2 h a la luz como se ha descrito antes (Sagi M. et al., 2004 Plant Cell 16, 616-628). Los discos de hojas se fotografiaron después de la ebullición en 96% de etanol durante 10 min. NBT y DAB hojas manchadas y discos de hojas se cuantificaron utilizando software NIH Image (versión 1.6).

Extracción de proteínas, fraccionamiento la determinación de proteína soluble total en gel y ensayo cinético de actividades de generación de ROS de XDH

[0049] Se prepararon extractos de XDH para el ensayo por electroforesis en gel nativa (PAGE) como se describe por Sagi M. et al. (1998 Plant Science 135, 125-135) y Yesbergenova et al. (2005, *ibid*). Actividades de generación de O₂ cinéticas de XDH se analizaron por espectrofotometría midiendo la oxidación de epinefrina para adrenocromo a 480 nm como se ha descrito anteriormente en Sagi M. y R. Fluhr (2001 Plant Physiol 126, 1281-1290). El medio de reacción contenía 6,2 mg de extracto de proteína, epinefrina 1 mM en tampón 50 mM Tris-HCl (pH 8,5) y 1 mM de

hipoxantina/xantina. Medio de reacción sin hipoxantina/xantina se utilizó como control. Seis muestras fueron analizadas y se promediaron para cada uno de los puntos de datos. Medios \pm de SEM para cada tratamiento se presentan.

5 Determinación de ureidos, hipoxantina y xantina

10 **[0050]** Los ureidos se extrajeron de las hojas, con un 80% de etanol y se determinaron de acuerdo con Vogels G. D. y Van der Drift C. (1970 Anal Biochem 33, 143-157) usando ácido alantoideo y alantoína como referencias. Seis muestras fueron analizadas y se promediaron para cada uno de los puntos de datos. Para hipoxantina y xantina determinación, hojas se extrajeron con 40 mM NaOH y se diluyeron cuatro veces por Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5. Hipoxantina/xantina se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando un 100x2.1 mm de diámetro interior, ODS-Hypersil (5 mm) de columna. La fase móvil fue un 10 mM NaOH/0,1 mM de Tris-HCl, pH 5,0, similar a la utilizada por Corpas F. J. et al., (1997 J Plant Physiol 151, 246-250). La hipoxantina y xantina fueron detectadas utilizando estándares de tiempo de retención y la relación de los espectros de absorción UV a 249 nm y 267 nm. Se usó un protocolo modificado para detectar la xantina a través del ensayo de oxidasa de xantina (Mohanty J. G. et al., 1997 Journal of Immunological Methods 202, 133-141). La mezcla de reacción modificada de Yesbergenova et al., (2005 *ibid*), contenía 0,4 U ML^{-1} HRP, 40 mU ml^{-1} de suero de leche oxidasa de xantina (Fluka), 3,4 mM de 3,5-dicloro-2-sulfonato de hidroxobenceno y 0,85 mM 4-aminoantipirina en Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5.

20 Ejemplo 1: Expresión XDH durante el estrés inducido por oscuridad y su posterior recuperación

25 **[0051]** La expresión XDH1 fue examinada bajo tratamiento extendido por oscuridad que impone importante removilización de los componentes celulares. Con este fin, plantas de tipo salvaje Col y plantas comprometidas-*Atxdh1* (líneas de interferencia de ARN Ri5, Ri7 y Ri10; línea de inserción de T-ADN, KO) afectados en la actividad XDH1 (Yesbergenova et al, 2005, *ibid*), fueron expuestos a 6 días oscuridad continuada seguida de un período de "recuperación" de 9 días bajo régimen de luz diurna normal (16 h luz/8 h oscuridad). Se encontró que el nivel de transcripción XDH1 para aumentar de forma continua en la oscuridad alcanzando un pico (> 20 veces de inducción) en 24 h (Fig. 1a, panel izquierdo). Los resultados implican que la inducción oscura de XDH se produce como parte de una respuesta fisiológica diurna normal, a pesar de que se eleva a niveles más altos durante el período de oscuridad prolongada. A su regreso a la luz el 7 d el nivel de transcripción disminuyó rápidamente (Fig. 1a, panel izquierdo). Por el contrario, transcripción XDH₂ se mantuvo sin cambios durante el tratamiento oscuro aunque fue ligeramente mayor durante el período de recuperación, tanto en Col y las plantas modificadas (Fig. 1A, panel derecho).

35 Ejemplo 2: Actividad de superóxido XDH paralelo a la expresión XDH

40 **[0052]** Para determinar si el rendimiento potencial enzimático es paralelo a los cambios de transcripción medidos, las actividades en gel de la generación de superóxido por XDH se probaron utilizando NADH y sustratos hipoxantina/xantina (Yesbergenova et al., 2005, *ibid*). actividad dependiente de NADH exhibida como máximo una mejora de 1,5 veces en la producción de O₂ durante el período de oscuridad (Fig. 1b, panel izquierdo), mientras que la actividad dependiente de la xantina/hipoxantina aumentó inmediatamente en la oscuridad a niveles de casi 3 veces en su máximo (Fig. 1c, panel izquierdo). No se detectaron actividades XDH dependientes de NADH o hipoxantina/xantina dependientes en los mutantes *Atxdh1* (Fig.s 1b y c, paneles de la derecha; datos no mostrados para las plantas ARNi), incluso durante el período de recuperación, donde se observó transcripción XDH₂ para aumentar (Fig. 1a). Esto podría indicar que la actividad XDH₂ o abundancia es muy baja y demuestra que normalmente XDH1 juega un papel en la adaptación al estrés oscuro. Los resultados del ensayo en gel pudieron ser confirmados en un ensayo de extracto de hoja cruda directa usando epinefrina como aceptor de electrones (Yesbergenova et al, 2005, *ibid*; Fig. 1d). En este caso, al menos un aumento de 2 veces en la actividad de XDH se pudo detectar en las hojas de tipo silvestre mientras que las líneas mutantes no mostraron ninguna actividad o insignificante. En total, mientras que los cambios exactos de nivel de veces en la actividad difieren de acuerdo con el procedimiento utilizado, las actividades medidas siguieron el aumento general y la caída en los niveles de transcripción.

55 Ejemplo 3: La mutación en XDH1 acelera la senescencia prematura en plantas estresadas inducida por oscuridad

60 **[0053]** Se hace ahora referencia a la Fig. 2, en la que las respuestas de tipo salvaje y plantas comprometidas XDH de *Arabidopsis* a estrés oscuro se muestran. En la Fig. 2a, de tipo silvestre (Col) y plantas comprometidas XDH (KO, SALK_148364; Ri, *xdh1* interferencia de ARN) se pusieron a prueba durante 6 días de tratamiento oscuro y la posterior recuperación de 9 días. La Fig. 2b muestra las tasas de supervivencia de tipo silvestre y plantas en peligro XDH 15 días después de haber sido expuestas a las condiciones descritas anteriormente. Las hojas de control no tratadas y tratadas con oscuridad Col y plantas comprometidas *Atxdh1* fueron extirpadas antes (0) y 6 d después (6) de la exposición a la oscuridad. La Fig. 2d muestra el nivel de daño de las hojas. La Fig. 2e muestra el contenido de clorofila en las hojas por encima de una Figura 2f de tratamiento oscuro de 6 d muestra contenido total de proteínas solubles en las hojas durante un tratamiento oscuro de 6 d.

65

[0054] Col de tipo salvaje y las líneas comprometidas XDH1 fueron examinadas más de cerca durante el tratamiento oscuro. Hojas en roseta de las plantas mutantes deficientes en la expresión XDH1 eran claramente más amarillas que las hojas de tipo salvaje (Fig. 2a, c). El análisis cuantitativo mostró una caída rápida de los niveles de clorofila residuales de 30% y el 50% de tipo salvaje y hojas mutantes, respectivamente (Fig. 2e). El amarillamiento fue acompañado por una reducción de las proteínas solubles, otra característica distintiva de senescencia (Fig. 2f). Hojas comprometidas *Atxdh1* en comparación con las hojas de tipo salvaje mostraron una mayor tasa de daños (Fig. 2d) y la acumulación de muchas células muertas más que comprobadas por tinción azul de tripano (Fig. 2g). Las plantas se devuelven a un ciclo diurno normal y su recuperación posterior fue seguida por un período adicional de 9 días. Las plantas de tipo silvestre mostraron una tasa de supervivencia del 80% en comparación con 20 a 45% para las líneas mutantes (Fig. 2b). Los resultados implican que los procesos XDH1 dependientes son importantes para la adaptación de las plantas de tratamiento oscuro extendido y la posterior recuperación de la luz normal.

Ejemplo 4: La senescencia y la expresión de genes de degradación asociada de clorofila a la en plantas de regulación hacia arriba *Atxdh1*

[0055] Se hace ahora referencia a la Fig. 3 en la que las transcripciones fueron controladas por análisis cuantitativa RT-PCR en tiempo real utilizando plantas de tipo silvestre (Col) XDH (KO, SALK_148364, *Atxdh1* línea de inserción de T-ADN) y Ri (media comprometida de 3 líneas de interferencia de ARN XDH1 independientes).

[0056] Amarillamiento mejorado de hojas inducidas por oscuridad en las líneas mutantes (tales como el descrito en la Fig. 2) puede ser indicativo de la senescencia apresurada. Para examinar esto al nivel molecular, se monitorizó la expresión de clases de genes asociados con la senescencia temprana y tardía. El estrés oscuro condujo a la acumulación más rápida y mejorada de las transcripciones de senescencia temprana, *WRKY53* (gen regulador relacionado con la senescencia) y *Erd1/SAG15* (gen asociado a la senescencia) (Brychkova et al, 2007, *ibid*.; Buchanan-Wollaston V. et al., 2005 Plant J 42, 567-585; Miao Y. et al, 2004, *ibid*) en hojas mutantes *Atxdh1* en comparación con las hojas de tipo salvaje (Fig. 3, paneles superiores). Los genes marcadores que hacen hincapié en los procesos finales de los años en la senescencia son *SRG1* (gene 1 relacionado con la senescencia, un miembro de Fe(II)/ familia de genes de oxidasa de ascorbato) y *XERO1/TAS14* (deshidrina; Alsheikh MK et al, 2005 Plant Cell Environ 28, 1114-1122. ; Brychkova et al, 2007, *ibid*; Callard D. et al, 1996 Plant Physiol 112, 705-715;. Weaver LM et al, 1998, *ibid*). Después de 6 días de que aparecieron 390 veces en las plantas de tipo salvaje Col y eran 2-6 veces mayor en las líneas mutantes (Fig. 3, paneles centrales). Del mismo modo, el nivel de transcripción del gen asociado a la senescencia de proteasa Cys 12 (*SAG12*), un marcador común de la senescencia de la hoja (Gepstein et al., 2003 Plant J 36, 629-642), exhibió más temprano y una mayor expresión en plantas comprometidas *Atxdh1* (véase la Fig. 10).

[0057] El gen clorofila-degradación *ACD1* (muerte celular acelerada 1) está implicado en la descomposición de la clorofila asociada a la senescencia (Tanaka et al., 2003, *ibid*), mientras que *SGN1* (proteína 1 mantener-verde) está implicado en el catabolismo de la clorofila durante el desarrollo (Park et al., 2007, *ibid*). Los niveles de transcripción de estos genes se indujeron rápidamente ya después de 1 día en la oscuridad y se mantuvieron a niveles más altos en los mutantes *Atxdh1* en comparación con los de las plantas Col (Fig. 3, paneles inferiores). Estos resultados indican que la presencia de *AtXDH1* juega un papel importante en impedir los síntomas y eventos moleculares indicativos de la senescencia prematura en respuesta al estrés inducido por la oscuridad.

Ejemplo 5: Actividades de generación de superóxido XDH y no XDH

[0058] Se hace ahora referencia a la Fig. 4 que muestra el análisis cuantitativo de la producción de NBT-O₂ en hojas en respuesta al tratamiento oscuro. Reacciones XDH de planta se pueden utilizar como oxígeno molecular receptores de electrones produciendo O₂, o si está disponible, NAD⁺ no reducido (Hesberg C. et al, 2004 J Biol Chem 279, 13547 a 13554; J. Nguyen 1986 Physiologie Végétale 24, 263- 281;. Yesbergenova et al, 2005, *ibid*). El superóxido resultante puede afectar aún más la fisiología del estrés inducido por la oscuridad. En un intento para iluminar la situación in vivo, las especies reactivas de oxígeno (ROS) se estimaron fuentes oscuras durante el tratamiento por el uso diferencial de 2 inhibidores, alopurinol y yodonio difenileno (DPI). El inhibidor de XDH alopurinol se convierte en aloxantina, que permanece firmemente unido al bolsillo de unión al sustrato en el dominio MoCo, evitando así una mayor renovación del sustrato (Harrison 2002, *ibid*;. Hesberg et al, 2004, *ibid*). En contraste, el DIP es un inhibidor suicido de enzimas que contienen flavina y se puede utilizar para estimar tanto XDH y, por ejemplo actividades de oxidasa NADPH (Sagi y Fluhr, 2001, *ibid*;. Yesbergenova et al, 2005, *ibid*). Con este fin, hojas de roseta de plantas tratadas con oscuridad fueron examinadas por la infiltración de NBT para la detección de superóxidos (Fryer et al., 2002, *ibid*). Durante el tratamiento de oscuridad, hojas de tipo salvaje tenían un nivel basal de superóxido total que se mantuvo dentro de \pm 15% del control de luz (no mostrado). En contraste, las hojas de mutantes mostraron niveles totales de \sim 30% más bajos de reducción de NBT, indicando que la actividad XDH tiene una contribución medible al medio redox de la planta como se ha observado previamente (Yesbergenova et al., 2005 *ibid*). La adición del inhibidor de XDH, alopurinol, da una medida independiente de la actividad de superóxido dependiente de XDH. Como se muestra en la Fig. 4b (panel medio) un aumento de casi 3 veces en la producción de superóxido dependiente de XDH se obtuvo en la oscuridad en el día 3. Por el contrario, no se detectó un aumento de tales plantas mutantes XDH. Una estimación de la actividad de XDH residual, ya sea debido a la inhibición alopurinol parcial o de la producción de O₂ por una fuente no XDH tales como la actividad de oxidasa NADPH se obtiene por

sustracción simultánea de +DPI de +valores de escaneado de la hoja alopurinol (Fig. 4B, panel inferior). En este caso la producción de O₂ aumentó en las plantas mutantes durante la oscuridad (es decir, actividades inhibidas de DPI) más que en las plantas de tipo salvaje. Por lo tanto, en plantas comprometidas XDH otras fuentes de ROS pueden, en parte, compensar en la oscuridad por la pérdida de ROS suministrado por XDH. En conjunto, la actividad XDH medida por la producción de superóxido aumenta en vivo en la oscuridad y hace una contribución significativa al medio de la hoja redox.

Ejemplo 6: Tratamiento oscuro modifica acumulación de metabolitos de purina

[0059] Se hace ahora referencia a la Fig. 5 en la que, se muestra el análisis de los metabolitos de la purina, xantina, alantoína y alantoato, en respuesta al estrés oscuro. Se examinó si los cambios detectados en la actividad XDH1 incidían sobre la acumulación de xantina y/o ureidos durante el tratamiento oscuro y la posterior recuperación de la luz. En las plantas de tipo silvestre (Col) el nivel de la xantina no cambió durante el tratamiento oscuro sobre el bajo nivel basal (Fig. 5a). Sin embargo, el nivel basal de contenido de xantina en mutantes *Atxdh1* era más de 10 veces mayor que en las plantas Col aunque los niveles de hipoxantina permanecieron por debajo de los límites de detección. El nivel de la xantina aumentado significativamente en hojas mutantes *Atxdh1* en tratamiento oscuro llegando a más de 10 veces el nivel basal en las plantas mutantes y 100 veces el nivel detectado en las plantas de tipo salvaje. Este nivel se reduce sólo ligeramente durante el periodo de recuperación (Fig. 5a), lo que indica que la actividad potencial XDH₂ puede desempeñar un papel de menor importancia por lo general en el control de este fondo de xantina. Así, la presencia de la mutación XDH1 desenmascara un aumento transitorio pero significativo en el flujo de catabolismo de la purina que se produce durante la oscuridad.

[0060] La actividad XDH produce urato que se convierte rápidamente a ureidos, alantoína y alantoato (Nguyen, 1986, *ibid.*; Sagi et al, 1998 *ibid.*). Inesperadamente, se encontró que sus niveles se mejoraron significativamente en hojas de tipo salvaje Col, exponiendo las plantas de tratamiento oscuro (5 veces; Figs. 5b, 5c, oscuro). La acumulación puede sugerir que en las plantas de tipo salvaje el procesamiento aguas abajo de ureidos está bloqueado de forma transitoria. Curiosamente, la transferencia de plantas de tipo salvaje tratadas con oscuridad a la luz después de 6 días en la oscuridad resultó en la reducción gradual de ureidos que se inició después del primer día y alcanzó un nivel basal del día 9 a la luz (día 15, las Figs. 5b y 5c, recuperación). En hojas mutantes *Atxdh1*, se detectaron niveles basales de alantoína y alantoato y fueron similares a los niveles de tipo salvaje. Su presencia puede representar la actividad XDH₂, la actividad residual o XDH1 representan una vía alternativa para la biosíntesis de ureido. Es importante destacar que el nivel de la alantoína y alantoato en hojas mutantes *Atxdh1* se mantuvo baja durante el estrés oscuro, o después de su recuperación (Figs. 5b, 5c). Los resultados indican que la actividad *AtXDH1* juega un papel fundamental en el catabolismo de purina inducida por la oscuridad, facilitando la producción de ureidos.

Ejemplo 7: Estrés inducido por oscuridad modifica los niveles de transcripción de genes implicados en el catabolismo de las purinas aguas arriba y aguas abajo a XDH

[0061] Se hace ahora referencia a la Fig. 6, que muestra el análisis cuantitativo de las transcripciones de tiempo real RT-PCR realizado utilizando plantas de tipo silvestre (Col) y comprometidas XDH (KO, SALK_148364 *Atxdh1* línea de inserción de T-ADN; Ri, los medios de tres líneas de interferencia de ARN XDH) después de permanecer en la oscuridad durante 6 días y se transfirieron a 16 h luz/8 h régimen oscuro para la recuperación durante 9 días adicionales. El aumento de los niveles de ureido implica un cuello de botella en su removilización durante el periodo oscuro extendido, que debe reflejarse en un aumento o disminución de las transcripciones en la vía catabólica. AMPD, catalizando la conversión de AMP a IMP, es el primer paso comprometido en el catabolismo de la purina (Zrenner R. et al., 2006 *Annu Rev Plant Biol* 57, 805-836). Tras la transferencia a oscuro, nivel de expresión de transcripción AMPD se eleva rápidamente en mutantes Col y *Atxdh1* y cae bajo la exposición a la luz (Fig. 6, panel superior). Además, la transcripción de expresión de las enzimas peroxisomales UO y TLP, se cree que participan en la producción de ureidos (Reumann S. et al., 2007 *Plant Cell*, tpc.107.050989), seguido de patrón similar de inducción de la transcripción durante el estrés oscuro y periodo posterior de recuperación, como se exhibe por AMPD y XDH1 (Fig. 12). Por el contrario, ALN que convierte a la alantoína y alantoato AAH que convierte a alantoato a ureidoglicolato se mejoraron en el primer día del tratamiento oscuro pero después se redujo significativamente por debajo del nivel basal en el 4^o y 6^o día. Esta última reducción coincide con el tiempo del aumento de la acumulación de ureidos. Tras la re-exposición a la luz, las transcripciones de nuevo volvieron a los niveles basales cercanos (Fig. 6, paneles medios e inferiores). Por lo tanto, las transcripciones aguas arriba y aguas abajo de la biosíntesis de ureido se regularon recíprocamente. El resultado es coherente con el aumento observado en los niveles de ureido e indica que existe un componente de la transcripción en el control de la acumulación de alantoína y alantoato durante el tratamiento oscuro (Fig. 5).

Ejemplo 8: Removilización de Purina también se refleja en la edad de la hoja

[0062] Se hace referencia a la Fig. 7, que muestra la influencia del envejecimiento sobre el fenotipo de la hoja, el nivel de metabolito de la purina y la expresión de transcripción de plantas de tipo salvaje y plantas comprometidas *Atxdh1*.

[0063] El tratamiento oscuro estimula la removilización de los metabolitos, los cuales deberían en parte imitar procesos que se producen durante el envejecimiento. Para examinar esto, transcripciones relacionadas con la síntesis de ureidos se examinaron en el tipo silvestre y plantas mutantes XDH1 sobre toda la vida de la planta. Al aumentar la edad, hojas en roseta de plantas mutantes XDH se amarillaron más temprano que las plantas Col de tipo salvaje y exhibieron un nivel significativamente mayor de pliegue de la transcripción *SAG12* (Fig. 7a). Los niveles de las transcripciones de las enzimas que conducen a la producción de alantoína y alantoato en las plantas de tipo salvaje, AMPD, XDH1, UO y TLP se eleva con la edad. En contraste, se observó una reducción concomitante en el nivel de transcripción de la alantoína y enzimas de utilización de alantoato, ALN y AAH (Fig. 7c). Consistente con estas observaciones, el mutante XDH mostró acumulación dependiente de la edad de la xantina y plantas de tipo salvaje mostraron acumulación gradual de ureidos, alantoína y alantoato (Fig. 7b). Interesantemente, los niveles de xantina y ureidos que se acumulan con la edad de la planta fueron similares a la acumulación detectada durante el estrés agudo oscuro (Fig. 5) y pueden indicar la capacidad catabólica del metabolismo de las purinas.

Ejemplo 9: La función de la xantina y ureidos en la protección celular durante el estrés inducido por la oscuridad

[0064] Se hace referencia a la Fig. 8 que muestra las respuestas de plantas de interferencia de ARN *xdh* (Ri) de *Arabidopsis* de tipo silvestre (Col) y de la aplicación de los catabolitos de purina: xantina, alantoína y alantoato. La pérdida inducida oscura de la clorofila y la muerte celular acelerada durante la recuperación puede ser debido a la acumulación de exceso de oxipurinas (Fig. 5A) o a la falta de un entorno de protección proporcionado por ureidos (Figs. 5B y 5C) o ambos. Para examinar esto directamente, discos de hojas cortadas de hojas en roseta mutantes Col y *Atxdh* fueron tratadas con xantina durante 48 h en la oscuridad y se tomaron muestras después de 24 h en la luz. La aplicación de la xantina 1 mM (en el rango del nivel de xantina calculado que se acumula en plantas mutantes tratadas por la oscuridad) causó una reducción en la clorofila que se exacerba en presencia de alopurinol en tanto de tipo salvaje y las líneas mutantes Ri (Fig. 8a). Curiosamente, discos de hojas de Col que exhibieron la degradación de la clorofila más baja contenida mejorada alantoína y los niveles de alantoato (Fig. 8A). Las observaciones indican que ureidos pueden proteger de la degradación de la clorofila durante el tratamiento oscuro y el período de recuperación. Para dilucidar el papel de la alantoína y alantoato directamente, discos de hojas se trataron con 0,1 mM alantoína o alantoato. En este caso, ambos tipos de ureidos protegieron los discos de hojas tratadas de degradación de la clorofila después de 48 h de tratamiento oscuro (Fig. 8b). Es importante destacar que la protección por las ureidos se produjo a pesar de la acumulación significativa de xantina en plantas Col alopurinol tratadas y mutantes *Atxdh* (Fig. 8b). Estos resultados sugieren que la degradación de la clorofila resultante de estrés inducido por la oscuridad y período de luz subsiguiente se debe a la falta de acumulación de ureidos que probablemente superan un papel negativo de la xantina o otros componentes inducidos por la oscuridad.

[0065] También se hace referencia a la Fig. 14, que muestra que la aplicación de alantoína evitan el deterioro de la hoja de perejil. Los discos de hojas de perejil se mantuvieron durante 2 días a la luz y después durante 2 días en la oscuridad con o sin la adición de 0 a 10 mM de alantoína. Hojas no separadas mantenidas a la luz sirvieron como control (CL). La influencia de la aplicación de la alantoína en la senescencia en perejil se examinó midiendo el contenido de clorofila en relación con el contenido en las hojas de control no separadas. En esta aplicación particular de caso de 0,1 a 0,5 mM la alantoína era particularmente eficaz en la prevención de la pérdida de clorofila.

[0066] Además, se hace referencia a la Fig. 15, la cual muestra la respuesta de tomate al estrés oscuro extendido y la recuperación a partir de entonces a la luz y el efecto de la aplicación de la alantoína exógena en el contenido de clorofila en la hoja. El nivel de alantoína en las hojas de plantas de tomate natural 1, 3 y 5 se midieron durante 12 días en la oscuridad y durante 10 días de recuperación a la luz a partir de entonces. La Fig. 15a muestra que la exposición de plantas de tomate al estrés oscuro aumenta el nivel de alantoína en las hojas. La Fig. 15b muestra que la aplicación de la alantoína a discos de hojas de tomate mantenidas en la oscuridad durante 2 días y después transferidas a la luz durante dos días adicionales retrasó la degradación de la clorofila.

[0067] Estos resultados muestran que la aplicación de la alantoína 0,1-10 mM protege hojas de degradación de la clorofila y amarillamiento. De acuerdo con una realización de la alantoína 0,1 mM, 0,5 mM de alantoína o cualquier concentración de alantoína en este rango son suficientes para evitar el amarilleo.

Ejemplo 10: Un papel para ureidos como carroñeros celulares

[0068] Se hace referencia a la Fig. 9, que muestra la acumulación de ROS en presencia de alantoína y alantoato en *Arabidopsis* de tipo silvestre (Col) y líneas *xdh1* interferencia de ARN (Ri). La acumulación de ROS se ha demostrado para iniciar la degradación de la clorofila (Rentel MC et al, 2004 *Naturaleza* 427, 858-861) y la degradación de la clorofila en las hojas mejoradas en ausencia de XDH puede resultar de la producción de ROS durante el estrés oscuro (Fig. 4; Guo y Crawford 2005 *ibid*). A la luz del efecto protector proporcionado por la aplicación de ureidos, es posible que actúan como protectores celulares a través de ROS de barrido. Para investigar el efecto de ureidos en la integridad de clorofila y capacidad de eliminación celular, discos de hojas se trataron con alantoína y alantoato y se examinaron para la clorofila, los niveles de H₂O₂ y superóxido. La clorofila restante se examinó después de la adición de alantoína de 0,1 mM o alantoato durante 24 h y posterior aplicación de 20 o 50 mM H₂O₂ durante 6 h. Los discos tratados mostraron un aumento significativo en la clorofila restante (26 a 31% de

20 mM H₂O₂ y 32 a 36% para 50 H₂O₂ mM, respectivamente; Fig. 9a) indica que ureidos pueden proteger las hojas de ROS.

5 **[0069]** La acumulación concomitante de ROS interno en forma de H₂O₂ fue examinada por aplicación de 3,3 'diaminobencidina (DAB). Líneas Ri mutantes mostraron 50% más de tinción DAB después de 24 h de tratamiento oscuro (Fig. 9b). Cuando los discos se trataron con alantoína o alantoato, se observó una significativa reducción de 2 veces en la intensidad de la tinción DAB. Tinción NBT para la presencia de superóxido reveló tinción reducida en líneas Ri (Fig. 9C) que habían sido descritos previamente para hojas enteras (Fig. 4). La adición de la alantoína/alantoato redujo significativamente la tinción en las líneas de Col pero no las líneas de RI. Los resultados indican que la presencia de ureidos disminuye la acumulación de H₂O₂ y se correlacionan con la observación de la reducción de la degradación de la clorofila.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 **[0070]**

<110> YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD. and BEN-GURION UNIVERSITY OF THE NEGEV RESEARCH AND DEVELOPMENT AUTHORITY

20 <120> METHOD FOR PROTECTING PLANTS FROM STRESS AND SENESCENCE

<130> YEDA/075 PCT

25 <150> US 61/024930

<151> 2008-01-31

<160> 36

30 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Synthetic primer

40 <400> 1

gattgttccc gttgcaaggt tgtt 25

<210> 2

<211> 28

45 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Synthetics primer

50 <400> 2

tgcaactgag agttgtttat ggattgag 28

<210> 3

55 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> Synthetics primer

<400> 3

aagagtgggg attttccag ctgt 25

<210> 4
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Synthetics primer
 <400> 4
 10 tgccaatct agtttctgat ctctga 27
 <210> 5
 <211> 27
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Synthetics primer
 20 <400> 5
 tttgtaaga ctctaccgg aaagaca 27
 <210> 6
 <211> 27
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Synthetics primer
 30 <400> 6
 gagggtggat tccttctgga tattgta 27
 <210> 7
 <211> 27
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> synthetics primer
 40 <400> 7
 cactgttat gtgaaagcca aggaatg 27
 <210> 8
 <211> 27
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Synthetics primer
 <400> 8
 55 ccaagccta aaaccatgta aatgtgg 27
 <210> 9
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Synthetics primer
 <400> 9
 65 ccatgctgta aaggaaaggt atgaaaa 27

ES 2 582 666 T3

	<code><210> 10</code>		
	<code><211> 27</code>		
	<code><212> ADN</code>		
5	<code><213> Secuencia artificial</code>		
	<code><220></code>		
	<code><223> Synthetics primer</code>		
10	<code><400> 10</code>		
	<code>tgattctcag acgatctga ggtttg</code>	27	
	<code><210> 11</code>		
	<code><211> 30</code>		
15	<code><212> ADN</code>		
	<code><213> Secuencia artificial</code>		
	<code><220></code>		
	<code><223> Synthetics primer</code>		
20	<code><400> 11</code>		
	<code>tcaaagaaaa gaaagatgtt accaaagtgg</code>	30	
	<code><210> 12</code>		
25	<code><211> 27</code>		
	<code><212> ADN</code>		
	<code><213> Secuencia artificial</code>		
	<code><220></code>		
	<code><223> Synthetics primer</code>		
30	<code><400> 12</code>		
	<code>gtgcatctgt aataactcct tggaat</code>	27	
	<code><210> 13</code>		
35	<code><211> 28</code>		
	<code><212> ADN</code>		
	<code><213> Secuencia artificial</code>		
	<code><220></code>		
40	<code><223> Synthetics primer</code>		
	<code><400> 13</code>		
	<code>tgatgttga caaatagaag gagcgttt</code>	28	
45	<code><210> 14</code>		
	<code><211> 29</code>		
	<code><212> ADN</code>		
	<code><213> Secuencia artificial</code>		
50	<code><220></code>		
	<code><223> Synthetics primer</code>		
	<code><400> 14</code>		
55	<code>tattcggatt ccccttgaga agcgaaca</code>	29	
	<code><210> 15</code>		
	<code><211> 28</code>		
60	<code><212> ADN</code>		
	<code><213> Secuencia artificial</code>		
	<code><220></code>		
	<code><223> Synthetics primer</code>		
65	<code><400> 15</code>		
	<code>tgatattgga caaatagaag gagcgttt</code>	28	

ES 2 582 666 T3

<210> 16
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Synthetics primer
 <400> 16
 10 tgcatTTGga ttaccctga gaagagaaa 29
 <210> 17
 <211> 26
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Synthetics primer
 20 <400> 17
 agactcacca acagctgac caatt 26
 <210> 18
 <211> 26
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> synthetics primer
 30 <400> 18
 cacctagtcc atcatccgag ctagag 26
 <210> 19
 <211> 25
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Synthetics primer
 <400> 19
 gattgtccc gttgcaaggt tgtt 25
 <210> 20
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Synthetics primer
 <400> 20
 55 tgcaactgag agttgttat ggattgag 28
 <210> 21
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Synthetics primer
 <400> 21
 65 aagagtgggg attttccag ctgt 25

<210> 22
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Synthetics primer
 <400> 22
 10 tgccaatct agtttctgat cttctga 27
 <210> 23
 <211> 27
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Synthetics primer
 20 <400> 23
 tttgtaaga ctctaccgg aaagaca 27
 <210> 24
 <211> 27
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Synthetics primer
 30 <400> 24
 gagggtggat tccttctgga tattgta 27
 <210> 25
 <211> 27
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Synthetics primer
 40 <400> 25
 cactgttat gtgaaagcca aggaatg 27
 <210> 26
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Synthetics primer
 <400> 26
 55 ccaagccta aaaccatgta aatgtgg 27
 <210> 27
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Synthetics primer
 <400> 27
 65 ccatgctgta aaggaaaggt atgaaaa 27

ES 2 582 666 T3

	<210> 28	
	<211> 27	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Synthetics primer	
10	<400> 28	
	tgattctcag acgatcttga ggttttg	27
	<210> 29	
	<211> 30	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Synthetics primer	
20	<400> 29	
	tcaaagaaaa gaaagatgtt accaaagtgg	30
	<210> 30	
	<211> 27	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Synthetics primer	
30	<400> 30	
	gtgcatctgt aataactcct tggaat	27
	<210> 31	
35	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Synthetics primer	
	<400> 31	
	tgatgttga caaatagaag gagcgttt	28
45	<210> 32	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Synthetics primer	
	<400> 32	
55	tattcggatt ccccttgaga agcgaaca	29
	<210> 33	
	<211> 28	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Synthetics primer	
65	<400> 33	
	tgatattgga caaatagaag gagcgttt	28

ES 2 582 666 T3

5
<210> 34
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetics primer

<400> 34
10 tgcatttga ttaccctga gaagagaaa 29

<210> 35
<211> 26
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetics primer

<400> 35
20 agactcacca acagctgac caatt 26

<210> 36
<211> 26
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetics primer

<400> 36
30 cacctagtcc atcatccgag ctagag 26

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

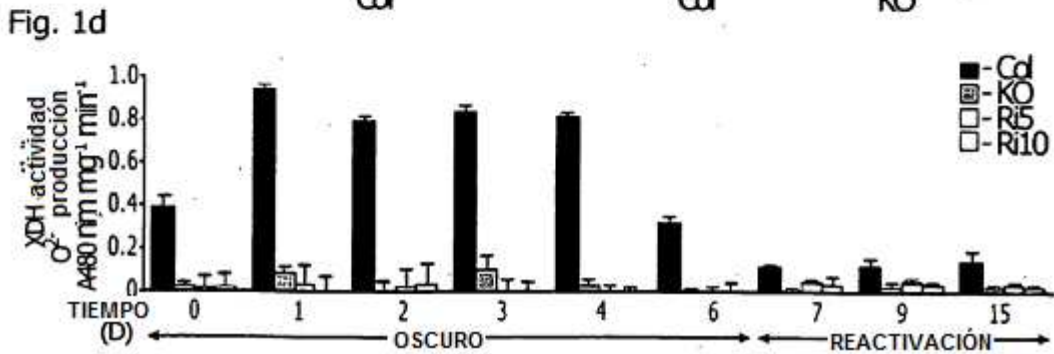
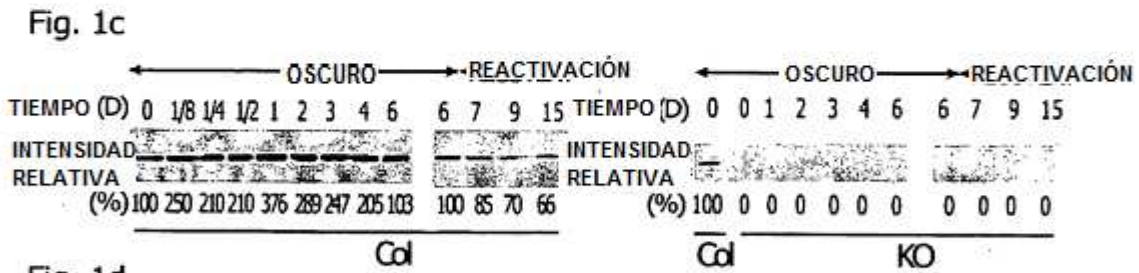
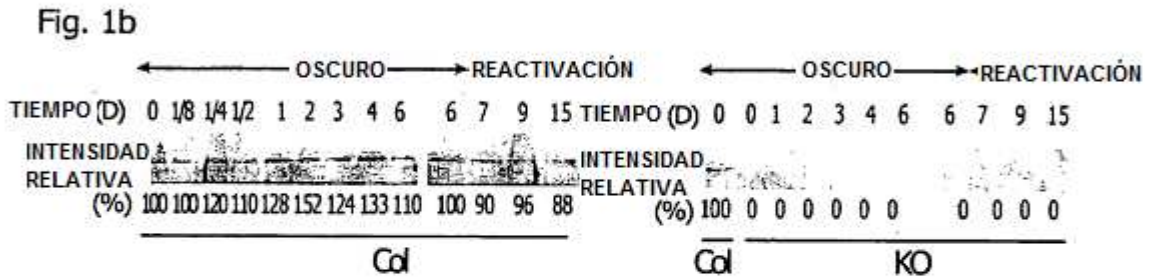
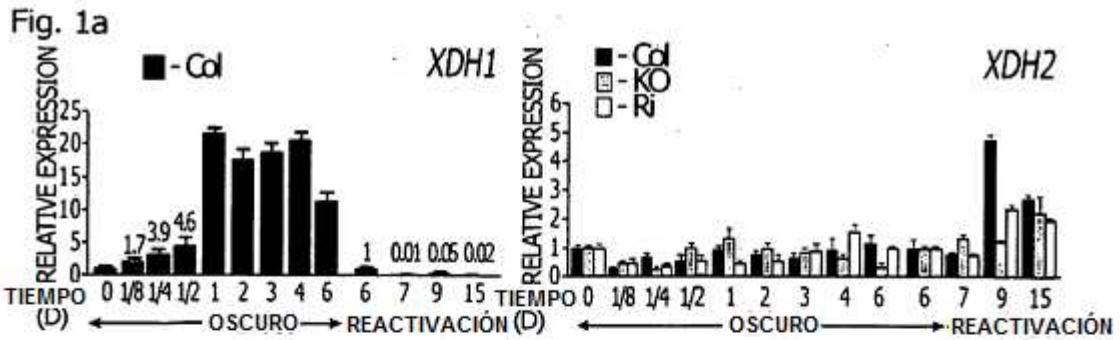
1. Un método para proteger plantas o partes de plantas a partir de un procedimiento relacionado con el estrés que comprende:
 5 la aplicación a la planta o parte de planta de una composición que comprende al menos un ureido seleccionado del grupo que consiste de la alantoína y alantoato en una cantidad eficaz para disminuir o retrasar el proceso relacionado con el estrés, en el que dicho proceso relacionado con el estrés se selecciona del grupo que consiste en la degradación de la clorofila, el estrés oxidativo, la senescencia, la senescencia prematura o cualquier combinación de los mismos.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la composición comprende el ureido 0,001 a 10 mM.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la composición comprende ureido de 0.01-10mM; o en el que la composición comprende ureido de 0.1-0.5mM.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las partes de la planta son seleccionadas a base de frutas, ramas cortadas de verduras y flores; o en el que las plantas son productos de hoja.
- 25 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las plantas o partes de plantas se separan de la planta.
- 30 6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la aplicación comprende la pulverización.
- 35 7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la aplicación comprende al menos parcialmente la inmersión de la planta o parte de planta en la composición.
- 40 8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que de aplicación comprende la adición de la composición a la raíz de planta o medio de la parte de planta.
- 45 9. Una planta transgénica que comprende al menos una célula transformada con un polinucleótido que codifica la deshidrogenasa de xantina (XDH) y al menos un polinucleótido adicional que codifica una enzima seleccionada del grupo que consiste en desaminasa de AMP (AMPD), oxidasa de urato (UO) y la transtiretina como proteína (TLP), en el que la planta transgénica comprende una cantidad elevada de un ureido seleccionado del grupo que consiste de la alantoína y alantoato y tiene una mayor tolerancia a un proceso relacionado con el estrés seleccionado de entre el grupo que consiste en la degradación de la clorofila, el estrés oxidativo, la senescencia, la senescencia prematura o cualquier combinación de los mismos en comparación con una planta no transgénica correspondiente.
- 50 10. Una planta transgénica que comprende al menos una célula transformada con un polinucleótido que reduce la expresión de una enzima endógena de la planta en la vía de utilización de ureido seleccionado del grupo que consiste en alantoinasa (ALN) y amidinohidrolasa de alantoato (AAH) en la que la planta transgénica comprende cantidad elevada de un ureido seleccionado del grupo que consiste de la alantoína y alantoato y tiene una mayor tolerancia a un proceso relacionado con el estrés seleccionado de entre el grupo que consiste en la degradación de la clorofila, el estrés oxidativo, la senescencia, la senescencia prematura o cualquier combinación de los mismos en comparación con una planta no transgénica correspondiente.

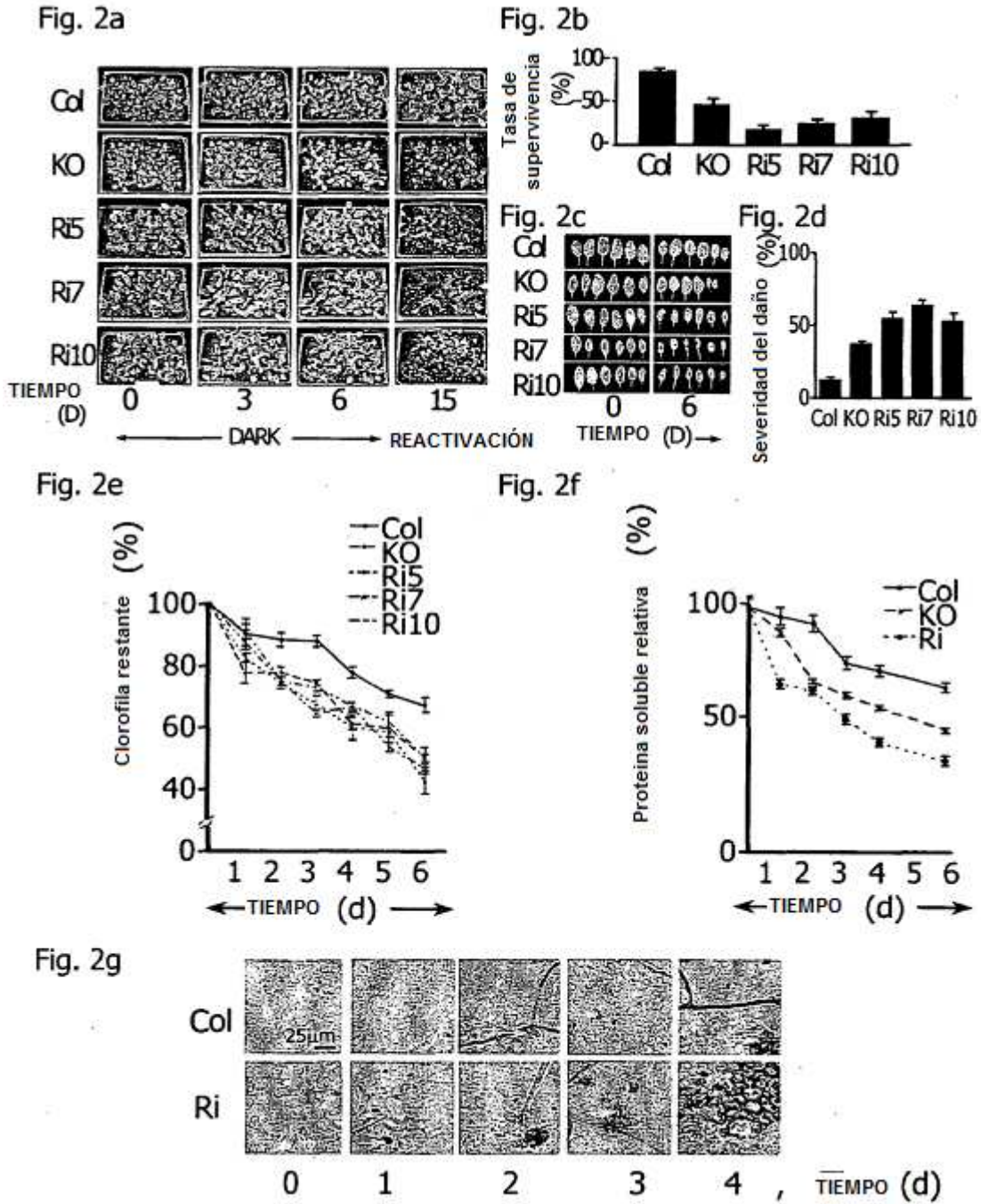
50

55

60

65





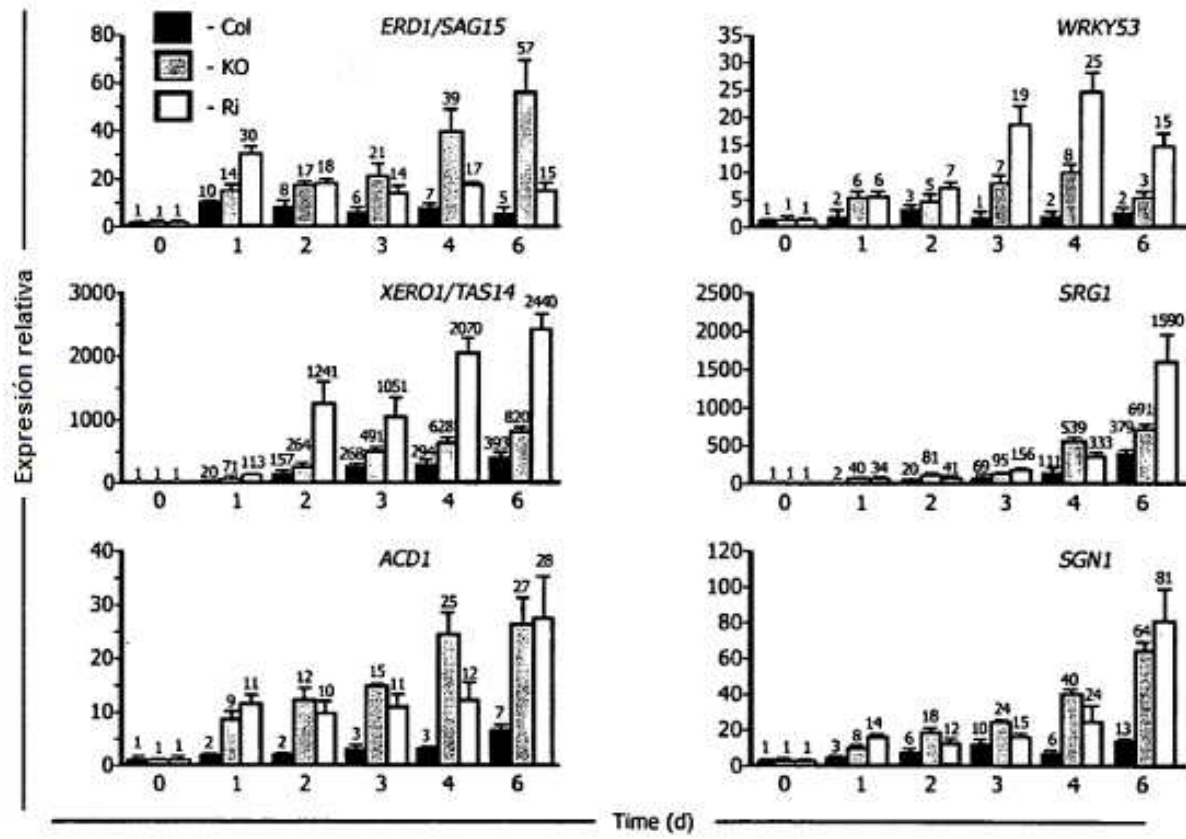


FIGURA 3

Fig. 4a

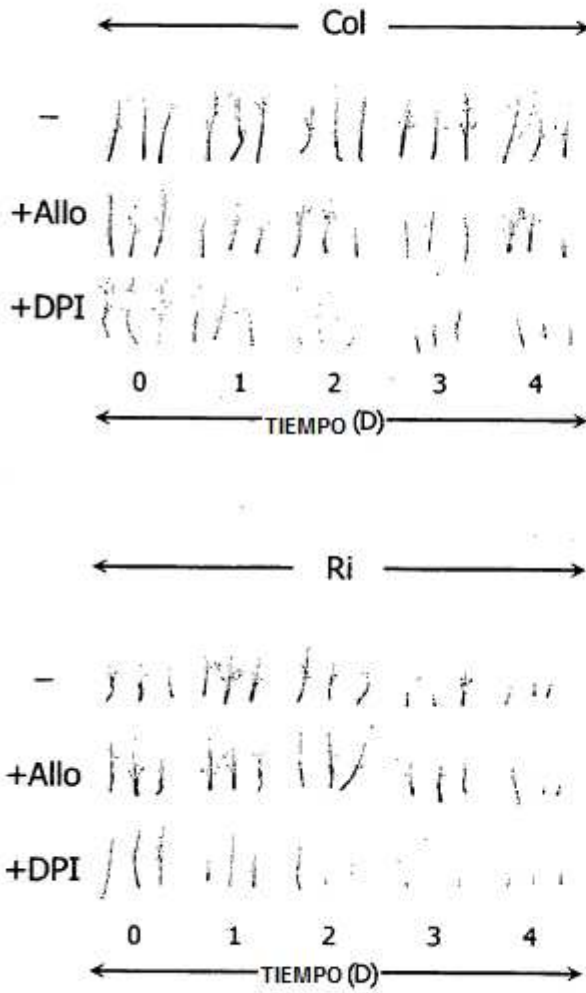


Fig. 4b

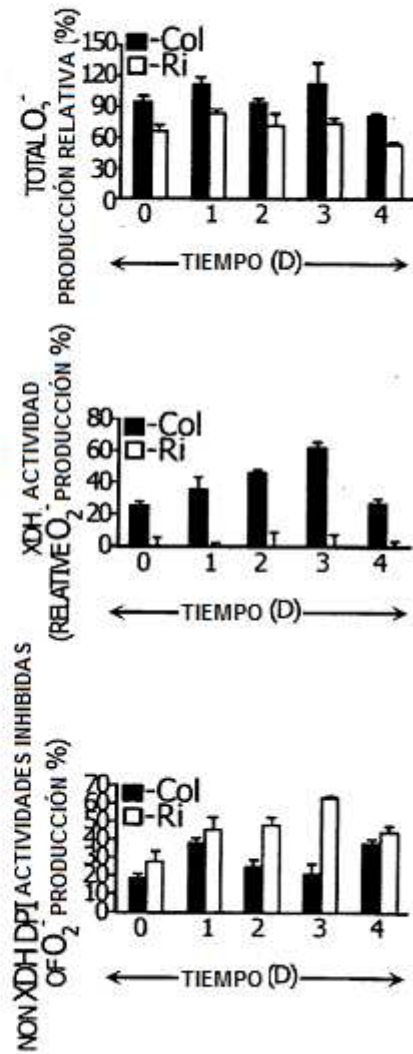


Fig. 5a

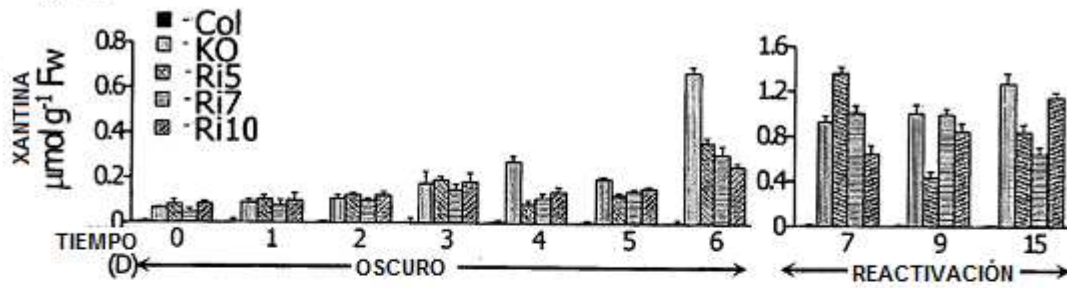


Fig. 5b

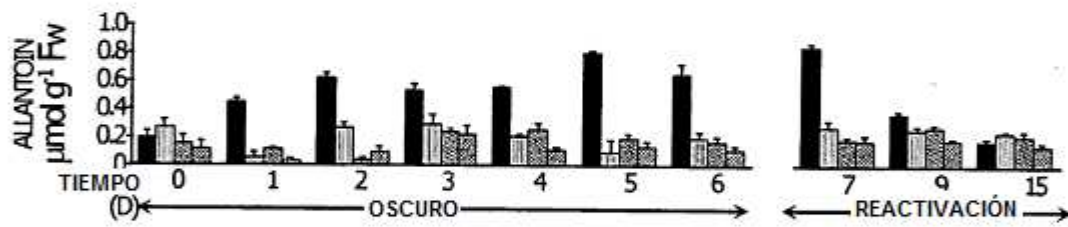


Fig. 5c

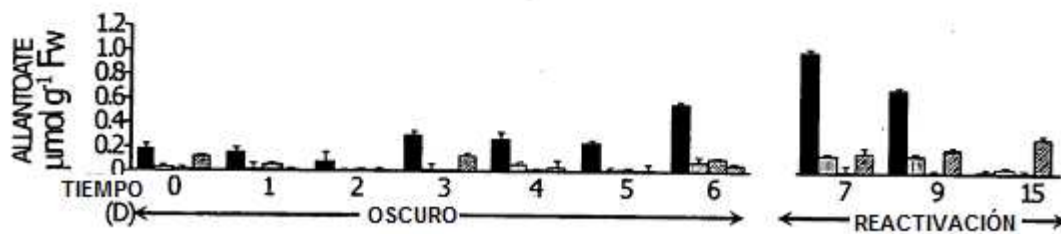


Fig. 6

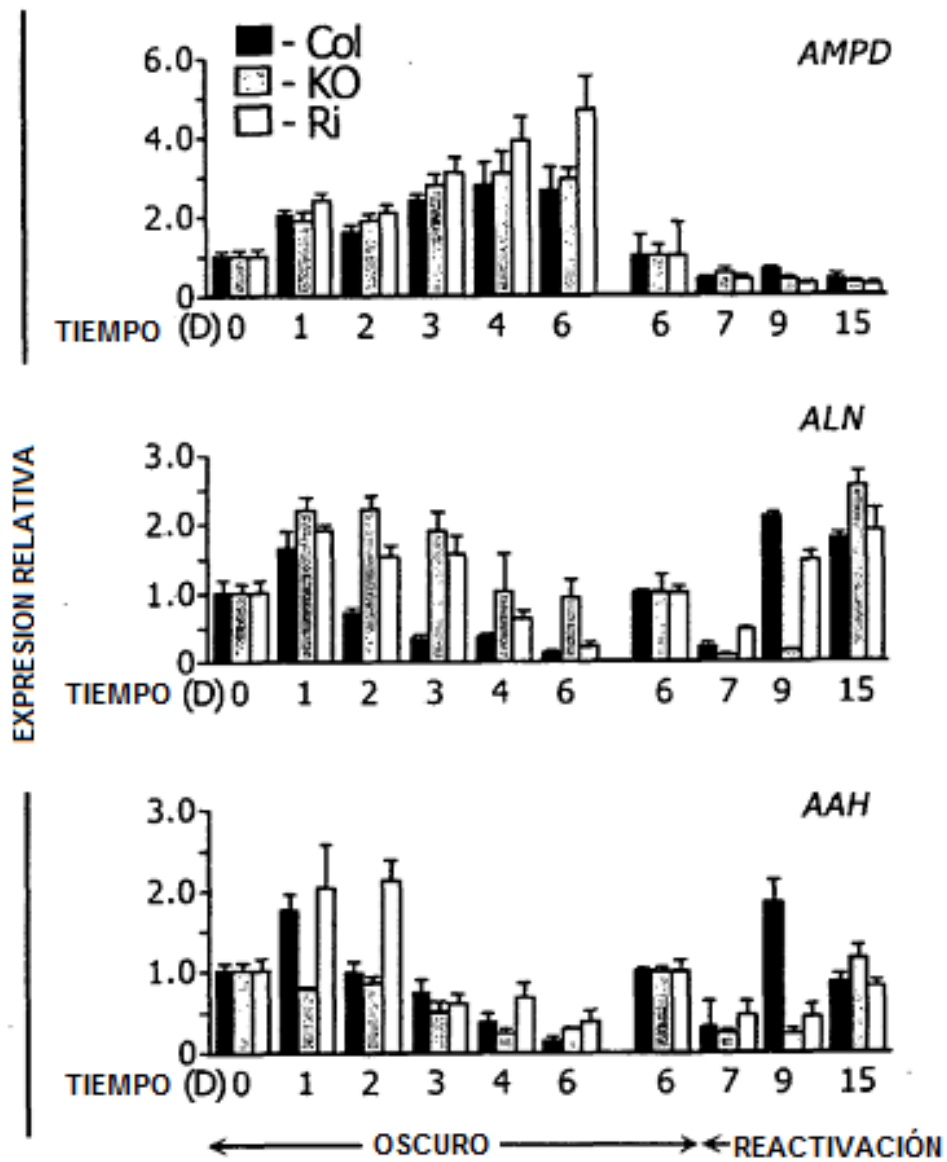


Fig. 7a

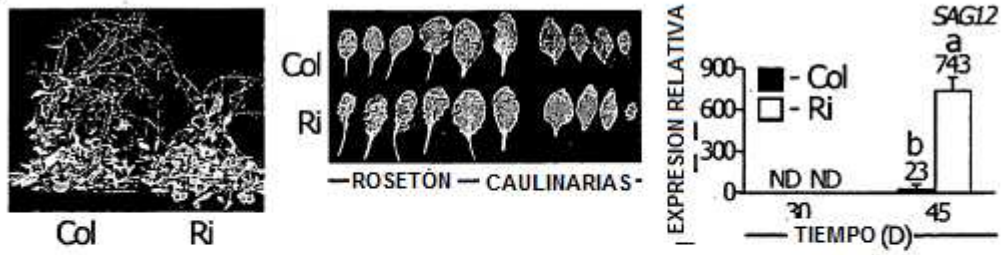


Fig. 7b

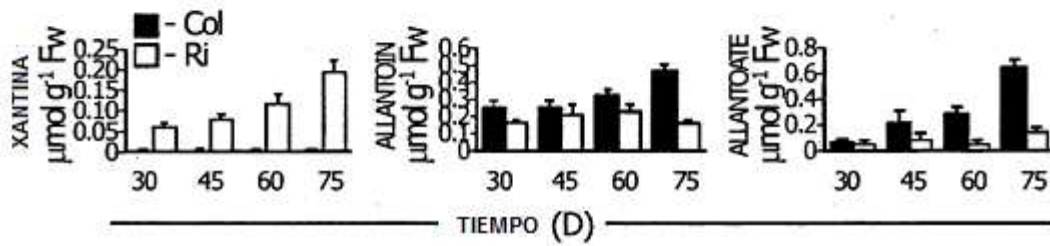


Fig. 7c

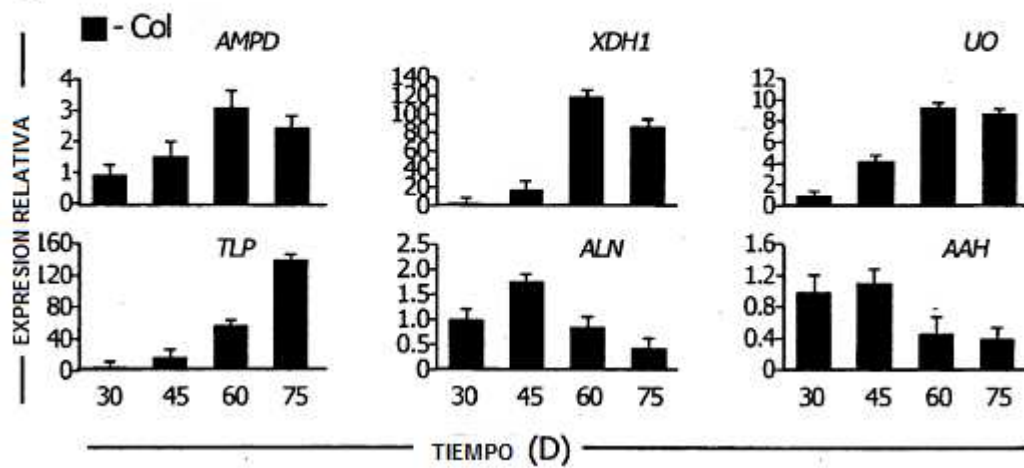


Fig. 8a

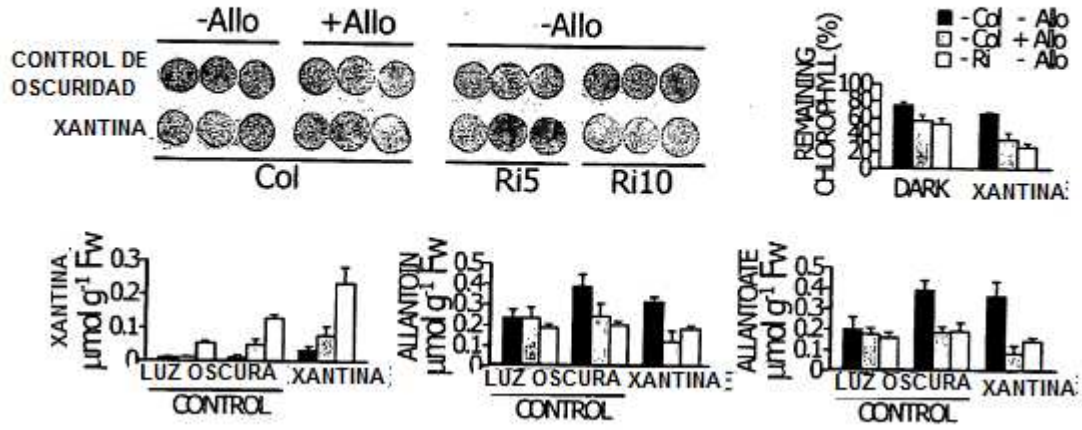


Fig. 8b

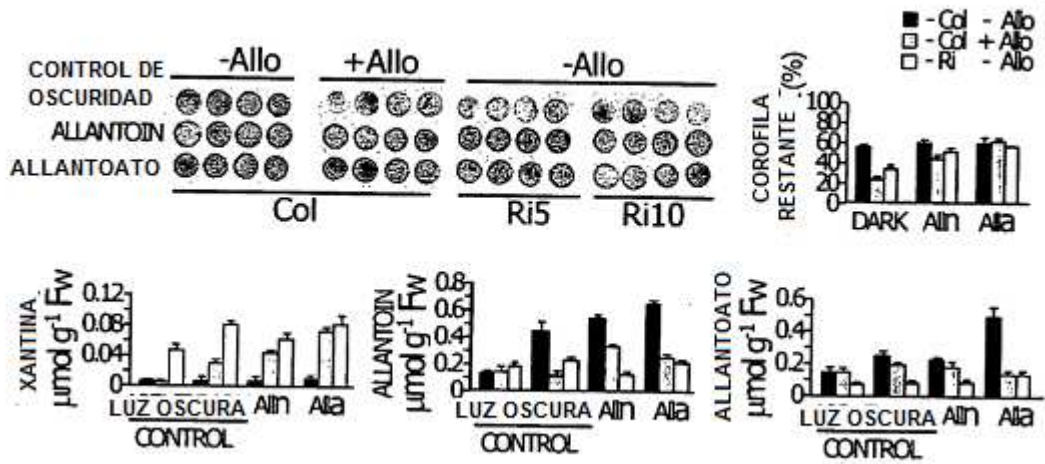


Fig. 9a

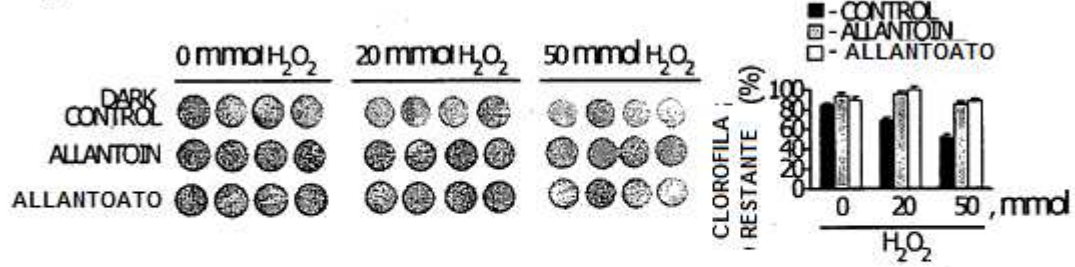


Fig. 9b

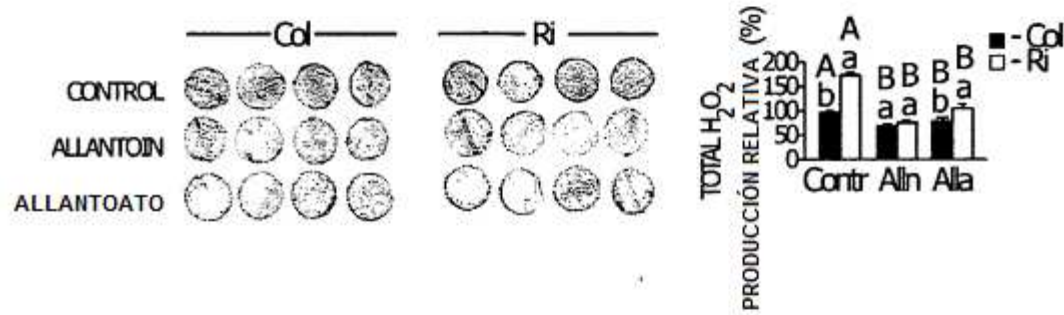


Fig. 9c

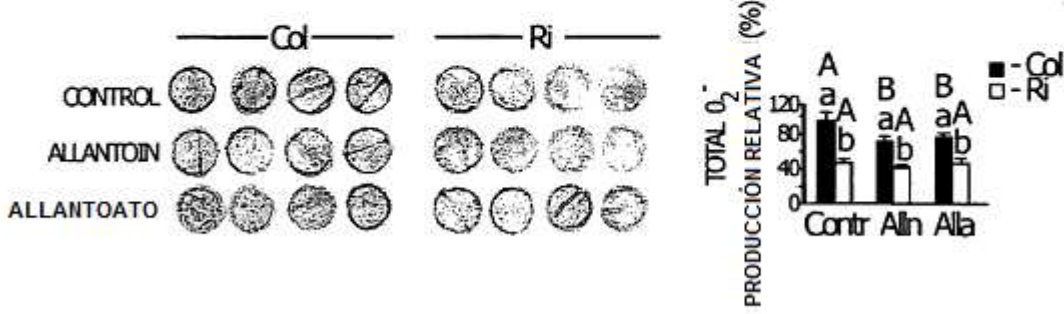


Fig. 10

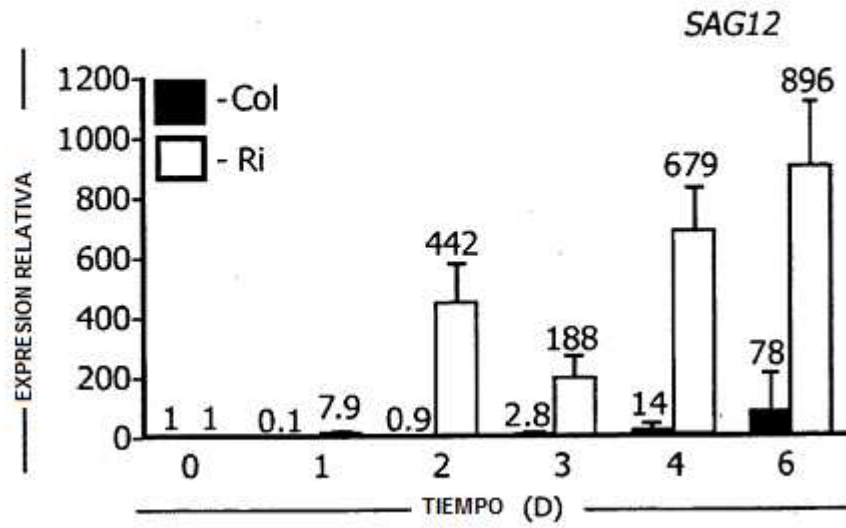


Fig. 11

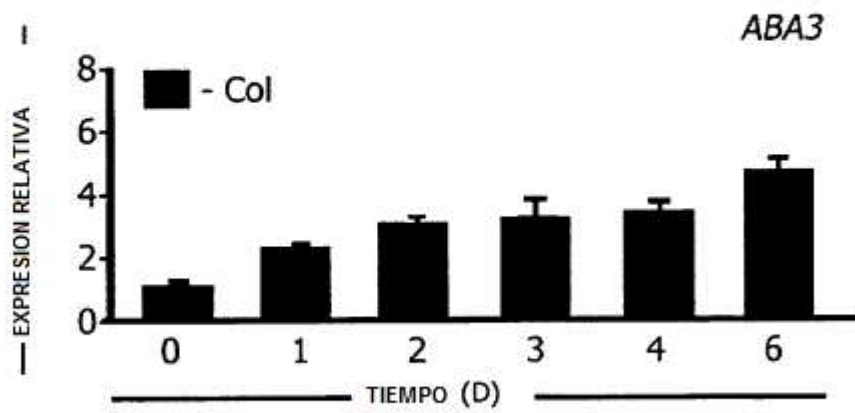


Fig. 12

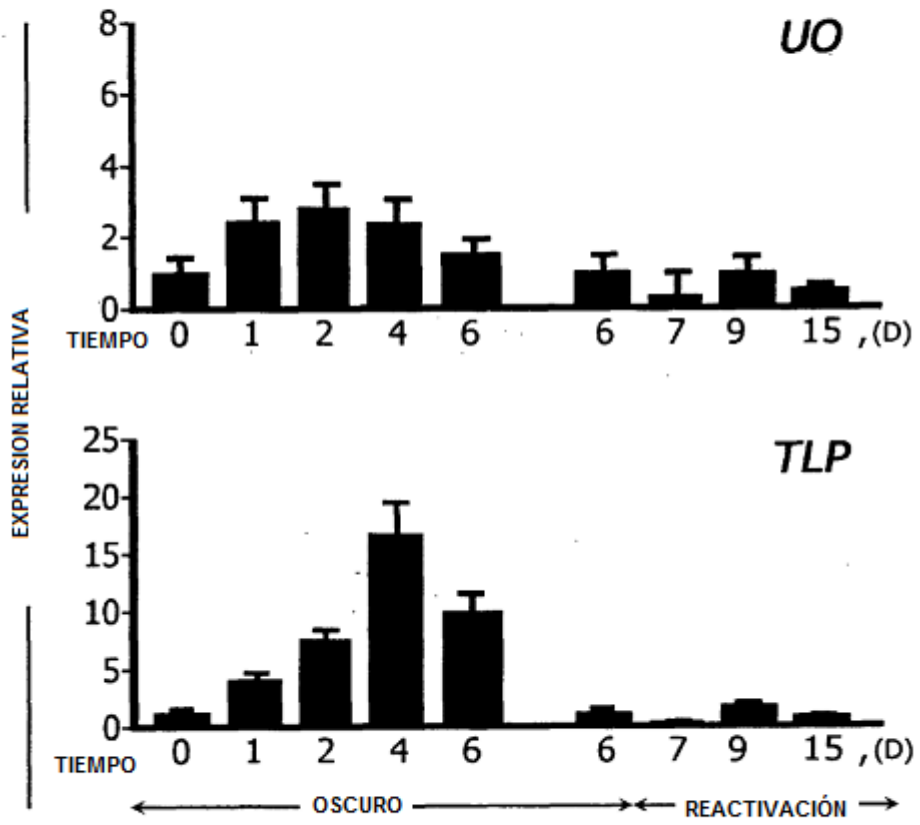


Fig. 13

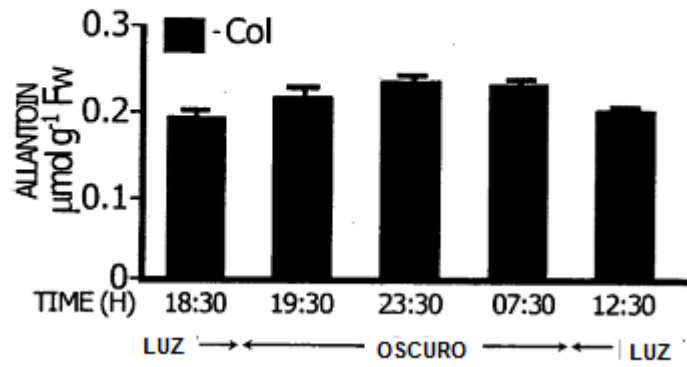


Fig. 14

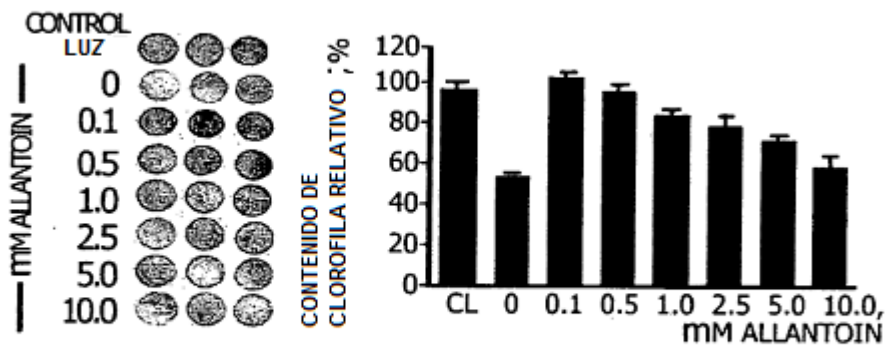


Fig. 15a

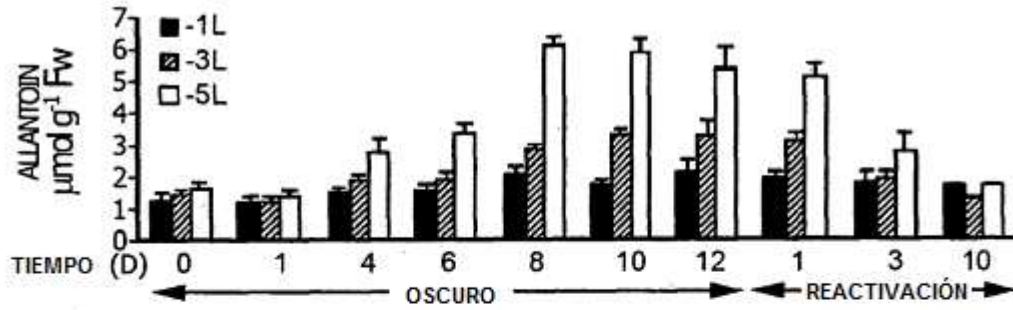


Fig. 15b

