

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 820 760**

51 Int. Cl.:

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2015 PCT/EP2015/053850**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2015 WO15124799**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2015 E 15707320 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 3110832**

54 Título: **Plantas con rendimiento incrementado y método de obtención de dichas plantas**

30 Prioridad:

24.02.2014 FR 1451445

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

22.04.2021

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (50.0%)
3, rue Michel Ange
75016 Paris, FR y
UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DE BONT, LINDA y
GAKIERE, BERTRAND**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 820 760 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Plantas con rendimiento incrementado y método de obtención de dichas plantas

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de aumento de la biomasa en una planta, en particular a un procedimiento de aumento del crecimiento de una planta, más particularmente de aumento de la velocidad de crecimiento de una planta, de aumento del rendimiento en semilla, de aumento de la resistencia al estrés abiótico, la resistencia al estrés biótico y un aumento de la velocidad de germinación, así como a las plantas que resultan de ello, y esto a través del aumento de la expresión de la L-aspartato oxidasa en el seno de la planta. El
10 procedimiento según la invención permite un aumento de las capacidades fotosintéticas de las plantas a través de un aumento de las cantidades de NAD y de sus derivados en el seno de dichas plantas.

El desarrollo de una agricultura duradera se enfrenta a un desafío principal para la comunidad internacional en los años venideros que consiste en conservar un crecimiento de la producción alimentaria al mismo ritmo que el de la población mundial, que está acompañado desafortunadamente de un descenso mundial de tierras arables de gran
15 calidad. Asumir este desafío necesitará unos esfuerzos en varios campos, de los cuales uno será proporcionar unos cultivos de un valor nutricional incrementado, capaces de resistir a los diversos estreses medioambientales, proporcionar más rendimiento con menos insumos, crecer más rápidamente, para suministrar al final un mejor rendimiento de cultivo y una biomasa más importante.

La seguridad alimentaria ha sido siempre una prioridad en el mundo entero y una preocupación creciente para el impacto medioambiental de la producción agrícola que necesita el desarrollo y la utilización de nuevos métodos para mejorar la productividad, protegiendo al mismo tiempo el medioambiente. Existe una necesidad incrementada de mejores enfoques para mejorar el rendimiento de los cultivos en unas condiciones de terreno diferentes.
20

Con el fin de aumentar los rendimientos y la biomasa disponible de las plantas cultivadas, se han llevado a cabo unos esfuerzos para modificar el contenido de plantas en lignina. Se han estudiado otros medios para aumentar la biomasa, tal como la ingeniería genética de las plantas, tal como por ejemplo la manipulación genética de los reguladores de crecimiento de los vegetales o de las vías de fotosíntesis.
25

El documento WO 2012/041496 describe un método de selección mediante una técnica de PCR que tiene como diana un grupo de genes marcadores de la eficacia de utilización energética con el fin de obtener unas plantas que tengan un mejor vigor y una mejor tolerancia a los estreses abióticos.
30

El documento US 2006100573 describe un método que consiste en sobreproducir una enzima del metabolismo secundario C³H implicada en la síntesis de lignina para producir más pared y por lo tanto más biomasa y más semillas.
35

El documento US 20060095981 describe un método que consiste en obtener unas plantas transgénicas que contienen la vía bacteriana de utilización del glicolato con el fin de reducir las pérdidas de rendimientos relacionadas con la fotorrespiración. Desafortunadamente, estas plantas producen formas activas de oxígeno que estresan las plantas producidas (Kebeish *et al.*, 2007; Maier *et al.*, 2012).
40

Sin embargo, cada uno de estos métodos tiene como objetivo una vía metabólica particular que no permite tratar los problemas de producción de biomasa, de resistencia al estrés abiótico, de resistencia al estrés biótico, de regularización de la germinación, del rendimiento en semilla, de manera global.
45

Existe también un método de tratamiento de semilla por una molécula insecticida de la familia de los isonicotinoides con fines de aumentar los rendimientos (documento WO 01/26468). Sin embargo, la utilización de estas moléculas, de estructura parecida a nucleótidos de piridina como el ácido nicotínico y su precursor, el NAD⁺, está sujeta a controversia debido al impacto que tendría sobre la mortalidad de las abejas.
50

El documento US 6271031 describe unos polinucleótidos que codifican unos polipéptidos y entre otros, la L-aspartato oxidasa. El objeto de la invención descrita en el documento US 6271031 tiene como objetivo no obstante modificar la producción de quinolinato y no muestra ninguna relación con un fenotipo relacionado con el crecimiento de la planta así transformada. El objetivo de la invención describe la obtención de ADNc que codifica la L-aspartato oxidasa, pero ningún ejemplo describe los efectos de su utilización en las plantas.
55

El documento US2007/016976 describe varios miles de secuencias polinucleotídicas cuya expresión está alterada, o bien hacia una sobreexpresión, o bien hacia una sub-expresión, en respuesta a una infección por un patógeno. Una secuencia entre éstas corresponde a la L-aspartato oxidasa, pero no se divulga nada en cuanto a un efecto fenotípico sobre el crecimiento de una planta modificada. Además, no se divulga ningún ejemplo de expresión de la aspartato oxidasa de la planta. El hecho de que la expresión de miles de genes sea inducida o reprimida por la alteración metabólica a consecuencia de una enfermedad no demuestra en nada la implicación de cada uno de los genes desregulados en la resistencia potencial a las enfermedades.
60
65

5 El documento WO994012 describe unos procedimientos que sirven para aumentar la resistencia de plantas a unos patógenos por expresión de una enzima que produce una especie de oxígeno reactivo al peróxido de hidrógeno o de una enzima de degradación de oxalato. Este documento menciona aproximadamente 25 enzimas, entre las cuales la L-aspartato oxidasa, susceptibles de producir una especie de oxígeno reactivo. Sin embargo, se cuestiona que la L-aspartato oxidasa pueda producir una especie de oxígeno reactivo y de hecho no se describe en el documento WO994012 ningún ejemplo de esta producción. En efecto, a diferencia de la isoforma bacteriana de la enzima, la L-aspartato oxidasa de planta no parece capaz de producir peróxido de oxígeno en presencia de oxígeno molecular, pero su actividad sería la de una succinato deshidrogenasa. Además, es bien conocido que en las plantas, son las NADPH oxidasas las que son las principales fuentes de producción de formas activas de oxígeno en respuesta a un ataque patógeno.

15 El documento WO2010086220 describe un método de incremento del rendimiento de las plantas por modificación del metabolismo nitrogenado a través de la transformación genética, que produce unas plantas más verdes a través de una producción más fuerte de clorofila. En lo que se refiere a la modificación de expresión de la L-aspartato oxidasa, ningún ejemplo demuestra el efecto de una sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa sobre el fenotipo de las plantas. Asimismo, no se evoca ningún efecto sobre el rendimiento o la velocidad de crecimiento de estas plantas.

20 Los inventores de la presente invención han descubierto ahora, de manera sorprendente, que la sobreexpresión de la enzima L-aspartato oxidasa (primera enzima de la vía de biosíntesis del NAD⁺) en el seno de una planta conduce a un aumento considerable de las capacidades fotosintéticas de la planta, lo cual se traduce por una aceleración del crecimiento, un aumento de la biomasa producida, un aumento del rendimiento, en particular del rendimiento en semilla. Se observa también una aceleración de la germinación, un aumento de la resistencia al estrés abiótico y un aumento de la resistencia al estrés biótico en las plantas que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa.

25 La sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa, primera enzima de la vía de biosíntesis del NAD denominada *de novo* (Noctor *et al.*, 2006), tiene como resultado aumentar los niveles de NAD y de sus derivados producidos por las plantas. Resulta de ello un aumento importante de los contenidos en NAD (pool de NAD que representa NAD⁺, NADH, NADP⁺ y NADPH) y del conjunto de los nucleótidos de piridina en las plantas que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa, pero también del nivel de otros metabolitos energéticos como el ATP. Se obtienen así unas plantas, células vegetales en las que la totalidad o parte de las plantas tienen un contenido energético elevado.

35 Se observan así unas consecuencias fisiológicas remarcables como un aumento de las capacidades fotosintéticas y unas velocidades de crecimiento de las plantas que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa. Resulta de ello un aumento significativo de biomasa, pero también unos rendimientos en semillas cuando se cultivan las plantas que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa hasta la madurez. Estos aumentos de rendimientos están fuertemente correlacionados con los niveles de sobreproducción de la L-aspartato oxidasa y de NAD.

40 Se observa en las plantas que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa un aumento muy fuerte de la resistencia de las plantas a unas condiciones medioambientales de estrés abiótico como una combinación de fuerte calor y/o fuerte luz.

45 Esta observación permite considerar una disminución de las intervenciones fitosanitarias sobre unos cultivos de plantas que sobreproducen la L-aspartato oxidasa y también extender el cultivo de una especie que sobreproduce la L-aspartato oxidasa más allá de la zona geográfica reservada habitualmente para la especie cultivada que no sobreexpresa la L-aspartato oxidasa.

50 Un aumento significativo de la resistencia de las plantas a unas condiciones medioambientales de estrés biótico como un ataque de pulgones se puede observar en unas plantas que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa.

55 Esta observación permite considerar una disminución de los tratamientos fitosanitarios, en particular insecticidas, sobre unos cultivos de plantas que sobreproduce la L-aspartato oxidasa, particularmente cuando las condiciones medioambientales son propicias para la multiplicación de los patógenos o devastadores.

60 Las semillas de las plantas que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa germinan más rápido y de manera más homogénea que las de plantas que no sobreexpresan la L-aspartato oxidasa. Esto puede permitir que el cultivo de plantas que sobreproduce L-aspartato oxidasa se instale más rápido, limitando la concurrencia de especies adventicias y las pérdidas de rendimientos. Por esta razón también, unos cultivos de plantas que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa necesitarán menos tratamientos herbicidas que tienen como diana las malas hierbas de los cultivos.

65 En unas condiciones medioambientales desfavorables, tales como un medio con carencia en nitrógeno, las semillas de plantas que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa germinan más rápido y, muy importante, mantienen una capacidad germinativa máxima en estas condiciones, mientras que la capacidad germinativa de las plantas que no sobreexpresan la L-aspartato oxidasa es mucho más débil. La presente invención permite considerar una

disminución de la aportación de insumos nitrogenados sobre unos cultivos que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa.

5 La sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa en unas plantas según la invención permite librarse de un tratamiento de *priming* de las semillas, en particular en las especies de huerta, metodología financieramente costosa utilizada habitualmente para aligerar la latencia, acelerar y homogeneizar la germinación de las semillas comerciales.

10 La presente invención se refiere por lo tanto a un método para mejorar por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre el rendimiento en semillas, la resistencia al estrés abiótico, la resistencia al estrés biótico, la velocidad de germinación o el crecimiento, en una planta, comprendiendo dicho método la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa; dicho método comprende la transformación de una célula vegetal con por lo menos un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa, y la generación a partir de dicha célula, de una planta que sobreexpresa la L-aspartato oxidasa.

15 En un modo particular, el método según la invención es un método para mejorar el rendimiento en semillas, en una planta, comprendiendo dicho método la transformación de una célula vegetal con por lo menos un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa, generando así una planta que sobreexpresa la L-aspartato oxidasa, y el cultivo de la planta hasta la madurez.

20 En un modo particular, el método según la invención es un método para mejorar la velocidad de germinación en una planta, comprendiendo dicho método la transformación de una célula vegetal con por lo menos un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa, generando así una planta que sobreexpresa la L-aspartato oxidasa, y el cultivo de la planta hasta la madurez.

25 La presente descripción divulga un método para mejorar por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre la biomasa, el rendimiento, en particular el rendimiento en semillas, la resistencia al estrés abiótico, la resistencia al estrés biótico, la velocidad de germinación o el crecimiento, en una planta, comprendiendo dicho método la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa, que se traduce por un aumento de las cantidades de NAD y de sus derivados.

30 En otro modo de realización, el método según la presente descripción tiene como objetivo mejorar la producción de biomasa en una planta, comprendiendo dicho método la transformación de una célula vegetal con por lo menos un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa, generando así una planta que sobreexpresa la L-aspartato oxidasa, y el cultivo de la planta hasta la madurez.

35 Las plantas según la invención presentan así un aumento de las cantidades de NAD y de sus derivados.

40 Los métodos según la invención tienen también como objetivo un aumento de las cantidades de NAD y de sus derivados.

45 Es también un objetivo de la presente invención proporcionar un método para mejorar la resistencia al estrés abiótico y/o la resistencia al estrés biótico en una planta, comprendiendo dicho método la transformación de una célula vegetal con por lo menos un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa, generando así una planta que sobreexpresa la L-aspartato oxidasa, y el cultivo de la planta hasta la madurez.

50 En un método según la presente invención, el por lo menos un ácido nucleico que codifica para L-aspartato oxidasa está bajo el control de un promotor que asegura la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa.

55 En otro modo preferido de realización de la presente invención, el por lo menos un ácido nucleico comprende un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo constituido por SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16.

60 En un modo de realización del método según la invención, el por lo menos un ácido nucleico comprende un ácido nucleico según SEC ID nº 1.

65 Un método según la presente invención tiene también como objetivo un método en el que la planta se selecciona de entre el grupo constituido por trigo, cebada, arroz, maíz, sorgo, girasol, colza, soja, algodón, guisante, alubia, yuca, mango, banana, patata, tomate, pimiento, melón, calabaza, sandía, lechuga, col, berenjena, álamo.

En un método particular de realización según la presente invención, la planta es el arroz (*Oryza sativa*), el trigo, la cebada o el maíz.

Según un modo divulgado en la presente descripción, la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa se realiza por introgresión de un elemento genético que codifica para una sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa.

Las plantas descritas en la presente memoria presentan así un aumento de las cantidades de NAD y de sus derivados.

5 Los métodos según la invención tienen también como objetivo un aumento de las cantidades de NAD y de sus derivados.

La presente descripción divulga un método en el que la introgresión de un elemento genético que codifica para una sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa se obtiene por fusión de protoplastos.

10 La presente descripción divulga un método en el que la introgresión de un elemento genético que codifica para una sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa se obtiene por rescate de embrión.

15 La presente descripción divulga un método para la producción de planta que presenta por lo menos un carácter fenotípico mejorado seleccionado de entre la biomasa, la velocidad de germinación, el rendimiento, en particular el rendimiento en semillas, la resistencia al estrés abiótico, la resistencia al estrés biótico, la velocidad de germinación, el crecimiento, comprendiendo el método la detección de la presencia de un elemento genético, en particular una secuencia de ácido nucleico, relacionado con la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa en una planta donante y la transferencia del elemento genético, en particular una secuencia de ácido nucleico, relacionado con la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa así detectada, desde la planta donante hacia una planta receptora.

20 La sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa se traduce por un aumento de las cantidades de NAD y de sus derivados.

25 En un modo de realización particular, la detección se realiza con la ayuda de por lo menos un marcador molecular.

En una forma alternativa, la detección se realiza mediante la medición de la actividad enzimática de la L-aspartato oxidasa en la planta donante.

30 La presente descripción divulga un método para aumentar por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre la biomasa, la velocidad de germinación, el rendimiento, en particular el rendimiento en semillas, la resistencia al estrés abiótico, la resistencia al estrés biótico, la velocidad de germinación, el crecimiento, en una planta que comprende el suministro de una población de plantas y la selección de los individuos de la población que presentan una expresión de la L-aspartato oxidasa más elevada posible.

35 En un modo de realización, la población de plantas es una población de plantas mutantes.

De manera particular, la población de plantas mutantes se obtiene por TILLING.

40 La presente descripción divulga un método que comprende la selección, en el seno de una población de plantas, de por lo menos una planta que presenta una sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa con respecto a la expresión de la L-aspartato oxidasa de las plantas parientes.

La presente descripción divulga un método en el que la introgresión comprende:

- 45 a) proporcionar una planta que presenta un nivel de expresión dado de la L-aspartato oxidasa,
- b) proporcionar una planta que presenta un nivel de expresión incrementado de la L-aspartato oxidasa con respecto a la planta proporcionada en a),
- 50 c) cruzar la planta proporcionada en a) con la planta proporcionada en b),
- d) generar una progenitura procedente del cruce c),
- 55 e) seleccionar, en el seno de la progenitura, por lo menos una planta que presenta un nivel de expresión de la L-aspartato oxidasa superior al de la planta proporcionada en b).

60 En un modo particular, el método descrito anteriormente comprende una etapa suplementaria de cruce de la planta seleccionada en e) con la planta proporcionada en b) seguida de una etapa suplementaria de selección en el seno de la progenitura obtenida de por lo menos una planta que presenta un nivel de expresión de la L-aspartato oxidasa superior al de la planta seleccionada en e).

65 La presente descripción divulga un método de selección de planta, caracterizado por que comprende la búsqueda de un alelo del gen de la enzima L-aspartato oxidasa que posee una mutación que resulta en una mejora de por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre la biomasa, el rendimiento en semillas, la resistencia al estrés abiótico, la resistencia al estrés biótico o la velocidad de crecimiento o la velocidad de germinación.

La presente descripción divulga una planta susceptible de ser obtenida mediante un método según uno de los modos de realización descritos en la presente memoria.

5 Finalmente, la presente descripción divulga la utilización de una planta tal como la obtenida mediante un método según uno de los modos de realización descritos en la presente memoria, o de un derivado de dicha planta, para la preparación de una composición destinada a la alimentación humana, la alimentación animal o la preparación de biocarburantes.

10 La presente descripción divulga la utilización de por lo menos un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa, y de la proteína codificada L-aspartato oxidasa, para la obtención de una planta que presenta por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre una biomasa incrementada, una velocidad de germinación incrementada, una velocidad de crecimiento incrementada, un rendimiento incrementado, en particular un rendimiento en semillas incrementado, una resistencia al estrés abiótico incrementada, una resistencia al estrés biótico incrementada, una velocidad de germinación incrementada, un crecimiento acelerado, a través de la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa.

15 La presente descripción divulga un procedimiento de obtención de por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre una biomasa incrementada, una velocidad de germinación incrementada, un rendimiento incrementado, en particular un rendimiento en semillas incrementado, una resistencia al estrés abiótico incrementado, una resistencia al estrés biótico incrementado, una velocidad de germinación incrementado, un crecimiento acelerado, en una planta, que comprende la etapa que consiste en sobreexpresar la L-aspartato oxidasa en unas células de dicha planta.

20 La sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa en las células de la planta se puede obtener mediante diversos medios a la disposición del experto en la materia, ya sea por transgénesis o por transformación.

25 La sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa se traduce por un aumento de las cantidades de NAD y de sus derivados.

30 La presente descripción divulga un procedimiento de producción de una planta o de una parte de una planta, que presenta por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre una biomasa incrementada, una velocidad de germinación incrementada, un rendimiento incrementado, en particular un rendimiento en semillas incrementado, una resistencia al estrés abiótico incrementada, una resistencia al estrés biótico incrementada, una velocidad de germinación incrementada, un crecimiento acelerado, comprendiendo dicho procedimiento la transformación de una célula vegetal con por lo menos un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa, y generar a partir de dicha célula, una planta que sobreexpresa la L-aspartato oxidasa

35 El método según la invención, para mejorar por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre el rendimiento en semillas, la resistencia al estrés abiótico, la resistencia al estrés biótico, o la velocidad de germinación o el crecimiento en una planta, comprende la transformación de una célula vegetal con por lo menos un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa, y la generación a partir de dicha célula, de una planta que sobreexpresa la L-aspartato oxidasa.

40 En un modo de realización particular, el por lo menos un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa está bajo el control de un promotor que asegura la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa.

45 La presente descripción divulga un procedimiento de producción de una célula vegetal, una planta o parte de planta, que presenta por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre una biomasa incrementada, una velocidad de germinación incrementada, un rendimiento incrementado, en particular un rendimiento en semillas incrementado, una resistencia al estrés abiótico incrementada, una resistencia al estrés biótico incrementada, una velocidad de germinación incrementada, un crecimiento acelerado, comprendiendo dicho procedimiento la etapa que consiste en transformar una célula vegetal con por lo menos un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa, y puede comprender la etapa suplementaria de generación de una planta a partir de la que sobreexpresa la L-aspartato oxidasa.

50 La presente descripción divulga un procedimiento para obtener unas plantas enriquecidas en nucleótidos de piridina, de biomasa y rendimiento en semillas aumentados y que presentan una fuerte resistencia a unos estreses medioambientales. El aumento objetivo de los contenidos en NAD a través de la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa en el seno de las células de la planta conduce a un aumento de los contenidos en metabolitos energéticos. Esta estrategia de sobreexpresión de una secuencia genética representa una nueva mejora genética que permite que las plantas superen su potencial máximo de rendimiento.

55 El método de la presente invención procura las ventajas siguientes:

60 - aumentar, de manera constitutiva, la biomasa de las plantas a lo largo de su desarrollo, y por lo tanto incrementar el rendimiento de los cultivos;

- aumentar significativamente el rendimiento en semilla de las plantas;
 - incrementar la precocidad de producción de biomasa, de semilla y la precocidad de germinación;
 - permitir producir unas plantas resistentes a las condiciones de fuerte calor y luz, lo cual limita las pérdidas de rendimiento en estas condiciones;
 - permitir que las plantas resistan mejor a diversos estreses bióticos como los ataques por devastadores tales como pulgones, lo cual permite considerar una reducción de los tratamientos fitosanitarios de los cultivos, insecticidas en particular;
 - permitir que las plantas aumenten su velocidad de germinación, por lo tanto, de instalación de un cultivo;
 - permitir a las plantas una mejor retirada de latencia (particularmente verdadero en algunas especies vegetales que necesitan un *priming* para germinar);
 - permitir que las plantas mantengan una fuerte capacidad de germinación particularmente en medio pobre en nitrógeno, lo cual permite considerar una limitación de las aportaciones nitrogenadas sobre estos cultivos, por lo tanto, limitar los costes y la contaminación agrícola;
 - y permitir producir unas plantas con mejor el estatus energético, lo cual permite considerar una reducción de los tratamientos fitosanitarios de los cultivos.
- Además, el método puesto a punto para medir la actividad de la L-aspartato oxidasa a partir de tejidos de la planta se puede utilizar como un marcador bioquímico del estado de homeostasia energética para la mejora de las plantas, pero también como marcador de selección de plantas según la invención, que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa.
- Las partes de la planta pueden ser unas raíces, unas hojas, el tronco, el tallo, los frutos, los órganos de reserva, y las flores, por ejemplo.
- La invención propone además un método para mejorar el rendimiento en semillas, en una planta, comprendiendo dicho método la transformación de una célula vegetal con por lo menos un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa, generando así una planta que sobreexpresa la L-aspartato oxidasa, y el cultivo de la planta hasta la madurez.
- La presente descripción divulga un método para mejorar la producción de biomasa en una planta, comprendiendo dicho método la transformación de una célula vegetal con por lo menos un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa, generando así una planta que sobreexpresa la L-aspartato oxidasa, y el cultivo de la planta hasta la madurez.
- La invención propone además un método para mejorar la resistencia al estrés abiótico en una planta, comprendiendo dicho método la transformación de una célula vegetal con por lo menos un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa, generando así una planta que sobreexpresa la L-aspartato oxidasa, y el cultivo de la planta hasta la madurez.
- La invención propone además un método para mejorar la resistencia al estrés biótico en una planta, comprendiendo dicho método la transformación de una célula vegetal con por lo menos un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa, generando así una planta que sobreexpresa la L-aspartato oxidasa, y el cultivo de la planta hasta la madurez.
- En un modo de realización particular de la presente invención, la transformación de una célula vegetal comprende la transformación con por lo menos un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa. Así, en tal caso, la transformación comprende la transformación con un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa en múltiples copias, lo cual permite una producción de la proteína en cantidad incrementada, y por lo tanto una sobreexpresión de esta enzima. La transformación se puede realizar con 2 copias de un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa, particularmente también con 3 copias de un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa, más particularmente también con 4 copias de un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa, más particularmente aún con 5 copias, o más, del ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa.
- En un modo de realización particular de un método según la invención, el ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa está bajo el control de un promotor que asegura la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa.
- La presente descripción divulga una célula vegetal, una planta o parte de planta, que es transgénica para por lo

menos un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa y que la sobreexpresa. Un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa puede ser cualquier ácido nucleico que codifica la enzima funcional de tal manera que, cuando se introduce en una célula hospedante y bajo el control de un promotor adecuado, la cantidad de L-aspartato oxidasa y/o su actividad enzimática en el seno de la célula están aumentadas.

5 A título de ejemplo, un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa puede ser el ácido nucleico según la secuencia SEC ID nº 1 que corresponde a *Arabidopsis thaliana*.

10 Esta secuencia SEC ID nº 1 corresponde a un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa de *Arabidopsis thaliana* estrictamente hablando y comprende una porción que codifica para un péptido de direccionamiento plastidial.

Más particularmente, el ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa:

15 i) tiene una secuencia que presenta por lo menos 55% de homología con la SEC ID nº 1 o su secuencia complementaria, o

20 ii) tiene una secuencia que se hibrida con la SEC ID nº 1 o su secuencia complementaria, en condiciones de astringencia, y que codifica para la L-aspartato oxidasa.

25 En un modo de realización particular, el ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa tiene una secuencia que presenta por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99%, de homología con la SEC ID nº 1.

30 El ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa a transferir con el fin de sobreexpresar la L-aspartato oxidasa puede ser asimismo un ácido nucleico homólogo de la planta hospedante seleccionado de entre los ácidos nucleicos de plantas, de microorganismos o de algas.

35 En el ámbito de la utilización de ácido nucleico de microorganismos que codifican para la L-aspartato oxidasa, convendrá realizar una construcción por ligación con una secuencia que codifica para un péptido de direccionamiento tal como, por ejemplo, un péptido de direccionamiento plastidial, tal como el de la pequeña sub-unidad de la rubisco.

40 El término "homólogo" u "homología" se refiere a cualquier ácido nucleico, o proteína, que tiene una o varias modificaciones de secuencia con respecto a toda o parte de la secuencia SEC ID nº 1 o de la secuencia SEC ID nº 2, respectivamente, conservando al mismo tiempo la mayoría o la totalidad de la actividad de la L-aspartato oxidasa.

45 En un modo de realización de la presente invención, la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa en las plantas se puede obtener utilizando unos ácidos nucleicos o unas proteínas, que comprenden cualquiera de las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos siguientes: SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16.

50 En un modo de realización particular de la presente invención, el ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa comprende un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo constituido por SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16.

55 En un modo de realización particular, el ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa tiene una secuencia que presenta por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99% de homología con la secuencia de un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo constituido por SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16.

60 La presente descripción divulga un casete de expresión que comprende un promotor que se puede expresar en una planta funcionalmente unida a una región codificante que contiene por lo menos un ácido nucleico que codifica para una L-aspartato oxidasa, en el que dicho promotor no es un promotor de L-aspartato oxidasa. Dicho promotor puede ser un promotor 35S, un promotor de ubiquitina o un promotor de actina, por ejemplo.

65 El término "transgénico" significa que la célula vegetal o de la planta comprende en su genoma por lo menos un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa que es ajeno a esta planta o célula de planta, o que

comprende, en su genoma, por lo menos una secuencia codificante endógena de la L-aspartato oxidasa funcionalmente unida a por lo menos una región de regulación, por ejemplo, un promotor, que no está presente en el gen endógeno de esta planta o célula vegetal. En general, el ácido nucleico ajeno está integrado de manera estable en el genoma de tal manera que el polinucleótido es transmitido a las generaciones sucesivas. El término transgénico incluye también el caso en el que la célula vegetal o la planta comprende, en su genoma, dos o más de dos ácidos nucleicos endógenos o exógenos de la especie de la célula o de la planta que codifican para la L-aspartato oxidasa, permitiendo así una sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa. El término "sobreexpresión" está destinado en la presente memoria a significar al mismo tiempo un aumento de la cantidad de la L-aspartato oxidasa con respecto a la cantidad expresada en una planta control, y una expresión ectópica de esta enzima, en un tejido o en un compartimento y/o a una fase de desarrollo en la que normalmente no se expresa. Abarca la situación en la que la L-aspartato oxidasa es endógena o heteróloga, es decir cuando se trata de un organismo, tal como una planta, diferente de la célula hospedante, o en la que por lo menos una región de regulación de transcripción de la L-aspartato oxidasa no está presente en el gen endógeno. La cantidad y/o la actividad de la proteína L-aspartato oxidasa expresada en una célula vegetal se puede determinar en nmoles de iminoaspartato producidos/min/mg de proteína o en nmoles de iminoaspartato producidos/min/mg de clorofila, por medición del NH_4^+ liberado por la descomposición casi instantánea del iminoaspartato en las condiciones de medición de ensayo.

El término "sobreexpresión" significa también que la actividad enzimática de la L-aspartato oxidasa producida en el seno de la célula hospedante después de la introducción de la secuencia que codifica para la L-aspartato oxidasa, a igualdad de cantidad de enzima producida, es superior a la actividad enzimática de la L-aspartato oxidasa de la célula hospedante antes de la introducción de dicha secuencia. Dicha sobreactividad específica se puede deber a una diferencia de estructura primaria, secundaria o terciaria de la proteína que se debe a una diferencia en la secuencia nucleica que la codifica.

La sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa se traduce por un aumento de las cantidades de NAD y de sus derivados.

Las plantas descritas en la presente memoria presentan así un aumento de las cantidades de NAD y de sus derivados.

El método permite también un aumento de las cantidades de NAD y de sus derivados.

El NAD (nicotinamida adenina dinucleótido) es una coenzima de oxidorreducción presente en todas las células vivas. El compuesto es un dinucleótido, ya que está compuesto por dos nucleótidos unidos por sus grupos fosfato. Uno de los nucleótidos contiene una adenina mientras que el otro contiene una nicotinamida. En el metabolismo, el NAD^+ está implicado en las reacciones redox transportando unos electrones. Esta coenzima está presente en dos formas en la célula. NAD^+ es un agente de oxidación y NADH es un agente de reducción.

La expresión NAD y sus derivados se entiende del NAD, del NAD^+ , del NADP, NADP^+ y NADPH .

La nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) es una coenzima de oxidorreducción. Es muy parecida a la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), la cual difiere por la presencia de un grupo fosfato sobre el segundo carbono de la β -D-ribofuranosa del resto adenosina. Su forma reducida está designada por NADPH o NADPH_2 o también $\text{NADPH}+\text{H}^+$.

Un "aumento" de por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre el crecimiento, el tamaño y/o el peso, el rendimiento, en particular el rendimiento en semillas, la velocidad de crecimiento, el crecimiento, la velocidad de germinación, la biomasa, la resistencia al estrés abiótico, la resistencia al estrés biótico, observado en las plantas según la invención que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa indica que este por lo menos un carácter es cuantitativamente significativamente superior al de las plantas control de la misma especie que no han sufrido ninguna transformación con un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa, o que no han sufrido ninguna introgresión de un elemento genético que codifica para dicha L-aspartato oxidasa, cuando se cultivan en las mismas condiciones de crecimiento.

Mediante la expresión "planta control", en el marco de la invención, se entiende una planta que tiene la misma base genética que una planta según la presente invención en la que la planta control no dispone del ácido nucleico o del elemento genético que permite una sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa según la presente invención; sobreexpresión relacionada con un aumento de un carácter fenotípico seleccionado de entre una biomasa incrementada, una velocidad de germinación incrementada, un rendimiento incrementado, en particular un rendimiento en semillas incrementado, una resistencia al estrés abiótico incrementada, una resistencia al estrés biótico incrementada, una velocidad de germinación incrementada, un crecimiento acelerado. Una planta control se cultiva para la misma duración de tiempo y en las mismas condiciones que una planta según la presente invención.

La expresión "variedad", "cultivar" u "obtención vegetal" se entiende en la presente memoria según la definición de

la UPOV. Así, una planta control puede ser una variedad, línea pura o un híbrido, con la condición de tener la misma base genética que la planta según la presente invención, con la excepción del ácido nucleico, o del elemento genético, que permiten la mejora de por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre la biomasa, la velocidad de germinación, el rendimiento, en particular el rendimiento en semillas, la resistencia al estrés abiótico, la resistencia al estrés biótico, la velocidad de germinación, el crecimiento, según la presente invención y unida a la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa.

En los métodos descritos en la presente memoria, el ácido nucleico o el elemento genético que codifica para la L-aspartato oxidasa puede ser heterólogo con respecto a la planta en la que se introduce o puede pertenecer a la misma especie y ello en la medida en la que se puede expresar en las plantas en cantidades superiores a la cantidad producida clásicamente por una planta no transformada o una planta que no contiene la secuencia o el elemento introducido o introgresado. Así, cualquier secuencia nucleotídica que codifica para la L-aspartato oxidasa puede ser utilizada, por ejemplo, una secuencia de tipo salvaje para el gen de la L-aspartato oxidasa, una secuencia mutada a nivel de la porción codificante de la enzima que conlleva una actividad específica más elevada o una secuencia mutada a nivel de la región promotora que conlleva una producción más fuerte de la proteína y por lo tanto una sobreexpresión de la enzima, incluso una combinación de los dos casos.

Ventajosamente, un ácido nucleico que codifica para L-aspartato oxidasa utilizado para transformar las células o las plantas según la invención comprende un ácido nucleico que codifica para la proteína de la SEC ID nº 2, por ejemplo la secuencia codificante del ADNc de *Arabidopsis thaliana* de la SEC ID nº 1.

En un modo de realización preferido del método según la invención, la planta se selecciona de entre el grupo constituido por trigo, cebada, arroz, maíz, sorgo, girasol, colza, soja, algodón, guisante, alubia, yuca, mango, banana, patata, tomate, pimiento, melón, calabacín, sandía, lechuga, col, berenjena, álamo.

En un modo de realización preferido del método según la invención, la planta se selecciona de entre el grupo que comprende trigo, cebada, arroz, maíz.

En un modo aún más preferido de realización del método según la invención, la planta es el arroz asiático (*Oryza sativa*) o el arroz africano (*Oryza glaberrima*) o el arroz híbrido de estas dos especies.

La presente descripción divulga la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa en una monocotiledónea, en particular el arroz (*Oryza sativa*), sobreexpresando la L-aspartato oxidasa codificada por un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo constituido por SEC ID nº1, SEC ID nº3, SEC ID nº4, SEC ID nº5, SEC ID nº6, SEC ID nº7, SEC ID nº8, SEC ID nº9, SEC ID nº10, SEC ID nº11, SEC ID nº12, SEC ID nº13, SEC ID nº14, SEC ID nº15, SEC ID nº16 en células de plantas de arroz.

La presente descripción divulga la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa en una monocotiledónea, en particular el arroz (*Oryza sativa*), sobreexpresando la aspartato oxidasa codificada por un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo constituido por SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16 en células de plantas de arroz.

La presente descripción divulga la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa en una monocotiledónea, en particular el arroz (*Oryza glaberrima*), sobreexpresando la aspartato oxidasa codificada por un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo constituido por SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16 en células de plantas de arroz.

La presente descripción divulga la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa en una monocotiledónea, en particular el trigo (*Triticum*), sobreexpresando la aspartato oxidasa codificada por un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo constituido por SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16 en células de plantas de trigo.

La presente descripción divulga la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa en una monocotiledónea, en particular la cebada (*Hordeum vulgare*), sobreexpresando la aspartato oxidasa codificada por un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo constituido por SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16 en células de plantas de cebada.

La presente descripción divulga la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa en una monocotiledónea, en particular el maíz (*Zea mays*), sobreexpresando la aspartato oxidasa codificada por un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo constituido por SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16 en células de plantas de maíz.

5 La presente descripción divulga la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa en una monocotiledónea, en particular el sorgo (*Sorghum bicolor*), sobreexpresando la aspartato oxidasa codificada por un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo constituido por SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16 en células de plantas de sorgo.

10 La presente descripción divulga la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa en una dicotiledónea, en particular el algodón (*Gossypium hirsutum*) sobreexpresando la aspartato oxidasa codificada por un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo constituido por SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16 en células de plantas de algodón.

15 La presente descripción divulga la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa en una dicotiledónea, en particular el tomate (*Solanum lycopersicum*), sobreexpresando la aspartato oxidasa codificada por un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo constituido por SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16 en células de plantas de tomate.

20 La presente descripción divulga la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa en una dicotiledónea, en particular la colza (*Brassica napus*), sobreexpresando la aspartato oxidasa codificada por un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo constituido por SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16 en células de plantas de colza.

25 La presente descripción divulga la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa en una dicotiledónea, en particular la soja (*Glycine max*), sobreexpresando la aspartato oxidasa codificada por un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo constituido por SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16 en células de plantas de soja.

30 La presente descripción divulga la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa en una dicotiledónea, en particular el girasol (*Helianthus annuus*), sobreexpresando la aspartato oxidasa codificada por un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo constituido por SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16 en células de plantas de girasol.

35 La presente descripción divulga la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa en una dicotiledónea, en particular la alubia (*Phaseolus vulgaris*), sobreexpresando la aspartato oxidasa codificada por un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo constituido por SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16 en células de plantas de alubia.

40 La presente descripción divulga la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa en una dicotiledónea, en particular el álamo (*Populus trichocarpa*), sobreexpresando la aspartato oxidasa codificada por un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo constituido por SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16 en células de plantas de álamo.

45 El experto en la materia sabrá cómo identificar unas secuencias de ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa en el seno de diferentes especies, por comparación de SEC ID nº 1 con las secuencias de otras especies, con un programa informático tal como BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) y DB rápido con los parámetros por defecto. El experto en la materia podrá utilizar también una de las secuencias de ácido nucleico seleccionada de entre el grupo constituido por SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16 con el fin de realizar unas comparaciones de secuencias con el fin de identificar y encontrar unas secuencias que codifican para la L-aspartato oxidasa convenientes.

50 Estos algoritmos se describen en "Les méthodes actuelles de séquençage et synthèse méthodes et applications", páginas 127-149, 1988, en Alabama R. Liss, Inc.

Las secuencias homólogas se definen preferentemente de la siguiente manera:

65 i) secuencias de ADN que muestran una similitud o identidad de por lo menos 55%, preferentemente por lo menos 70%, preferentemente por lo menos 80%, aún más preferentemente por lo menos 90%, todavía más preferentemente por lo menos 95% con la secuencia SEC ID nº 1; o con una secuencia seleccionada de

entre el grupo constituido por SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16

5 ii) secuencias que se hibridan con la secuencia de SEC ID nº 1, o con una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16 o con su secuencia complementaria, en condiciones de hibridación de astringencia, por ejemplo de astringencia baja, o

10 iii) secuencias que codifican una enzima L-aspartato oxidasa que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2, o una secuencia de aminoácidos similar, por ejemplo, cualquier secuencia de aminoácidos con una actividad enzimática L-aspartato oxidasa y que tiene por lo menos 60%, preferentemente por lo menos 70%, preferentemente por lo menos 80%, aún más preferentemente por lo menos 90%, más preferentemente aún por lo menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de la SEC ID nº 2.

De manera preferida, dicha secuencia nucleotídica homóloga se hibrida específicamente a unas secuencias complementarias de la secuencia SEC ID nº 1 o de una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16, en condiciones rigurosas. Los parámetros que definen las condiciones de astringencia dependen de la temperatura (T_m) a la cual el 50% de las hebras emparejadas se separan. Unas condiciones de baja astringencia son aquellas en las que la hibridación se observa utilizando una temperatura de hibridación de 5 a 10°C por debajo de T_m , y los tampones de hibridación son unas soluciones de fuerza iónica elevada, por ejemplo, una solución 6 x SSC.

25 Las expresiones "similitud de secuencia" o "identidad de secuencia" o también "homología de secuencia" se utilizan en la presente memoria de manera intercambiable y significan en el contexto dos o más secuencias de ácidos nucleicos o proteicos que son los mismos o tienen un porcentaje específico de restos de aminoácidos o de nucleótidos que son los mismos, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, tal como se mide utilizando uno de los algoritmos de comparación de secuencias siguientes o por inspección visual, si dos secuencias que deben ser comparadas entre sí tienen unas longitudes diferentes, una identidad de secuencia se refiere preferentemente al porcentaje de restos de nucleótidos de la secuencia más corta, que son idénticos a los restos nucleotídicos de la secuencia más larga. La identidad de secuencia se puede determinar de manera clásica con la utilización de programas informáticos como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 pour Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Sciences Drive Madison, WI 53711). Bestfit utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981), con el fin de encontrar el segmento que tiene la identidad de secuencia más elevada entre las dos secuencias. Cuando se utiliza Bestfit o cualquier otro programa de alineación de secuencia para determinar si una secuencia particular presenta, por ejemplo, 95% de identidad con una secuencia de la presente invención, de referencia, preferentemente los parámetros están adaptados de tal manera que el porcentaje de identidad se calcula sobre la longitud entera de la secuencia de referencia y que están permitidas las diferencias de homología que van hasta 5% del número total de los nucleótidos en la secuencia de referencia.

45 Un ácido nucleico es homólogo a una secuencia, tal como la secuencia (secuencia codificante, CDS), representada en la SEC ID nº 1 por ejemplo, tal como se utiliza en la presente memoria, cuando comprende una secuencia nucleotídica que difiere de esta secuencia, por ejemplo la SEC ID nº 1, por una mutación, inserción, delección o sustitución de una o varias bases, o por la degenerescencia del código genético, que codifica por lo tanto un polipéptido que tiene la actividad de la enzima L-aspartato oxidasa. Una proteína es homóloga a la L-aspartato oxidasa representada en la SEC ID nº 2, cuando comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia SEC ID nº 2 por mutación, inserción, delección o sustitución de uno o varios de los aminoácidos, mientras que es un polipéptido que tiene la actividad de la enzima L-aspartato oxidasa.

La L-aspartato oxidasa (EC 1.4.3.16) es una enzima que cataliza la reacción química:



Los tres sustratos de esta enzima son L-aspartato, H_2O y O_2 , mientras que sus dos productos son iminoaspartato y H_2O_2 . En solución a pH 8, el iminoaspartato producido durante la reacción enzimática, también denominado iminosuccinato, es inestable, y produce NH_4^+ (semi-vida: 2,5 min).

60 La L-aspartato oxidasa es una enzima que cataliza la primera etapa de la biosíntesis *de novo* de NAD^+ . El oxígeno puede estar sustituido por el fumarato como receptor de electrones, para dar el succinato. La capacidad de la enzima para utilizar al mismo tiempo el oxígeno y el fumarato como cofactor de re-oxidación le permite funcionar en unas condiciones aeróbicas y anaeróbicas. La enzima es un miembro de la familia de las enzimas succinato deshidrogenasa/fumarato-reductasa.

65

La expresión "actividad de enzima L-aspartato oxidasa" o "actividad enzimática L-aspartato oxidasa", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere en particular a su actividad oxidorreductasa en las plantas, que puede ser determinada por incubación de la proteína con L-aspartato, fumarato y FAD durante 30 minutos, seguida de la medición espectrofotométrica a DO 635 nm del NH_4^+ liberado por descomposición del iminoaspartato producido durante la reacción. Un protocolo detallado de medición se describe en la sección experimental más adelante.

El ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa está generalmente insertado, en simple o múltiples ejemplares, en una construcción nucleotídica, denominada casete de expresión, en el que está unido de manera funcional a unos elementos que permiten su expresión, más particularmente su sobreexpresión y eventualmente su regulación.

Entre estos elementos, se pueden citar en particular los promotores de transcripción, unos activadores y/o terminadores.

En un modo de realización particular, la célula vegetal está transformada con un casete de expresión que comprende por lo menos una secuencia nucleotídica que codifica la L-aspartato oxidasa y un promotor específico de un tejido. La expresión en los tejidos que contienen lignina o inflorescencias puede ser de un interés particular, así como la expresión selectiva o preferencial en las flores o las semillas. Un promotor específico de la raíz puede ser asimismo útil. La expresión en los tejidos de las raíces puede ser llevada a cabo utilizando el gen de quitinasa ácida (Samac *et al.*, 1990), o los sub-dominios específicos profundos del promotor CaMV35S que se han identificado (Benfield *et al.*, 1989).

Entre los promotores de transcripción que pueden ser empleados, se pueden citar: un promotor 35S, o el promotor 35S de doble constitutiva (pd35S) del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), como se describe en Kay *et al.*, 1987; un promotor PCRU de la crucifera de rábano que dirige la expresión de las secuencias asociadas únicamente en las semillas de la planta transgénica; los PGEA1 y PGEA6 promotores que corresponden a la región 5' no codificante de los genes de la proteína de almacenamiento de semillas (GEA1 y GEA6, respectivamente) de *Arabidopsis thaliana* que dirigen una expresión específica en las semillas; el promotor quimérico PSP (Ni *et al.*, 1995) que es una fusión de una triple repetición de un elemento activador de la transcripción del promotor del gen de la octopina sintasa en *Agrobacterium tumefaciens*; un promotor de actina de arroz, seguido eventualmente por el intrón actina de arroz (PAR- IAR), por ejemplo; el promotor contenido en el plásmido pAct1-F4 (Mc Elroy *et al.*, 1991) la HMGW promotor de trigo (de alto peso molecular glutenina); el promotor del gen de la zeína del maíz (P-ceína) contenido en el plásmido p63, que dirige la expresión en el albumen de las semillas.

Otros promotores que se pueden expresar en una planta convenientes de acuerdo con la presente invención comprenden, pero no se limitan a: unos promotores que provienen de la familia de la ubiquitina (por ejemplo, el promotor de la ubiquitina del maíz del documento EP 0 342 926), un promotor actina del arroz tal como el promotor descrito por Mc Elroy *et al.*, (ya mencionado anteriormente) o el promotor descrito en el documento US 5,641,876; cualquiera de los promotores de la vena virus del mosaico de la yuca (WO 97/48819), cualquiera de la serie de promotores pLEX de trébol subterráneo Stunt virus (WO 96/06932), o un promotor de la alcohol deshidrogenasa, por ejemplo, pADH 1S (números de acceso GenBank X04049, X00581).

Entre los terminadores que se pueden utilizar en las construcciones de la invención, se puede citar en particular el extremo 3' del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*.

El casete de expresión se puede insertar en un vector nucleotídico, tal como un plásmido, que puede comprender además un gen marcador, por ejemplo un gen que permite seleccionar una planta transformada de una planta que no contiene ADN ajeno transfectedo. Como gen marcador, éste puede estar en particular constituido por un gen que confiere una resistencia a un antibiótico o una resistencia a un herbicida, o una resistencia a un aminoácido, por ejemplo.

El vector así construido se puede utilizar para transformar unas células hospedantes, según unas técnicas conocidas por el experto en la materia.

Se pueden citar en particular unos métodos de transferencia directa de genes en unas células vegetales, tales como la transformación por *Agrobacterium tumefaciens*, la microinyección directa en embrioides de planta (Neuhaus *et al.*, 1987), la infiltración al vacío (Bechtold *et al.*, 1993) o la electroporación (Chupeau *et al.*, 1989), o como variante, la precipitación directa con la ayuda de PEG (Schocher *et al.*, 1986) o el bombardeo de partículas recubiertas del ADN plasmídico de interés, utilizando una pistola (Fromm M. *et al.*, 1990), por ejemplo.

En un modo de realización descrito en la presente memoria, las células vegetales son transformadas con un vector tal como se ha definido anteriormente, transferido en un hospedante celular susceptible de infectar dichas células vegetales permitiendo la integración, en el genoma de estas últimas, de secuencias nucleotídicas de interés contenidas inicialmente en el genoma del vector antes mencionado. Ventajosamente, el hospedante celular utilizado es una cepa bacteriana, tal como *Agrobacterium tumefaciens*, o *Agrobacterium rhizogenes* por ejemplo.

Para transformar las monocotiledóneas tales como el arroz (*Oryza sativa*), se puede utilizar el procedimiento descrito por Ishida *et al.*, (1996), o cualquiera de los métodos descritos en Hiei *et al.*, (1994), Hiei *et al.* (1997), en la patente US 5.641.664 o 5.679.558, o en Christou *et al.*, (1991). Según otro protocolo, la transformación se puede realizar según el método descrito por Finer *et al.*, (1992) utilizando un cañón de partículas con unas partículas de tungsteno o de oro, por ejemplo.

Las plantas así obtenidas sobreexpresan la L-aspartato oxidasa.

Dichas plantas o partes de una planta se obtienen ventajosamente mediante el procedimiento descrito anteriormente, en el que una célula vegetal es transformada con por lo menos un ácido nucleico que codifica para la enzima L-aspartato oxidasa, y puestas en cultivo, gracias a lo cual se obtiene una planta que sobreexpresa la L-aspartato oxidasa.

Como ejemplos de plantas transgénicas, se pueden citar trigo, cebada, arroz, maíz, sorgo, girasol, colza, soja, algodón, guisante, alubia, yuca, mango, banana, patata, tomate, pimiento, melón, calabaza, sandía, lechuga, col, berenjena, álamo.

El aumento del crecimiento de las plantas, en particular de las raíces, favorece el vigor de las plantas y su capacidad para recuperar los sustratos nutritivos y el agua en el suelo o el medio de cultivo.

La velocidad de crecimiento y el aumento de la velocidad de crecimiento de las plantas, en particular de las inflorescencias y de los frutos son ventajosos para la producción de semillas, de forraje, de flores o de frutos, en particular de hortalizas-frutos para los cultivos hortícolas.

Las plantas transgénicas según la invención abarcan al mismo tiempo las plantas de la primera generación, así como sus descendientes que contienen el casete de expresión que permite la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa según la invención (variedades descendientes o variedades híbridas, en particular).

Las partes de la planta comprenden cualquier tejido u órgano, tales como raíces, flores, tallos, troncos, hojas, frutos, órganos de reserva o semillas.

La presente descripción divulga las semillas que presentan una expresión incrementada de L-aspartato oxidasa, obtenida por una sobreexpresión específica de una secuencia de codificación de L-aspartato oxidasa en la semilla.

En un modo de realización descrito en la presente memoria, el casete de expresión de la invención se utiliza para sobreexpresar la L-aspartato oxidasa en una planta o una célula vegetal. Esta utilización conduce a un aumento de la biomasa, el crecimiento de la planta, el tamaño, el peso, el rendimiento y/o la velocidad de crecimiento.

En otro modo de realización descrito en la presente memoria, el casete de expresión según la invención se utiliza para aumentar por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre la biomasa, la velocidad de germinación, el rendimiento, en particular el rendimiento en semillas, la resistencia al estrés abiótico, la resistencia al estrés biótico, la velocidad de germinación, el crecimiento, en una célula vegetal, una planta o una parte de planta.

Como se ha evocado anteriormente, el ácido nucleico que codifica para una sobreexpresión de L-aspartato oxidasa en el seno de las plantas según la invención puede pertenecer a la misma especie y ello en la medida en la que puede ser expresado en las plantas en cantidades superiores a la cantidad producida clásicamente por una planta que no contiene la secuencia nucleotídica o el elemento genético introducido. Así, cualquier secuencia nucleotídica que codifica para la L-aspartato oxidasa puede ser utilizada, por ejemplo, una secuencia de tipo salvaje para el gen de la L-aspartato oxidasa, una secuencia mutada de una secuencia salvaje que codifica para la L-aspartato oxidasa, o también una secuencia mutada del promotor del gen de una L-aspartato oxidasa salvaje o mutada que induce un aumento de la cantidad de L-aspartato oxidasa, o de la estabilidad del ARN mensajero de L-aspartato oxidasa, o una expresión de una L-aspartato oxidasa que tiene una actividad enzimática superior, con respecto a la cantidad y/o a la actividad de L-aspartato oxidasa que se producían o expresaban en el seno de la planta hospedante antes de recibir la secuencia introducida.

Tal como se ha indicado anteriormente, la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa en las células de la planta se puede obtener mediante diversos medios a disposición del experto en la materia, ya sea por transgénesis, por transformación, por introgresión, por selección, por selección asistida por marcadores, por mutagénesis aleatoria o dirigida seguida o no de selección, por ejemplo.

La presente descripción divulga una sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa realizada por introgresión de un elemento genético que codifica para una sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa.

La expresión "elemento genético" o "material genético" utilizada en la presente memoria se refiere a cualquier gen, grupo de genes, QTL, locus, alelo, fragmento cromosómico, secuencia nucleotídica, secuencia nucleica que es capaz de contribuir al aumento de por lo menos un carácter fenotípico de la planta, seleccionado de entre una

biomasa incrementada, una velocidad de germinación incrementada, un rendimiento incrementado, en particular un rendimiento en semillas incrementado, una resistencia al estrés abiótico incrementada, una resistencia al estrés biótico incrementada, una velocidad de germinación incrementada, un crecimiento acelerado, influyendo sobre la expresión de la L-aspartato oxidasa a nivel del propio ADN, tanto a nivel de la traducción, de la transcripción y/o como de la activación de un producto de polipéptido final, es decir, para regular el metabolismo de la planta que conduce a la expresión fenotípica del genotipo.

En el contexto de la presente descripción, los términos "introgresión", "introgresado" e "introgresar" designan el proceso mediante el cual uno o unos elementos genéticos tales como un gen o unos genes, uno o unos QTL, uno o unos alelos, uno o unos fragmentos cromosómicos, o una o más secuencias nucleicas presentes en el genoma de una especie, variedad o cultivar son desplazados y transferidos de manera estable en el genoma de otra especie, variedad o cultivar, por cruzamiento sexual. La transferencia puede ser natural o artificial. El proceso puede ser complementado eventualmente por retrocruzamiento con un pariente recurrente, en este caso, la introgresión se refiere a la introducción de uno o varios elementos genéticos, tales como uno o varios genes, uno o varios alelos, uno o varios QTL, uno o varios fragmentos cromosómicos o una o varias secuencias nucleicas de una especie en el pool genético de la otra por retrocruzamiento repetido de un híbrido interespecífico con uno de sus parientes. Una introgresión puede ser descrita asimismo como la integración estable de un material genético heterólogo en el genoma de una planta receptora por cruzamiento sexual entre plantas de especie idéntica o parecida, es decir sexualmente compatibles. La noción de sexualmente compatible se entiende que la fertilización de una flor de una planta por el polen de otra planta da lugar a la fecundación del óvulo y a la producción de un fruto que contiene una o varias semillas capaces de germinar y dar una nueva planta. La noción de sexualmente compatible se entiende también de los casos en los que la viabilidad del embrión formado está asegurada por una o unas técnicas de rescate de embrión. El experto en la materia dispone de diversos métodos de rescate de embrión que puede utilizar en función de las especies utilizadas.

Se describe así un método para aumentar por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre la biomasa, la velocidad de germinación, el rendimiento, en particular el rendimiento en semillas, la resistencia al estrés abiótico, la resistencia al estrés biótico, la velocidad de germinación, el crecimiento, en una planta que comprende el suministro de una población de plantas, incluyendo el suministro de una población de plantas procedentes de cruzamientos, y la selección de los individuos de la población que presentan una expresión de la L-aspartato oxidasa más elevada posible.

La población de planta puede ser una población de plantas mutantes, generada por mutagénesis química o por cualquier otro medio capaz de inducir una o varias mutaciones en el seno del genoma de las plantas así tratadas. El tratamiento de mutagénesis resulta de la introducción voluntaria de mutaciones por acción de agentes mutágenos químicos o físicos en una secuencia ADN, agentes que pueden ser un tratamiento químico como por ejemplo un tratamiento con metanosulfonato de etilo (EMS).

De manera ventajosa, se puede utilizar una población TILLING para la selección de individuos que presentan una expresión de la L-aspartato oxidasa más elevada posible.

Típicamente, la tecnología TILLING se basa en la mutagénesis de semillas seguida de un fenotipaje y de un genotipaje con el fin de identificar las mutaciones y cuyo alelo o cuyos alelos asociados a un fenotipo dado, preferentemente un fenotipo ventajoso. La generación de población TILLING se puede realizar de la siguiente manera. Unas semillas M0 son mutageneizadas mediante un tratamiento con etilmetanosulfonato (EMS). Las plantas M1 procedentes de las semillas M0 son autofecundadas, se extrae el ADN de las familias M2 para un screening de alto caudal de las mutaciones y se recogen las semillas M3 y se conservan. Se realiza un pool de ADN de las familias M2 8 veces y se amplifica para un gen diana. Los productos de amplificación son incubados con una endonucleasa que corta preferentemente los desapareamientos en los heterodúplex entre salvaje y mutante. Los productos de digestión son sometidos a una electroforesis en gel de secuencia. La tecnología LI-COR permite un marcado fluorescente bicaternario (IRDye 700 y 800) que permite una confirmación visual rápida ya que las mutaciones son detectadas sobre las dos hebras complementarias y así fácilmente diferenciadas de los artefactos. Después de la detección de una mutación en un pool, el ADN de las familias individuales se criba rápidamente por desconvolución del pool con el fin de identificar la familia que lleva la mutación.

En un modo de realización descrito en la presente memoria, se obtiene la introgresión de un elemento genético que codifica para una sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa por fusión de protoplastos.

Así, en este modo de realización descrito, para aumentar por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre la biomasa, la velocidad de germinación, el rendimiento, en particular el rendimiento en semillas, la resistencia al estrés abiótico, la resistencia al estrés biótico, la velocidad de germinación, el crecimiento, la fusión de protoplastos se puede utilizar para la transferencia de por lo menos un elemento genético a partir de una planta donante hacia una planta receptora. La fusión de protoplastos es una unión inducida o espontánea, como una hibridación somática, entre dos o varios protoplastos (las paredes celulares son eliminadas por tratamiento enzimático) con el fin de producir una célula única bi- o multi-nucleada. La célula fusionada, que se puede obtener también con las especies vegetales que no pueden ser cruzadas sexualmente en la naturaleza, se cultiva en una

5 planta híbrida que presenta la combinación de características deseables. Más precisamente, se puede obtener un primer protoplasto a partir de una planta según la invención y que presenta por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre la biomasa, la velocidad de germinación, el rendimiento, en particular el rendimiento en semillas, la resistencia al estrés abiótico, la resistencia al estrés biótico, la velocidad de germinación, el crecimiento y una sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa. Se puede obtener un segundo protoplasto a partir de una planta que comprende unas características de valor comercial. Los protoplastos son fusionados después mediante unos procedimientos de fusión de protoplastos tradicionales, que son conocidos en la técnica.

10 Alternativamente, el rescate de embrión se puede utilizar en la transferencia de un elemento genético, en particular un ácido nucleico, que permite la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa de una planta donante hacia una planta receptora. El rescate de embriones se puede utilizar como procedimiento para aislar unos embriones a partir de cruzamientos en el que las plantas no consiguen producir unas semillas viables. En este proceso, el óvulo fecundado o inmaduro de una planta es un tejido de cultivo para crear nuevas plantas.

15 La presente descripción divulga un método en el que la introgresión de un elemento genético que codifica para una sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa se obtiene por rescate de embrión.

20 La presente descripción divulga un método para la producción de plantas que presentan por lo menos un carácter fenotípico mejorado seleccionado de entre la biomasa, la velocidad de germinación, el rendimiento, en particular el rendimiento en semillas, la resistencia al estrés abiótico, la resistencia al estrés biótico, la velocidad de germinación, el crecimiento, que comprende la detección de la presencia de un elemento genético, en particular una secuencia de ácido nucleico, relacionado con la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa en una planta donante y la transferencia del elemento genético, en particular una secuencia de ácido nucleico, relacionado con la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa así detectada, desde la planta donante hacia una planta receptora. La transferencia de la secuencia de ácido nucleico se puede realizar mediante cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente en la presente memoria.

30 La transferencia se puede realizar mediante una técnica seleccionada de entre transgénesis, introgresión, fusión de protoplastos, rescate de embrión. Un ejemplo de realización de dicho procedimiento comprende la transferencia por introgresión del elemento genético, en particular la secuencia de ácido nucleico, relacionado con la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa a partir de una planta donante hacia una planta receptora por cruzamiento sexual de las plantas. Por lo tanto, esta transferencia puede ser realizada ventajosamente utilizando unas técnicas de cruzamiento y de selección tradicionales.

35 La presente descripción divulga la detección de la presencia de un elemento genético relacionado con la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa y se realiza con la ayuda de por lo menos un marcador molecular.

40 La presente descripción divulga la detección de la presencia del elemento genético relacionado con la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa que se realiza mediante la medición de la actividad enzimática de la L-aspartato oxidasa en la planta donante.

45 Según algunos modos de realización, el elemento genético responsable de la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa puede ser introgresado en las variedades comerciales de plantas de interés agronómico con la ayuda de la selección asistida por marcadores (SAM) que implica la utilización de uno o varios marcadores moleculares para la identificación y la selección de las plantas de la descendencia que contienen el elemento genético, gen o pluralidad de genes, secuencias de ácido nucleico que codifica para la característica deseada de sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa.

50 En el contexto de la presente descripción, dicha identificación y dicha selección se basan en la selección de genes, de elementos genéticos o de secuencias de ácidos nucleicos o de marcadores asociados.

55 Las plantas obtenidas según estos modos de realización pueden sacar ventajosamente la mayoría de sus atributos de la planta receptora, y sacar por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre la biomasa incrementada, la velocidad de germinación incrementada, el rendimiento incrementado, en particular el rendimiento en semillas incrementado, la resistencia al estrés abiótico incrementado, la resistencia al estrés biótico incrementado, la velocidad de germinación incrementada, el crecimiento incrementado de la planta donante, gracias a la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa.

60 Como se ha descrito anteriormente, las técnicas de cruzamiento tradicionales se pueden utilizar para la introgresión de secuencia de ácido nucleico responsable de la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa relacionada con por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre la biomasa incrementada, la velocidad de germinación incrementada, el rendimiento incrementado, en particular el rendimiento en semillas incrementado, la resistencia al estrés abiótico incrementado, la resistencia al estrés biótico incrementado, la velocidad de germinación incrementada, el crecimiento incrementado en el seno de una planta receptora.

65 En algunos modos de realización, una planta donante que presenta por lo menos un carácter fenotípico

seleccionado de entre la biomasa incrementada, la velocidad de germinación incrementada, el rendimiento incrementado, en particular el rendimiento en semillas incrementado, la resistencia al estrés abiótico incrementado, la resistencia al estrés biótico incrementado, la velocidad de germinación incrementada, el crecimiento incrementado y que comprende una secuencia de ácido nucleico responsable de una sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa, se cruza con una planta receptora que, en algunos modos de realización puede presentar unas características comercialmente deseables.

La población de plantas que resultan de ello (que representan los híbridos F1) es entonces autofecundada produciendo unas semillas F2. Las plantas F2 procedentes de semillas F2 son cribadas después con vistas a determinar las plantas que presentan una sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa, asociada a por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre la biomasa incrementada, la velocidad de germinación incrementada, el rendimiento incrementado, en particular el rendimiento en semillas incrementado, la resistencia al estrés abiótico incrementada, la resistencia al estrés biótico incrementada, la velocidad de germinación incrementada, el crecimiento incrementado, mediante unos métodos conocidos por el experto en la materia.

La medición de la expresión o de la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa se puede realizar mediante diferentes medios a disposición del experto en la materia tales como RNA-Seq, Transferencia Northern, PCR cuantitativa y semi-cuantitativa, Transferencia Western, Elisa o medición de actividad enzimática, por ejemplo.

Las líneas de plantas que presentan una sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa, asociada a por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre la biomasa incrementada, la velocidad de germinación incrementada, el rendimiento incrementado, en particular el rendimiento en semillas incrementado, la resistencia al estrés abiótico incrementada, la resistencia al estrés biótico incrementada, la velocidad de germinación incrementada, el crecimiento incrementado, pueden ser desarrolladas utilizando las técnicas de selección recurrente y de retrocruzamiento, autofecundación, y/o dihaploides, o cualquier otra técnica utilizada para realizar unas líneas parentales. En un procedimiento de selección recurrente y de retrocruzamiento, el aumento de la expresión de la L-aspartato oxidasa, asociada a por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre la biomasa, la velocidad de germinación, el rendimiento, en particular el rendimiento en semillas, la resistencia al estrés abiótico, la resistencia al estrés biótico, la velocidad de germinación, el crecimiento, puede ser introgresada en una planta receptora diana (el pariente recurrente) cruzando el pariente recurrente con una primera planta donante, que difiere del pariente recurrente y que se denomina en la presente memoria el "pariente no recurrente". El pariente recurrente es una planta que no presenta una sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa, asociada a por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre la biomasa incrementada, la velocidad de germinación incrementada, el rendimiento incrementado, en particular el rendimiento en semillas incrementado, la resistencia al estrés abiótico incrementada, la resistencia al estrés biótico incrementada, la velocidad de germinación incrementada, el crecimiento incrementado, pero puede poseer unas características comerciales deseables.

El pariente no recurrente puede ser cualquier variedad vegetal o línea pura que es sexualmente compatible con el pariente recurrente.

Las plantas de la descendencia de un cruzamiento entre el pariente recurrente y el pariente no recurrente son retrocruzadas con el pariente recurrente. La población de plantas que resulta de ello se criba después para una sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa, asociada a por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre la biomasa incrementada, la velocidad de germinación incrementada, el rendimiento incrementado, en particular el rendimiento en semillas incrementado, la resistencia al estrés abiótico incrementada, la resistencia al estrés biótico incrementada, la velocidad de germinación incrementada, el crecimiento incrementado.

La selección asistida por marcadores (SAM) se puede realizar utilizando unas sondas de hibridación o de polinucleótidos, con el fin de identificar las plantas que comprenden una secuencia de ácido nucleico o cualquier elemento genético que conlleva una sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa, asociada a por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre la biomasa incrementada, la velocidad de germinación incrementada, el rendimiento incrementado, en particular el rendimiento en semillas incrementado, la resistencia al estrés abiótico incrementada, la resistencia al estrés biótico incrementada, la velocidad de germinación incrementada, el crecimiento incrementado.

Tras el cribado, las plantas híbridas F1 que presentan una sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa, asociada a por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre la biomasa incrementada, la velocidad de germinación incrementada, el rendimiento incrementado, en particular el rendimiento en semillas incrementado, la resistencia al estrés abiótico incrementada, la resistencia al estrés biótico incrementada, la velocidad de germinación incrementada, el crecimiento incrementado, se seleccionan después y se retrocruzan con el pariente recurrente para un cierto número de generaciones con el fin de permitir que la planta se vuelva cada vez más consanguínea. Este proceso se puede efectuar para dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, o más generaciones.

La presente descripción divulga un procedimiento de obtención de planta que presenta por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre la biomasa incrementada, la velocidad de germinación incrementada, el rendimiento incrementado, en particular el rendimiento en semillas incrementado, la resistencia al estrés abiótico

incrementada, la resistencia al estrés biótico incrementada, la velocidad de germinación incrementada, el crecimiento incrementado, que puede comprender:

- 5 (a) proporcionar una planta que presenta un nivel de expresión dado de la L-aspartato oxidasa;
- (b) proporcionar una segunda planta que presenta un nivel de expresión de la L-aspartato oxidasa superior al de la planta proporcionada en (a);
- 10 (c) efectuar un cruzamiento de la planta proporcionada en (a) con la planta proporcionada en (b), para producir unas plantas de la descendencia F1;
- (d) seleccionar unas plantas de la descendencia F1 que presentan una sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa con respecto a la planta proporcionada en (a);
- 15 (e) cruzar las plantas seleccionadas en (d) con la planta proporcionada en (a) para producir unas plantas de descendencia de retrocruzamiento;
- (f) seleccionar unas plantas de la descendencia de retrocruzamiento que presentan una sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa con respecto a las plantas seleccionadas en (d);
- 20 (g) repetir las etapas (e) y (f) dos o varias veces seguidas;
- (h) autofecundar eventualmente las plantas procedentes de retrocruzamiento con el fin de identificar las plantas homocigotas, y
- 25 (i) efectuar un cruzamiento de por lo menos una planta de la descendencia de retrocruzamiento o de las plantas auto-fecundadas con otra planta proporcionada en (a) para producir una planta que presenta por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre la biomasa incrementada, la velocidad de germinación incrementada, el rendimiento incrementado, en particular el rendimiento en semillas incrementado, la resistencia al estrés abiótico incrementada, la resistencia al estrés biótico incrementada, la velocidad de germinación incrementada, el crecimiento incrementado, cuando se cultiva en las mismas condiciones medioambientales.
- 30

35 Tal como se indica, la última generación de retrocruzamiento se puede auto-fecundar con el fin de proporcionar unos individuos homocigotos que presentan una sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa y por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre la biomasa incrementada, la velocidad de germinación incrementada, el rendimiento incrementado, en particular el rendimiento en semillas incrementado, la resistencia al estrés abiótico, la resistencia al estrés biótico incrementada, la velocidad de germinación incrementada, el crecimiento incrementado.

40 La etapa de selección comprende la selección de individuos que contienen cada uno un alelo del gen que codifica para una sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa.

45 La presente descripción divulga un método de selección de planta, caracterizado por que comprende la búsqueda de un alelo del gen de la enzima L-aspartato oxidasa que posee una mutación que resulta en una mejora de por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre biomasa, velocidad de germinación, rendimiento, en particular rendimiento en semillas, resistencia al estrés abiótico, resistencia al estrés biótico, velocidad de germinación, crecimiento.

50 La etapa de selección comprende la selección con la ayuda de un marcador molecular para el alelo del gen de la L-aspartato oxidasa.

55 La etapa de selección comprende la selección midiendo la actividad de la enzima L-aspartato oxidasa en las plantas jóvenes y seleccionando las que presentan una actividad elevada de la enzima.

La presente descripción divulga un procedimiento de selección de planta que presenta una sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa que comprende las etapas siguientes:

- 60 (a) proporcionar una población de plantas;
- (b) medir la actividad de la L-aspartato oxidasa de cada individuo de la población de plantas proporcionada;
- (c) seleccionar la o las plantas que presentan la actividad L-aspartato oxidasa más elevada.

La población de planta puede ser una población de TILLING.

65 Alternativamente, la población de plantas es una población procedente de cruzamientos intraespecíficos o interespecíficos.

Asimismo, la población de plantas puede ser una población de variedades comerciales.

En el contexto de la presente invención, la expresión "sobrexpresión" en referencia a la L-aspartato oxidasa se refiere al hecho de que la secuencia nucleica de ADN que codifica la proteína está transcrita en ARN en cantidad incrementada y/o que los ARN de la proteína son traducidos en proteína en cantidad incrementada y/o que la cantidad o la actividad específica de la proteína traducida está incrementada. La medición de esta "sobrexpresión" se puede evaluar tanto a nivel del ARN como a nivel de las proteínas mediante diferentes medios a disposición del experto en la materia, tales como RNA-Seq, transferencia Northern, PCR cuantitativa y semi-cuantitativa, transferencia Western, Elisa o medición de actividad enzimática, por ejemplo. Al final, la noción de expresión o de sobrexpresión hace referencia a la actividad enzimática de la L-aspartato oxidasa en el seno de la planta, ya sea que se deba a una síntesis más grande de la proteína y/o a una actividad específica más importante.

En el contexto de la presente descripción, las expresiones "cruzamiento sexual" y "reproducción sexuada" se refieren a la fusión de los gametos para producir una descendencia (por ejemplo, por fecundación, de manera que se produzcan unas semillas por polinización en las plantas). Un "cruzamiento sexual" o "fertilización cruzada" es, en algunos modos de realización, la fecundación de un individuo por otro (por ejemplo, la polinización cruzada de las plantas). El término "autofecundación" hace referencia a algunos modos de realización de la producción de semillas por autofecundación u auto-polinización, es decir que polen y óvulos son de la misma planta.

Por el término "carácter", se entiende una característica o un fenotipo, por ejemplo, el rendimiento, la biomasa o la velocidad de germinación. Un carácter puede ser heredado de manera dominante o recesiva, o puede ser monogénico o poligénico.

Mediante la expresión "planta donante" se entiende una planta que proporciona por lo menos un elemento genético relacionado con una sobrexpresión de la L-aspartato oxidasa.

Mediante la expresión "planta receptora" se entiende una planta que recibe por lo menos un elemento genético relacionado con una sobrexpresión de la L-aspartato oxidasa.

Las expresiones "marcador genético", "marcador de ADN" o "marcador molecular" son intercambiables y hacen referencia a una característica del genoma de un individuo (por ejemplo, un nucleótido o una secuencia de ácido nucleico que está presente en el genoma de un individuo), que está relacionada con uno o varios locus de interés. Los marcadores genéticos comprenden, por ejemplo, unos polimorfismos nucleotídicos simples (SNP), unos indels (es decir inserciones/supresiones), unas repeticiones de secuencias simples (SSR), unos polimorfismos de restricción de longitud de los fragmentos (RFLP), o unas longitudes de los fragmentos amplificados (AFLP) por ejemplo. Los marcadores genéticos pueden, por ejemplo, ser utilizados para localizar unos locus genéticos que contienen unos alelos que contribuyen a la variabilidad de las características fenotípicas. La expresión "marcador genético" puede hacer referencia asimismo a una secuencia de polinucleótido complementario de una secuencia genómica, tal como una secuencia de un ácido nucleico utilizado como sonda. Un marcador genético o molecular puede estar físicamente situado en una posición sobre un cromosoma que es distal o proximal con respecto a uno o varios locus genéticos al o a los que está unido (es decir es intragénico o extragénico, respectivamente). En algunos modos de realización de la presente invención, uno o varios marcadores genéticos comprenden entre uno y diez marcadores, y en algunos modos de realización, uno o varios marcadores genéticos comprenden más de una decena de marcadores genéticos.

El término "genotipo" hace referencia a la constitución genética de una célula o de un organismo. Como se conoce en la técnica, un genotipo puede referirse a un único locus o a múltiples locus. En algunos modos de realización, el genotipo de un individuo se refiere a uno o varios genes que están unidos por el hecho de que uno o varios de los genes están implicados en la expresión de un fenotipo de interés (por ejemplo, un carácter tal como se define en la presente memoria). Así, en algunos modos de realización, un genotipo comprende uno o varios alelos presentes en un individuo con uno o varios locus para un carácter.

El término "gen" se refiere a una unidad hereditaria que comprende una secuencia de ADN que ocupa un sitio específico sobre un cromosoma y que contiene la instrucción genética para una característica o un rasgo particular en un organismo.

Los términos "ácido nucleico" u "oligonucleótido" o "polinucleótido" o "secuencia nucleica" o equivalentes gramaticales de estos, significan por lo menos dos nucleótidos unidos de manera covalente juntos. Los oligonucleótidos son típicamente de aproximadamente 7, 8, 9, 10, 12, 15, 25, 18, 20, 30, 40, 50 o hasta aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. Los ácidos nucleicos, secuencias nucleicas y los polinucleótidos son unos polímeros de cualquier longitud, incluyendo las longitudes más grandes, por ejemplo 200, 300, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 10000, etc. Un ácido nucleico de la presente invención contendrá generalmente unos enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, están incluidos unos análogos de ácido nucleico, que pueden tener unos esqueletos alternativos que comprenden, por ejemplo, fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato, o enlaces O-metilfosforoamidito (véase Eckstein, 1991), y unos esqueletos peptídicos y los enlaces de ácidos nucleicos. Se

pueden utilizar unas mezclas de ácidos nucleicos naturales y de análogos.

5 En el ámbito de la presente invención, la expresión "fenotipo" o carácter fenotípico" hace referencia a la apariencia o a cualquier otra característica detectable de un individuo, que resulta de la interacción de su genoma, proteoma y/o metaboloma con el entorno.

Una "planta" es una planta en cualquier etapa de desarrollo, en particular una planta de semillas.

10 Una "célula de planta" es una unidad estructural y fisiológica de una planta, que comprende un protoplasto y una pared celular. La célula vegetal puede estar en forma de una célula única aislada o una célula cultivada, o como una parte de unidad organizada superior tal como, por ejemplo un tejido vegetal, un órgano vegetal o una planta entera. Una célula de planta puede ser capaz de regenerar una planta o no ser capaz de regenerar una planta.

15 La expresión "material vegetal" se refiere a hojas, tallos, raíces, flores o partes de flores, frutos, polen, óvulos, cigotos, semillas, esquejes, celulares o cultivos de tejidos, o cualquier otra parte, o productos de una fábrica.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "parte de planta" designa una parte de una planta, que comprende unas células simples o unos tejidos celulares tales como las células de plantas que están intactas en plantas, unos montones de células, y unos cultivos de tejido a partir del cual las plantas pueden ser regeneradas o no. Unos ejemplos de partes de plantas comprenden, pero no se limitan a, unas células individuales y unos tejidos de polen, los óvulos, las hojas, los embriones, las raíces, trozos de raíz, anteros, flores, frutos, tallos, brotes y semillas, así como injertos, porta injertos, protoplastos, calli, y análogos.

25 Tal como se ilustra en la presente memoria, el término "población" designa un conjunto genéticamente heterogéneo de plantas que comparten una derivación genética común.

30 La "biomasa" significa el conjunto de la materia orgánica producida por una planta. Esta biomasa se puede medir en peso fresco, en peso seco por planta o por m² por ejemplo. Alternativamente, la biomasa se puede evaluar por el tamaño de la planta o el número de hojas, por ejemplo.

La expresión "velocidad de germinación" corresponde al tiempo medio entre la imbibición de la semilla y la emergencia de la radícula de la cubierta de la semilla.

35 La expresión "rendimiento" se entiende como la cantidad de materia vegetal comercial producida por la planta cultivada por unidad de superficie, para una densidad de plantación dada, llegado el caso.

La expresión "rendimiento en semillas" representa la cantidad de semillas, en peso o en número, producida por la planta cultivada por unidad de superficie o por planta, para una densidad de plantación dada, llegado el caso.

40 La expresión "resistencia al estrés biótico" se entiende como la capacidad de la planta a enfrentarse y luchar contra un estrés que aparece tras daños causados a dicha planta por otros organismos vivos, como las bacterias, los virus, los hongos, los parásitos, los insectos útiles y perjudiciales, las malas hierbas y las otras plantas cultivadas o indígenas. Los daños causados por estos diversos agentes vivos pueden parecer muy similares y afectan al crecimiento y al rendimiento de las plantas cultivadas.

45 La expresión "resistencia al estrés abiótico" se entiende como la capacidad de la planta para enfrentarse y luchar contra un estrés inducido por unos factores no vivos en un entorno específico. Los factores de estrés abióticos son de origen natural, frecuentemente intangibles, unos factores tales como la luz del sol intensa, o la deficiencia de luz, el exceso o la deficiencia de agua, el frío o el exceso de calor, la salinidad o también el viento, por ejemplo, pueden causar daños a las plantas de la zona afectada. El estrés abiótico es esencialmente inevitable y particularmente limitativo para las plantas. El estrés abiótico es el factor más nocivo sobre el crecimiento y la productividad de los cultivos en el mundo entero.

50 La expresión "crecimiento" hace referencia a la variación de biomasa de la planta considerada, entre la emergencia y la recogida por unidad de tiempo en condiciones dadas de exposición al sol, de irrigación y de insumos.

Figuras

60 La figura 1 es una descripción de la vía de biosíntesis de NAD en las plantas, y su uso para el metabolismo energético y la señalización está relacionado con el estrés. (la actividad L-aspartato oxidasa (AO) se pone en evidencia en la figura).

65 La figura 2 es una representación esquemática de la construcción de un vector de transformación de planta pCW162, incluyendo el casete de sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa (AO).

La figura 3 es un gráfico que representa el nivel de expresión (A) y la actividad (B) de la L-aspartato oxidasa

en las hojas de plantas control (ctrl), de plantas que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa (35S::AO1 y 35S::AO2) y de plantas mutante-negativo de la L-aspartato oxidasa (mAO), de 6 semanas de edad.

5 La figura 4 es un gráfico representativo de los metabolitos relacionados con la energía (ATP (B) y nucleótidos de piridina (A)) en las hojas de plantas control (ctrl), de plantas que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa (35S::AO1 y 35S::AO2) y de plantas mutante-negativo de la L-aspartato oxidasa (mAO), de 6 semanas de edad.

10 La figura 5 representa las capacidades fotosintéticas de hojas de plantas control (■) y de plantas que sobreexpresan (▲) la L-aspartato-oxidasa, de 6 semanas de edad.

La figura 6 es una fotografía de plantas de *Arabidopsis thaliana* control y de plantas que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa (35S::AO1 y 35S::AO2), de 6 semanas de edad.

15 La figura 7 es un gráfico que representa la biomasa (B) y el tamaño (A) de las plantas control (ctrl), de plantas que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa (35S::AO1 y 35S::AO2) y de plantas mutante-negativo de la L-aspartato oxidasa (mAO).

20 La figura 8 es un gráfico que representa la biomasa en semillas recogidas a partir de plantas control (ctrl), de plantas que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa (35S::AO1 y 35S::AO2) y de plantas mutante-negativo de la L-aspartato oxidasa (mAO).

La figura 9 es un gráfico que representa la correlación entre la actividad de la L-aspartato oxidasa (A), los niveles de NAD (B) y la biomasa expresada en diámetro de roseta.

25 La figura 10 es una fotografía de plantas control (ctrl) y de plantas que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa (35S::AO) en unas condiciones de estrés abiótico que corresponden a un fuerte calor combinado con una fuerte luminosidad.

30 La figura 11 es una curva de germinación de plantas control (◆) y de plantas que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa (35S::AO1 (◻ y X) y 35S::AO2 (▲)) en unas condiciones de medio rico en nitrógeno (nitrato) (A) y condiciones de medio deficiente en nitrógeno (nitrato) (B).

35 La figura 12 es un gráfico que representa unas condiciones de estrés que corresponden a la proliferación de pulgones *Myzus persicae* sobre unas plantas control (ctrl) y unas plantas que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa (35S::AO1 y 35S::AO2).

Ejemplos

40 Material y métodos

Generación de plantas transgénicas

45 El ADNc (secuencia codificante, CDS) de *Arabidopsis thaliana* que codifica para la L-aspartato-oxidasa (L-AO) (SEC ID nº 1) se ha amplificado por PCR con los cebadores de secuencias siguientes:

cebador sentido (GAG AGA CCC GGG ATG GCG GCT CAT GTT TCT AC);
cebador antisentido (GAG AGA CAG CTG AAT CGT TAG TTA TTC ACT CGA C);

50 El amplificado se ha sub-clonado después entre los sitios Sma11 y Sal1 del vector pCW162 binario, bajo el control del promotor CaMV35S para generar unas plantas transgénicas que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa. El casete nptII de pCW162 se utilizó para la selección de las plantas transgénicas sobre el medio que contiene la kanamicina. Se utilizó después el plásmido resultante para la transformación estable de plantas de *Arabidopsis thaliana* para sobreexpresar el gen L-AO, utilizando la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Los transformantes primarios se seleccionaron sobre medio Murashige y Skoog que contiene 50 mg.l⁻¹ de monosulfato de kanamicina. Después de aproximadamente 10 días de cultivo *in vitro* (23°C, bajo intensidad luminosa de 100 μmoles de fotones.m⁻².s⁻¹), se han transferido las plantas resistentes en maceta de mantillo en cámara de cultivo de días largos (LD, régimen día/noche de 16h/8h) con el fin de obtener unas semillas que han sufrido un nuevo régimen de selección. El número de plantas transgénicas putativas se ha anotado para seleccionar las líneas que han insertado una sola copia del transgén (relación ¾ no resistentes, ¼ resistentes). Los descendientes se seleccionaron hasta la obtención de líneas estables homocigotas para la inserción ADN-T.

Medición de los niveles de transcritos L-aspartato oxidasa

65 Después de una extracción del ARN total utilizando el kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel) según las instrucciones del proveedor, se ha utilizado 1 μg de ARN total como matriz para la síntesis de ADNc primera hebra

y una transcripción inversa con el sistema de síntesis de la primera hebra SuperScript III (Invitrogen). La sobreexpresión del gen de la L-aspartato oxidasa se ha examinado por RT-PCR con los cebadores de las secuencias siguientes:

- 5 cebador sentido (GAT CGT TCA CCG TGC TGA TA) y
 cebador antisentido (TGT GTT CAA GCC ATC CTG AG)

La línea, o planta, control (ctrl) se ha obtenido a partir del ecotipo Columbia (Col 0) transformado con el vector pCW1628 vacío.

10

Cultivo de las plantas

Las líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en este estudio se obtuvieron a partir de plantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia (Col 0). Después de 48h de estratificación a 4°C en la oscuridad, las semillas se sembraron y se cultivaron en unas condiciones de días cortos (SD, régimen día/noche de 8 h/16 h), en una cámara de cultivo bajo una iluminación energética de 100 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a nivel de la hoja, a 18-20°C y 65% de humedad, (salvo para la determinación del número de sílicos y la medición de la cantidad de semillas, se trataba de condiciones de días largos, LD, régimen día/noche de 16h/8h). Se realizó una aportación de solución nutritiva dos veces por semana.

15

20

Extracción de las muestras para los análisis metabólicos

Se extrajeron unas muestras en el medio del fotoperiodo, se congelaron rápidamente en el nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis. Para los análisis metabólicos y transcriptómicos, las plantas se analizaron y muestrearon con 6 semanas de edad (SD), y con 8 semanas de edad (SD) para el análisis de los intercambios gaseosos.

25

Dosificación de la actividad de la L-aspartato oxidasa

Se ha desarrollado un método de dosificación de la actividad de la L-aspartato oxidasa utilizando un espectrofotómetro: se trituró 0,5 g de muestra de hojas congeladas en nitrógeno líquido, y recogidos en 2 ml de amortiguador de extracción (Tris-HCl pH 8). Después de la centrifugación, se desalo el extracto bruto por cromatografía de exclusión de tamaño sobre columna PD10. Para 0,7 ml del extracto desalado, se añadieron 100 μl de L-aspartato 10 mM, 100 μl de fumarato 10 mM y 100 μl de FAD 200 μM para iniciar la reacción, que se siguió a 30°C durante 30 min. La reacción se detuvo por calentamiento a 100°C 2 min para precipitar las proteínas, seguido de una centrifugación. A 1 ml de sobrenadante de reacción se añadieron sucesivamente:

30

35

- 0,5 ml de fenolato de sodio 0,33 M pH 13;
- 0,5 ml de nitroprusiato de sodio 0,1%;
- 0,5 ml NaClO 0,2%.

40

La actividad L-aspartato oxidasa se midió en espectrofotometría a DO 635 nm por dosificación, contra un intervalo patrón de 0 a 100 nmoles de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, del NH_4^+ que proviene de la degradación casi instantánea a pH 8 del iminoaspartato formado durante la reacción.

45

Mediciones metabólicas

Las dosificaciones de metabolitos con las propiedades antioxidantes como los nucleótidos de piridina NAD^+ y NADH se realizaron por espectrofotometría a través de un acoplamiento en lector de microplacas. Estos metabolitos se cuantificaron por una reacción de reciclaje siguiendo la reducción del DCPIP (2,6-diclorofenol-indofenol) a 600 nm en presencia de alcohol deshidrogenasa y de etanol. Se dosifica el NAD^+ después de la extracción ácida: se trituraron aproximadamente 100 mg de hojas en mortero en nitrógeno líquido, a los que se añade 1 ml de HCl 0,2 N. Después de la descongelación del triturado, éste se trasfiere a un tubo Eppendorf de 2 ml. El extracto se clarifica después por centrifugación durante 10 minutos a 14000 g, a 4°C. Se calentaron 200 μl de sobrenadante durante 1 minuto a 100 °C, después se neutralizan añadiendo 20 μl de NaH_2PO_4 200 mM pH 5,6, y un volumen suficiente de NaOH 0.2 M (alrededor de 200 μl) para alcanzar un pH 7. Para la dosificación del NADH , se necesitó una extracción alcalina. De la misma manera que para la extracción ácida, se trituraron 100 mg de hojas en mortero en nitrógeno líquido, después se añadió 1 ml de NaOH 0,2 M. Después, se centrifugó la mezcla durante 10 minutos a 14000 g a 4°C. Se calentaron 200 μl de sobrenadante durante 1 minuto a 100°C, y después se neutralizaron añadiendo 20 μl de NaH_2PO_4 200 mM pH 5,6, y un volumen suficiente de HCl 0,2 N (alrededor de 150 μl) para alcanzar un pH 7.

55

60

La medición espectrofotométrica de los metabolitos extraídos se efectúa de la siguiente manera: en cada pocillo de medición, se añadieron sucesivamente 100 μl de tampón HEPES 100 mM/EDTA 2 mM pH 7,5, 20 μl de DCPIP 1,2 mM, 10 μl de PMS (metosulfato de fenazina) 10 mM y 10 μl de ADH (25 U) en un volumen final de 200 μl . Para las muestras a ensayar, se añadieron 20 μl de extracto y 25 μl de agua bidestilada. Después de la agitación de la

65

placa, la reacción se inicia por adición de 15 µl de EtOH absoluto. Las mediciones de NAD se realizan a 600 nm mediante el lector de microplaca por referencia a un intervalo de NAD⁺ o de NADH.

5 La dosificación de ATP se realizó utilizando el kit ENLITEN ATP Assay System Bioluminescence (Promega) siguiendo el procedimiento recomendado por el proveedor.

Mediciones de intercambio de gas

10 Las mediciones de intercambios gaseosos y de fluorescencia de la clorofila se efectuaron utilizando el sistema de Li- 6400 xt (Li -Cor, Lincoln, NE, USA) y los parámetros se calcularon con el programa proporcionado por el fabricante. Las condiciones eran: una densidad del flujo de fotones ¼ 1000 mmol m⁻².s⁻¹, una temperatura de la cámara 22°C, un caudal de 100 mmol.s⁻¹, una humedad relativa de 60%. Las respuestas de la asimilación clara de carbono (An) y la fracción molar de CO₂ interna (curvas An/Ci) realizadas en condiciones ambientales de contenido en oxígeno (21%) se midieron sobre las hojas atadas con un sistema de análisis de gases infrarrojo equipado con una cámara fluorimétrica (Li-Cor 6400-40; Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska, Estados Unidos).

Prueba de germinación

20 Con el fin de asegurarse de que las diferencias observadas en los porcentajes de germinación no se deben a la calidad de las semillas, se cultivaron lado a lado las plantas salvajes y unas plantas mutantes en unas condiciones idénticas en una cámara de cultivo para producir unas semillas frescas en unas condiciones de días largos. Las semillas en plena madurez y esterilizadas se sembraron sobre unas placas de medio ¼ Hoagland's, desprovisto de nitratos (0,2 mM) o rico en nitratos (2,25 mM). Después de la estratificación durante 2 días a 4°C en la oscuridad, se colocaron las semillas en una cámara de cultivo a 23°C. Se utilizó la protrusión de la radícula como criterio para la evaluación de las diferencias de germinación entre los tipos salvajes y mutantes de semillas.

Prueba de resistencia a unas condiciones de estrés abiótico

30 Se transfirieron unas plantas de 7 semanas de edad cultivadas en condiciones de días cortos (SD) durante una semana en unas condiciones de luz continua de 350 µmol fotones.m⁻².s⁻¹ a 37°C y 65% de humedad.

Prueba de resistencia a un estrés biótico

35 Unos pulgones *Myzus persicae* procedentes de una misma colonia mantenida en laboratorio sobre unas plantas salvajes de *Arabidopsis thaliana* de mismo ecotipo que el de las plantas salvajes y mutantes probadas, se recogieron y se transfirieron sobre unas plantas frescas de 5 semanas de edad. En 2 días, dieron nacimiento a unas larvas. Los pulgones adultos se retiraron y sólo se guardaron las larvas. Esto ha permitido obtener unos pulgones de la misma edad ± 1 día. 7 días más tarde, se transfirieron 3 pulgones sobre cada una de las plantas de cada genotipo de 18 días de edad. Después de 5 días, se contó con lupa el número de pulgones para cada planta. Por análisis estadístico (ANOVA), se verificó que el diámetro de las rosetas no influía sobre la proliferación de los pulgones.

Análisis estadísticos

45 Salvo que se indique lo contrario, los datos son las medias y las desviaciones estándares de tres a cinco muestras independientes de diferentes plantas; unas diferencias significativas están expresadas con la ayuda de la prueba t de Student a P <0,05. Todos los experimentos se repitieron por lo menos tres veces y dieron unos resultados similares. La prueba t de Student y el análisis de varianza de dos vías (ANOVA) se realizaron utilizando el programa Excel (Microsoft).

Resultados

55 Los resultados indican que la secuencia nucleotídica de *Arabidopsis thaliana* utilizada para la transformación de las plantas y que es homóloga a la de la L-aspartato oxidasa bacteriana caracterizada en la bibliografía, corresponde bien a una actividad L-aspartato oxidasa y que las líneas transformadas presentan una actividad de la L-aspartato oxidasa aumentada de 2 a 4 veces (figura 3).

60 Los resultados demuestran que la sobreexpresión constitutiva del ADNc de la L-aspartato oxidasa conlleva un aumento de los niveles de NAD y de los metabolitos energéticos conexos (figura 4).

Los resultados muestran que las líneas que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa presentan unos porcentajes de asimilación fotosintéticos del CO₂ más elevados (figura 5).

65 Se evaluó el crecimiento y el rendimiento de las plantas transformadas con el casete de expresión de la L-aspartato oxidasa. La sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa conduce a un aumento del crecimiento de las raíces, así como la superficie de las hojas. El tamaño de las plantas transgénicas que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa

es superior al tamaño de las plantas control de misma edad (figuras 6 y 7). Se observa lo inverso en plantas mutantes en los niveles de aspartato oxidasa muy reducidos (figura 7). El peso fresco de las plantitas ha aumentado asimismo de manera significativa (figura 7) y la relación peso fresco/peso seco está inalterada con respecto a las plantas control. Además del aumento del desarrollo de la planta, se puede detectar un aumento del tamaño de las células de la epidermis. No se ha observado ninguna variación de ploidía entre las plantas que sobreexpresan y las plantas que no sobreexpresan la L-aspartato oxidasa, lo cual confirma que el tamaño incrementado de las líneas que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa no está relacionado con un aumento de la ploidía. Se ha observado una fuerte correlación entre el diámetro de la roseta y la abundancia de los transcritos, de la actividad y del nivel de L-aspartato oxidasa y de NAD (figura 9), que muestra que el aumento del crecimiento de las plantas depende directamente del nivel de expresión de la L-aspartato oxidasa. La sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa provoca así un aumento del crecimiento celular y un aumento del crecimiento y del desarrollo de la planta entera.

El rendimiento en semillas de las plantas transgénicas que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa resultó ser superior al de las plantas control. El aumento en 45% del rendimiento en semillas observado (figura 8) está en correlación con el número de silículas por planta. Este aumento de la producción de semillas no se acompaña de ningún problema de llenado de las silículas en las plantas que sobreexpresan L-aspartato oxidasa con respecto a las plantas control. Además, el tamaño de las silículas es idéntico entre todas las plantas. La sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa conlleva así un rendimiento incrementado en semillas. A la inversa, las plantas mutantes de baja actividad L-aspartato oxidasa tienen un rendimiento en semillas un 42% inferior a las líneas control.

El aumento del rendimiento en semillas es concomitante con una calidad de germinación incrementada. En efecto, las semillas producidas por las plantas que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa germinan más rápidamente que las semillas control (figura 11). La facultad de germinación de las plantas que sobreexpresan L-aspartato oxidasa no está modificada en un entorno pobre en nitrógeno, tal como se observa para las semillas control (figura 11). La sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa estimula así la germinación y las semillas pueden germinar mejor en condiciones de carencia en nitrógeno.

Las plantas que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa expuestas en continuo a $350 \mu\text{moles fotones.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, y 37°C han sobrevivido mientras que las plantas control se desecan y mueren en las mismas condiciones extremas (figura 10). La sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa refuerza así la resistencia de las plantas a unas condiciones severas de estrés abiótico.

Las plantas que sobreexpresan L-aspartato oxidasa cultivadas en presencia de pulgones *Myzus persicae* han limitado el desarrollo de los pulgones con respecto a unas plantas control infestadas en las mismas condiciones (figura 12). La sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa refuerza así la resistencia de las plantas a unas condiciones de estrés biótico como un ataque de pulgones.

Las plantas que sobreexpresan la L-aspartato oxidasa expuestas en continuo a $350 \mu\text{moles fotones.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, y 37°C han sobrevivido mientras que las plantas control se desecan y mueren en las mismas condiciones extremas (figura 10). La sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa refuerza así la resistencia de las plantas a unas condiciones severas de estrés abiótico.

Las plantas que sobreexpresan L-aspartato oxidasa cultivadas en presencia de pulgones *Myzus persicae* han limitado el desarrollo de los pulgones con respecto a unas plantas control infestadas en las mismas condiciones (figura 12). La sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa refuerza así la resistencia de las plantas a unas condiciones de estrés biótico como un ataque de pulgones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) UNIVERSITE PARIS-SUD 11

5 <120> PLANTAS CON RENDIMIENTO INCREMENTADO Y MÉTODO DE OBTENCIÓN DE DICHAS PLANTAS

<130> 367194D33312

<150> FR 1451445

10 <151> 2014-02-24

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

15

<210> 1

<211> 3912

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

20

<400> 1

atggcggctc atgtttctac tggaaacatt cataatcttct atcttgccggg gcaggtttac	60
aggggacaag ctttttcatg gagttctgct tctactttca tggcaaatcc attcaaagag	120
ccctcttggg caagtggggg atttaaggct ctaaaagctg agagatgtgg ttgttactct	180
cgtggtatct ccccatcag tgagacctca aaacctatca gggctgtttc ggtatcttct	240
tcaacaaagt attatgatt cactgtgatt ggtagtggag tagcgggtct gcgttatgct	300
ttagaagttg caaagcaagg aacagtcgca gtgattacca aagatgagcc tcatgagagt	360
aacacaaact atgctcaagg tgggtgttagt gctgtgttat gccctttgga ttctgttgaa	420
agtcatatgc gggacactat ggtcgctggt gctcatcttt gtgatgaaga aaccgtaaga	480
gttgtgtgta ctgaagggcc tgaaaggatt cgtgaaactga ttgcaatggg agcatcattt	540
gatcacggcg aggatggaaa tttgcatttg gccagagagg gtggtcactc gcattgtagg	600
atcgttcacg ctgctgatat gacaggaaga gagattgaga gagctttact tgaagctgta	660
cttaatgatc ccaacatatc tgtcttcaa caccatcttg caatcgatct gctcacttct	720
caggatggct tgaacacagt ttgtcatggt gtggacactt tgaatatcaa aactaatgag	780
gtagtacgct ttatatcgaa ggtgacattg cttgcttcag gtggagctgg gcatacttat	840
ccatcaacca caaatcctct ggtggctact ggagatggga tggcgatggc tcatcgagct	900
caagctgtga tctcaaatat ggaatttggt cagtttcatc ctactgccct agccgacgaa	960
ggtcttccca tcaaactaca aactgctagg gaaaacgcgt tcctcatcac cgaggcgggtg	1020
agaggtgatg gtggcatcct ctataatcta ggaatggagc gattcatgcc tgtttacgat	1080
gaacgagctg agcttgctcc aagagacgtg gttgcaagaa gtattgatga ccagcttaag	1140
aaacgaaacg aaaagtatgt gttacttgac ataagccata agccaagaga aaagattctt	1200

ES 2 820 760 T3

gccatttcc ogaacatagc ttctgaatgt cttaaacacg gtctggatat caccgcgcag 1260
 cctattccgg ttgtccctgc agcccattac atgtgtggag gagttcgtgc tggtttaca 1320
 ggcgaaacca atgtccttgg attgtttgta gcaggtgaag tagcatgtac aggcctccac 1380
 ggggcaaadc gtcttgctag taactcgctt ttagaagctc tggttttcgc gagacgggct 1440
 gttcagcctt cgactgagct catgaaacgc acaagacttg atgtatgcgc atcagagaaa 1500
 tggacaaggc ctgttggtgc gacagctaga ttgctaggag atgaagtaat agcaaagatt 1560
 atagctttga ctaaagaagt gagaagagag cttcaggagg taatgtggaa gtatgttgg 1620
 attgtcagat cgacaattcg gctcaccact gctgagagga aaatcgaga gctagaagca 1680
 aaatgggaaa catttttgtt tgaacatgga tgggaacaaa cagtggtagc tcttgaagct 1740
 tgtgagatga gaaacttgtt ctgttcgctt aagccttggg tgagcagcgc gttagctaga 1800
 catgaaagca gaggtcttca ttacatgaca gactttcctt ttgtggaaga aagcaagcgg 1860
 attccgacga ttattctacc gtcttctcct acaacagcta gttggagctc aaggcggta 1920
 cagaatataa gtagcagctc acttattgat tgctaaatgg cggctcatgt ttctactgga 1980
 aacattcata atttctatct tgcggggcag gtttacaggg gacaagcttt ttcattggagt 2040
 tctgcttcta ctttcattgc aaatccattc aaagagccct cttgggtcaag tggggtattt 2100
 aaggctctaa aagctgagag atgtggttgt tactctcgtg gtatttccc catcagtgag 2160
 acctcaaac ctatcagggc tgtttcggta tcttctcaa caaagtatta tgatttact 2220
 gtgattggta gtggagtagc gggctcgcgt tatgctttag aagttgcaa gcaaggaaca 2280
 gtcgcagtga ttaccaaga tgagcctcat gagagtaaca caaactatgc tcaaggtggt 2340
 gttagtgcctg tgttatgcc tttggattct gttgaaagtc atatgcggga cactatggtc 2400
 gctggtgctc atctttgtga tgaagaaacc gtaagagttg tgtgtactga agggcctgaa 2460
 aggattcgtg aactgattgc aatgggagca tcatttgatc acggcgagga tggaaattg 2520
 catttggcca gagaggggtg tcaactcgc atgtaggatcg ttcacgctgc tgatagaca 2580
 ggaagagaga ttgagagagc tttacttgaa gctgtactta atgatccaa catatctgtc 2640
 ttcaaacacc attttgcaat cgatctgctc acttctcagg atggcttgaa cacagtttgt 2700
 catggtgtgg acactttgaa tatcaaaact aatgaggtag tacgctttat atcgaaggtg 2760
 acattgcttg cttcaggtgg agctgggcat atctatccat caaccacaaa tcctctggtg 2820
 gctactggag atgggatggc gatggctcat cgagctcaag ctgtgatctc aaatatggaa 2880
 tttgtgcagt ttcacctac tgccctagcc gacgaaggtc ttccatcaa actacaaact 2940
 gctagggaaa acgcgttcct catcaccgag gcgggtgagag gtgatgggtg catcctctat 3000
 aatctaggaa tggagcgatt catgcctgtt tacgatgaac gagctgagct tgetccaaga 3060
 gacgtggttg caagaagtat tgatgaccag cttaagaaac gaaacgaaaa gtatgtgta 3120

ES 2 820 760 T3

cttgacataa gccataagcc aagagaaaag attccttgccc atttcccga catagcttct 3180
 gaatgtctta aacacgggtct ggatatcacc cgtcagccta ttccggttgt ccctgcagcc 3240
 cattacatgt gtggaggagt tcgtgctggt ttacaaggcg aaaccaatgt ccttgattg 3300
 tttgtagcag gtgaagtagc atgtacaggc ctccacgggg caaatcgtct tgctagtaac 3360
 tcgcttttag aagctctggt tttcgcgaga cgggctgttc agccttcgac tgagctcatg 3420
 aaacgcacaa gacttgatgt atgcgcatca gagaaatgga caaggcctgt tgttgcgaca 3480
 gctagattgc taggagatga agtaatagca aagattatag ctttgactaa agaagtgaga 3540
 agagagcttc aggaggtaat gtggaagtat gttggtattg tcagatcgac aattcggctc 3600
 accactgctg agaggaaaat cgcagagcta gaagcaaat gggaaacatt tttgtttgaa 3660
 catggatggg aacaaacagt ggtagctctt gaagcttgtg agatgagaaa cttgttctgt 3720
 tgcgctaagc ttgtggtgag cagcgcgta gctagacatg aaagcagagg tcttcattac 3780
 atgacagact ttccttttgt ggaagaaagc aagcggattc cgacgattat tctaccgtct 3840
 tctcctacaa cagctagttg gagctcaagg cggttacaga atataagtag cagctcactt 3900
 attgattgct aa 3912

<210> 2

<211> 651

5 <212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Ala Ala His Val Ser Thr Gly Asn Ile His Asn Phe Tyr Leu Ala
 1 5 10 15

Gly Gln Val Tyr Arg Gly Gln Ala Phe Ser Trp Ser Ser Ala Ser Thr
 20 25 30

Phe Met Ala Asn Pro Phe Lys Glu Pro Ser Trp Ser Ser Gly Val Phe
 35 40 45

Lys Ala Leu Lys Ala Glu Arg Cys Gly Cys Tyr Ser Arg Gly Ile Ser
 50 55 60

Pro Ile Ser Glu Thr Ser Lys Pro Ile Arg Ala Val Ser Val Ser Ser
 65 70 75 80

Ser Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Thr Val Ile Gly Ser Gly Val Ala Gly
 85 90 95

Leu Arg Tyr Ala Leu Glu Val Ala Lys Gln Gly Thr Val Ala Val Ile
 100 105 110

10

ES 2 820 760 T3

Thr Lys Asp Glu Pro His Glu Ser Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Gly Gly
 115 120 125

Val Ser Ala Val Leu Cys Pro Leu Asp Ser Val Glu Ser His Met Arg
 130 135 140

Asp Thr Met Val Ala Gly Ala His Leu Cys Asp Glu Glu Thr Val Arg
 145 150 155 160

Val Val Cys Thr Glu Gly Pro Glu Arg Ile Arg Glu Leu Ile Ala Met
 165 170 175

Gly Ala Ser Phe Asp His Gly Glu Asp Gly Asn Leu His Leu Ala Arg
 180 185 190

Glu Gly Gly His Ser His Cys Arg Ile Val His Ala Ala Asp Met Thr
 195 200 205

Gly Arg Glu Ile Glu Arg Ala Leu Leu Glu Ala Val Leu Asn Asp Pro
 210 215 220

Asn Ile Ser Val Phe Lys His His Phe Ala Ile Asp Leu Leu Thr Ser
 225 230 235 240

Gln Asp Gly Leu Asn Thr Val Cys His Gly Val Asp Thr Leu Asn Ile
 245 250 255

Lys Thr Asn Glu Val Val Arg Phe Ile Ser Lys Val Thr Leu Leu Ala
 260 265 270

Ser Gly Gly Ala Gly His Ile Tyr Pro Ser Thr Thr Asn Pro Leu Val
 275 280 285

Ala Thr Gly Asp Gly Met Ala Met Ala His Arg Ala Gln Ala Val Ile
 290 295 300

Ser Asn Met Glu Phe Val Gln Phe His Pro Thr Ala Leu Ala Asp Glu
 305 310 315 320

Gly Leu Pro Ile Lys Leu Gln Thr Ala Arg Glu Asn Ala Phe Leu Ile
 325 330 335

Thr Glu Ala Val Arg Gly Asp Gly Gly Ile Leu Tyr Asn Leu Gly Met
 340 345 350

Glu Arg Phe Met Pro Val Tyr Asp Glu Arg Ala Glu Leu Ala Pro Arg

ES 2 820 760 T3

<210> 3
 <211> 1953
 <212> ADN
 <213> Populus trichocarpa

5

<400> 3

atgacaacga gtatagctgg tggaagcagc aacctccact accggttaag tttccgccag	60
gctaaagggt gtagacaatc ttcttggatt tccagtttga cattcaatgg atgcttgcgg	120
aatgagattt catggtcggg tgggctatca aagttgttgc agttccagag atataaattt	180
tcccgatcta ccattagcaa aaactggaaa cctcttggaa caagaaaagt aagtgtatca	240
tcttgcttga gagatagtac agttaagtac tttgatattg ctgtcattgg aagtggagtt	300
gctggtctgc gctatgctct tgaagttgca aaatatggaa ctggtgcagt cattaccaag	360
gctgagcccc atgagagcaa tacaactat gcccaagggt gtggttagtgc agtgctgtcc	420
ccatcagact ctgtggagag tcacatgcag gatactatgg tagcaggtgc ttatctatgt	480
gatgaggaga ctgtcagagt tgtctgcaca gaaggacctg acagaattag agaattgata	540
gctatgggtg caatgtttga tcatggggag gatggaaact tgcacctagc aaggggaagg	600
ggtcactctc accatagaat tgttcatgct gctgatatga ccggaaggga gattgagcga	660
gctctgctgg aggccgttgt caatgatcct aatatctctg tgtttgagca ccattttgcc	720
atagatttgc taacttctca ggatggctct gacatggttt gtcatggtgt ggacactttg	780
aacactgaaa ctcaacaggt ggttcgattt atttcaaagg tgactttact tgcacaggt	840
ggggctgggc atatctaccc atccaccaca aatcctccgg tggcaacagg agatggaatg	900
gctatggctc accgagctca agctgtgatt tccaacatgg aatttgtgca gttccacca	960
actgctttag ctgatgaagg gcttccata aaaccaatca aagctcgaga aaacgattt	1020
ctcatcactg aagctgtaag gggcgatgga ggcacctctc ataacttaga ctgggaaaga	1080
ttcatgcccc tgtatgatga gagagctgag ctagctccta gggatgtagt ggcgaggagc	1140
atagatgacc agcttaagaa gcgttgtgag aagtatgtgc tacttgatat tagtcacaag	1200
cctagagaga agattctctc tcaactcccc aacatagctg ctgagtgctc ccagtatggc	1260
ctggatataa cccgccaaac aattcctgtg gttcctgctg cccattacat gtgcggtgga	1320
gtccgtgctg ggcttcaggg ggagacaaat gtgcagggcc tctatgtggc aggtgaggtt	1380

ES 2 820 760 T3

gcatgcactg gtttgacg agcaaaccga ctcgctagca attcattgct ggaagcacta 1440
 gtttttgctc gaagagctgt tcagccatca attgatcaca tgaagagctc tagccttgat 1500
 ctcaagtctt caaattgggtg ggccagacca gtagtaccca attcacctgg gagcaatgta 1560
 atggacaacg tatcgaggaa gacaagggaa gtgaggagag agttgcagtc aatcatgtgg 1620
 aagtacgtag ggattgtccg gtcaacaaca aggcttghaa ccgaggagg agaaatcagt 1680
 gagtttagagg ccagtgagg gaagtactta ttcgaggaag gatgggagca gacaatgggt 1740
 gggcttgagg cttgtgaaat gagaaacctc ttttgttggt caaagctgggt agtgagcagt 1800
 gcactcgcta ggcatgaaag ccgtgggctg cactatacga ttgattttcc tcatgtggag 1860
 gaaagtaaga ggctaccaac agttattctt ccatctcttg tgaataataa tacatggagc 1920
 tcacgacagc tacacaagca ggtcattttt tag 1953

<210> 4

<211> 1929

5 <212> ADN

<213> Solanum lycopersicon

<400> 4

atggcaactg gtatagcttc aggaagcggg caattatatt tgagggagca tgtctatcgg 60
 aggagtagct atggaaaagc tcattgtcat tccactgtga tcctgagcag catgcaaaac 120
 caaatccatt ggtcttcttg gatttccaaa ctcttacaag ttgatagaag taactattca 180
 caatgtcaag tgaaaacaaa ccggaagtct cacagaggaa caatcaaatc atgccagaga 240
 gaaggtcaa caaggtatth tgattttgct gtgattggta gtggcattgc tggccttcga 300
 tatgctcttg aggttgccaa acatggatct gtggctgtga taaccaaggc cgagcctcat 360
 gagagtaaca ctaactatgc tcaaggtgggt gtaagtgtg tgctctgcc taaggattca 420
 gtggagaacc acatgaaaga tacaattgtg gcaggtgctt acctctgtga tgaggagatt 480
 gttagagttg tgtgcactga aggacctgag agaattagag aactgattgc tatgggtgct 540
 tcgttcgatc atggggagga tggcaatctg catctagcca ggaaggggg ccactcccat 600
 cgccgaattg tccatgctgc tgatatgaca ggcagagaga taggaagggc cctattagag 660
 gcggttgta aggatcctaa tataatgtg tttcaacacc attttgcaat agatttggtg 720
 accaccagg atggttctga catagtttgt cacggaattg atactataaa cacagaaaca 780
 caggaggtca taagattcat ttcaaaagt actttgctgg catcaggtgg agctggacat 840
 atctatccaa gcactactaa tccgccagtt gccactggag atggaatagc tatggctcat 900
 cgagctcaag ctgtaatttc caacatggag tttgtgcaat tccaccgac tgccttgct 960
 gatgaaggcc ttcccatcag accatcaaat gccagagaga atgcttttct gataactgaa 1020
 10 gctgtcagag gtgatggagg cattctttac aacttagata tggagagatt catgccatcg 1080

ES 2 820 760 T3

tatgatgaaa gagccgagct tgccccaaga gatgtggtag caagaagtat tgatgaccag 1140
ctcaaaaagc gtggtgaaga gtatgttctt cttgatataca gtcacaagcc caaagagaag 1200
attctttctc attttcctaa catagctgct gagtgtctcc gctatgggtt agacataaca 1260
cagcagccga ttccagtggc tcccgagct cactacatgt gtggtggagt ccgtgctggg 1320
ctcgaagggtg agactaatgt acgaggtctt tatgtggcag gtgaagttgc atgtactggt 1380
ttgcatgggtg caaaccgact tgctagcaac tccttggtg aagcactagt gtttgcacga 1440
agagctgtaa agccttcaat agatcacatg aacctttcta aaatcgggtca cagtgttca 1500
aattggtggc cgcggcctgt agcacccttg ttactaggag atacagtagt taacaaagtc 1560
attcgtcaga caagggagt gaggaagaa ctacagtcaa tcatgtggga atacgttga 1620
attgttcggt ctacctcacg actaacctt gcagaaacca gaatcataga gttggagtta 1680
aatgggaac gatacctatt tcagcatggg tgggaaccga ctatggttg ttttagaggct 1740
tgcgagatga ggaatctctt ctggttgccc aagctggtt ttagcagtgc cctttcgcga 1800
catgagagtc gtgggcttca ttataccatt gacttccctc acgtcgagga aagcaagagg 1860
ttgcctacag taatttttcc ttcacagcta aatagctcgc ggcaattaca taagcagcag 1920
atatgttag 1929

<210> 5
<211> 1944
5 <212> ADN
<213> Glycine max

<400> 5

atggcaactt gtgttcctgc tgtaagtggc gcactgcatt atggagtgc aaactgcaag 60
ggacacagct acagaaggag tgcttccttt tctgatgtgc ctaacacggg attcttaca 120
aaagatcttt catggtctaa agtggatcc aaggtcctgc agatacacag atgtgggttt 180
tctgcacctc cacttcataa ggatcagaaa ctcttcaaag tcatttcctc atggaagaaa 240
gatagtccca caaaataactt tgactttatc gtcattggga gtggaattgc tggcctccga 300
tatgcgcttg aagttgcaaa atatggatct gttgcagtga taaccaaggc tgagtctcat 360
gaatgcaata ctaattatgc tcaaggtggc gttagtgtg tgctatgcc ttcagattct 420
gtggagagtc acattaagga caccattgtg gctggggcat atctttgtga tgaggaaagc 480
gtccgggttg tctgcaactga aggaccgaa agagtcagag aactgattgc tatgggtgca 540
tcatttgatc atggggaaga tggtaacttg catctaataga gagagggggg tcattcacat 600
catagaattg ttcagctgctc tgatatgact ggaaaagaga ttgaacgggc tctactgaag 660
gaagttatca gtaatccag aatTTTTgtg tttgaacacc attttgctat agatcttctc 720
10 acttgtcagg atcgatctga tatgattgt cttggtgttg acacactgaa ttctaaaacc 780

ES 2 820 760 T3

ctagaggatga ttagatttct ttcaaaggtc actttacttg cgtcagggtg agctggacat 840
 atttatccta aaactacaaa tcctctggta gccactggag atggaattgc catggcacac 900
 cgagctcaag ctgtgatttc caacatggag tttgtgcagt tccatccaac tgccttagct 960
 gatgaagggc ttcctattaa accaaccaag cctcgggaaa atgcatttct gataactgaa 1020
 gctgtcagag gtgatggggg catcctttat aatthttggca tggaaagatt catgcccttg 1080
 tatgatgaga gggcagagct tgctccaagg gatgtggtgg caagaagtat agacgaccaa 1140
 cttaaaaagc gtcacatgaga gtatgtgctc ctcgatataa gtcacaagcc caaggaggaa 1200
 attctctccc atttccccaa cattgcttct acgtgtctcc agtatggttt ggacataact 1260
 cgtcgtccaa tcccagttgt tccagctgct cattacatgt gtggaggagt tcaagctggt 1320
 ctccaaggag agaccaatgt gaaaggctctg tatgtagctg gtgaggtagc atgcacaggt 1380
 ttgcatggag caaatagact tgctagcaac tcattgcttg aggcactggt ttttgcaaga 1440
 agagctgtgc agccctcagt tgatcacatg aagggtctta gccttgatct gactgcatca 1500
 aactgtggc ctgagaccgt tgtgcctttg cactcggaa gtaatgtcac agacaaaatt 1560
 atgtcaacga caaaggaatt gagggcagaa ctgcaatcca tcatgtggga ctatgtagga 1620
 attgttcggt ccacaatgag actagagact gctgagcaaa aaattggtag tttagaagct 1680
 aatgggagg agtctctggt tcagcatgga tggaagccaa caatggtcgg gcctgagatc 1740
 tgtgagatga gaaacctctt ttgtttgtgca aagctggtgg tcagcagtgc gctttctagg 1800
 catgagagcc gtggactaca ttacactggt gattttcctt atctcgagga gagtaagaga 1860
 cttccaacaa tcatttttcc aagttcacct gtaaacagta catggagttc tcggcaatta 1920
 cacaagcagc ccatgtacca gtaa 1944

<210> 6
 <211> 1938
 <212> ADN
 <213> Oriza sativa

5

<400> 6

atggcggtct tgatgaacgg ctttgggagc ctccaatgca aggcgacggt gcatgtcgag 60
 aaagggcaca tgcaagcatc ggggatggcc ttcttctctc ccgtcaacag atgcgccag 120
 gttcatatct ccagtattcc tcatttcacg ggcgcgaagt ctgttagtgc ttcccaactt 180
 cgaatgaggc acaaggctcg gtccatcaga gcctctgag cctcgtgctt gcaagatgaa 240
 acaacaaaat atttcgattt tgtggtcatt ggcagcggtg ttgctggcct aaggtatgct 300
 ctggaagtgt ctaagtacgg ctctgtcgcc atcattacca aagcagagcc tcatgagagc 360
 aacacgaact acgcacaagg cgggtgtcagc gcggttctat gccctcaga ttctgtagag 420
 agccacatgc aagacacat tgctcggggg gcttatctgt gtgatgaaga gactgtcagg 480

10

ES 2 820 760 T3

gtagtatgca cagaaggacc ggagcgtgtg aaggagctca ttgccatggg agcttcattt 540
 gaccatggcg aggacggaag gctgcacctt gcaagggaag gtggacattc tcacaacaga 600
 atagttcatt ctgctgatat gactggaaga gagatcgaga gagcactgct tcaagcagtt 660
 gataatgatg ataacatata tttgtttggc caccactttg ccattgattt actcacctgt 720
 cagagtaatg gtgaaatata ttgctatggt gtggattcat tggacgctga aactcagaag 780
 gcaattcgtt tcatctcgaa agtaacattg cttgcatctg gaggagtggg tcatatatac 840
 ccctcaacga ccaatccacc ggtagctact ggggatggaa ttgcaatgtc tcatcgtgcg 900
 caggctgtaa tatctaataat ggagtttgtg cagttccacc caactgcact atcagatgag 960
 ggtctcccaa taaaaccagc tacaagaaga gagaatgcat tcctcataac agaagcagtc 1020
 agaggagatg gaggaattct ttataatcag tccatggaga ggtttatgac ttcgatgat 1080
 gaccgtgcag agttagcacc gagagatgtg gtcgcaagaa gcatagatga ccaactgaa 1140
 aagaggggag aaaagtatgt cctcctggat atcagtcaca agccaaggga aaaggttctt 1200
 gcccattttc caaacattgc agctgaatgc ctgcccacg gtctcgacat cacacaacag 1260
 ccgatacctg ttgttcctgc agctcattac atgtgtgggg gtgtccgggc tgggttgacg 1320
 ggggagacaa atgtgaaagg cctgtatggt gctggtgagg ttgcatgcac tggattgcac 1380
 ggtgctaate ggcttgcaag caactcactg cttgaagcac tgggtgttgc tccgagagca 1440
 gtgcagcctt caatagatca tatggtcgat gcagatgtcg atccttcttt cggaagaaa 1500
 tgggctcgtc ctgtgctgtc tgtctccctt agggacagta tactatctga tatcattgag 1560
 aagacaaagc aggccaggat ggagcttcag tcaataatgt gggagtatgt cgggatagtg 1620
 cggctcgacga accgcctgaa gcacgcggaa tggaagatca gtgatctgga gtcagaatgg 1680
 gaggagtctt tgttcaggag ggggtggaag cctacaatgg tgggggttga gacctgtgaa 1740
 atgaggaacc tcttctgctg cgcaaagctg gttgtgaaaa gtgctcttgc aaggcacgag 1800
 agccgaggct tgcaacttcac cgaagacttc ccttacctgg aggagagcaa gaggaagcct 1860
 acagtgatct tccctactca tatccaggag ctgacatgga gctcaaagcc attgcagaag 1920
 cagctgcagt gcaagtag 1938

<210> 7
 <211> 1995
 <212> ADN
 <213> Zea mays

<400> 7

atggcgaacc tgacgaacgg ctttgcgagc ctccattgcg caggggcat gcatgtggac 60
 aaagggcaca tgcaagcatc gggactgcct tttctctctt tcagaagatg cgcccagctt 120
 gatatctcca gactaggtag cgtgcctcgt ttcatgggag caacatctgc tactgtctcc 180

ES 2 820 760 T3

caacatcatg tgaggcagag gatcagcgcc atcagagcct ctactctttc ctgcctgcaa 240
 gacgatgcca caaaattctt tgattttgtg gttattggca gcggtgttgc tggcctaagg 300
 tatgctctgg aagtttcaaa gcacggctct gttgctatta tcaccaaggc agagcctcat 360
 gagagcaaca caaactatgc acaaggcggg gttagtgcog ttctatgccc ctcgattct 420
 gtagaaagtc acatgaaaga cacaattggt gcaggggctt atttgtgcga tgaagagatt 480
 gtcagggtag ttgtcacaga aggtccagag cgtgtcaagg aactaattgc catgggtgcc 540
 tcattcgacc atggtgaaga tggtaggctg caccttgcaa ggaagggtg tcattctcac 600
 aacagaattg tccattctgc cgatatgact ggaagagaga ttgaaagagc actgcttcaa 660
 gcagttcaca atgatgataa catactttg tttggctatc actttgctat tgatctattg 720
 acatgtcaga aaaatggtga aatctattgc tatggagtgg attcaataga cattgaaacc 780
 cagaaggtag tccgcttcat ctcgaaagt acattgcttg catcaggagg agctggccat 840
 atatatocca caaccaccaa tccaccggta gctactgggg acggaatcgc aatgtgcat 900
 cgtgctcagg ctgtaatac caatatggag tttgtgcagt tccatccaac tgcactttca 960
 gatgagggcc tgccaataaa gccaaagaca agaagagaga atgcatttct cataacggaa 1020
 gcggtgagag gagacggagg aattctttac aaccagtcca tggagagatt catgccgatg 1080
 tacgatgacc gctcggagct ggcgccgaga gacgtggtg cgaggagcat agacgaccag 1140
 ctgaagaaac gaggcgaaaa gtatgtcctc ctggacatca gccacagacc aagagacaag 1200
 gttcttgccc acttcccca catcgcgcc gagtgcctgc ggtacggcct ggacatcacc 1260
 cggcagccca tcccggtggt cccggcggcg cactacatgt gcggcggcgt ccgggcaggg 1320
 ctgcaggggg agaccaacgt gaagggcctc tacgtggccg gcgaggtcgc gtgcacgggg 1380
 ctgcacgggt ccaaccggct agcaagcaac tcgctgctgg aagcgtggt gttcgcaggg 1440
 agggcgggtc agccgtccat cgacctcatg gtggatgccg acggagatgc cagaccgtcg 1500
 ctggtggcga ggtgggcacg gccgacgctg ccgcggtcgg tgctgggcga cagcgtgctg 1560
 tcggacatcg tggggcggac gaggcaggcc aggatggagc tgcaatcagt gatgtgggag 1620
 tatgtcggca tcgtgcgctc gacggggcgg ctgaagcagg ccgagtggag gatcggtgac 1680
 ctggagtccg agtgggagga gttcctgttc cggcgggggt ggaagccgac cacggtgggc 1740
 gtcgaggtct gcgagatgc caacctctc tgctgcgcca agctcgtcgt caggagcgcg 1800
 ctggccaggc gcgagagccg cggcctgcac ttcaccgagg acttcccgt cctggaggag 1860
 agcaggagga agcctacggt catcttcccg gccgccgtgc aggagctcac gtggagctcc 1920
 aagccgttgc agaggcagct gcaagcagat gacaatgcat gcagttcatc cggctgggcc 1980
 ttggggattc gttaa 1995

<210> 8
 <211> 1965
 <212> ADN
 <213> Sorghum bicolor

5

<400> 8

ES 2 820 760 T3

atggcgaacc tgacgaacgg ctttgcgagc ctccattgcg caggggcgat gcatgtggac 60
aaagggcaca tgcaagcttc gggactgcct tttctctctt tcagaagatg ctccaagctt 120
gatatctcca gactaggtac cgtgcctcgt ttcattggcg caaaatctgc tactgtctcc 180
cagcatcatg tgagacacag gatcagcgcc accagagcct ctactttttc ctgcctgcaa 240
gatgatacca caaaattctt cgatttcgtg gttattggca gtggtgtcgc tggcctaagg 300
tatgctctgg aagtttcaaa gcacggctct gttgctatta tcaccaaggc agagccttat 360
gagagcaaca caaactatgc acaaggcggg gttagcgccg ttctatgcc ctcggattct 420
gtagaaagt c acatggaaga cacaattggt gccggggcct atctgtgtga cgaagagacc 480
gtcagggtag tttgcacaga aggtccagag cgtgtcaagg aactaattgc catgggtgcc 540
tcattcgacc atggtgaaga cggtaggctg caccttgcaa ggaaggtgg acattctcac 600
aacaggattg tccattctgc tgatatgact ggaagagaga ttgaaagagc actacttcaa 660
gcagttgaca atgatgataa catatcgttg tttggtcatc actttgctat tgatctattg 720
acatgccaga aaaatggtga aatatattgc tatggagtgg attcगतaga cattgaaact 780
cagaaggtag tccgtttcat ctcgaaagtg aactgcttg catcaggagg agttggccat 840
atatatccca caaccaccaa tccactggta gctacagggg atggaatcgc gatgtctcat 900
cgtgctcagg ctgtaatatc caatatggag tttgtgcagt tccatccaac tgcactttca 960
gatgagggcc tgccaatcaa gccaaagaca agaagagaga atgcattcct cataacggaa 1020
gcggtcagag gagacggagg aattctttac aatcagtcca tggagagatt catgcccattg 1080
tacgacgatc gcgcccagtt ggcgccaaga gatgtggttg cgaggagcat agatgaccag 1140
ctgaagaagc gaggcgagaa ctacgtcctc ctggacatca gccacaagcc aagagagaag 1200
gttcttgctc acttccccaa catcgccgcc gagtgcctgc ggtacggcct ggacatcaca 1260
cggcagccca tcccgggtgt cccggcgcg cactacatgt gcggcggcgt cccggccggg 1320
ctgcaggggg agaccaacgt gaagggcctg tacgtcgccg gcgaggtcgc gtgcacgggg 1380
ctgcacggcg cgaaccggct ggcgagcaac tcgctgctgg aggcgctggt gttcgccagg 1440
agggcggtgc agccgtccat cgaccacatg ttggacgccg acggcgacgg cgacggcgac 1500
ggcgacgctt ccctggcggc gagatggcg cgcccgacgc tgccgtggtc gtcgctgggc 1560
gacggcgcg cgtcgacat cgtggagcgg acgaggcagg ccaggacgga gctgcagtcg 1620
gtgatgtgg agtacgtcgg catcgtgcgg tcgacggggc ggctgaagca ggccgagtgg 1680
aagatcggcg acatggagtc ggagtgggag gagttttgt tccggcgggg gtggaagccg 1740
accatggtgg gcatcgaggg ctgagagatg cgcaacctct tctgctgcgc caagctcgtc 1800
gtcaagagcg cgtggccag gcgagagac cgcgccctgc acttaccga ggacttcccc 1860
tacctggagg agagcaggag gaagcccacg gtcattctcc cggccgccgt gcaggaggtc 1920
acgtggagct ccaagccggt gcagaggcag ctgcagtgca agtag 1965

- 5 <210> 9
- <211> 2010
- <212> ADN
- <213> Chlamydomonas reinhardtii

ES 2 820 760 T3

<400> 9

atggcagtcg cgcttcagcg ctctgctgtg ggtaagcgcc tgcgcgccgc taccgccgtc 60
 cgcgtcggcc tgagcgagtc ggctcggcga cctgtggcgc gcccactgg tgtggccgct 120
 cgtcgggtca cccgcagctt cgtcgtccgc gctgacgtga actccgatgc gttccagcca 180
 cgcccggcgg gcgccccggc cgcgcgtgtc gcgcccgaga acacgccgcc tgtccgtcaa 240
 cacgatttcc tcgtcatcgg ctccggcatc gccggcctga cgtacgcgct gaaagtggca 300
 gagtatggca cggttgccat catcaccaag gacaacgctg ctgagggctg cactcgttat 360
 gcgcaaggag gcgtgtgcgc tgtgctggac aagagcgaca gtgttgctga tcacgttcgt 420
 gacaccattg ttgctggcgc cttcttgaac gatcctcagg ccgtggaagt tgtgtgccgt 480
 gagggccccg cccgcgtgct ggagctggtg gagctggcgc ccgagttctc ccgcaacaac 540
 gatggctccc tgcacctgac caaggagggg ggccacagca accgccggat cgtgcacgcc 600
 gcggatatga cgggcgcaga gatcgcgcgc gcgctgctga cgtccgcca gagccaccgc 660
 aacatccact tctatgagca ccacctggcg gttgacctag tcgtggacga gtatggtggt 720
 atgctgcaact gcttcggcgc cgacgtgctg gaccagcgtt ccggcacgat gagcaggttc 780
 ctgggcctgg ccacgctgct ggctagcggg ggcgctggtc aggtgtacc caacaccacc 840
 aaccgcacg tcgccaccgg agacggcatc gctatggcct accgcgcgca cgccaacgtg 900
 agcaacatgg agttcgtgca gttccacccc actggcctgt acaaccccgc cgggtgtgag 960
 ggcagcacct tcctgatcac cgaggccgtc cgcggcgagg gcggtatgct gttcaacaag 1020
 gccggcgagc ggttatgga gacgtacgac aaggagcgcc tggagctggc cccgcgcgac 1080
 gtggtggcac gcgccattca cgaccagatg cgcctgggca acgagcacgt gtggctggac 1140
 atcagccaca agcctcgcga tgaggtgcta caccacttcc ccaacatcgc ggcgcgctgc 1200
 cttaccctgg gtatcgacat cgcgctgac cccatcccgg tggtgccggc gcagcactac 1260
 acgtgcggcg gcgtcaaacac gggcctgctg ggcgagacca atgtgcaggg gctgtacggc 1320
 tgcggcgagg tggcctgctc cggcctgcac ggcgccaacc gcctggcttc caactctctg 1380
 ttggagggcc tgggttttgc agagcgtgcc gtcaacccca gcgtggcgca cgctgagcac 1440
 gcgctgcgca actcgggccg gcagctgcac tacgccctg ccagcgcgga tttccgcggc 1500
 gcgctggcgc cgcgggagct gacgcccag ctggcgcagt ggggtgcggc gcggcgtcaa 1560
 gagctgcgcg acatcatgtg gcgctactgc ggcacgtg gcaggaccaa ggagctgcag 1620
 caggcccgcg acttcgtggt gtcgctgtac attgagacga aggccatcta caagaactac 1680
 ggcgtgaaca cgcagttggt ggagctgctc aacatggcca ccgtggcgga gctgacggtg 1740
 tcgtgcgcgc tgcagcgcaa ggagagccgc ggcctgcact ttagcgccga ctaccgcac 1800
 ctggacgacg cgcagcgccg cccagcatg atcagcacct cgctcaagac gcgctacgac 1860
 ctgtcgcctt acatgocgaa cgtgccatct gtgtgcgccg ccggggctgg cggccccgca 1920
 agcccggcgc agggcaagcg cctggcgccg cgcaagcagc ccaccgcga gcgcgagttg 1980
 5 gcggtgcgct ccacgccgca agacctgtga 2010

<210> 10

ES 2 820 760 T3

<211> 2004
 <212> ADN
 <213> Phaseolus vulgaris

5 <400> 10

atgcagtcgc ctacttgtat tgcaatggcg acttgatac ctgctggaag tggcacactg	60
caatttagag tgacaaactg caagggacac agttgtagaa ggactgcttt ggtttctgat	120
gccccaatcg cgagattcct acgaaaagat ctttcatggt ctaaagcagt atccaaacac	180
gtttgtgcat tttctgcacc tccacttcaa aagaatcaga aactcttcaa aatcgtttcc	240
tcttgcaaga tagatagtct cacacagtgc tttgactttt ccattattgg gagtgggatt	300
gctggtctcc gctatgcgct tgaagttgca aaatatggat ctggtgcagt gataaccaag	360
gctgagtctc acgaatgcaa tactaattat gctcaaggtg gtgtagtgc tgtgctaggc	420
ccttcagatt ctgtggagag tcacatgaag gacaccattg tagctggggc atatctttgt	480
gatgaggaaa gcgtccgagt tgtctgtact gaaggacctg aaagagtcag agaattaatt	540
gctatgggtg catcatttga ccatggggaa gatggttaact tgcatttcat gagggaggga	600
ggtcattcac atcatagaat tgttcatgct gctgatatga ctggaaagga gattgaacgt	660
gctctactga aggcagttat caacaatcct aatatttttg tgtttgaaca ccattttgct	720
attgatcttc ttacttgtca ggatgaatct gacataattt gtcttggtgt tgacacgctg	780
aacactaaaa ccctagaggt gggaacagca gtgataagat ttctttcaaa ggcgacttta	840
cttgcatctg gtggagcagg gcatatttat cccaaaacta caaatcctct ggtagccact	900
ggagatggaa ttgccatggc tcatcgagct caagctttga tttccaacat ggagtttgtt	960
cagttccatc caactgcctt agctgatgaa gggcttcta tcaaacaac caagcctagg	1020

ES 2 820 760 T3

gaaaaagcat ttctgatatc cgaagcggtt agaggtgatg ggggcatcct ttataattta 1080
 ggcatggaaa gattcatgcc cttgtatgat gagagggcag agcttgctcc aagggatggt 1140
 gtggctagaa gcatagatga ccaacttaaa aagcgtgatg agaagtatgt tcttcttgat 1200
 ataagtcaca agccgaagga ggaaatcctc tcccattttc ccaacatttc atctacgtgt 1260
 ctcaagtatg gtttgacat aactcgtcac ccgatcccgg ttgttccagc tgctcattac 1320
 atgtgtggag gagttcaagc tggcttcaa ggagagacca atgtgaaagg tctgtatgta 1380
 gctggtgagg tagcatgcac aggtttgcac ggagcaaaca gacttgctag caactcattg 1440
 cttgaggcac tcgtttttgc aagaagagct gtgcagccct cagttgattg gatgaagagc 1500
 tctagccttg atctgactgc atcaaacttg tggcctcgac ctgctgctgc gcctttgtcg 1560
 ctcgaaagta atgtcactga caagattctg tcaatgacaa aggaatcgag gacagaactg 1620
 caatccatca tgtggaacta tgtaggaatt gttcggtcga cgatgagact agagacagca 1680
 aagcaaaaca tttgcaactt ggaggctaaa tgggaggagt gcttgtttga gcatggatgg 1740
 aagccaacaa tggcaggctc tgagatctgt gagatgagaa acctcttttg ctgcgcaaag 1800
 ctggtgatca gcagtgtctt ttcgaggcac gagagtogag gactgcatta cacagttgat 1860
 tttcctcatc ttgaggaaag caagagactt ccaacaatca tttttccaag ttcaactgta 1920
 aacagtacat ggagttctcg acaattacac aagcagccca tgtaccagga aggcacaaa 1980
 ttgtgtcaca atacatataa atag 2004

<210> 11

<211> 1863

5 <212> ADN

<213> Physcomitrella patens

<400> 11

atgttttttt tgaacgctat tccgataaat ctctgtggtg ttttcttgca gctaaacggg 60
 cgggacagga gaaatgaaat tagaaagttt attgccgcct cgaatcgtaa catccaggca 120
 gaagcgagct tatctggtga tggcgaagag gaggatca cgaataactt cgatttcctc 180
 gtaatcggaa gtggaatagc aggcttgaga tatgctctgg aagttgcaa gtacggttca 240
 gttgcaatac tcacgaagtc cgaaccgcac gagagtaaca ctgtgtatgc acagggaggt 300
 gttagtgtctg ttttagatcc cgaagattct gtagagagtc acatccgaga cacgatcgtc 360
 gctggtgctt tcttatgtga tgaggagact gtagaggtcg tgtgtcgaga aggtccagag 420
 cgtgtgaaag agttgatggc ttggggtgca ttgtttgatc aaagtgaaga tggtcagctc 480
 catctagcta ggaaggagc ccactctcat catcgcattg ttcattgcggc tgatatgact 540
 gggcgagaga tcgagagagc tcttttgact accgtttctc aaaatccgga cattgtaatt 600
 10 tttaaacatc atgctgtctgt ggatcttctc actcttcagg acggggacag tgtagtatgc 660

ES 2 820 760 T3

tatggtgtgg atgctctaga tacgcagaaa aataaagtta tgcgttttct agccggagtt 720
 acgatgtag catcaggagg tgcagggcac gtttatocta ctacgaccaa tcctttggtg 780
 gcaaccggcg atggagttgc tctggcacia cggctctcgtg cagtgggtgc taacatggaa 840
 tttgtacagt ttcattccac ggctttggcg gatgaaggct taccaataaa acctgccaaa 900
 cgggacaatg cttttctgat tacggaagct gtgctggag ctggaggaat tttgtataac 960
 caaagtatgg agagatttat gccattatat gactctcggc cggagctcgc acctcgggat 1020
 gttgtggccc ggagcattga tgatcaactc aagaaacgta atgagaaatt cgtttatctg 1080
 gatatacagc ataaaccagc cagcgagata atgtctcact ttccaaatat tgctgctgag 1140
 tgcctgaagt atgggctgga tattacgaag caaccatcc ctgtggtacc tgctgcatc 1200
 tacatgtgtg gaggcgtaca gactggtttg gtgggagaga cctcaatcaa ggggctcttt 1260
 gccgctggtg aagttacttg taccggtttg cacggtgcaa atagacttgc cagcaattcc 1320
 ttactggagg ctttagtggt tgccggagaga gctgtcggc cttcagttgc ttacgcactt 1380
 cagagtaaca ttggacgatc ggaggtgaag caagcgaagg agtggcctcg tcctactgct 1440
 ccctcagctt caaatgactt gcagatggat gagattctcc gcattacagc tttgaaaagg 1500
 aagcgattgc aacaagcaat gtgggatttt gtcggaattg ttcggctctac agagcgtctc 1560
 aagcgtgctc aagcggagtt aagggagctg gagtgtgaat gggaggcaca actcctcaga 1620
 catggttga aacctacat ggtcagctta gaggtttgtg agatgcgcaa cttggtatcg 1680
 gtgtcctacc tgattgtgaa cagcgtctc acacggcaag agagtcgtgg ccttcattac 1740
 acgacaagct ttccagaact tgttgagagc gaaaggtttc ctaccattct ttgtccgacc 1800
 gctgcaatga acaattcgtg gagttcacag gttgttcaca gattggcaat agaactctcaa 1860
 taa 1863

<210> 12
 <211> 1602
 <212> ADN
 <213> Rhodothermus marinus

<400> 12

atgcccagac gttatcagtt cgatthttctg gtcacggta gtggcattgc cggcctgacg 60
 ttcgcgctgc gcgtggccga tcacggctcg gtcgccatcg tcacgaaaaa agaaagcgtc 120
 gagtcgaaca cgaactacgc gcagggcggc attgcggccg tcatggacgc ggccgattcg 180
 ttcgaacagc acgtgcagga tacgctcga gcccgggccc gcctgtgcca ccgcgaggtg 240
 gtggaacagg tcgtgcggga agggcccga cgggtgcgtg aactgatggc gctcggggca 300
 cagttcacc gcgaaaacgg ccggctgcat ctggggcgtg agggcggcca ctcccgaat 360
 cgcacgtgc acgccccga cgcgaccggc cgcgaggtcg agcgggctg gctggcgcgc 420

ES 2 820 760 T3

gtgcgcgcc acccgaacat tcacatcttc gagtaccatt atgcggttga tctgatcacc 480
gagcatcatc tcggccagta cgtctcgcgg ttgcgtccc acatccactg cttcggggcg 540
tacgtgctgg acgagcgggc cgacgtggtg catacgtttc tggcgaaggc caccctgctg 600
gccacggggc gttccgggca ggtctacctg cataccacga acccgccggt ggccacgggc 660
gacgggggtg ccatggccta tcggggccaag gcccgctgg ccaacatgga attcattcag 720
tttcaccoga ccacgctttt ctaccccgac ggtcccaagg aacgctcgtt tctgatcagc 780
gaagcgggtc ggggtgaggg agcccggctc tacaacctgg ccggcgagcg cttcatgccg 840
aagtatgacc cgcggggcga gctggcgcgg cgcgacattg tggcgcgcgc catcgacgac 900
cagctcaagc ggcgcggcga tccgcacgtc tggctggaca tctcgcaccg gccggccgag 960
gaaatcaaac gccgcttccc gaacatctac cggacgctgc tcgactacgg catcgacatg 1020
acacagcagc ccattccggt cgtgccggcc gcgcaactacc agtgtggtgg cgtactgacc 1080
gacctgcacg gtcgcaccac gattcatggt ctgtacgcag ccggcgaggt agcctgtacg 1140
ggactgcacg gcgccaaccg actggccagc aactcgctgc tggaggcgct cgtctttgcc 1200
cgacgggagg ccgaagacgc cgtgcagtac atccagacgc agacgtggcg tacggacgtg 1260
ccggactggg acgaccgggg caccgagcgc ccgcaggaat ggggtgctcat cgcgcacaac 1320
cgggacgagc tgcggcgcat catgtgggac tacgtgggca tcgtgcgctc gcagcttcgt 1380
ctggagcggg ccctgcgccg caccgactg ctctacgaag aaaccgagga cttctaccgt 1440
cgcgcccagc tctcgcggg gctgtgtgaa ctgcgtaaca tgatcgccgt ggcttacctg 1500
atcattcgca gcgctctgat gcgccgcgag agccgcggct tgcaactacat gctcgactat 1560
ccggagcccg tcgagagcga gcgccggccc acgctggctc ga 1602

<210> 13
<211> 1623
<212> ADN
<213> Escherichia coli

5

<400> 13

atgaatactc tccctgaaca ttcattgtgac gtgttgatta tcggtagcgg cgcagccgga 60
ctttcactgg cgctgcgcct ggctgaccag catcaggtca tcgttctaag taaaggcccg 120
gtaacggaag gttcaacatt ttatgcccg ggcggtattg ccgcgctgtt tgatgaaact 180
gacagcattg actcgcattg ggaagacaca ttgattgccg gggctgggat ttgcgatcgc 240
catgcagttg aatttgcgc cagtaatgca cgatcctgtg tgcaatggct aatcgaccag 300
ggggtgttgt ttgataccca cattcagccg aatggcgaag aaagctacca tctgactcgt 360
gaaggtggac atagtcaccg tcgtattctt catgccgccg acgccaccgg tagagaagta 420
gaaaccacgc tgggtgggcaa ggcgcagaac catccgaata ttcgcgtgct ggagcgcagc 480

10

ES 2 820 760 T3

aacgcggttg atctgattgt ttctgacaaa attggcctgc cgggcacgcg atgggttggt 540
 ggcgcgtggg tatggaaccg aaataaagaa acggttgaaa cctgccacgc aaaagcagtg 600
 gtactggcaa ccggcgggtgc ttcaaaagtt tatcagtaca ccaccaatcc ggatatttct 660
 tctggcgatg gcattgctat ggcgtggcgc gcaggetgcc gggttgccaa tctcgaattt 720
 aatcagttcc accctaccgc gctgtatcac ccacaggcac gcaatttcct gttaacggaa 780
 gcactgcgcg gcgaaggcgc ttatctcaag cgcccggacg gcacgcggtt tatgcccgat 840
 tttgatgagc gcggcgaact ggccccgcgc gatattgtcg cccgcgccat tgaccatgaa 900
 atgaaacgcc tcggcgcaga ttgtatgttc ctcgacatca gccataagcc cgccgatttt 960
 attcgcagc atttcccgat gatttatgaa aaattgctcg ggctggggat agatctcacg 1020
 aaagaacccg tgccgattgt gcctgctgca cattatacct gcggtggtgt aatggtgat 1080
 gatcatgggc gtacggacgt cgatggtttg tatgccattg gcgaagtgag ttataccggc 1140
 ttacacggcg ctaaccgcat ggcctcgaat tcattgctgg agtgtctggt ctatggctgg 1200
 tcggcggcag aagatatcag cagacgtata ccttatgcc acggcgtcag tacgttaccg 1260
 ccgtgggatg aaagccgcgt tgaaaaccct gacgaacggg tagtaattca gcataactgg 1320
 cacgagctac gtctgtttat gtgggattac gttggcattg ttcgcacaac gaagcgcctg 1380
 gcacgcgcc tcggcgggat aaccatgctc caacaagaaa tagacgaata ttacgccat 1440
 ttccgcgtct caaataattt gctggagctg cgtaatctgg tacaggttgc cgagttgatt 1500
 gttcgcgtg cgatgatgca caaggagagc cgtggcctgc atttcacgct ggattatccg 1560
 gaactgctca cgcattccgg tccatcgatc ctttctgccc gcaatcatta cataaacaga 1620
 taa 1623

<210> 14
 <211> 1596
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

5

<400> 14

atgtctaaaa agacgattgc agtcatcggg tcaggggccc cggcactttc cttagctgca 60
 gctttcccgc cctcatacga agtgactggt atcacaaaa aaagcgtcaa aaacagcaat 120
 tctgtctatg cacaaggcgg gattgctgcg gcctatgcaa aagatgactc gattgaagcc 180
 catctggagg atacgttata cgcagggtgc ggccataata atctagctat tgtagcagac 240
 gtattacatg atggaaaaat gatggttcaa agcctattgg agcgtggatt tccattcgac 300
 cgcaatgaac gaggcgggtg ttgtcttggg agagaagggg cccactcata caaccgcata 360
 tttcatgcag gcggagacgc aacaggcagg ctgcttatcg attatttgct caaacggatc 420
 aacagcaaaa tcaagttaat cgagaatgaa acggcagcag atttgcttat agaggacgga 480

10

ES 2 820 760 T3

cgatgtatcg gcgtcatgac aaaagacagc aaagggcggc tcaaggtaag gcacgcagac 540
 gaagttgtgc tggctgccgg cggctgtgga aacctgtttc ttcaccatac gaatgatctc 600
 actgtcacag gtgacggctt ttctctggct taccgggccg gggcggaatt aacggatttg 660
 gagtttactc agtttcaccc gacactgctt gtgaaaaatg gtgtttccta cgggcttggt 720
 tcagaagctg tcagagggga aggcggatgt ttagtagacg aaaacggccg caggattatg 780
 gctgaacggc atccttttagg tgacctggct ccaagagata ttgtctcacg ggttattcac 840
 gaagaaatgg caaaaggaaa tcgctgttat atagacttca gtgcgatttc tgattttgaa 900
 acgcgtttcc ctaccatcac cgctatttgt gaaaaagcag ggattgatat ccacagcggga 960
 aaaattcctg ttgctccggg aatgcatttc ttaatgggag gtgtttcagt taatcgctgg 1020
 ggagaaacga cagtgccggg gctttatgcg attggcgaga cagcatgctc cggtttacet 1080
 ggagcaaacc ggcttgcaag caattcttta ttggaagcgc tggattttgg aaaaagggca 1140
 gcagagcata ttatccaaaa accggtttat aacaggcaat atcaatcagg gctagaaacc 1200
 agtgtcttct acgaggtgcc ggatatagag gggcatgaac tgcaaagcaa aatgacaagc 1260
 cacatgtcta ttctgcggga acaaagcagt ttgattgagc ttagcatctg gcttcatacg 1320
 ctgccttttc aggaagtaaa tgtgaaggat atcacaattc ggcatgga actttctcat 1380
 ctatggcaaa ctgcaaagct gatgacgttt tctgcgcttt tgcgggagga aagcagaggg 1440
 gctcacttcc gcaccgattt tctcatgct gaggtgagct ggcaaggaag acaaattgtc 1500
 catacaaaaa aaggaacgaa gatcagaaaa aacgagggga tttggaacaa tgaatcattt 1560
 acagctgaaa aaattactga atcacttttt tcttga 1596

<210> 15
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Triticum aestivum

5

<400> 15

atgggtgctt catttgatca tgggtgaagat ggcaggctcc accttgcaag ggaaggtgga 60
 cattctcaca acagaatcgt ccattctgcc gatatgactg gaaaagagat tgaaagagcg 120
 ctgcttcaag cggttgaaaa tgatgagaac atatctgtgt tcggccacca cttcgccatt 180
 gatctgttga cctgtcagaa taatgggtgaa atcttttggt acggagtgga ttcattggac 240
 accaaagctc aaaaggtagt ccgtttcatc tcaaaaagtaa cattgcttgc gtccggagga 300
 gctggccata tatatccac aacaaccaat ccaccgggtg ctactgggga tggaatcgca 360
 atgtgccatc gcgctcaggc tgtgatatcc aatatggagt ttgtgcaatt ccatccaact 420
 gcactatcag acgaaggcct tccaataaag ccagctaaaa taagagataa tgcatttctt 480
 gtaacagaag cagtcagagg agatggagga attctttaca accaatccat ggagagattt 540

10

ES 2 820 760 T3

atgcctttat acgacgaccg tgccgagttg gcaccgaggg atgtggttgc aagaagcata 600
gatgatcaac tgaagaaacg tggagagaag tatgttctct tggacatcag ccacaagcca 660
agggagaaaa ttcttgctca ttttccgaac attgcagctg aatgcctgcg gcacggtctg 720
gacatcacac agcagcccat acctgtcgtc cctgcagctc attacatgtg cggtggtggt 780
cgggctgggt tgcaagggga gacgagtgtg aaaggcttgt atgtcgtctg tgaggttgct 840
tgcactggat tgcaagggtc taatcgtctt gcaagcaact cattgctgga agcgttggtgta 900
tttgctcaga gagccgtgca gccctctatc gaccacatgg tggatgcgga tgctgaccct 960
tgtctcgcgg agaaatgggc acgccctgtg ctctctgtct ccattaagga cagtgcactg 1020
tctgacatca ttgagaggac aaagaagacc aggatggagc tgcaatccat aatgtggaag 1080
tacgttggtg tagtgcggtc gacgaaccgg ctgaagaatg cagaatgga gattggtgat 1140
ctagagtcat agtgggagga attcttattc aggaggggct ggaagcctgc ctcagtgggg 1200
atcgaggcct gcgaaatgag gaacctcttc tgctgcgcaa agctggttgt gaagagcgcg 1260
cttgcgaggc gggagagtgc tggcctgcac ttcactgagg acttcctta cctggaggag 1320
agcaagagga agcctacagt gatcttccct actgctatcc aagagctaac atggagtcca 1380
aagccattgc agaggcagct gcagtgcaaa tag 1413

<210> 16
<211> 1923
5 <212> ADN
<213> Hordeum vulgare

<400> 16

atgggaggct ctgctggcct ccaccatgtg catgtgcagg gagcacacat gcaggcgtct 60
cgcccgcctt ctctctcctt cagagcctgc gccagctcg agatctccag attttgcaact 120
accctcgtt tcagtccgt gaaggctctc agtgcttcgc aacagcatac gaggcacagg 180
ttcagctcca tcagagcctc tgccctcca tgcatgcagg atgacaccac gagatacttt 240
gatttcgtgg tcatcggcag tgggtgcgct ggcctaagggt atgctctaga agtctcgaag 300
cacggctctg ttgctatcat caccaaagca gaggctcatg agagcaacac caactacgcg 360
caaggcggcg tcagtgccgt tctgtgcccc aaggattccg tagaaagcca tatgcaagat 420
actattgttg caggggctta tctctgcgat gaggagaccg tcaggatagt atgcacagaa 480
ggctctgagc gtgtcaagga gctaatagcc atgggtgctt catttgacca tggggaagat 540
ggcaggctgc acctcgcaag ggaagggtga cattctcaca acagaatcgt acattctgct 600
gatatgactg gaaaagagat tgaaagagcg ctcttcaag cggttgaaaa tgatgagaac 660
atatctgtgt tcggccacca ctctgccatt gatctgttga cctgtcagaa caatggtgaa 720
10 atcttttgtt acggagtgga ttogttggac accaaaagctc aaaaggtagt ccgtttcatc 780

ES 2 820 760 T3

tcaaaagtaa cattgcttgc atctggagga gctggccata tatatcccac aacaaccaat	840
ccaccggtgg ctactgggga tggaatcgca atgtgtcatc gcgctcaggc tgtgatatcc	900
aatatggagt ttgtccagtt ccatccaact gcaactatcag acgaaggcct cccaataaag	960
ccagctaaaa caagagataa tgcatttctc gtaacagaag cagtcagagg agatggagga	1020
attctttaca accaatccat ggagagattt atgcctttat acgacgaccg tgctgagttg	1080
gcaccaaggg atgtggttgc aagaagcata gatgatcaac tgaagaaacg tggagagaag	1140
tatgttctgt tggacatcag ccacaagcca agggaaaaaa ttcttgctca ttttcccaac	1200
attgcagctg aatgcctgct gcacggtctg gacatcacac agcaaccctat acctgtcgtc	1260
cctgcagctc attacatgtg cggtggtggt cgggctgggt tgcaagggga gacaagtgtg	1320
agaggcttgt atgtcgtggt tgaggttgct tgcactggat tgcacggtgc taatcgtctt	1380
gcaagcaact cattgctgga agcattggta ttcgctcaga gagccgtgca gccctctatc	1440
gaccacatgg tggatgctga tgctgaccctg tgtctcgcag agaaatgggc acggcctgtg	1500
ctctctgtct ccattagga cagtgcactg tctgacatca ttgagaggac aaagaagacc	1560
aggatggagc tacaatccat aatgtgggag tatgtcggta tagtgccgtc aacgaaccgg	1620
ctaaagaatg cagaatggaa gattggtgat ctgagtcag agtgggagga attcttattc	1680
agggggggct ggaagcctgc cacggtgggg atcgaggcct gcgaaatgag gaacctcttc	1740
tgctgcgcaa agctggttgt gaagagcgcg cttgcgaggc gggagagccg tggcctgcac	1800
ttcacagagg acttccctta cctggaggag agcaagagga agcctacagt gatcttccct	1860
actgctatcc aagagctgac atggagttca aagccattgc agaggcagct gcagtgcaaa	1920
tag	1923

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para mejorar por lo menos un carácter fenotípico seleccionado de entre el rendimiento en semillas, la velocidad de germinación o el crecimiento en una planta, comprendiendo dicho método la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa, comprendiendo dicho método la transformación de una célula vegetal con por lo menos un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa, y la generación a partir de dicha célula, de una planta que sobreexpresa la L-aspartato oxidasa.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, para mejorar el rendimiento en semillas, en una planta, comprendiendo dicho método la transformación de una célula vegetal con por lo menos un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa, generando así una planta que sobreexpresa la L-aspartato oxidasa, y el cultivo de la planta hasta la madurez.
- 15 3. Método según la reivindicación 1, para mejorar la resistencia al estrés abiótico y/o la resistencia al estrés biótico en una planta, comprendiendo dicho método la transformación de una célula vegetal con por lo menos un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa, generando así una planta que sobreexpresa la L-aspartato oxidasa, y el cultivo de la planta hasta la madurez.
- 20 4. Método según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el por lo menos un ácido nucleico que codifica para la L-aspartato oxidasa está bajo el control de un promotor que asegura la sobreexpresión de la L-aspartato oxidasa.
- 5 5. Método según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el por lo menos un ácido nucleico comprende un ácido nucleico según la SEC ID nº 1.
- 25 6. Método según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el por lo menos un ácido nucleico comprende un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo constituido por SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16.
- 30 7. Método según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la planta se selecciona de entre el grupo constituido por trigo, cebada, arroz, maíz, sorgo, girasol, colza, soja, algodón, guisante, alubia, yuca, mango, banana, patata, tomate, pimiento, melón, calabacín, sandía, lechuga, col, berenjena, álamo.
- 35 8. Método según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la planta es el arroz (*Oryza sativa*), el trigo, la cebada o el maíz.

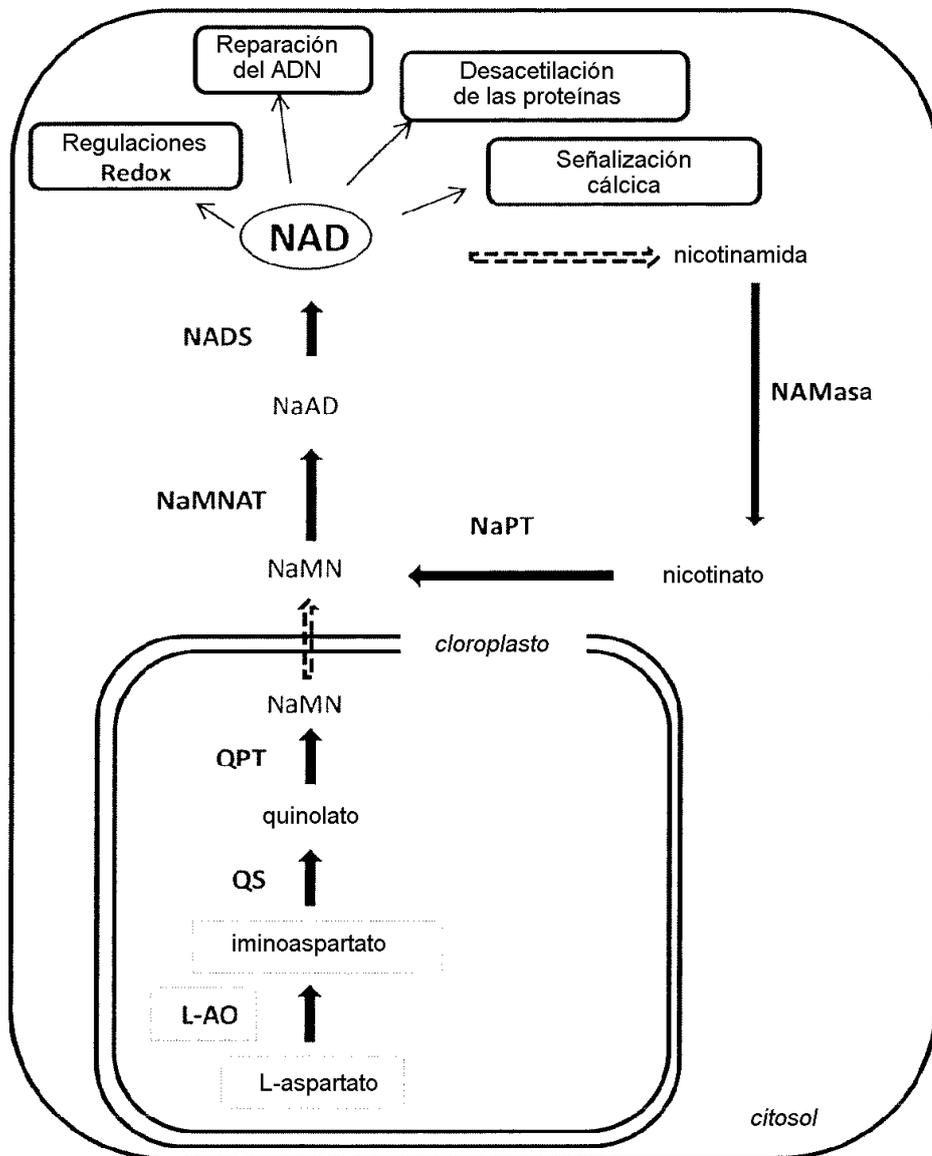


Figura 1

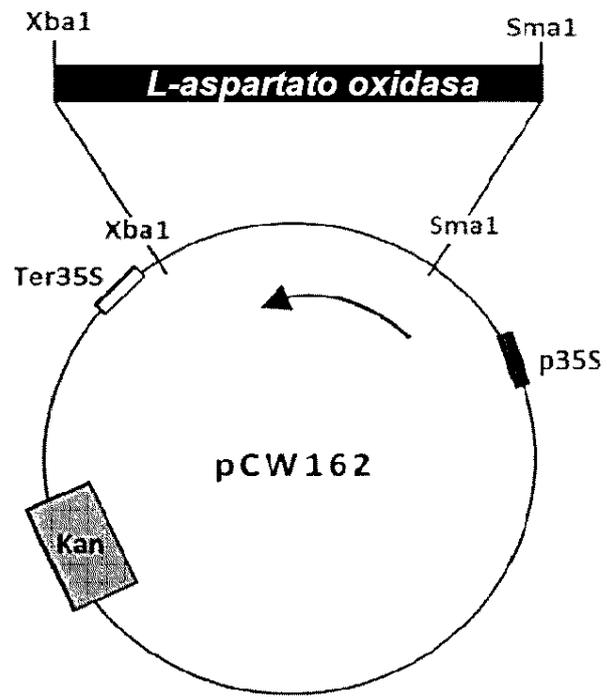


Figura 2

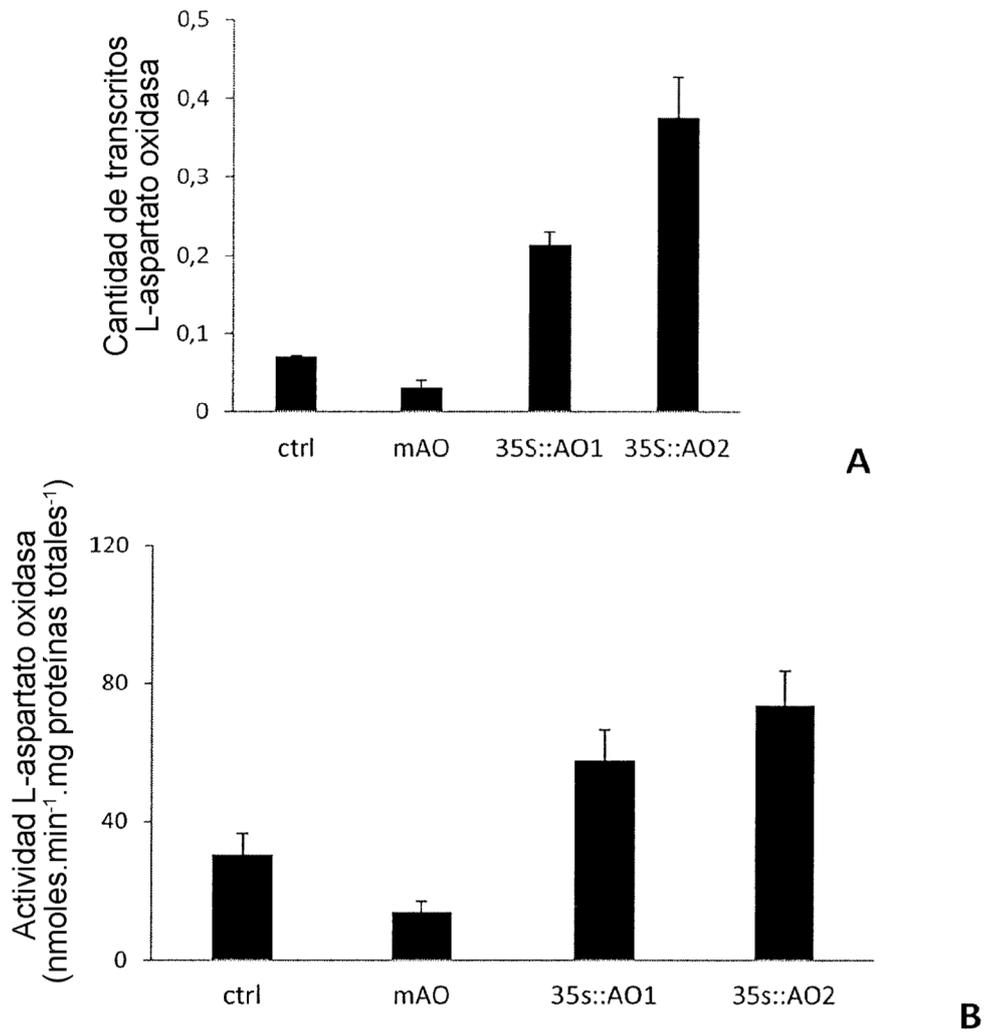
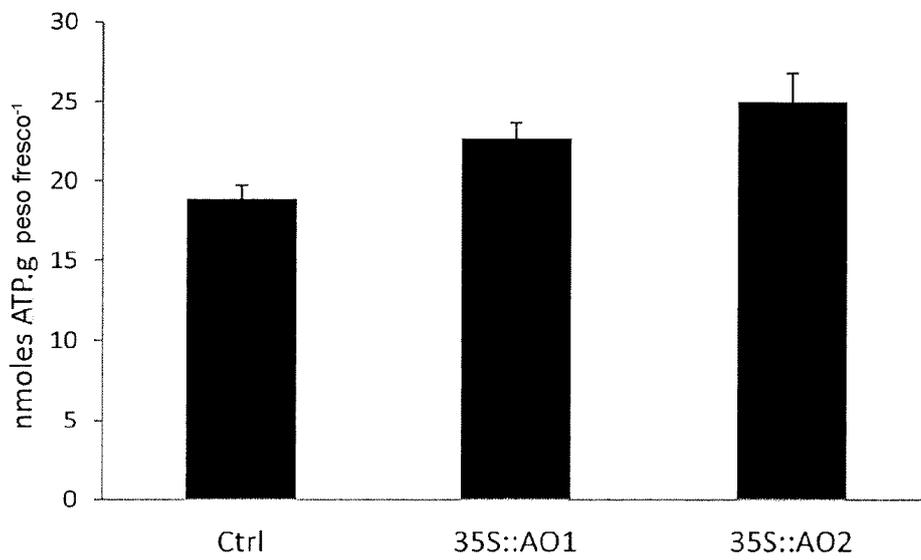
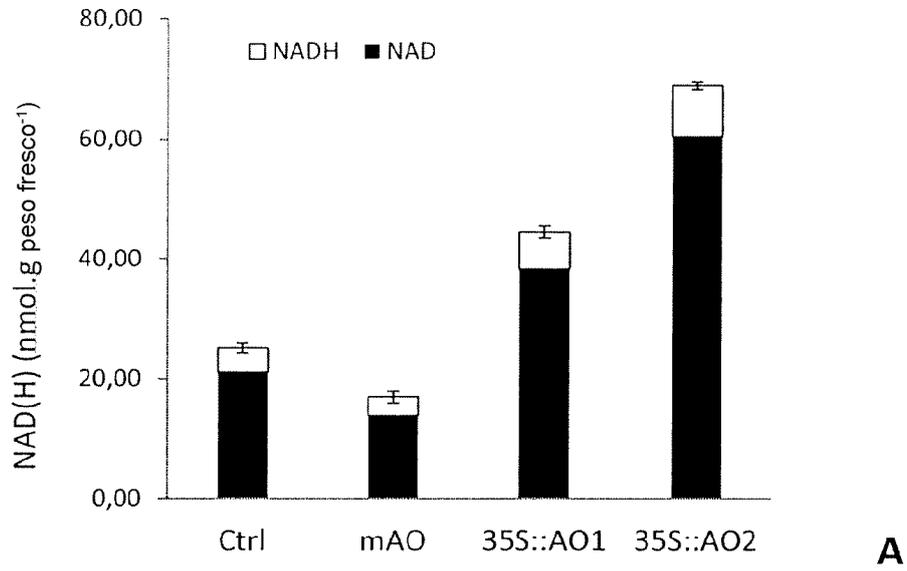


Figura 3



B

Figura 4

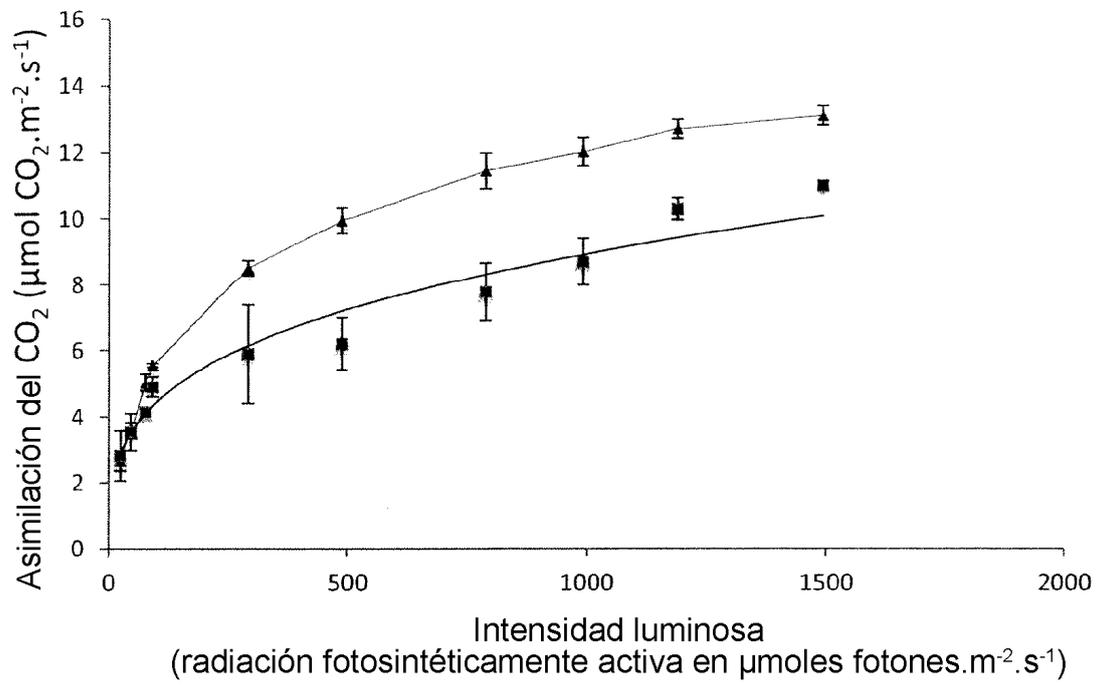


Figura 5

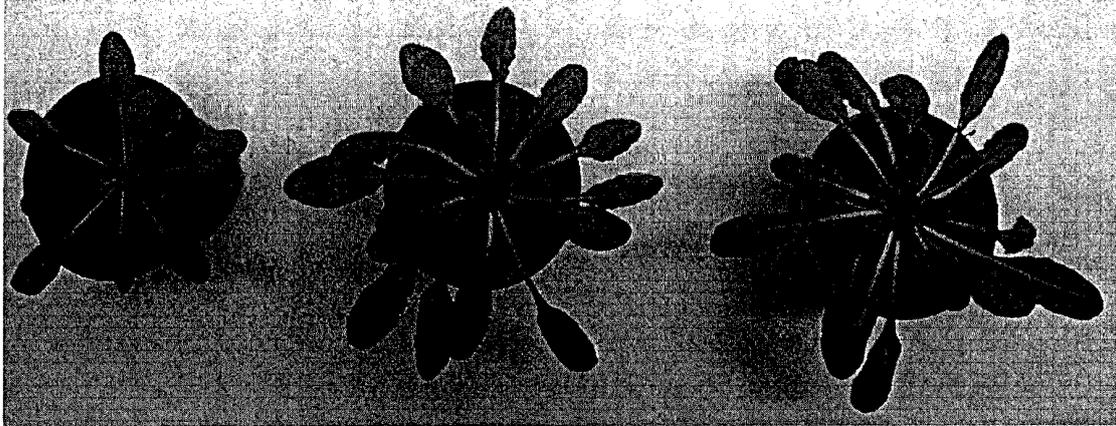
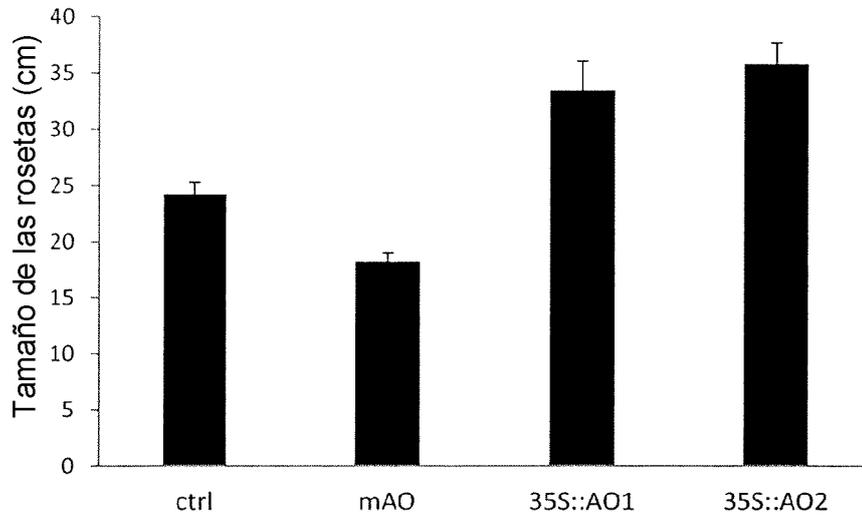
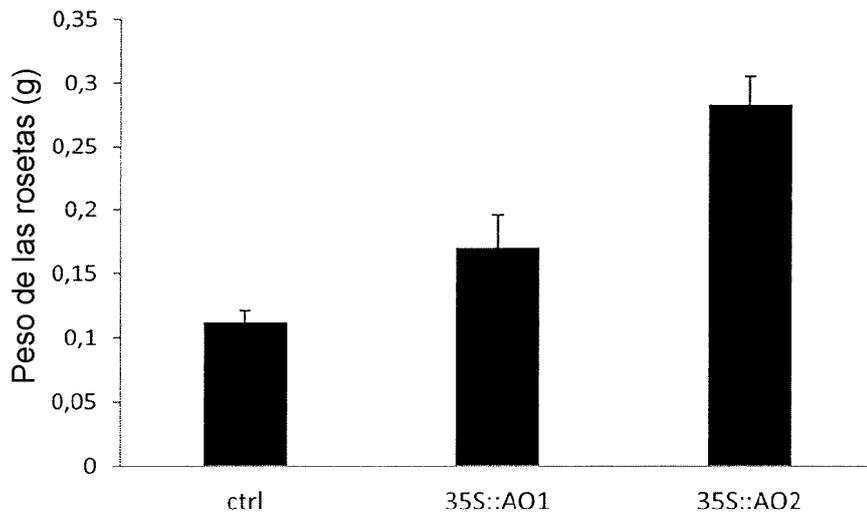


Figura 6



A



B

Figura 7

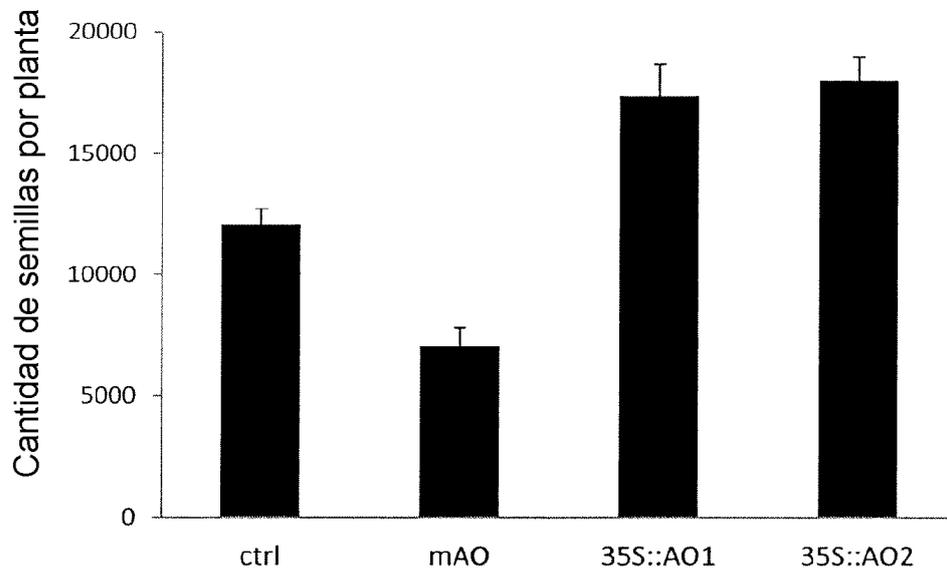


Figura 8

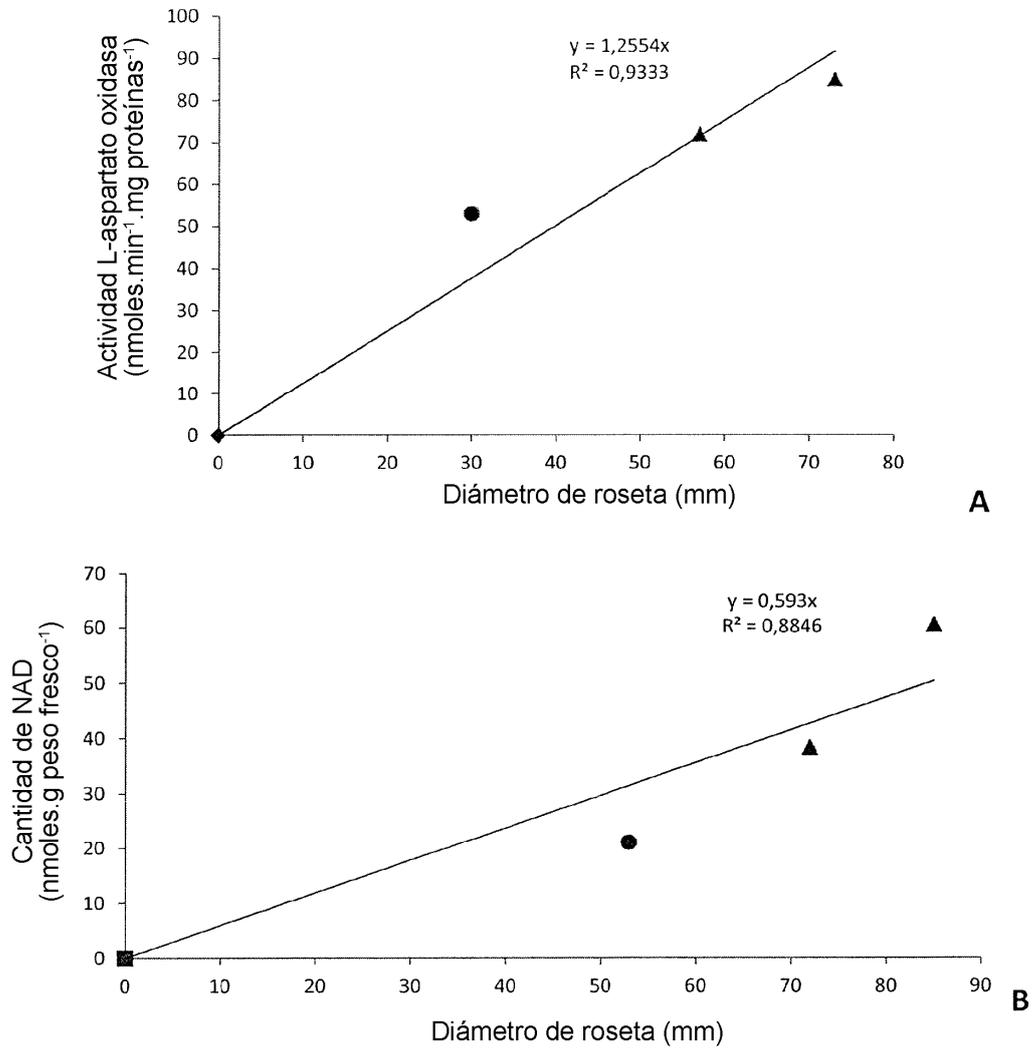


Figura 9



Figura 10

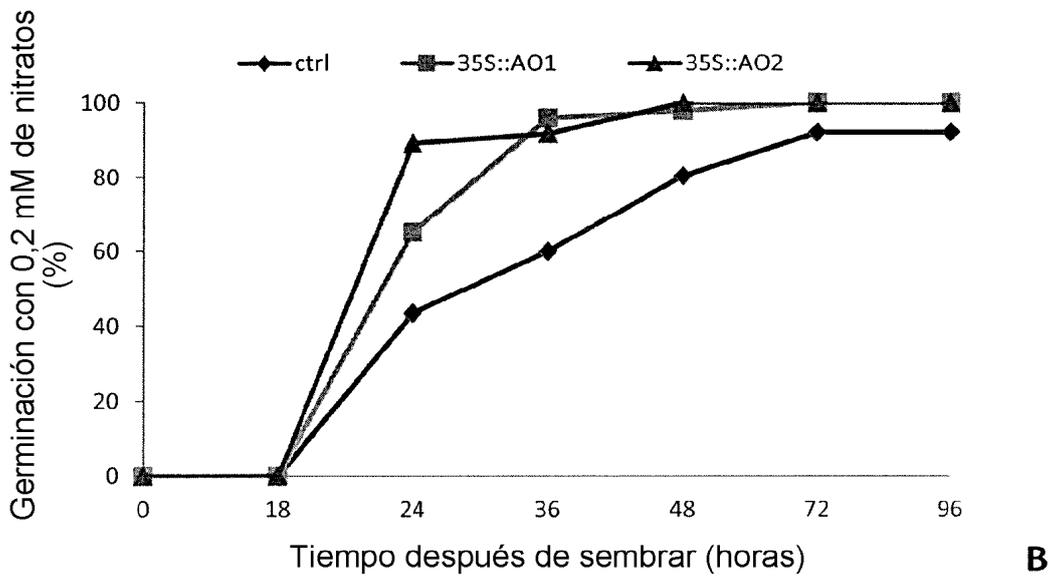
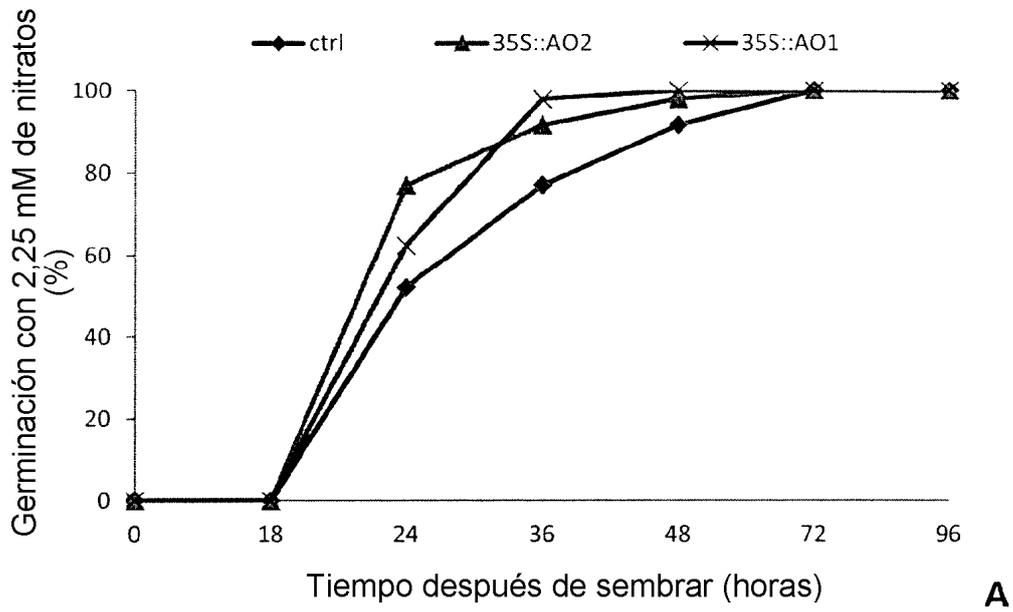


Figura 11

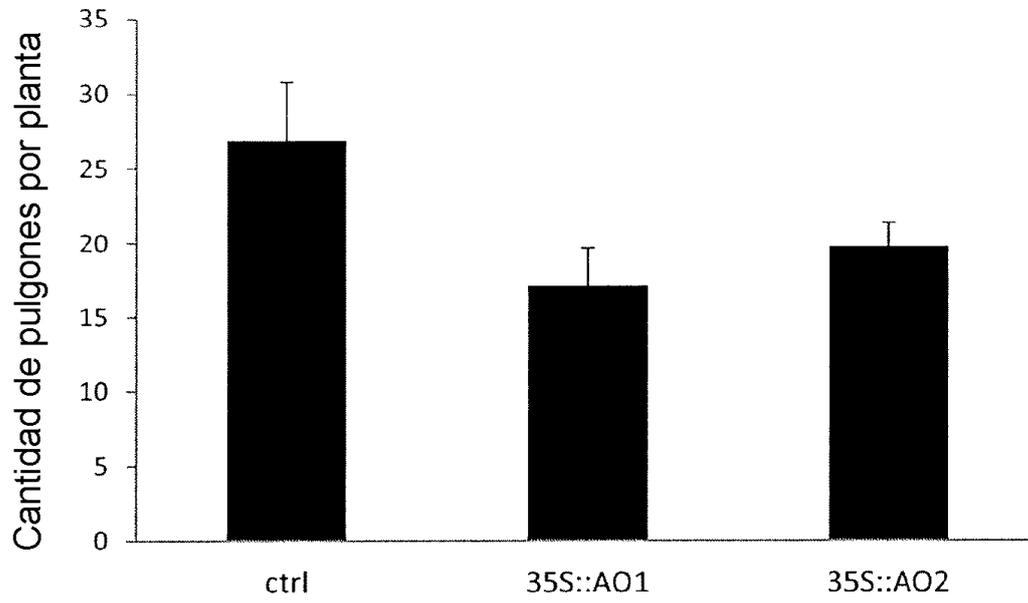


Figura 12