



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 347 399**

② Número de solicitud: 200802652

⑤ Int. Cl.:
A01N 33/24 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 3/04 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **18.09.2008**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **28.10.2010**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
28.10.2010

⑦ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 35 %)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) (Titular al 65 %)

⑦ Inventor/es: **Salinas Muñoz, Julio;**
Catala Rodríguez, Rafael y
López Cobollo, Rosa

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Planta transgénica RCI5 resistente al frío y estrés salino productora de TMAO, elementos necesarios para su obtención y uso de composiciones que contienen TMAO para inducir tolerancia al frío y estrés salino.**

⑤ Resumen:

Planta transgénica RCI5 resistente al frío y estrés salino productora de TMAO, elementos necesarios para su obtención y uso de composiciones que contienen TMAO para inducir tolerancia al frío y estrés salino.

La presente invención describe una planta transgénica resistente al frío y al estrés salino basada en el uso de un nuevo gen, el gen RCI5, codificante de una enzima monoxigenasa que induce la aparición de TMAO. Además la invención proporciona secuencia de nucleótidos, vectores y células necesarias para llevar a cabo el procedimiento para obtener dichas plantas transgénicas. Finalmente, se añade el uso de composiciones que contienen TMAO para la mejora de la tolerancia al estrés salino de las plantas afectadas mediante la aplicación exógena de dichas soluciones sobre la planta o semilla, por ejemplo pulverización o inyección.

ES 2 347 399 A1

DESCRIPCIÓN

Planta transgénica RCI5 resistente al frío y estrés salino productora de TMAO, elementos necesarios para su obtención y uso de composiciones que contienen TMAO para inducir tolerancia al frío y estrés salino.

5

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un método para aumentar la tolerancia al frío y al estrés salino de una planta alterando la expresión del gen *RCI5*. En particular, la presente invención proporciona una planta transgénica que tiene un mayor nivel de la proteína RCI5 en relación con una planta no transgénica, y el uso de composiciones que contienen TMAO para la mejora de la tolerancia al estrés salino de las plantas afectadas, mediante la aplicación de las soluciones que contengan dicho compuesto por cualquier vía que ponga en contacto la composición de la invención con cualquier parte de la planta y/o semillas.

15 **Estado de la técnica**

Las temperaturas de congelación constituyen uno de los principales factores ambientales que limitan el crecimiento, productividad y distribución geográfica de las plantas (Boyer, 1982). Muchas especies de climas templados han adquirido a lo largo de la evolución una respuesta adaptativa que les permite enfrentarse a las temperaturas de congelación. Por medio de esta respuesta, conocida como aclimatación al frío (Levitt, 1980), las plantas adquieren una tolerancia a las temperaturas de congelación después de un tiempo de exposición a temperaturas bajas no congelantes. La aclimatación a frío constituye un ejemplo representativo de la interacción de las plantas con su entorno y de como esta interacción ha condicionado la evolución de algunas especies. El esclarecimiento de los mecanismos moleculares que controlan este proceso adaptativo no es solo interesante desde el punto de vista básico, para entender como crecen y se desarrollan las plantas, sino que además tiene un gran potencial biotecnológico en la obtención de herramientas moleculares para mejorar la tolerancia a la congelación de cultivos muy importantes. Hay que resaltar que, diferentes trabajos han mostrado que la aclimatación a las temperaturas bajas también aumenta la tolerancia de las plantas a otros estreses abióticos como deshidratación y estrés salino. Por tanto, el estudio de la aclimatación a frío debería aportar información esencial de como las plantas responden de manera coordinada a diferentes condiciones ambientales adversas

El proceso de aclimatación a frío es muy complejo y conlleva numerosos cambios a nivel bioquímico y fisiológico, incluyendo cambios en la membrana lipídica (Uemura *et al.*, 1995), síntesis de nuevas proteínas (Kawamura y Uemura, 2003), incremento del contenido endógenos de ABA (Lang *et al.*, 1994), y la acumulación de solutos compatibles (Wanner y Junttila, 1999). Cada vez hay mas pruebas que muestran que la mayoría de estos cambios son controlados a través de una extensa reprogramación de la expresión génica (Salinas 2002; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006; Welling y Palva, 2006). De hecho, estudios recientes usando la tecnología de microarrays han revelado que la expresión de cientos de genes cambia en respuesta a las temperaturas bajas, indicando que la aclimatación a frío esta mediada por múltiples rutas (Fowler y Thomashow, 2002; Kreps *et al.*, 2002; Seki *et al.*, 2002; Maruyama *et al.*, 2004; Vogel *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005; Oono *et al.*, 2006; Matsui *et al.*, 2008; Chawade *et al.*, 2007). Muchos de estos genes también son regulados por deshidratación y salinidad (Matsui *et al.*, 2008), confirmando a nivel molecular la estrecha relación existente en las repuestas de la planta a estos estreses abióticos. Como ejemplo de esto sirve un grupo de genes que contienen el motivo CCGAC en su promotor, que es la secuencia central del elemento de regulación en cis CRT/DRE (C-repeat/dehydration-responsive element) (Baker *et al.*, 1994; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994). El motivo CCGAC es suficiente para mediar la respuesta de la expresión génica a frío, deshidratación y estrés salino (Baker *et al.*, 1994; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994), e interacciona específicamente con la familia de factores transcripcionales denominados CBF/DREB (C-repeat Binding Factor/DRE Binding protein) (Stockinger *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998). Tres genes correspondientes a miembros de esta familia (CBF1/DREB1B, CBF2/DREB1C, CBF3/DREB1A) son inducidos rápidamente por temperaturas bajas (Gilmour *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998; Medina *et al.*, 1999), mientras que la expresión de otros dos (DREB2A, DREB2B) responde principalmente a deshidratación y estrés salino (Liu *et al.*, 1998).

Desafortunadamente, sin embargo, a pesar del gran número de genes que se han identificado cuya expresión es regulada por frío, las funciones celulares y metabólicas de la mayoría de los mismos, así como su implicación en la aclimatación a frío, son todavía desconocidos. El análisis de las secuencias de algunos de estos genes sugiere que deben estar implicados en la protección de la célula produciendo proteínas funcionales, mientras que otros genes codificarían proteínas con alguna función en la regulación de la expresión génica y en la transmisión de la señal (Fowler y Thomashow, 2002; Kreps *et al.*, 2002; Seki *et al.*, 2002; Maruyama *et al.*, 2004; Vogel *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005; Oono *et al.*, 2006; Matsui *et al.*, 2008; Chawade *et al.*, 2008). Las proteínas funcionales incluyen enzimas para la producción de osmolitos compatibles, enzimas relacionadas con el quenching de especies reactivas de oxígeno (ROS), chaperonas que protegerían las proteínas y las membranas, y canales iónicos y de agua para el mantenimiento de la homeostasis iónica y del agua. Entre las proteínas reguladoras, además de los factores de transcripción, se encuentran proteínas de unión a RNA, de unión a calcio, proteínas kinasas y fosfatasas, encimas implicadas en el reciclaje de fosfoinositoles y otras moléculas señalizadoras (Matsui *et al.*, 2008). La caracterización de la función de los genes regulados por frío y de su implicación en el proceso de aclimatación debería contribuir al entendimiento de los mecanismos que gobiernan este proceso adaptativo.

Estreses abióticos ambientales, como las temperaturas de congelación y el estrés salino, se encuentran entre los problemas más importantes para una agricultura sostenible a nivel mundial. En los últimos años, se han realizado grandes esfuerzos para entender la respuesta a nivel molecular a estos estreses, lo cual ha facilitado la identificación de genes implicados en la tolerancia a las temperaturas de congelación y al estrés salino (Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2007). Sin embargo, aun se ha de aclarar como son percibidas las señales físicas y como son convertidas en señales bioquímicas.

Descripción de la invención

Descripción breve

Un aspecto de la invención lo constituye una planta transgénica tolerante al frío y al estrés salino, en adelante planta transgénica RCI5 de la invención, que comprende una secuencia de nucleótidos que permite la expresión de una proteína con actividad monooxigenasa (FMO), seleccionada del siguiente grupo:

- i.- la secuencia de nucleótidos del gen RCI5 de SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma; y
- ii.- una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a).

Un aspecto particular de la presente invención lo constituye una planta transgénica de la presente invención en la que la secuencia de nucleótidos, que permite la expresión de una proteína con actividad monooxigenasa (FMO), es el gen RCI5 de SEQ ID NO: 1. Una realización particular de ésta es la planta transgénica de *Arabidopsis RCI5-OE* generada en la presente invención (ver Ejemplo 1.2 y Materiales y Métodos).

Otro aspecto de la invención lo constituye un procedimiento de obtención de la planta transgénica RCI5, en adelante procedimiento de obtención de una planta transgénica de la invención, que consiste en la introducción en una planta de una secuencia de nucleótidos constituida por:

- i.- una secuencia de nucleótidos codificante de proteína con actividad monooxigenasa (FMO), seleccionada del siguiente grupo:
 - la secuencia de nucleótidos del gen RCI5 de SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma; o una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a), y
 - ii.- una secuencia de nucleótidos promotora que permite y regula la expresión de la secuencia de i.- y la aparición de una proteína con actividad monooxigenasa en el interior de la célula.

Una realización particular de la presente invención lo constituye un procedimiento de obtención de plantas de la invención que comprende los siguientes pasos:

- a) obtención de un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos del gen RCI5 SEQ ID NO: 1,
- b) obtención de microorganismos portadores del vector a), y
- c) transformación de las plantas con el vector de a) o con el microorganismo de b).

Otro aspecto de la presente invención lo constituye una secuencia de nucleótidos, en adelante secuencia de la presente invención, que permite la expresión de una proteína con actividad monooxigenasa en las células de planta y que está constituida por una de las posibilidades siguientes:

- a) una secuencia de nucleótidos codificante de una proteína con actividad monooxigenasa (FMO), seleccionada del siguiente grupo: la secuencia de nucleótidos del gen RCI5 de SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma; o una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a), con o sin
- b) una secuencia de nucleótidos promotora que permite y regula la expresión de la secuencia de a) y la aparición de una proteína con actividad monooxigenasa en el interior de la célula.

Otro aspecto particular de la presente invención lo constituye una secuencia de nucleótidos de la invención en la que la secuencia de nucleótidos codificante de una proteína con actividad monooxigenasa está constituida por la secuencia de nucleótidos RCI5 de SEQ ID NO: 1, un fragmento de la misma o una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definidas anteriormente.

ES 2 347 399 A1

Otro aspecto particular de la presente invención lo constituye una secuencia de nucleótidos de la invención en la que la secuencia de nucleótidos promotora es cualquier secuencia de nucleótidos promotora capaz de regular la expresión génica en plantas como por ejemplo, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, un promotor fuerte constitutivo, como por ejemplo el promotor del virus del mosaico 35S, o un promotor que se exprese en respuesta a distintos tipos de estrés abiótico, como por ejemplo el del gen *RD29A* (Kasuga *et al.*, 1999)

La invención también se refiere a un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos *RCI5* de la invención, en adelante vector de expresión de la presente invención, y que permite la transformación o transfección de microorganismos y células y la posterior obtención de las plantas transgénicas de la invención. Como realizaciones particulares del vector de expresión de la invención se han generado los vectores *GST::RCI5* (ver Ejemplo 1) y el vector *35S::RCI5* (ver ejemplo 2).

Otro aspecto de la invención lo constituye un microorganismo o célula, en adelante célula de la invención, que contiene la secuencia de nucleótidos *RCI5* de la invención o el vector de expresión de la invención.

Otro aspecto más particular de la invención lo constituye una semilla de una planta que comprende una secuencia de nucleótidos, codificante de una proteína con actividad monooxigenasa, constituida por la secuencia de nucleótidos *RCI5* de SEQ ID NO: 1, un fragmento de la misma o una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definidas anteriormente.

Finalmente, otro aspecto de la presente invención es el uso de las secuencias de nucleótidos, vectores de expresión, células transformadas, y del procedimiento de la presente invención para la obtención de plantas transgénicas de interés comercial.

Además, otro aspecto de la invención se basa en el uso de una composición por ejemplo, acuosa, que comprende el compuesto óxido de trimetilamina (TMAO) o un derivado del mismo, en adelante uso de una composición de la invención, para inducir tolerancia al estrés salino y al frío en las plantas y/o semillas.

Otro aspecto particular de la presente invención se basa en el uso de una composición de la invención donde la composición acuosa comprende el compuesto TMAO en una concentración comprendida entre 1 μ M y 100 mM, preferentemente entre 50 μ M y 1 mM, y más preferentemente a 100 μ M.

Una realización particular de la presente invención lo constituye el uso de una composición de la invención en el que la concentración de TMAO es de 100 μ M.

La concentración de los componentes activos de las composiciones dependerá del tipo de planta, fase de desarrollo de la misma, así como de la frecuencia y forma de aplicación de las composiciones.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el uso de una composición de la invención para inducir tolerancia al estrés salino en las plantas mediante su aplicación a la parte aérea mediante pulverización.

Los principios fisiológicos del transporte de los compuestos absorbidos por las hojas mediante pulverización, son similares a los que ingresan en las plantas por la absorción vía radicular, sin embargo, el movimiento de los compuestos aplicados sobre las hojas no es el mismo en tiempo y forma que el que se realiza desde las raíces al resto de la planta. La absorción foliar es más efectiva cuando las condiciones de absorción desde el suelo son adversas como por ejemplo en caso de sequía, estrés salino, temperaturas extremas u otros estreses. Además, es mucho más fácil obtener una distribución uniforme, a diferencia de la aplicación de granulados o en mezclas físicas.

Otro aspecto particular de la presente invención lo constituye el uso de una composición de la invención para inducir tolerancia al estrés salino y al frío en las plantas mediante su aplicación al tallo por inyección.

Otro aspecto particular de la presente invención lo constituye el uso de una composición de la invención que se aplica al suelo u otro sustrato de cultivo, al agua de riego (o solución de cultivo) o por inmersión del sistema radicular de las plantas y/o de semillas.

La aplicación de las composiciones acuosas por medio de la inmersión de la parte radicular de la planta así como de semillas se realiza por un tiempo y con una concentración que depende del tipo de planta, estado de desarrollo así como de la frecuencia y forma de aplicación de las composiciones. En el caso de semillas que requieran un tratamiento especial de escarificación o eliminación de determinadas cubiertas para facilitar su germinación, el proceso de inmersión en las composiciones acuosas de la presente invención, se podrá realizar de forma más efectiva después de la eliminación de las cubiertas para facilitar la absorción de los compuestos activos. Asimismo, también se podrán sumergir las semillas en cualquier estadio de germinación.

Las formas de aplicación que se han citado hasta ahora no limitan otro tipo de aplicaciones de las composiciones que contienen TMAO a las plantas.

Los usos de una composición de TMAO descritos anteriormente pueden comprender además un aditivo seleccionado de entre fertilizantes orgánicos o inorgánicos, insecticidas, nematocidas, fungicidas, bactericidas o herbicidas.

De esta manera, al aplicar las composiciones que contienen TMAO junto con aditivos, ya sea para aportar nutrientes o para tratar determinadas infecciones o plagas, se consigue no aumentar los costos de los tratamientos al hacerlo de forma coordinada.

5

Descripción detallada

La presente invención se enfrenta al problema de proporcionar nuevas plantas transgénicas capaces de adaptarse a situaciones limitantes del medio ambiente, preferentemente por su tolerancia al estrés salino y al frío, así como a la necesidad de aportar nuevas composiciones para mejorar la tolerancia de las plantas al estrés.

La solución proporcionada por esta invención se basa en que los inventores han aislado, identificado y caracterizado un nuevo gen que codifica una flavina monooxigenasa (FMO), en adelante *RCI5* (SEQ ID NO: 1), es decir, un nuevo gen *RCI*, que es inducido por estrés salino y el frío. La sobreexpresión constitutiva de la proteína *RCI5* (SEQ ID NO: 2 en *Arabidopsis* condujo a la expresión incrementada de diferentes genes inducibles por estrés, incluyendo el regulon CBF y genes codificantes de proteínas implicadas en la eliminación de especies reactivas de oxígeno, con lo que se provoca una mejora de la tolerancia a la congelación y al estrés salino.

En animales, la monooxigenasas (FMOs) están implicadas en la síntesis de óxido de trimetilamina (TMAO) que funciona como un importante osmoprotector (Yancey *et al.*, 2004). Además, los datos presentados demuestran, por primera vez, que las plantas también contienen TMAO y proteína *RCI5* endógenos involucrados en la biosíntesis de TMAO. De acuerdo con esto, los niveles de TMAO en *Arabidopsis* se incrementan cuando la proteína *RCI5* es sobreexpresada en respuesta a las temperaturas bajas y al NaCl, la cual es capaz de oxidar el metabolito endógeno TMA a TMAO.

El gen *RCI5* se identificó buscando nuevos genes en *Arabidopsis* implicados en la aclimatación al frío. Al igual que otros genes inducidos por frío, el gen *RCI5* está sometido a una compleja regulación. Bajo condiciones controladas, durante estadios tempranos del desarrollo de *Arabidopsis*, su expresión es muy baja y se encuentra limitada al tejido vascular de todos los tejidos. En plantas adultas, sin embargo, *RCI5* únicamente se expresa, y en niveles muy bajos, en las venas de las hojas. En respuesta a temperaturas bajas, los niveles de expresión de *RCI5* se inducen de forma intensa, principalmente en la vasculatura de las hojas. Esta inducción no se ve afectada en mutantes deficientes en ABA ni en plantas que no expresan *CBFs*, indicando que la regulación de *RCI5* por frío se lleva a cabo mediante vías de transducción de señales independientes de ABA y los *CBFs*. *RCI5* es además inducido por el tratamiento con NaCl a través de una vía independiente de ABA. Los niveles de expresión inducidos por NaCl son idénticos al los causados por las temperaturas bajas. Es interesante el hecho de que el efecto del NaCl no es debido a su componente osmótico sino que es específico del iónico. La deshidratación, sin embargo, no tiene efecto alguno en la expresión de *RCI5*. El genoma de *Arabidopsis* contiene mas de 50 genes cuya expresión es regulada, al igual que *RCI5*, por las temperaturas bajas y por NaCl pero no por deshidratación (Fowler y Thomashow, 2002; Kreps *et al.*, 2002; Seki *et al.*, 2002; Maruyama *et al.*, 2004; Vogel *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005; Oono *et al.*, 2006; Matsui *et al.*, 2008), poniendo de manifiesto la existencia de una importante interacción entre las vías de señalización de frío y sal.

La sobreexpresión constitutiva de *RCI5* incrementa de forma significativa la tolerancia a la congelación en *Arabidopsis*, antes y después de la aclimatización al frío, lo que sugiere fuertemente que *RCI5* regula de forma positiva tanto la respuesta a la aclimatización al frío como la tolerancia a la congelación. Más aún, plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan la proteína *RCI5* son significativamente más tolerantes a altas concentraciones de NaCl y LiCl que las plantas salvajes originales, demostrando que *RCI5* actúa como un regulador positivo en la tolerancia al estrés salino en *Arabidopsis*. Por el contrario, la proteína *RCI5* parece que no está implicado en la tolerancia de esta especie al estrés producido por la deshidratación y por el tratamiento con manitol. Por lo tanto, los resultados de la presente invención indican que *RCI5* no juega un papel general en el desarrollo de tolerancia en plantas a estrés abiótico, sino que presenta una función más específica en la tolerancia al frío y al estrés salino, lo que se corresponde con el hecho que la expresión de la proteína *RCI5* se induce como respuesta a bajas temperaturas, NaCl y LiCl, pero no por deshidratación ni por manitol.

Además, los datos de la presente invención demuestran que la proteína *RCI5* regula positivamente la expresión génica inducida por estrés. De hecho, bajo condiciones control y/o de estrés (frío y estrés salino), las plantas *RCI5-OE* muestran niveles altos de transcritos correspondientes a diferentes genes inducibles por estrés, entre los que se encuentran los *CBFs*, *KINI*, *LTI78*, *COR15A*, *COR47*, *CAT2* y *SOD2*. Por contra, la expresión de *RAB18* y *RCIIA* no esta alterada en las líneas *RCI5-OE*, evidenciando de nuevo que la proteína *RCI5* no opera como un regulador positivo general de la expresión génica inducida por estrés. Por otro lado, es importante destacar que se ha descrito que la expresión de *CBFs*, *KINI*, *LTI78*, *COR15A*, *COR47*, *CAT2* y *SOD2* es capaz de mejorar la supervivencia a estrés abiótico (Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998; Kasuga *et al.*, 1999; Gilmour *et al.*, 2000; Catala *et al.*, 2003; Maruyama *et al.*, 2004; Gilmour *et al.*, 2004; Novillo *et al.*, 2004; McKersie *et al.*, 1996; Van Breusegem *et al.*, 1998; Apel y Hirt, 2004). Por tanto, el incremento de la tolerancia a las temperaturas de congelación, antes y después de la aclimatización a frío, y al estrés salino mostrado por las plantas *RCI5-OE* debe ser atribuido a la alta expresión de estos genes.

El gen *RCI5* codifica una proteína con actividad monooxigenasa como se evidencia por la caracterización de la proteína recombinante obtenida y el análisis de la oxidación de NADPH en extractos de las plantas transgénicas *RCI5-*

OE. Sin embargo, esta proteína contiene todos los motivos típicos característicos de las enzimas FMO, incluyendo un punto de unión a FAD, un motivo identificativo de FMO, y un dominio de unión a NADPH (Cashman, 1994). Los motivos FMOs se han descrito en distintos organismos, desde bacterias a humanos, siendo los de origen eucariota los mejor caracterizados. Este motivo FMO se une al cofactor FAD y cataliza la oxigenación de metabolitos endógenos que contienen nitrógeno nucleofílico, fósforo, azufre, o selenio a expensas de NADPH. En plantas, se ha descrito que las proteínas FMOs juegan un papel en la biosíntesis de auxinas en petunia y Arabidopsis (Zhao *et al.*, 2001; Tobeña-Santamaria *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2007). Además, en Arabidopsis, las FMOs son requeridas en la respuesta de defensa frente a patógenos (Bartsch *et al.*, 2006; Koch *et al.*, 2006; Mishina y Zeier, 2006) y se han implicado en la biosíntesis de glucosinolatos (Hansen *et al.*, 2007). Los resultados descritos en esta invención indican claramente que estos dominios FMOs de la proteína de la invención RCI5 en plantas presentan una función en respuestas al estrés abiótico, principalmente en respuestas al estrés por frío o estrés salino. Finalmente, RCI5 presenta una propiedad funcional en las respuestas de la planta a patógenos aunque deberá ser investigado en un futuro.

Por último, la aplicación exógena del compuesto TMAO reproduce parcialmente los perfiles de expresión génica inducida por bajas temperaturas y estrés salino, así como los fenotipos originados por la sobreexpresión de RCI5 (ver Ejemplo 3), indicando que el TMAO es una nueva molécula señalizadora en plantas que media la tolerancia a frío y al estrés salino mediante la regulación positiva de la expresión de genes inducidos por estrés. Hay que señalar que los fenotipos de tolerancia inducidos por el TMAO son muy similares a los manifestados por las plantas transgénicas RCI5-OE, como cabría esperar de estar RCI5 implicado en la biosíntesis de TMAO.

En resumen, los resultados presentados en la presente invención son la primera evidencia de que las plantas también contienen el metabolito TMAO, cuya síntesis está inducida por la proteína RCI5 y que las plantas transgénicas RCI5-OE que contienen mayores niveles de RCI5 son más tolerantes al frío y al estrés salino que las plantas silvestres; y que la aplicación exógena en plantas del compuesto TMAO las protege del frío y del estrés salino.

Por lo tanto, un aspecto de la invención lo constituye una planta transgénica tolerante al frío y al estrés salino, en adelante planta transgénica RCI5 de la invención, que comprende una secuencia de nucleótidos que permite la expresión de una proteína con actividad monooxigenasa (FMO), seleccionada del siguiente grupo:

- i.- la secuencia de nucleótidos del gen RCI5 de SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma; y
- ii.- una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a).

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análoga” pretende incluir a cualquier secuencia de nucleótidos que pueda ser aislada o construida en base a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID N01, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia.

En general, una secuencia de nucleótidos análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos identificada como la SEQ ID NO: 1. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad, a nivel de nucleótidos, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.

Un aspecto particular de la presente invención lo constituye una planta transgénica de la presente invención en la que la secuencia de nucleótidos, que permite la expresión de una proteína con actividad monooxigenasa (FMO), es el gen RCI5 de SEQ ID NO: 1. Una realización particular de ésta es la planta transgénica de Arabidopsis RCI5-OE generada en la presente invención (ver Ejemplo 1.2 y Materiales y Métodos).

Además, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de mejora de la tolerancia de plantas a salinidad y frío mediante ingeniería genética de plantas. La técnica ha sido desarrollada en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* y puede ser aplicada a plantas de interés agronómico y comercial -entre otras, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención: arroz, trigo, soja, maíz, tomate, tabaco, judía, así como diferentes especies frutales (naranja, limonero, etc.)- mediante distintas técnicas de ingeniería genética conocidas por un experto en la materia. Ello es posible porque las secuencias de nucleótidos ortólogas u homólogas de la secuencia descrita en la presente invención (SEQ ID NO: 1) están conservados en plantas de interés agronómico y existe tecnología adecuada para su aislamiento y uso en ingeniería genética de plantas.

Secuencias de nucleótidos homólogas a la descrita en la presente invención (SEQ ID NO: 1) pueden encontrarse como formas homólogas en otras especies de plantas superiores de interés comercial donde pueden estar de forma natural o en otro caso, también podrían estar como resultado de un proceso de transformación génica en el que el organismo transformado reproduzca dichas moléculas de ADN. Estas formas homólogas de la invención pueden ser aisladas, mediante técnicas convencionales, a partir del ADN de cualquier planta que las contenga y mediante el empleo de sondas o de oligonucleótidos, preparados gracias a la información de las secuencias de nucleótidos de dichas moléculas de ADN proporcionadas en esta invención, por cualquier experto en la materia.

ES 2 347 399 A1

Así, otro aspecto de la invención lo constituye un procedimiento de obtención de la planta transgénica *RCI5*, en adelante procedimiento de obtención de una planta transgénica de la invención, que consiste en la introducción en una planta de una secuencia de nucleótidos constituida por:

5 i.- una secuencia de nucleótidos codificante de proteína con actividad monooxigenasa (FMO), seleccionada del siguiente grupo:

- la secuencia de nucleótidos del gen *RCI5* de SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma; o una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a), y

10

ii.- una secuencia de nucleótidos promotora que permite y regula la expresión de la secuencia de i.- y la aparición de una proteína con actividad monooxigenasa en el interior de la célula.

15 Una realización particular de la presente invención lo constituye un procedimiento de obtención de plantas de la invención que comprende los siguientes pasos:

a) obtención de un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos del gen *RCI5* SEQ ID NO: 1,

20

b) obtención de microorganismos portadores del vector a), y

c) transformación de las plantas con el vector de a) o con el microorganismo de b).

25 Las secuencias de nucleótidos, vectores de expresión y células o microorganismos transformados, desarrollados y necesarios para la puesta en práctica del procedimiento de obtención de las plantas transgénicas de la presente invención, así como su empleo para la producción de dichas plantas, constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

30 Así, otro aspecto de la presente invención lo constituye una secuencia de nucleótidos, en adelante secuencia de la presente invención, que permite la expresión de una proteína con actividad monooxigenasa en las células de planta y que está constituida por una de las posibilidades siguientes:

35 b) una secuencia de nucleótidos codificante de una proteína con actividad monooxigenasa (FMO), seleccionada del siguiente grupo: la secuencia de nucleótidos del gen *RCI5* de SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma; o una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a), con o sin

b) una secuencia de nucleótidos promotora que permite y regula la expresión de la secuencia de a) y la aparición de una proteína con actividad monooxigenasa en el interior de la célula.

40

Otro aspecto particular de la presente invención lo constituye una secuencia de nucleótidos de la invención en la que la secuencia de nucleótidos codificante de una proteína con actividad monooxigenasa está constituida por la secuencia de nucleótidos *RCI5* de SEQ ID NO: 1, un fragmento de la misma o una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definidas anteriormente.

45

Otro aspecto particular de la presente invención lo constituye una secuencia de nucleótidos de la invención en la que la secuencia de nucleótidos promotora es cualquier secuencia de nucleótidos promotora capaz de regular la expresión génica en plantas como por ejemplo, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, un promotor fuerte constitutivo, como por ejemplo el promotor del virus del mosaico 35S, o un promotor que se exprese en respuesta a distintos tipos de estrés abiótico, como por ejemplo el del gen *RD29A* (Kasuga *et al*, 1999)

50

La secuencia de nucleótidos *RCI5* de la invención puede ser utilizada, en general, en la generación de un vector de expresión que permite la expresión de estas proteínas en una amplia gama de células huésped.

55

Por lo tanto, la invención también se refiere a un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos *RCI5* de la invención, en adelante vector de expresión de la presente invención, y que permite la transformación o transfección de microorganismos y células y la posterior obtención de las plantas transgénicas de la invención. Como realizaciones particulares del vector de expresión de la invención se han generado los vectores *GST::RCI5* (ver Ejemplo 1) y el vector *35S::RCI5* (ver ejemplo 2).

60

En general, el vector de expresión de la presente invención comprende, al menos, una secuencia de la invención y, al menos, un promotor que dirige la transcripción del gen de interés (en este caso se indica el cDNA del gen como secuencia de nucleótidos codificante representativa del propio gen) al que está operativamente enlazado, y otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción del gen de interés y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), etc. Ejemplos de vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso concreto entre plásmi-

65

ES 2 347 399 A1

dos de expresión de plantas (Rothstein *et al*, 1987; Potrykus, I, 1991), virus ("Plant Virology Protocols" From Virus Isolation to Transgenic Resistance Edited by: Gary D. Foster University of Bristol, Bristol, UK Published: 1998), que pueden contener, además, un origen bacteriano o de levadura de replicación para que pueda ser amplificado en bacterias o levaduras, así como un marcador utilizable para seleccionar las células transfectadas diferente al gen o genes de interés. Para la transformación de las plantas se pueden utilizar diferentes métodos - vectores plasmidicos, liposomas, electroporación, microinyección, etc - descritos en diversos manuales (ver por ejemplo: (Plant Gene Transfer and Expression Protocols Jones, Heddwyn University of Hertfordshire, Hatfield, UK. Human Press Publishers). La elección del vector dependerá de la célula hospedadora y de la planta en la que se va a introducir posteriormente.

Otro aspecto de la invención lo constituye un microorganismo o célula, en adelante célula de la invención, que contiene la secuencia de nucleótidos RCI5 de la invención o el vector de expresión de la invención.

Otro aspecto más particular de la invención lo constituye una semilla de una planta que comprende una secuencia de nucleótidos, codificante de una proteína con actividad monooxigenasa, constituida por la secuencia de nucleótidos RCI5 de SEQ ID NO: 1, un fragmento de la misma o una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definidas anteriormente.

Finalmente, otro objeto de la presente invención es el uso de las secuencias de nucleótidos, vectores de expresión, células transformadas, y del procedimiento de la presente invención para la obtención de plantas transgénicas de interés comercial.

Además, otro aspecto de la invención se basa en el uso de una composición por ejemplo, acuosa, que comprende el compuesto óxido de trimetilamina (TMAO) o un derivado del mismo, en adelante uso de una composición de la invención, para inducir tolerancia al estrés salino y al frío en las plantas y/o semillas.

Otro aspecto particular de la presente invención se basa en el uso de una composición de la invención donde la composición acuosa comprende el compuesto TMAO en una concentración comprendida entre 1 μ M y 100 mM, preferentemente entre 50 μ M y 1 mM, y más preferentemente a 100 μ M.

Una realización particular de la presente invención lo constituye el uso de una composición de la invención en el que la concentración de TMAO es de 100 μ M.

La concentración de los componentes activos de las composiciones dependerá del tipo de planta, fase de desarrollo de la misma, así como de la frecuencia y forma de aplicación de las composiciones.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el uso de una composición de la invención para inducir tolerancia al estrés salino en las plantas mediante su aplicación a la parte aérea mediante pulverización.

Los principios fisiológicos del transporte de los compuestos absorbidos por las hojas mediante pulverización, son similares a los que ingresan en las plantas por la absorción vía radicular, sin embargo, el movimiento de los compuestos aplicados sobre las hojas no es el mismo en tiempo y forma que el que se realiza desde las raíces al resto de la planta. La absorción foliar es más efectiva cuando las condiciones de absorción desde el suelo son adversas como por ejemplo en caso de sequía, estrés salino, temperaturas extremas u otros estreses. Además, es mucho más fácil obtener una distribución uniforme, a diferencia de la aplicación de granulados o en mezclas físicas.

Otro aspecto particular de la presente invención lo constituye el uso de una composición de la invención para inducir tolerancia al estrés salino y al frío en las plantas mediante su aplicación al tallo por inyección.

Otro aspecto particular de la presente invención lo constituye el uso de una composición de la invención que se aplica al suelo u otro sustrato de cultivo, al agua de riego (o solución de cultivo) o por inmersión del sistema radicular de las plantas y/o de semillas.

La aplicación de las composiciones acuosas por medio de la inmersión de la parte radicular de la planta así como de semillas se realiza por un tiempo y con una concentración que depende del tipo de planta, estado de desarrollo así como de la frecuencia y forma de aplicación de las composiciones. En el caso de semillas que requieran un tratamiento especial de escarificación o eliminación de determinadas cubiertas para facilitar su germinación, el proceso de inmersión en las composiciones acuosas de la presente invención, se podrá realizar de forma más efectiva después de la eliminación de las cubiertas para facilitar la absorción de los compuestos activos. Asimismo, también se podrán sumergir las semillas en cualquier estadio de germinación.

Las formas de aplicación que se han citado hasta ahora no limitan otro tipo de aplicaciones de las composiciones que contienen TMAO a las plantas.

Los usos de una composición de TMAO descritos anteriormente pueden comprender además un aditivo seleccionado de entre fertilizantes orgánicos o inorgánicos, insecticidas, nematocidas, fungicidas, bactericidas o herbicidas. De esta manera, al aplicar las composiciones que contienen TMAO junto con aditivos, ya sea para aportar nutrientes o para tratar determinadas infecciones o plagas, se consigue no aumentar los costos de los tratamientos al hacerlo de forma coordinada.

Descripción de las figuras

Figura 1

5 *RCI5* es regulado transcripcionalmente por frío y NaCl en hojas y flores por una vía independiente de ABA y los CBFs

En las hibridaciones de tipo Northern se utilizó la sonda de *RCI5* y *GUS*. Cada carril contiene 20 μ g de RNA total. Como controles de tratamiento y carga se emplearon las sondas correspondientes a los genes *KINI* y *18S rRNA*, respectivamente.

10

a) RNAs procedentes de plantas de 3 semanas crecidas a 20°C (C), o expuestas adicionalmente a 4°C los tiempos indicados.

15

b) RNAs procedentes de raíces, hojas, tallos, flores y silicuas de plantas de 8 semanas crecidas a 20°C (C), o expuestas 1 día adicional a 4°C.

c) RNAs procedentes de plantas *Ler*, *aba1-1*, *Col*, *cbf2*, *CBF1-AS3* de 3 semanas crecidas a 20°C (C), expuestas 1 día adicional a 4°C (4°C), o tratadas con NaCl 250 mM recogiendo el material un día mas tarde (NaCl).

20

d) RNAs procedentes de plantas de 3 semanas crecidas a 20°C (C), expuestas un día adicional a 4°C (4°C), regadas con NaCl 250 mM recogiendo el material 24 h después (NaCl), deshidratadas hasta perder el 50% de su peso fresco (D), regadas con LiCl 20 mM (LiCl) o manitol 500 mM (Manitol) recogiendo el material a las 24 h.

25

e) RNAs procedentes de plantas transgénicas *RCI5::GUS* de 3 semanas crecidas a 20°C (C), expuestas 1 día adicional a 4°C (4°C) o regadas con NaCl 250 mM (NaCl) recogiendo el material a las 24 h.

30

f) Localización histoquímica de la actividad GUS en semillas, plántulas y distintos órganos de plantas transgénicas *RCI5::GUS* de 8 semanas crecidas a 20°C (C), o expuestas un día adicional a 4°C (4°C). En la respuesta a deshidratación se obtuvo el mismo patrón de actividad GUS que las plantas control (C). En el caso de tratamiento con NaCl se obtuvo el mismo patrón que el mostrado en las plantas expuestas a 4°C (4°C).

Figura 2

35 *RCI5* tiene actividad monooxigenasa

a) Tinción con Coomassie de un gel SDS-PAGE al 12% conteniendo las distintas fracciones obtenidas al purificar *RCI5*. El primer carril incluye un extracto de bacterias conteniendo el vector de expresión de proteínas (pGEX), el segundo carril incluye un extracto de bacterias conteniendo el plásmido de expresión *pGEX::RCI5* (*pGEX-RCI5*), el tercer carril incluye la proteína de fusión GST::*RCI5* después de ser purificada por medio de una columna de glutation sepharosa 4B (GST-*RCI5*), y el ultimo carril contiene la proteína *RCI5* purificada a partir de GST::*RCI5* mediante digestión con trombina (*RCI5*). Cada carril contiene 20 μ g de proteína.

b) Medidas de actividad monooxigenasa de las fracciones proteicas que se muestran en el panel (a). La gráfica muestra los μ moles de NADPH consumidos por hora a 24°C. En todos los casos, los experimentos se realizaron con 100 μ g de proteína. Los datos corresponden a medias \pm SE de tres experimentos independientes.

c) Niveles de mRNAs de *RCI5* en plantas transgénicas *35S::RCI5*. Las hibridaciones de tipo Northern fueron realizadas con RNA total (20 μ g) aislado de plantas de Arabidopsis de 3 semanas y cuatro líneas transgénicas independientes (1T-4T) conteniendo la fusión *35S::RCI5* (*RCI5-OE*) crecidas en condiciones control. Como control de carga se empleó la sondas correspondiente a al gen *18S rRNA*.

d) La gráfica muestra el NADPH consumido por hora a 24°C en plantas de Arabidopsis control (WT) y en las cuatro líneas transgénicas (1T-4T) que contienen la fusión *35S::RCI5* (*RCI5-OE*) crecidas en condiciones control.

55

Figura 3

60 *Las plantas 35S::RCI5* tienen mayor tolerancia a la congelación y al estrés salino que *Col*

a) Porcentaje de plantas *Col* y transgénicas *35S::RCI5* (línea 1T1) crecidas durante 2 semanas a 20°C que sobreviven tras ser expuestas 6 h a distintas temperaturas de congelación. Los datos corresponden a medias \pm SE de tres experimentos independientes, con un número mínimo de 50 plantas de cada genotipo por experimento.

b) Porcentaje de plantas *Col* y transgénicas *35S::RCI5* (línea 1T1) crecidas durante 2 semanas a 20°C y aclimatadas durante 7 días a 4°C, que sobreviven tras ser expuestas 6 h a distintas temperaturas de congelación. Los datos corresponden a medias \pm SE de tres experimentos independientes, con un número mínimo de 50 plantas de cada genotipo por experimento.

ES 2 347 399 A1

c) Plantas Col y transgénicas 35S::*RCI5* (Línea 1T1) crecidas 2 semanas a 20°C, después de ser congeladas a -6°C durante 6 h.

5 d) Plantas Col y transgénicas 35S::*RCI5* (Línea 1T1) crecidas 2 semanas a 20°C y aclimatadas durante 7 días a 4°C, después de ser congeladas a -8°C durante 6 h.

10 e) Tolerancia a NaCl, LiCl y Manitol. Número de hojas verdes y porcentaje de peso fresco inicial en plantas Col y transgénicas 35S::*RCI5* (línea 1T1) expuestas a concentraciones crecientes de NaCl (50 mM-200 mM), LiCl (5 mM-20 mM) o manitol (100 mM-400 mM), durante 2 días a cada concentración, respecto a los mismos parámetros en plantas Col a las que no se les ha aplicado el tratamiento. Los datos corresponden a medias \pm SE de tres experimentos independientes, con un número mínimo de 20 plantas de cada genotipo por experimento.

15 f) Plantas Col y transgénicas 35S::*RCI5* (línea 1T1) después de ser expuestas a concentraciones crecientes de NaCl (50 mM-200 mM), LiCl (5 mM-20 mM) o manitol (100 mM-400 mM), durante 2 días a cada concentración.

Figura 4

RCI5 está implicado en la biosíntesis de TMAO en Arabidopsis

20 Las gráficas muestran los μ moles de TMAO por cada kg de peso fresco. Los datos corresponden a medias \pm SE de cinco experimentos independientes y en cada experimento se incluyeron un mínimo de 50 plantas.

25 a) Plantas Col crecidas a 20°C durante 3 semanas y expuestas 1 día adicional a 4°C, regadas con NaCl 250 mM recogiendo el material al cabo de 1 día, o deshidratadas hasta perder el 50% de su peso fresco.

b) Plantas Col y transgénicas 35S::*RCI5* crecidas a 20°C durante 3 semanas.

30 c) Plantas col y transgénicas 35S::*RCI5* crecidas a 20°C durante 3 semanas y expuestas 1 día a 4°C o regadas con NaCl 250 mM recogiendo el material al cabo de un día.

d) μ moles de TMAO obtenidos mediante una reacción *in vitro* usando diferentes concentraciones (50, 100 y 200 μ M) de *RCI5* purificado de *E. coli*.

35 Figura 5

El TMAO media la respuesta de la expresión génica a las temperaturas bajas

40 Hibridaciones de tipo Northern utilizando sondas específicas para (a y c) *KIN1*, *LTI78*, *COR15A*, *COR47*, *RAB18*, *RCIIA*, *CAT2*, *SOD2* y *RCI5* (esta último solo en c); (b y d) *CBF1*, *CBF2* y *CBF3* y *GUS*. Cada carril contiene 20 μ g de RNA total. En todos los casos se usaron sondas específicas para cada gen. Como control de la carga se empleó la sonda correspondiente a *18S rRNA*.

45 a) Hibridaciones tipo Northern con las sondas anteriormente mencionadas de muestras procedentes de plantas Col (WT) y transgénicas 35S::*RCI5* (*RCI5-OE*) crecidas durante 3 semanas a 20°C (C), expuestas 1 día adicional a 4°C o tratadas con NaCl 250 mM recogiendo el material al cabo de 1 día.

50 b) Hibridaciones tipo Northern con las sondas anteriormente mencionadas de muestras procedentes de plantas Col (WT) y transgénicas 35S::*RCI5* (*RCI5-OE*) crecidas durante 3 semanas a 20°C (C), expuestas 3 horas adicionales a 4°C o tratadas con NaCl 250 mM recogiendo el material al cabo de 3 horas.

55 c) Hibridaciones tipo Northern con las sondas anteriormente mencionadas de muestras procedentes de plantas Col crecidas durante 3 semanas a 20°C (C), tratadas con TMAO 100 μ M (TMAO), expuestas a 4°C o tratadas con NaCl 250 mM recogiendo el material al cabo de 1 día.

d) Hibridaciones tipo Northern con las sondas anteriormente mencionadas de muestras procedentes de plantas Col crecidas durante 3 semanas a 20°C (C), tratadas con TMAO 100 μ M (TMAO), expuestas a 4°C o tratadas con NaCl 250 mM recogiendo el material al cabo de 3 horas.

60 Figura 6

El TMAO aumenta la tolerancia a la congelación y al estrés salino

65 a) Porcentaje de plantas Col crecidas a 20°C (C) y tratadas con TMAO 100 μ M 3 días antes de la congelación (TMAO), no aclimatadas (NA) y aclimatadas 7 días a 4°C (A), que sobreviven tras ser expuestas 6 horas a -6°C o -8°C, respectivamente. Los datos corresponden a medias \pm SE de tres experimentos independientes, con un número mínimo de 50 plantas de cada genotipo por experimento.

ES 2 347 399 A1

b) Porcentaje de número de hojas verdes en plantas Col crecidas en MS (C) y Col crecidas en MS suplementado con TMAO 100 μ M (TMAO), expuestas posteriormente a concentraciones crecientes de NaCl (50 mM-200 mM), LiCl (5 mM-20 mM) o manitol (100 mM-400 mM) durante 2 días a cada concentración, respecto al número de hojas verdes en plantas Col a las que no se les ha aplicado el tratamiento. Los datos corresponden a medias \pm SE de tres experimentos independientes, con un número mínimo de 20 plantas de cada genotipo por experimento.

c) Plantas Col crecidas a 20°C (C) y tratadas con TMAO 100 μ M 3 días antes de la congelación (TMAO), no aclimatadas (NA) y aclimatadas 7 días a 4°C (A), que sobreviven tras ser expuestas 6 horas a -6°C o -8°C, respectivamente.

d) Plantas Col crecidas en MS (C) o en MS suplementado TMAO 100 μ M (TMAO) después de ser expuestas a concentraciones crecientes de NaCl (50 mM-200 mM), LiCl (5 mM-20 mM) o manitol (100 mM-400 mM) durante 2 días a cada concentración.

Figura 7

Organización genómica de RCI5

a) Mapa de restricción del fragmento de DNA genómico que contiene el gen *RCI5*. Se indican los sitios de corte de las enzimas de restricción *EcoRI* (E), *XbaI* (X) y *HindIII* (H). ATG indica el inicio de la traducción de *RCI5* y los rectángulos grises sus regiones codificantes. La línea de puntos marca la región utilizada como sonda.

b) Hibridación de tipo Southern con 5 μ g de DNA genómico de *Arabidopsis* digerido con *EcoRI* (E), *XbaI* (X) y *HindIII* (H), utilizando la sonda de *RCI5*. A la derecha se indican los tamaños (en kpb) de las bandas obtenidas.

Figura 8

Medidas de TMAO en plantas de Arabidopsis expuestas a frío o estrés salino

Gráficas representativas que muestran μ moles de TMAO por Kg de peso fresco de plantas de Col de tres semanas crecidas a 20°C y expuestas a 4°C durante diferentes tiempos (0, 6, 12, 24, 48 y 72 horas) (a) o expuestas a diferentes concentraciones de NaCl (50, 100, 150, 200, 250 y 300 mM) durante 1 día (b).

Figura 9

Medidas de TMAO en plantas tratadas con TMAO

Gráficas representativas que muestran μ moles de TMAO por Kg de peso fresco de plantas de Col de tres semanas crecidas a 20°C y tratadas con diferentes concentraciones de TMAO durante 1 día (0, 10, 50, 100 y 200 μ M) (a) o tratadas con 100 μ M TMAO durante diferentes tiempos (0, 6, 12, 24, 48, y 76 horas).

Ejemplos de la invención

Ejemplo 1

Aislamiento e identificación de gen y de la proteína de la invención RCI5

1.1.- *Identificación de un cDNA codificante de la proteína RCI5 inducido en respuesta a bajas temperaturas y a estrés salino*

RCI5 (At1g12140) fue aislado mediante el rastreo de una biblioteca de cDNAs preparada a partir de plántulas etioladas de *Arabidopsis* aclimatadas a frío (4°C, durante 3 días) con una sonda substractiva enriquecida en transcritos inducidos por frío. La comparación de este cDNA (SEQ ID NO: 1), denominado *RCI5*, con otras secuencias genómicas reveló que el gen *RCI5* contiene 5 exones y 4 intrones (SEQ ID NO: 3). El análisis de la expresión de este gen en plántulas etioladas de *Arabidopsis* mediante hibridaciones de tipo Northern con una sonda específica confirmó que, de hecho, su expresión se induce en respuesta a temperaturas bajas (Fig. 1a). Los transcritos de *RCI5* se acumulan de manera transitoria durante la exposición a 4°C, alcanzando el nivel máximo a las 12 h del comienzo del tratamiento. En plántulas crecidas en condiciones control, los niveles de transcritos de *RCI5* son muy bajos (Fig. 1a). La especificidad de la sonda fue determinada por hibridaciones de tipo Southern (Fig. 7b). Cuando se estudió la expresión de *RCI5* en plantas adultas (Fig. 1b), la inducción por frío se detectó principalmente en hojas aunque se observó una pequeña inducción en flores. La acumulación de mensajeros *RCI5* no experimentaba cambios aparentes ni en raíces, ni en tallos ni en silicuas expuestas a frío (Fig. 1b). En condiciones no estresantes, se detectaron niveles muy bajos de transcritos *RCI5* en todos los órganos, excepto en silicuas (Fig. 1b). La inducción de *RCI5* en respuesta a las temperaturas bajas no se veía afectada en *aba1-1*, un mutante deficiente en ABA (Koornneef *et al.*, 1982), *cbf2-1*, un mutante nulo para el gen *CBF2* (Novillo *et al.* 2004), y *CBF1-AS3*, una línea transgénica de *Arabidopsis* que no presenta inducción por frío

de *CBF1* o *CBF3* (Novillo *et al.*, 2007) (Fig. 1c), sugiriendo fuertemente que *RCI5* es regulado por las temperaturas bajas a través de una vía de señalizaron independiente de ABA y de los CBFs.

Ya que, como se ha mencionado anteriormente, muchos genes inducibles por frío responden también a otros estreses abióticos, se examinó el efecto de la deshidratación y del estrés salino en la expresión de *RCI5*. Únicamente se observó acumulación de mRNAs de *RCI5* después del tratamiento con NaCl (Fig. 1d). Para determinar si esta acumulación era causada por el componente iónico u osmótico del tratamiento con NaCl, se estudió la expresión de *RCI5* en plantas de *Arabidopsis* expuestas a LiCl, ya que Li⁺ es un catión tóxico muy relacionado con el ión Na⁺, y manitol, que mimetiza el estrés osmótico sin la toxicidad del estrés iónico. Los resultados obtenidos revelaron que *RCI5* se inducía por LiCl pero no por manitol (Fig. 1d), indicando que el componente iónico era el responsable de la acumulación de transcritos de *RCI5* en respuesta a estrés salino. Como en el caso de las temperaturas bajas, la inducción de *RCI5* en respuesta a NaCl parece estar mediada a través de una vía independiente de ABA (Fig. 1c). *KINI* fue usado como control positivo de todos los experimentos.

La expresión de *RCI5* a nivel tisular durante el desarrollo de la planta y en respuesta a diferentes tratamientos fue estudiada mediante el análisis de plantas de *Arabidopsis* que contienen una fusión de un fragmento de 782 pb del promotor de *RCI5* (de -770 a +12 desde el ATG) al gen reportador *uidA* (*GUS*). Se examinaron cinco líneas transgénicas independientes que contenían una única copia en homocigosis del transgén. En todos los casos, la acumulación de mRNAs de *GUS* en hojas expuestas a 4°C o NaCl presentaban un patrón muy similar al observado para los transcritos endógenos de *RCI5* (Fig. 1e). Estos resultados sugieren que el fragmento de promotor aislado contenía los elementos de regulación en cis implicados en la inducción de *RCI5* en respuesta a las temperaturas bajas y a estrés salino, y que esta inducción está regulada a nivel transcripcional. El análisis histoquímico de la actividad *GUS* no mostró tinción en las semillas transgénicas (Fig. 1f). Bajo condiciones no estresantes sólo se pudieron detectar niveles muy bajos de tinción *GUS* durante la germinación y en los primeros estadios del desarrollo en los haces vasculares de raíces, hipocotilos, cotiledones y hojas (Fig. 1f). En plantas desarrolladas completamente, la tinción *GUS* fue ligeramente apreciable en las venas de las hojas (Fig. 1f). Cuando se expusieron plantas transgénicas en germinación a temperaturas bajas o NaCl, la tinción *GUS* fue como en plantas no estresadas pero significativamente más fuerte (Fig. 1f). Las plantas transgénicas adultas únicamente mostraban niveles altos de actividad *GUS* en el tejido vascular, aunque se podía observar una ligera tinción en las flores (base y venas de los sépalos) y en las silicuas (zona de abscisión) (Fig. 1f). En las líneas transgénicas sometidas a deshidratación, el patrón de actividad *GUS* era, en todos los casos, como el obtenido en condiciones control (Fig. 1f). En conjunto, todos estos datos demuestran que la expresión de *RCI5* se encuentra regulada durante el desarrollo de *Arabidopsis* y se induce en respuesta a frío y estrés salino, principalmente en el tejido vascular de las hojas.

1.2.- El gen *RCI5* codifica para una proteína con actividad monooxigenasa de tipo flavina

La secuencia del cDNA *RCI5* (SEQ ID NO: 1) codifica para un polipéptido de 459 aminoácidos (SEQ ID NO: 2), con un peso molecular estimado de 52 kDa y un pI de 6.1. Búsquedas en bases de datos reveló que dicho polipéptido o proteína *RCI5* contiene los típicos motivos de una enzima flavina monooxigenasa (FMO) (Cashman, 1994). De hecho, *RCI5* posee un sitio altamente conservado de unión a FAD, un dominio de identificación de FMO y un dominio de unión a NADPH que son característicos de las enzimas FMO.

Esta proteína *RCI5* es una enzima con actividad FMO que fue analizada en primer lugar investigando su capacidad para oxidar NADPH, tras haber sido expresada y purificada en *Escherichia coli* (Fig. 2a). Los resultados mostraron que, de hecho, *RCI5* tiene actividad monooxigenasa. La proteína de fusión GST::*RCI5* purificada y, sobre todo, la misma proteína *RCI5* exhibió una mayor capacidad para oxidar NADPH (2 y 8 veces, respectivamente) que los extractos de *E. coli* conteniendo el plásmido vacío o con el cDNA de *RCI5* (Fig. 2b). Posteriormente, se analizó la actividad monooxigenasa de *RCI5* *in vivo* utilizando plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan de forma constitutiva la proteína *RCI5* (plantas transgénicas *RCI5-OE*). Para determinar la actividad monooxigenasa se seleccionaron cuatro líneas independientes, homocigotas para una copia única del transgén y que mostraban niveles altos de expresión de *RCI5* en condiciones control (Fig. 2c). Las plantas sobreexpresoras de *RCI5* crecieron y se desarrollaron de manera idéntica a las plantas silvestres en condiciones normales de crecimiento. En todos los casos, extractos de estas líneas transgénicas *RCI5-OE* presentaron una capacidad para oxidar NADPH significativamente mayor que los extractos de plantas silvestres (Fig. 2d). Así, se concluye que la proteína *RCI5* es una enzima con actividad FMO.

Ejemplo 2

Las plantas transgénicas RCI5 de la invención presentan una mayor tolerancia al frío y al estrés salino la cual está mediatizada por mayores niveles de TMAO producidos por la proteína RCI5

2.1.- La sobreexpresión de la proteína RCI5 incrementa la tolerancia de las plantas, Arabidopsis, al estrés por frío y al salino

La tolerancia a la congelación de plantas transgénicas *RCI5-OE* y silvestres de dos semanas, antes y después de aclimatarlas al frío (4°C, 7d), fue cuantificada como el porcentaje de plantas supervivientes después de haber

sido expuestas 6 h a diferentes temperaturas de congelación. La deshidratación fue inducida manteniendo plántulas transgénicas y silvestres de 10 días en un papel de filtro durante 2 días. La tolerancia a este estrés fue cuantificada como el porcentaje de peso fresco inicial (FW) remanente tras el tratamiento. Por último, la tolerancia al estrés salino fue estimada determinando el peso fresco y el número de hojas de plantas transgénicas *RCI5-OE* y silvestres de 10 días cultivadas durante 8 días en medios con concentraciones crecientes de NaCl (de 50 a 200 mM). La sobreexpresión de *RCI5* incrementó significativamente la tolerancia de *Arabidopsis* a la congelación tanto de plantas no aclimatadas como aclimatadas 7 días a 4°C, siendo este incremento muy similar en ambos casos. Como todas las líneas transgénicas *RCI5-OE* mostraron fenotipos de tolerancia similares, únicamente se presentan los resultados de la línea 1T (Figs. 3a, b). Los valores de LT_{50} (temperatura que causa un 50% de mortalidad) de plantas no aclimatadas silvestres y transgénicas *RCI5-OE* estimados fueron -5,4 y -6,5°C, respectivamente (Fig. 3a). Los valores de LT_{50} de plantas silvestres y *RCI5-OE* aclimatadas a frío fueron -7,5 y -8,7°C, respectivamente (Fig. 3b). El incremento en la tolerancia de las líneas *RCI5-OE*, antes y después de la aclimatación, era muy evidente a nivel fenotípico (Figs. 3c, d). No se observó ninguna diferencia entre las plantas silvestres y *RCI5-OE* cuando se analizó la tolerancia a la deshidratación (datos no mostrados). Sin embargo, todas las líneas sobreexpresoras de *RCI5* presentaron una mayor tolerancia al estrés salino que las plantas silvestres. Los fenotipos de tolerancia mostrados por las diferentes líneas *RCI5-OE* eran casi indistinguibles por lo que solamente se presentan los resultados correspondientes a la línea 1T (Fig. 3e). Las plantas transgénicas *RCI5-OE* expuestas a estrés salino tenían mayor número de hojas verdes y de FW que las plantas silvestres no estresadas (p.e., alrededor de 120% en ambos casos; Fig. 3e), indicando que la sobreexpresión del gen *RCI5* es suficiente para superar el estrés producido por el tratamiento de NaCl. Además, las plantas silvestres sólo tuvieron un 80 y 70% de hojas verdes y peso fresco del que presentan en condiciones control (Fig. 3e). Los mismos resultados se obtuvieron cuando se expusieron plantas silvestres y transgénicas *RCI5-OE* a concentraciones crecientes de LiCl (5 mM-20 mM; Fig. 3e). Por el contrario, plantas silvestres y transgénicas *RCI5-OE* expuestas a concentraciones crecientes de manitol (100 mM-400 mM) mostraron valores de número de hojas verdes y FW muy similares (Fig. 3e). Las diferencias encontradas entre la tolerancia de las plantas transgénicas *RCI5-OE* y de las plantas silvestres a los tratamientos con NaCl y LiCl fueron muy claras a nivel fenotípico (Fig. 3f). En conjunto, estos resultados demuestran que la sobreexpresión constitutiva del gen *RCI5* incrementa la tolerancia de *Arabidopsis* a la congelación y al estrés salino, debido a su componente iónico, sugiriendo que la proteína *RCI5* actúa como un regulador positivo de la respuesta de *Arabidopsis* a frío y estrés salino.

2.2.- La proteína de la invención *RCI5* (SEQ ID NO: 2) participa en la biosíntesis del óxido trimetilamina (TMAO)

La pregunta resultante era como la proteína *RCI5* podría regular en *Arabidopsis* las respuestas al estrés por frío o salino. Numerosos estudios indican que una de las funciones fisiológicas de las FMO podría ser la osmoregulación, ya que en animales se ha demostrado que estas enzimas oxidan el metabolito endógeno trimetilamina (TMA) a TMAO (Ziegler, 1993; Larsen y Schelenk, 2001), un potente osmolito que facilita la adaptación de diferentes organismos marinos a entornos salinos y con temperaturas de congelación (Yancey *et al.*, 1982; Larsen y Schelenk, 2001; Seibel y Walsh, 2002; Treberg *et al.*, 2005; Strambini y Gonnelli, 2008). Por lo tanto, se decidió investigar si la proteína *RCI5* estaba implicada en la biosíntesis de TMAO. Así, se trató de detectar TMAO en plantas de *Arabidopsis* creciendo en condiciones controladas. Los resultados revelaron que, de hecho, plantas de *Arabidopsis* no estresadas tienen niveles muy bajos, pero detectables ($\sim 5 \mu\text{mol Kg}^{-1}$ FW) de TMAO (Fig. 4a). Es destacable, sin embargo, que cuando las plantas fueron expuestas a temperaturas bajas o estrés salino, los dos tratamientos que inducen la expresión del gen *RCI5* (Fig. 1d), el contenido de TMAO se incrementa significativamente. Así pues, la exposición a 4°C ó 250 mM durante 24 h produce una acumulación de TMAO hasta valores cercanos a 25 y 35 $\mu\text{mol Kg}^{-1}$ FW, respectivamente (Fig. 4a), que son los niveles máximos de TMAO endógeno que se detectaron en las condiciones de estrés (Fig. 8). La deshidratación como estrés, que no tiene ningún efecto en la expresión de *RCI5* (Fig. 1d), tampoco afecta los niveles de TMAO (Fig. 4a).

La identificación de TMAO endógeno en *Arabidopsis* y la existencia de una correlación entre la expresión de la proteína *RCI5* y el contenido en TMAO llevó a analizar el contenido de esta molécula en las líneas transgénicas *RCI5-OE*. De forma clara, todas las plantas que sobreexpresaban el gen *RCI5* (*RCI5-OE*) manifestaron niveles significativamente más elevados de TMAO (~ 2 veces) que las plantas silvestres originales (Figura 4b), indicando que la proteína *RCI5* está involucrada en la biosíntesis de TMAO. Estos niveles, sin embargo, eran menores (3-4 veces) que los determinados en plantas silvestres expuestas a frío o a el tratamiento con sal (Figura 4a), lo que sugiere fuertemente que otras enzimas FMO, además de *RCI5*, tienen que estar implicadas en la biosíntesis de TMAO en respuesta a estos estreses. De igual forma, las plantas transgénicas *RCI5-OE* sometidas a 4°C ó a 250 mM de NaCl durante 24 horas exhibieron mayores (~ 2 veces) cantidades de TMAO que las plantas silvestres expuestas al mismo tratamiento (Figura 4c).

Una evidencia completa y definitiva de la implicación de la proteína *RCI5* en la biosíntesis de TMAO se obtuvo mediante ensayos *in vitro* donde se analizó la capacidad de *RCI5* para oxidar TMA a TMAO. Los resultados confirmaron que la proteína *RCI5* de la invención purificada de *E. coli* fue capaz de oxidar TMA de una manera dosis dependiente, generando cantidades sustanciales de TMAO (Figura 4d). Estos datos demuestran que las plantas *Arabidopsis* contienen niveles constitutivos de TMAO, que dichos niveles se incrementan significativamente en respuesta a estrés por bajas temperaturas y salino, y que dicho incremento se debe en parte, por la inducción de la expresión de *RCI5*.

3.- El compuesto TMAO media la tolerancia a frío y sal en *Arabidopsis*

3.1.- El compuesto TMAO media la tolerancia a frío y sal en *Arabidopsis* mediante la regulación positiva de la expresión de genes que responden a estrés

5 Los resultados descritos hasta ahora sugieren una función de la proteína RCI5 en la osmoregulación a través de la biosíntesis de TMAO. Sin embargo, la mayor acumulación de TMAO en plantas de *Arabidopsis* sujetas a estrés por frío o sal ($25\text{-}35 \mu\text{mol Kg}^{-1} \text{FW}$) parece ser baja para mediar un reajuste osmótico en estas condiciones. De hecho, esta concentración es del orden de tres veces de magnitud menor que la descrita para el TMAO en animales (Larsen y Schlenk, 2001; Seibel y Walsh, 2002) y para diferentes osmolitos, como la prolina y la glicinobetaina, en plantas (Wood *et al.*, 1996; Russell *et al.*, 1998; Sakamoto y Murata, 2000). Se ha propuesto que, en bajas concentraciones, algunos osmolitos pueden ejercer su papel protector frente a estrés abiótico por medio de mecanismos diferentes a la osmoprotección (Chen y Murata, 2002). Por ejemplo, se ha sugerido que la prolina y la glicina botaina podrían regular la expresión génica (Rajendrakumar *et al.*, 1997; Iyer y Caplan, 1998; Kavi Kishor *et al.*, 2005; Mattioli *et al.*, 2008). Por tanto, se examinó la posibilidad de que el TMAO pudiese actuar como una molécula señalizadora mediando la inducción de la expresión génica en respuesta a estrés.

Ya que la proteína RCI5 está implicado en la síntesis de TMAO (ver mas arriba), primero se estudiaron los niveles de transcritos de diferentes genes cuya expresión se induce por estrés en las líneas transgénicas *RCI5-OE* crecidas en condiciones control o expuestas a temperaturas bajas o estrés salino. Entre los genes estudiados se incluyeron *KINI*, *LTI78*, *COR15A* y *COR47*, que son inducidos en respuesta a diferentes estreses abióticos a través de las rutas dependientes e independientes de los CBFs (Gilmour *et al.*, 2004; Maruyama *et al.*, 2004), *RAB18* y *RCI1A*, que son regulados positivamente por frío por una vía independiente de los CBFs (Lang y Palva, 1992; Jarillo *et al.*, 1994; Gilmour *et al.*, 2004; Maruyama *et al.*, 2004; López-Cobollo y Salinas, unpublished results), y *CAT2* y *SOD2*, dos genes cuya expresión aumenta en respuesta a diferentes estreses y codifican proteínas implicadas en la detoxificación de ROS (Refs; Kliebestein *et al.*, 1998; Chevalier *et al.*, 1992). Además, se estudiaron los niveles de los genes *CBFs* (*CBF1-3*), cuya expresión es promovida específicamente por las temperaturas bajas (Gilmour *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998; Medina *et al.*, 1999). Como los patrones de expresión de todas las líneas transgénicas *RCI5-OE* analizadas fueron muy similares solo se muestran los resultados obtenidos con la línea 1T (Figs. 5a, b). En condiciones control, la acumulación de transcritos correspondientes a *KINI*, *COR15A*, *COR47*, y principalmente los de *CAT2* y *SOD2* fueron considerablemente superiores en las plantas sobreexpresoras de *RCI5* que en las silvestres (Fig. 5a). La expresión de los otros genes analizados no se vio afectada en las líneas transgénicas *RCI5-OE* (Figs. 5a, b). La inducción de todos los genes, excepto *RAB18* y *RCI1A*, en respuesta a frío era mayor en las plantas que sobreexpresaban *RCI5* (Fig. 5a, b). En condiciones de estrés salino, todos los genes que responden a NaCl (p.e., *KINI*, *LTI78*, *COR15A*, *COR47*, *CAT2* y *SOD2*, ver estos genes en la Fig 5a) mostraban una mayor inducción en las plantas *RCI5-OE* (Fig. 5a, b). Estos patrones de expresión justifican completamente el incremento de la tolerancia a la congelación, antes y después de la aclimatación a frío y a estrés salino de las líneas *RCI5-OE* (Fig. 3). Por tanto, se concluye que la proteína RCI5 regula positivamente la respuesta de la expresión génica a estrés, lo cual sugiere que el TMAO podría, de hecho, mediar la inducción por estrés de la expresión génica y, por tanto, la tolerancia de *Arabidopsis* a la congelación y al estrés salino.

3.2.- La aplicación externa mediante pulverización de TMAO induce tolerancia al frío y al estrés salino

Si el TMAO actúa como una molécula señalizadora y media la inducción de la expresión génica por estrés, su aplicación exógena a plantas de *Arabidopsis* en condiciones control debería inducir la expresión génica regulada por estrés. Esta hipótesis se verificó examinando la acumulación de los transcritos correspondientes a los genes analizados anteriormente en plantas silvestres de *Arabidopsis* pulverizadas con $100 \mu\text{M}$ TMAO, una concentración que, tras 24 h de tratamiento, provoca una acumulación de TMAO endógeno en el mismo rango detectado en plantas expuestas a temperaturas bajas o estrés salino ($30\text{-}35 \mu\text{mol Kg}^{-1} \text{FW}$; Fig. 9). Excepto en el caso de *RAB18* y *RCI1A*, el TMAO exógeno activó la expresión de todos los genes hasta niveles similares a los alcanzados tras la exposición a 4°C y NaCl (Figs. 5c, d), confirmando que el TMAO media la inducción de la expresión génica por estrés. También se estudió la acumulación de mRNA de *RCI5* en respuesta a TMAO. Los resultados obtenidos indican que la inducción por frío y sal del gen *RCI5* no está mediada por TMAO (Fig. 5c).

Por último, se estudió si el TMAO también mediaba la tolerancia de *Arabidopsis* a la congelación y al estrés salino. Para ello, plantas silvestres de *Arabidopsis* fueron pulverizadas con $100 \mu\text{M}$ TMAO y se determinó su tolerancia a la congelación, antes y después de la aclimatación a frío, así como su tolerancia a deshidratación y estrés salino. De manera consistente con lo descrito anteriormente, la aplicación exógena de TMAO aumentó de manera significativa la tolerancia de *Arabidopsis* a la congelación, tanto de plantas aclimatadas como no aclimatadas, y a estrés salino (Figs. 6a, b), pero no tuvo ningún efecto en la capacidad de *Arabidopsis* para tolerar la deshidratación. También de estudio la tolerancia a LiCl y manitol de plantas de *Arabidopsis* tratadas con TMAO. El TMAO incrementó la tolerancia de *Arabidopsis* a LiCl pero no a manitol (Fig. 6b), indicando que, como la proteína RCI5, está implicado de manera específica en la tolerancia al componente iónico del estrés salino. Las diferencias fenotípicas de las plantas tratadas con TMAO y las no tratadas son muy evidentes (Figs. 6c, d). En conjunto, todos estos resultados indican que el TMAO actúa como una molécula señalizadora mediando la tolerancia de *Arabidopsis* a la congelación y al estrés salino regulando positivamente la inducción de la expresión génica.

*Materiales y métodos**Material vegetal, condiciones de crecimiento y tratamientos*

5 En este estudio se utilizó como material vegetal *Arabidopsis thaliana* (L.) ecotipos Columbia (Col) y Landsberg erecta (*Ler*), los mutantes *aba1-1* (ref) y *cbf2-1* (Novillo *et al.*, 2004), así como *CBF1-AS3*, una línea transgénica de *Arabidopsis* en la cual *CBF1* y *CBF3* no son inducidos por frío (Novillo *et al.*, 2007). Para la obtención de plántulas, las semillas eran sembradas en condiciones estériles en cajas Petri con medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 250 mg/l MES, solidificado con agar al 0,8% (w/v). Las plantas eran cultivadas en macetas que contenían
10 una mezcla de sustrato orgánico con vermiculita (3:1, v/v), y se regaban con agua y una solución mineral (Haughn y Sommerville, 1986). Ambas, plántulas y plantas, se crecían a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ en condiciones de día largo (16 horas de luz blanca fluorescente, flujo de fotones de $70\text{-}90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$).

Los análisis de expresión se realizaron con plantas de tres semanas, excepto en el análisis en diferentes órganos
15 donde se utilizaron plantas de 8 semanas. El tratamiento de bajas temperaturas se realizó transfiriendo las plantas a una cámara de crecimiento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ durante diferentes periodos bajo las condiciones de luz y fotoperiodo descritas anteriormente. Para los tratamientos con NaCl, LiCl y manitol las plantas fueron regadas con 250 mM NaCl, 20 mM LiCl y 500 mM manitol respectivamente, y recolectadas un día mas tarde. La deshidratación fue inducida dejando las plantas, previamente separadas de su sistema radicular, perder un 50% de su FW. Para los tratamientos de TMAO, las
20 plantas fueron pulverizadas con $100 \mu\text{M}$ TMAO y recolectadas un día mas tarde. El control del tratamiento de TMAO se obtuvo pulverizando plantas con agua. En todos los casos, las plantas fueron congeladas inmediatamente con N_2 después de los tratamientos y guardadas a -80°C hasta su uso.

El TMAO endógeno se midió siempre en plantas de 3 semanas. Se utilizaron plantas pulverizadas con $100 \mu\text{M}$ TMAO y recogidas tras diferentes tiempos de tratamiento, o pulverizadas con diferentes concentraciones (10, 50, 100 y $200 \mu\text{M}$) de TMAO y recogidas un día después. También se regaron plantas con diferentes concentraciones (50, 100, 150, 200, 250 y 300 mM) de NaCl y se recogieron un día después. El efecto de las temperaturas bajas en el contenido de TMAO endógeno se estudio exponiendo plantas a 4°C durante diferentes tiempos. Después de recogerlas, las plantas siempre fueron congeladas en N_2 y usadas inmediatamente.
30

Los experimentos de congelación se llevaron a cabo con plantas de 2 semanas como se ha descrito previamente (Novillo *et al.*, 2004). La tolerancia fue establecida como la capacidad de las plantas de crecer tras 14 días de recuperación en condiciones control. La tolerancia a sal se analizo transfiriendo plántulas de 1° días a placas nuevas medio suplementado con concentraciones crecientes de NaCl (50, 100, 150 y 200 mM) o LiCl (5, 10, 15 y 20 mM). El estrés osmótico se impuso transfiriendo plántulas de 10 días a placas con medios suplementados con concentraciones crecientes de manitol (100, 200, 300 y 400 mM). En todos los casos, las plantas se mantuvieron 2 días a cada concentración. La tolerancia a estos tratamientos se evaluó determinando el peso fresco y el número de hojas verdes al final del tratamiento. La deshidratación fue inducida retirando las plántulas de 10 días del medio de crecimiento, situándolas en un papel de filtro húmedo, y se dejaron que crecieran durante 2 días sin agua. La deshidratación se estimo como el porcentaje de FW inicial después del tratamiento. Para analizar el efecto del TMAO en la tolerancia a la congelación, se pulverizaron plantas de 2 semanas con $100 \mu\text{M}$ TMAO 1 h antes de ser congeladas o aclimatadas a frío como se ha descrito previamente. El efecto del TMAO en la tolerancia de *Arabidopsis* a NaCl, LiCl, manitol y deshidratación se estudió germinando semillas en placas con medio suplementado con $100 \mu\text{M}$ TMAO. A continuación, las plántulas de 10 días se procesaron como se ha descrito anteriormente.
45

Métodos de Biología Molecular

RC15 se aisló rastreando una biblioteca de cDNA, preparada a partir de plántulas etioladas de *Arabidopsis* aclimatadas a frío, con una sonda substractiva enriquecida en transcritos inducibles por frío siguiendo protocolos descritos previamente (Jarillo *et al.* 1994). Para los análisis de similitud de secuencia se usó el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Centre for Biotechnology Information (Altschul *et al.*, 1997). Las digestiones con enzimas de restricción, los clonajes, la extracción de proteínas totales de plantas, y las hibridaciones de DNA y RNA se realizaron de acuerdo a procedimientos estándar (Sambrook *et al.*, 1989). El RNA total se aisló como se ha sido reportado previamente (Logemann *et al.*, 1987).
55

El cDNA completo de *RC15* fue obtenido por RT-PCR de RNA total de plantas de *Arabidopsis* ecotipo Col expuestas a 4°C durante 24 h, usando los cebadores SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5. El fragmento resultante se rellenó con Klenow y se ligó en el sitio *SmaI* del plásmido *pBluescript SK(+)* (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, USA) para obtener el plásmido *pBSRC15*. Para obtener la fusión *GST::RC15*, el plásmido *pBSRC15* fue digerido con *BamHI* y *Sall*. Entonces, el fragmento conteniendo el cDNA de *RC15* se rellenó con Klenow y se ligó en el sitio *SmaI* del vector *pGEX-4T1* (GE Healthcare, Bio-Sciences, Piscataway, NJ).
60

Para expresar *RC15* en *E. coli*, se transformó la cepa BL21(DE3) pLysS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) con el vector *pGEX-4T1* que contiene la fusión *GST::RC15*. La purificación de *RC15* de *E. coli* se realizó de acuerdo al protocolo de la casa comercial, induciendo la expresión en el cultivo durante 4 horas a 28°C con 0.1 mM IPTG. El vector *pGEX-4T1* se usó como control.
65

ES 2 347 399 A1

La sonda específica para *RCI5* se generó mediante PCR sobre cDNA de *Arabidopsis* ecotipo Col usando los cebadores SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7. Las sondas específicas para *KIN1*, *LTI78*, *COR47*, *COR15A*, *RC11A*, *RAB18*, *CBF1*, *CBF2*, *CBF3*, *GUS* y *SOD2* fueron obtenidas como se ha sido descrito previamente (Kliebenstein *et al.*, 1998; Novillo *et al.*, 2007;). La sonda específica para *CAT2* se obtuvo mediante PCR sobre DNA genómico de *Arabidopsis* con los cebadores SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9. Como control de carga se usó un fragmento *EcoRI* del 18S *rRNA* (Tremousaygue *et al.*, 1992). Las muestras de RNA de cada experimento se analizaron en al menos dos membranas independientes, y cada experimento se repitió al menos 3 veces.

10 *Obtención de las Plantas Transgénicas*

Mediante PCR se amplificó un fragmento de 0.77 kb inmediatamente anterior al ATG de la región codificante de *RCI5*, usando como molde DNA genómico de *Arabidopsis* ecotipo Col y los cebadores SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11. El fragmento de promotor se clonó en el sitio *SmaI* del vector pBluescript SK(+). Posteriormente, el plásmido fue digerido con *Sall* y *BamHI*, y el fragmento obtenido se ligó en los correspondientes sitios de restricción del plásmido *pBI101* (Clontech, Palo Alto, CA, USA) para obtener la fusión *RCI5::GUS*. El plásmido *pBSRCI5* (ver anterior) fue digerido con *SmaI* y el cDNA de *RCI5* resultante se ligó en el sitio *SmaI* del vector *pROK2* bajo el control del promotor CaMv35S (Baulcombe *et al.*, 1986), para obtener la construcción *35S::RCI5*.

Los plásmidos recombinantes, una vez verificada la construcción mediante secuenciación, se introdujeron en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (Deblaere *et al.*, 1985). Para transformar las plantas de *Arabidopsis* ecotipo Col se siguió el método de inmersión floral (Clough y Bent, 1998).

25 *Localización Histoquímica de la Actividad GUS*

El análisis histoquímico de la actividad GUS en las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que contienen la fusión *RCI5::GUS* se realizó siguiendo protocolos descritos anteriormente (Medina *et al.*, 2001).

30 *Cuantificación de la Actividad Monooxigenasa*

La cuantificación de la actividad monooxigenasa se realizó siguiendo esencialmente protocolos publicados previamente con modificaciones (Agustsson y Strom, 1981); (Lang *et al.*, 1998). Resumidamente, 100 μ l de tampón PBS (pH 7.4) conteniendo 100 μ g de proteínas procedentes de extractos bacterianos, 100 μ g de proteínas purificadas de *E. coli*, o 100 μ g de proteínas totales de plantas de 3 semanas se añadieron a 2 ml de una mezcla de reacción estándar consistente en 2.5 nmol FAD, 600 nmol NADPH, 6 μ mol MgCl₂ y 40 μ mol de pirofosfato potásico (pH 8.2). La reacción se inició con 300 nmol TMA. Después de 20 min a 24°C, la reacción se paró añadiendo HClO₄ a una concentración final del 1%. La actividad monooxigenasa se cuantificó como la cantidad de NADPH consumido por hora a 24°C.

40 *Determinación del Contenido en TMAO*

El contenido de TMAO fue cuantificado reduciendo el TMAO a TMA con TiCl₃, siguiendo el protocolo descrito previamente (Bystedt *et al.*, 1959) con algunas modificaciones. Diez gramos de tejido verde congelado se homogeneizó con 7,5% TCA. Después de 2 h de incubación a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron 15 min a 20°C y el sobrenadante se filtró a través de papel Whatman n° 1. El contenido en TMA se estimó añadiendo 1 ml de formaldehído al 20%, 3 ml de KOH al 30% y 10 ml de tolueno a 1 ml de sobrenadante filtrado. Esta mezcla se agitó vigorosamente durante 15 s y se dejó reposar 5 min, la fase de tolueno que contenía el TMA se recuperó y se transfirió a un tubo nuevo que contenía 1 mg de Na₂SO₄. Mediante agitación suave se obtuvo una fase acuosa libre de tolueno que se usó en el análisis espectrofotométrico. Cinco ml del extracto con tolueno se incubó con 5 ml de ácido pícrico 0,02% durante 30 s a temperatura ambiente. Tras esta incubación, en presencia de TMA se desarrolló un color amarillo cuya concentración era proporcional a la concentración de TMA, y que era directamente proporcional a la absorbancia a 410 nm. El TMAO se redujo añadiendo 132 μ l de 15% TiCl₃ a 4 ml del sobrenadante filtrado. La mezcla se incubó a 80°C durante 90 s y se enfrió inmediatamente. El contenido en TMA en la mezcla, después de la reducción del TMAO, se determinó como en las muestras de TMA. Los valores obtenidos se refirieron a una curva de calibración generada con varias soluciones con distintas concentraciones de TMA comercial (Sigma, St. Louis, MO). El contenido en TMAO se calculó como la diferencia de TMA antes y después de la reducción.

Para evaluar la capacidad de *RCI5* para generar TMAO, se cuantificó la actividad monooxigenasa, usando 0, 50, 100 y 200 μ g de proteína purificada de *E. coli*, como se ha descrito anteriormente (Cuantificación de la Actividad Monooxigenasa). A continuación, la determinación de TMAO se realizó como se ha descrito anteriormente cogiendo 1 ml de reacción final para medir el TMA y 1 ml para reducir el TMAO a TMA.

65

Bibliografia

- 5 **Agustsson, I., and Strom, A.R. (1981).** Biosynthesis and turnover of trimethylamine oxide in the teleost cod, *Gadus morhua*. *The Journal of biological chemistry* 256, 8045-8049.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* 25, 3389-3402.
- 10 **Apel, K., and Hirt, H. (2004).** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual review of plant biology* 55, 373-399.
- Baker, S.S., Wilhelm, K.S., and Thomashow, M.F. (1994).** The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant molecular biology* 24, 701-713.
- 15 **Bartsch, M., Gobbato, E., Bednarek, P., Debey, S., Schultze, J.L., Bautor, J., and Parker, J.E. (2006).** Salicylic acid-independent ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 signaling in *Arabidopsis* immunity and cell death is regulated by the monooxygenase FM01 and the Nudix hydrolase NUDT7. *The Plantcell* 18, 1038-1051.
- 20 **Baulcombe, D.C., Saunders, G.R., Bevan, M.W., Mayo, M.A. and Harrison, B.D. (1986).** Expression of biologically active viral satellite RNA from nuclear genome of transformed plants. *Nature* 321, 446-449.
- Boyer, J.S. (1982).** Plant Productivity and Environment. *Science* (New York, N.Y) 218, 443-448.
- 25 **Bystedt, J., Swenne, L., and Aas, W.A. (1959).** Determination of trimethylamine oxide in fish muscle. *J. Sci. Food Agric.* 10 301-304.
- Cashman, J.R. (1994).** Structural and catalytic properties of the mammalian flavin-containing monooxygenase. *Chem. Res. Tox.* 8 165-181.
- 30 **Catala, R., Santos, E., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Martinez-Zapater, J.M., and Salinas, J. (2003).** Mutations in the Ca²⁺/H⁺ transporter CAX1 increase CBF/DREB1 expression and the cold-acclimation response in *Arabidopsis*. *The Plantcell* 15, 2940-2951.
- 35 **Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998).** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16, 735-743.
- Chawade, A., Brautigam, M., Lindlof, A., Olsson, O., and Olsson, B. (2007).** Putative cold acclimation pathways in *Arabidopsis thaliana* identified by a combined analysis of mRNA co-expression patterns, promoter motifs and transcription factors. *BMC genomics* 8, 304.
- 40 **Chen, T.H., and Murata, N. (2002).** Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current opinion in plant biology* 5, 250-257.
- 45 **Cheng, Y., Dai, X., and Zhao, Y. (2006).** Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes & development* 20, 1790-1799.
- Chevalier, C., Yamaguchi, J., and McCourt, P. (1992).** Nucleotide Sequence of a cDNA for Catalase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology* 99, 1726-1728.
- 50 **Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., and Leemans, J. (1985).** Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic acids research* 13, 4777-4788.
- 55 **Fowler, S., and Thomashow, M.F. (2002).** *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *The Plant cell* 14, 1675-1690.
- 60 **Gilmour, S.J., Fowler, S.G., and Thomashow, M.F. (2004).** *Arabidopsis* transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. *Plant molecular biology* 54, 767-781.
- Gilmour, S.J., Sebolt, A.M., Salazar, M.P., Everard, J.D., and Thomashow, M.F. (2000).** Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant physiology* 124, 1854-1865.
- 65 **Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Stockinger, E.J., Salazar, M.P., Houghton, J.M., and Thomashow, M.F. (1998).** Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant J* 16, 433-442.

- Hansen, B.G., Kliebenstein, D.J., and Halkier, B.A. (2007).** Identification of a flavin-monoxygenase as the S-oxygenating enzyme in aliphatic glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis. *Plant J* 50, 902-910.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., and Bohnert, H.J. (2000).** Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 51, 463-499.
- Haughn, G., and Sommerville, C. (1986).** Sulfonylurea-resistant mutants of Arabidopsis thaliana. *Mol. General Genet.* 204, 430-434.
- Iyer, S., and Caplan, A. (1998).** Products of Proline Catabolism Can Induce Osmotically Regulated Genes in Rice. *Plant Physiol.* 116, 203-211.
- Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Schabenberger, O., and Thomashow, M.F. (1998).** Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* (New York, N.Y 280, 104-106.
- Jarillo, J.A., Capel, J., Leyva, A., Martinez-Zapater, J.M., and Salinas, J. (1994).** Two related low-temperature-inducible genes of Arabidopsis encode proteins showing high homology to 14-3-3 proteins, a family of putative kinase regulators. *Plant molecular biology* 25, 693-704.
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1999).** Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature biotechnology* 17, 287-291.
- Kavi Kishor, P.B., Sangam, S., Amrutha, R.N., Laxmi, P.S., Naidu, K.R., Rao, K.R.S.S., Rao, S., Reddy, K.J., Theriappan, P., and Sreenivasulu, N. (2005).** Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current science* 88, 424-438.
- Kawamura, Y., and Uemura, M. (2003).** Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of Arabidopsis leaves associated with cold acclimation. *Plant J* 36, 141-154.
- Kliebenstein, D.J., Monde, R.A., and Last, R.L. (1998).** Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant physiology* 118, 637-650.
- Koch, M., Vorwerk, S., Masur, C., Sharifi-Sirchi, G., Olivieri, N., and Schlaich, N.L. (2006).** A role for a flavin-containing mono-oxygenase in resistance against microbial pathogens in Arabidopsis. *Plant J* 47, 629-639.
- Koornneef, M., Dellaert, L.W., and van der Veen, J.H. (1982).** EMS- and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Mutation research* 93, 109-123.
- Kreps, J.A., Wu, Y., Chang, H.S., Zhu, T., Wang, X., and Harper, J.F. (2002).** Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant physiology* 130, 2129-2141.
- Lang, D.H., Yeung, C.K., Peter, R.M., Ibarra, C., Gasser, R., Itagaki, K., Philpot, R.M., and Rettie, A.E. (1998).** Isoform specificity of trimethylamine N-oxygenation by human flavin-containing monoxygenase (FMO) and P450 enzymes: selective catalysis by FM03. *Biochemical pharmacology* 56, 1005-1012.
- Lang, V., and Palva, E.T. (1992).** The expression of a rab-related gene, rab18, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Plant molecular biology* 20, 951-962.
- Larsen, B.K., and Schlenk, D. (2001).** Effect of salinity on flavin-containing monoxygenase expression and activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of comparative physiology* 171, 421-429.
- Lee, B.H., Henderson, D.A., and Zhu, J.K. (2005).** The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *The Plant cell* 17, 3155-3175.
- Levitt, J. (1980).** Responses of plants to environmental stresses: chilling, freezing and high temperatures stresses. (New York: Academic Press).
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1998).** Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *The Plant cell* 10, 1391-1406.
- Logemann, J., Schell, J., and Willmitzer, L. (1987).** Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical biochemistry* 163, 16-20.

- Maruyama, K., Sakuma, Y., Kasuga, M., Ito, Y., Seki, M., Goda, H., Shimada, Y., Yoshida, S., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004).** Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *Plant J* 38, 982-993.
- 5 **Matsui, A., Ishida, J., Morosawa, T., Mochizuki, Y., Kaminuma, E., Endo, T.A., Okamoto, M., Nambara, E., Nakajima, M., Kawashima, M., Satou, M., Kim, J.M., Kobayashi, N., Toyoda, T., Shinozaki, K., and Seki, M. (2008).** Arabidopsis transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array. *Plant & cell physiology* 49, 1135-1149.
- 10 **Mattioli, R., Marchese, D., D'Angeli, S., Altamura, M.M., Costantino, P., and Trovato, M. (2008).** Modulation of intracellular proline levels affects flowering time and inflorescence architecture in Arabidopsis. *Plant molecular biology* 66,277-288.
- 15 **McKersie, B.D., Bowley, S.R., Harjanto, E., and Leprince, O. (1996).** Water- Deficit Tolerance and Field Performance of Transgenic Alfalfa Overexpressing Superoxide Dismutase. *Plant physiology* 111, 1177-1181.
- Medina, J., Catala, R., and Salinas, J. (2001).** Developmental and stress regulation of RCI2A and RCI2B, two cold-inducible genes of arabidopsis encoding highly conserved hydrophobic proteins. *Plant physiology* 125, 1655-1666.
- 20 **Medina, J., BARGUES, M., Terol, J., Perez-Alonso, M., and Salinas, J. (1999).** The Arabidopsis CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant physiology* 119, 463-470.
- 25 **Mishina, T.E., and Zeier, J. (2006).** The Arabidopsis flavin-dependent monooxygenase FM01 is an essential component of biologically induced systemic acquired resistance. *Plant physiology* 141, 1666-1675.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962).** A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* 15, 473-497.
- 30 **Novillo, F., Medina, J., and Salinas, J. (2007).** Arabidopsis CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, 21002-21007.
- 35 **Novillo, F., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Salinas, J. (2004).** CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101, 3985-3990.
- 40 **Oono, Y., Seki, M., Satou, M., Iida, K., Akiyama, K., Sakurai, T., Fujita, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2006).** Monitoring expression profiles of Arabidopsis genes during cold acclimation and deacclimation using DNA microarrays. *Functional & integrative genomics* 6, 212-234.
- Rajendrakumar, C.S., Suryanarayana, T., and Reddy, A.R. (1997).** DNA helix destabilization by proline and betaine: possible role in the salinity tolerance process. *FEBS letters* 410, 201-205.
- 45 **Russell, B.L., Rathinasabapathi, B., and Hanson, A.D. (1998).** Osmotic stress induces expression of choline monooxygenase in sugar beet and amaranth. *Plant physiology* 116, 859-865.
- Sakamoto, A., and Murata, N. (2000).** Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *Journal of experimental botany* 51, 81-88.
- Salinas, J. (2002).** Molecular mechanisms of signal transduction in cold acclimation. (Oxford University Press).
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning: a Laboratory Manual. (Cold Spring Harbor, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- 55 **Seibel, B.A., and Walsh, P.J. (2002).** Trimethylamine oxide accumulation in marine animals: relationship to acylglycerol storage. *The Journal of experimental biology* 205, 297-306.
- 60 **Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y., and Shinozaki, K. (2001).** Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *The Plant cell* 13, 61-72.
- Stockinger, E.J., Gilmour, S.J., and Thomashow, M.F. (1997).** Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 1035-1040.
- 65

- Strambini, G.B., and Gonnelli, M. (2008).** Singular efficacy of trimethylamine N-oxide to counter protein destabilization in ice. *Biochemistry* 47, 3322-3331.
- Tobena-Santamaria, R., Blied, M., Ljung, K., Sandberg, G., Mol, J.N., Souer, E., and Koes, R. (2002).** FLOOZY of petunia is a flavin mono-oxygenase-like protein required for the specification of leaf and flower architecture. *Genes & development* 16, 753-763.
- Treberg, J.R., Bystriansky, J.S., and Driedzic, W.R. (2005).** Temperature effects on trimethylamine oxide accumulation and the relationship between plasma concentration and tissue levels in smelt (*Osmerus mordax*). *Journal of experimental zoology* 303, 283-293.
- Tremousaygue, D., Laudie, M., Grellet, F., and Delseny, M. (1992).** The Brassica oleracea rDNA spacer revisited. *Plant molecular biology* 18, 1013-1018.
- Uemura, M., Warren, G., and Steponkus, P.L. (2003).** Freezing sensitivity in the *sfr4* mutant of *Arabidopsis* is due to low sugar content and is manifested by loss of osmotic responsiveness. *Plant physiology* 131, 1800-1807.
- Van Breusegem, F., Kushnir, S., Slooten, L., Bauw, G., Botterman, J., Van Montagu, M., and Inze, D. (1998).** Processing of a chimeric protein in chloroplasts is different in transgenic maize and tobacco plants. *Plant molecular biology* 38, 491-496.
- Vogel, J.T., Zarka, D.G., Van Buskirk, H.A., Fowler, S.G., and Thomashow, M.F. (2005).** Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *Plant J* 41, 195-211.
- Wanner, L.A., and Junttila, O. (1999).** Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 120, 391-400.
- Welling, A., and Palva, E.T. (2008).** Involvement of CBF transcription factors in winter hardiness in birch. *Plant physiology* 147, 1199-1211.
- Wood, A.J., Saneoka, H., Rhodes, D., Joly, R.J., and Goldsbrough, P.B. (1996).** Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum. *Plant physiology* 110, 1301-1308.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1994).** A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant cell* 6, 251-264.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2006).** Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual review of plant biology* 57, 781-803.
- Yancey, P.H., Rhea, M.D., Kemp, K.M., and Bailey, D.M. (2004).** Trimethylamine oxide, betaine and other osmolytes in deep-sea animals: depth trends and effects on enzymes under hydrostatic pressure. *Cellular and molecular biology* (Noisy-le-Grand, France) 50, 371-376.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., and Somero, G.N. (1982).** Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* (New York, N.Y) 217, 1214-1222.
- Zhao, Y., Christensen, S.K., Fankhauser, C., Cashman, J.R., Cohén, J.D., Weigel, D., and Chory, J. (2001).** A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* (New York, N.Y) 291, 306-309.
- Zhu, J., Dong, C.H., and Zhu, J.K. (2007).** Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Current opinion in plant biology* 10, 290-295.
- Ziegler, D.M. (1990).** Flavin-containing monooxygenases: enzymes adapted for multisubstrate specificity. *Trends in pharmacological sciences* 11, 321-324.
- Zou, Q., Bennion, B.J., Daggett, V., and Murphy, K.P. (2002).** The molecular mechanism of stabilization of proteins by TMAO and its ability to counteract the effects of urea. *Journal of the American Chemical Society* 124, 1192-1202.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Planta transgénica tolerante al frío y al estrés salino **caracterizada** porque comprende una secuencia de nucleótidos que permite la expresión de una proteína con actividad monooxigenasa (FMO), seleccionada del siguiente grupo:
- 10 i.- la secuencia de nucleótidos del gen *RCI5* de SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma; y
 - ii.- una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a).
- 15 2. Planta transgénica según la reivindicación 1 **caracterizada** porque la secuencia de nucleótidos es la SEQ ID NO: 1.
3. Planta transgénica según la reivindicación 1 **caracterizada** porque la planta es *Arabidopsis*, preferentemente la planta transgénica *RCI5-OE*, que contiene la SEQ ID NO: 1
- 20 4. Procedimiento de obtención de la planta transgénica según las reivindicaciones 1 a la 3 **caracterizado** porque consiste en la introducción en una planta de una secuencia de nucleótidos constituida por:
- 25 i.- una secuencia de nucleótidos codificante de proteína con actividad monooxigenasa (FMO), seleccionada del siguiente grupo:
 - 30 - la secuencia de nucleótidos del gen *RCI5* de SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma; o una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a), y
 - ii.- una secuencia de nucleótidos promotora que permite y regula la expresión de la secuencia de i.- y la aparición de una proteína con actividad monooxigenasa en el interior de la célula.
- 35 5. Procedimiento según la reivindicación 4 **caracterizado** porque comprende los siguientes pasos:
- a) obtención de un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos del gen *RCI5* SEQ ID NO: 1,
 - 35 b) obtención de microorganismos portadores del vector a), y
 - c) transformación de las plantas con el vector de a) o con el microorganismo de b).
- 40 6. Una secuencia de nucleótidos codificante de una proteína con actividad monooxigenasa (FMO), seleccionada del siguiente grupo:
- 45 a) la secuencia de nucleótidos del gen *RCI5* de SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma; o una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a), con o sin
 - b) una secuencia de nucleótidos promotora que permite y regula la expresión de la secuencia de a) y la aparición de una proteína con actividad monooxigenasa en el interior de la célula.
- 50 7. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 6 **caracterizado** porque la secuencia de nucleótidos de a) está constituida por la secuencia de nucleótidos *RCI5* de SEQ ID NO: 1.
- 55 8. Vector de expresión génica **caracterizado** porque comprende la secuencia de nucleótidos según las reivindicaciones 6 y 7 y que permite la transformación o transfección de microorganismos y células y la posterior obtención de las plantas transgénicas de la invención.
9. Vector de expresión según la reivindicación 8 **caracterizado** porque es el vector 35S::*RCI5*.
- 60 10. Microorganismo o célula **caracterizado** porque contiene la secuencia de nucleótidos según las reivindicaciones 6 y 7 o el vector de expresión según las reivindicaciones 8 y 9.
11. Semilla de una planta **caracterizada** porque contiene la secuencia de nucleótidos según las reivindicaciones 6 y 7 o el vector de expresión según las reivindicaciones 8 y 9.
- 65 12. Uso de una composición acuosa que comprende el compuesto óxido de trimetilamina (TMAO) o un derivado del mismo para inducir tolerancia al estrés salino y al frío en las plantas y/o semillas.

ES 2 347 399 A1

13. Uso de una composición según la reivindicación 12 **caracterizado** porque la composición acuosa comprende el compuesto TMAO en una concentración comprendida entre 1 μM y 100 mM, preferentemente entre 50 μM y 1 mM, y más preferentemente a 100 μM .

5 14. Uso de una composición según la reivindicación 12 **caracterizado** porque la composición acuosa de TMAO es de 100 μM .

10 15. Uso de una composición según las reivindicaciones 12 a la 14 **caracterizado** porque la composición acuosa se aplica mediante pulverización a la parte aérea.

16. Uso de una composición según las reivindicaciones 12 a la 14 **caracterizado** porque la composición acuosa se aplica al tallo por inyección.

15 17. Uso de una composición según las reivindicaciones 12 a la 14 **caracterizado** porque la composición acuosa se aplica al suelo u otro sustrato de cultivo, al agua de riego (o solución de cultivo) o por inmersión del sistema radicular de las plantas y/o de semillas.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

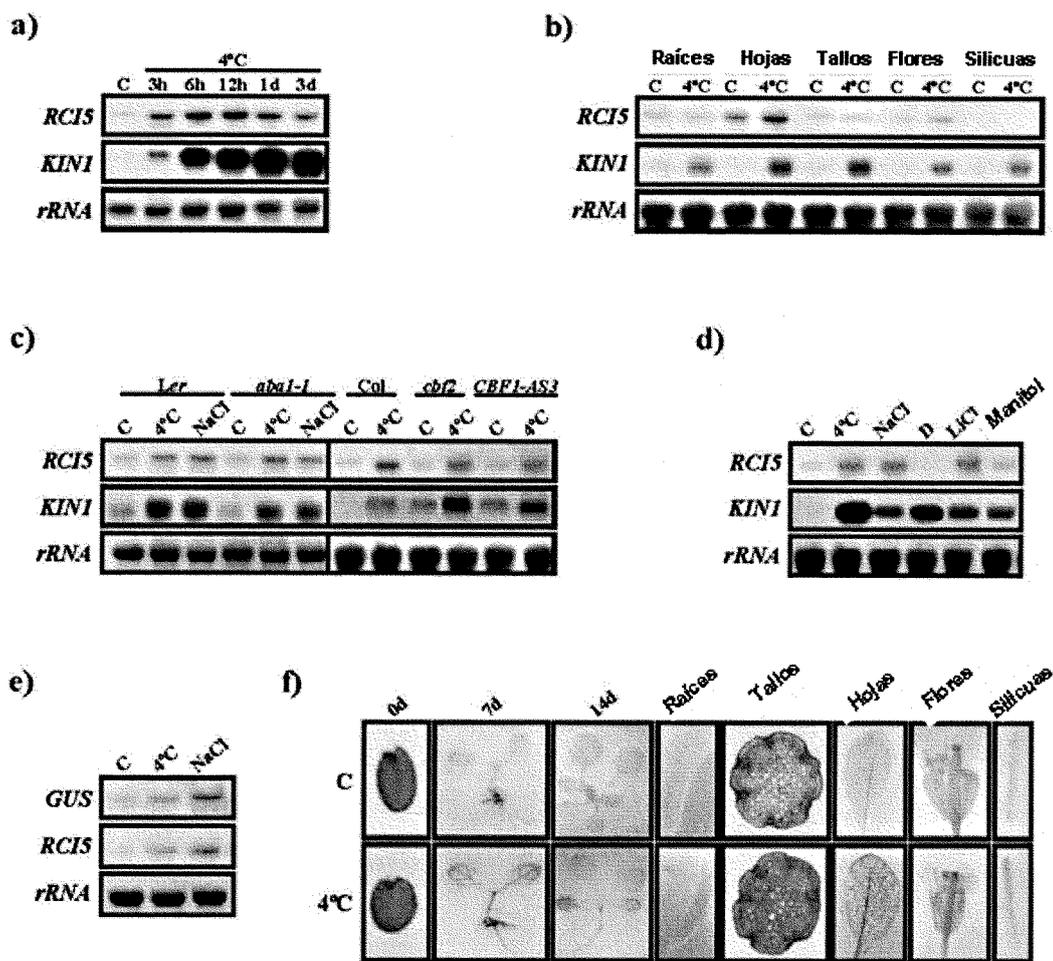


FIG. 1

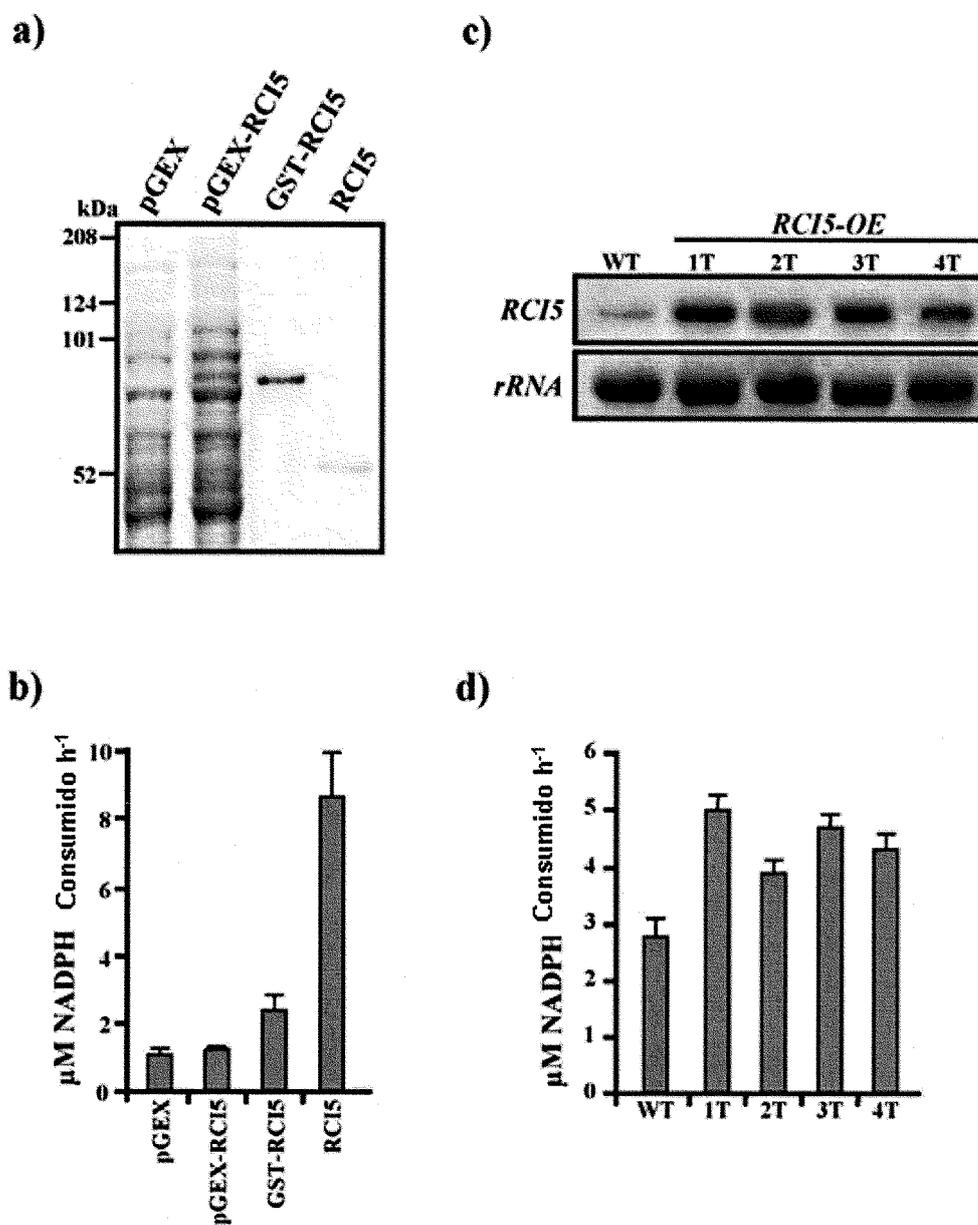


FIG. 2

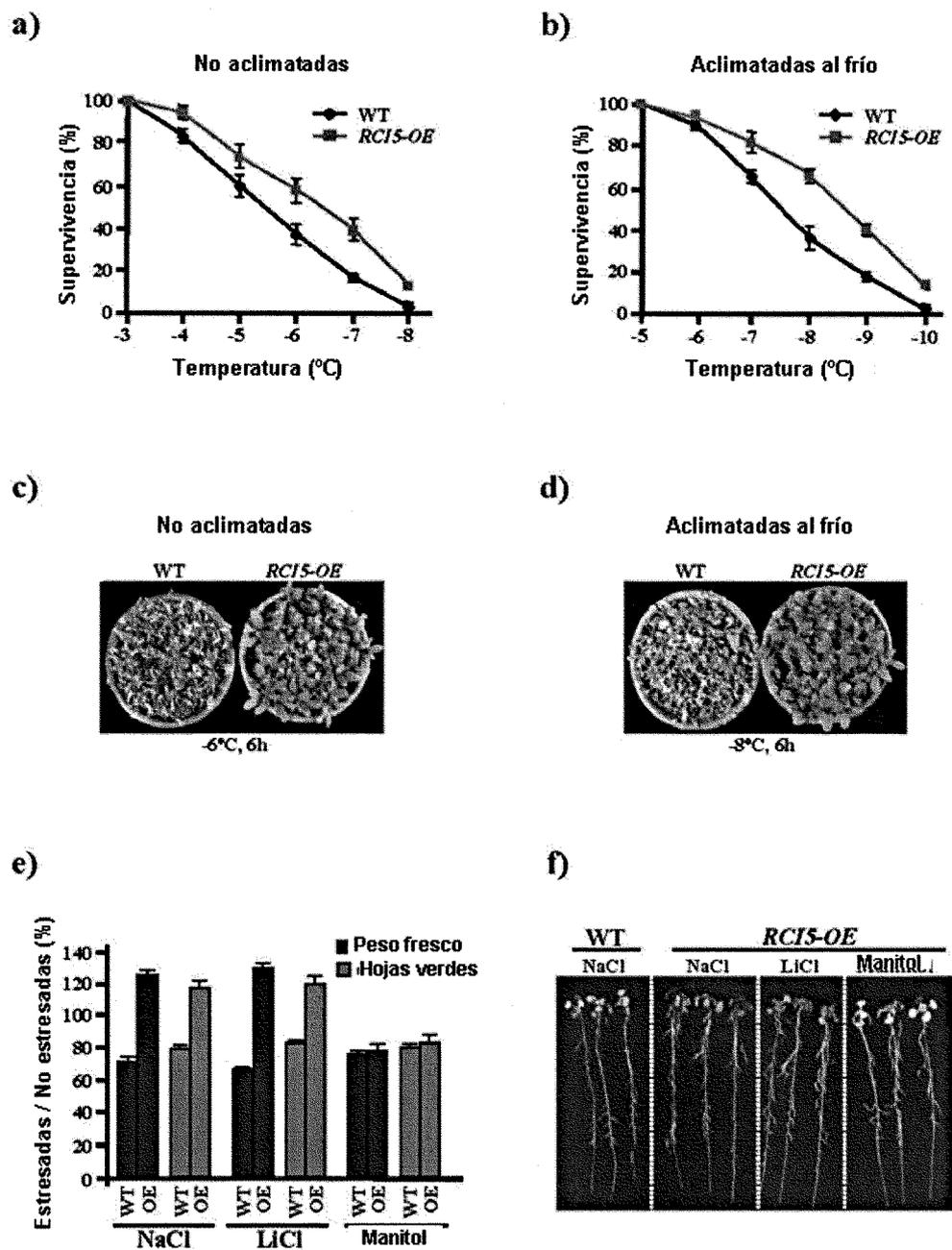


FIG. 3

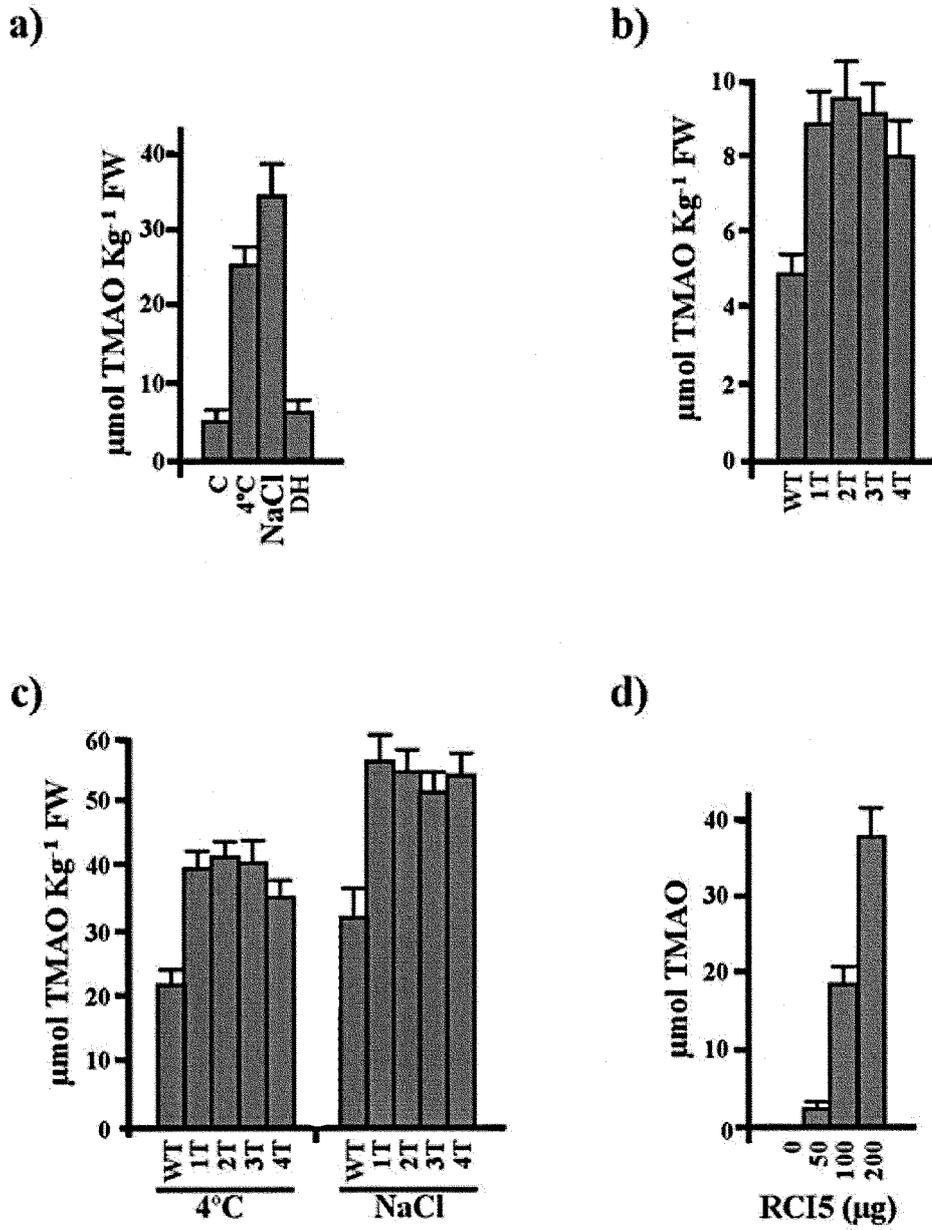


FIG. 4

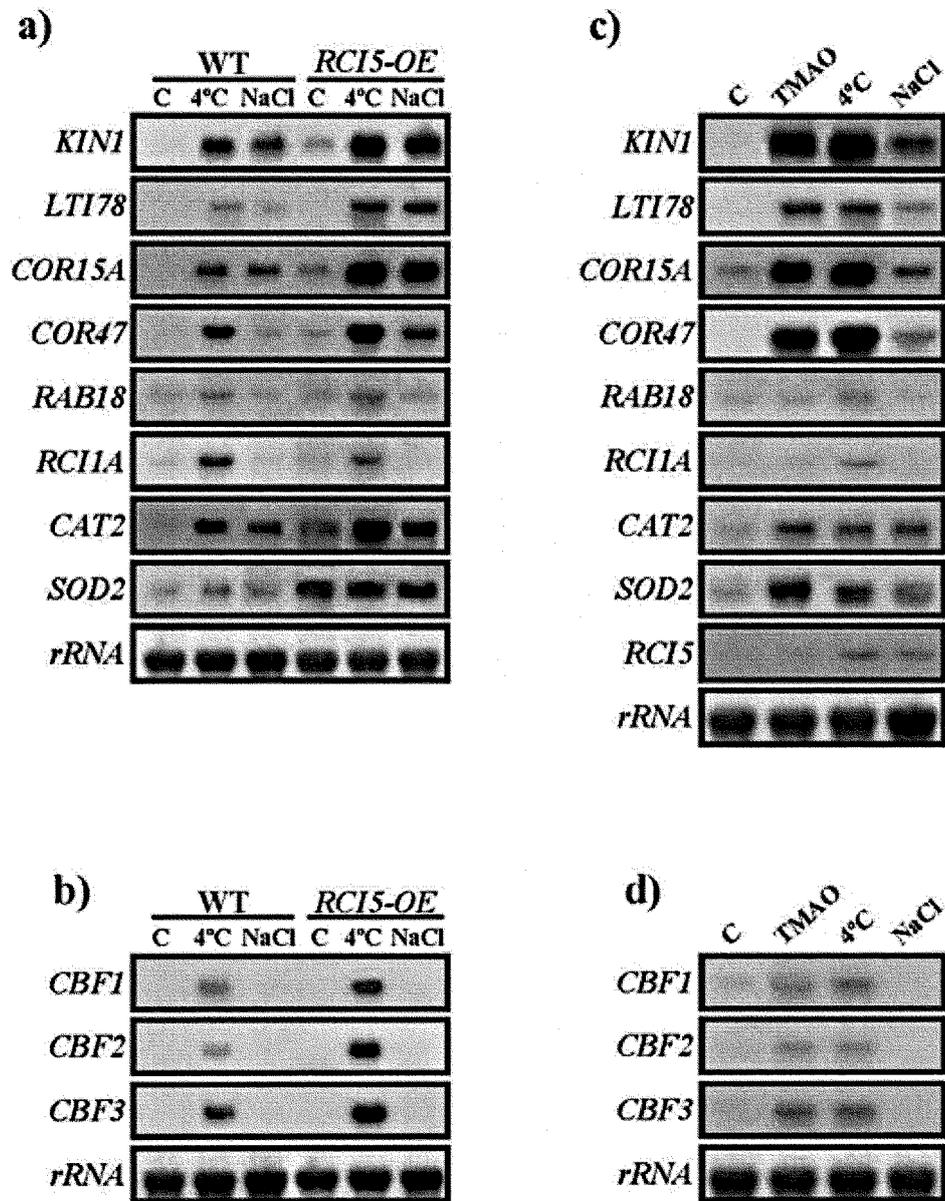
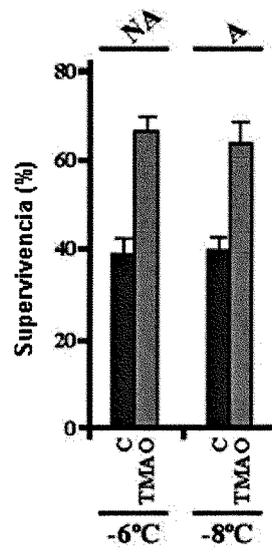
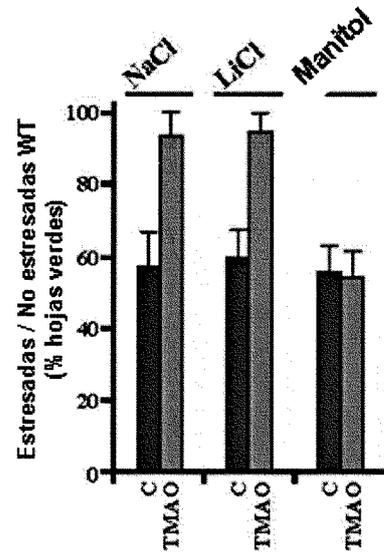


FIG. 5

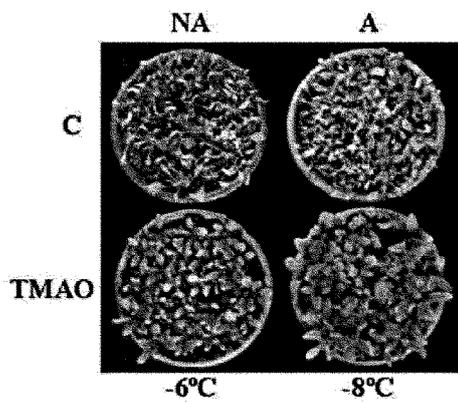
a)



b)



c)



d)

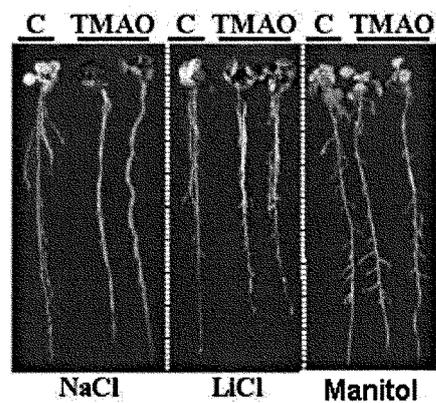
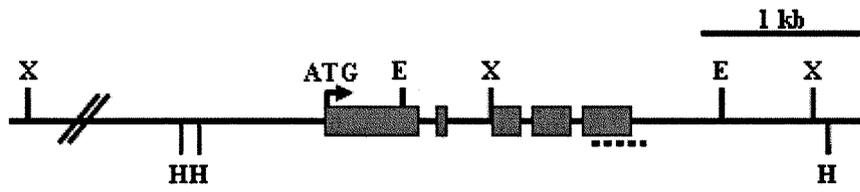


FIG. 6



b)

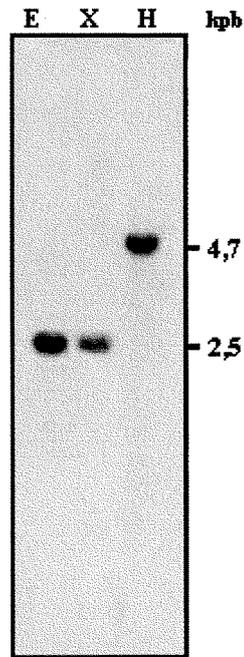


FIG. 7

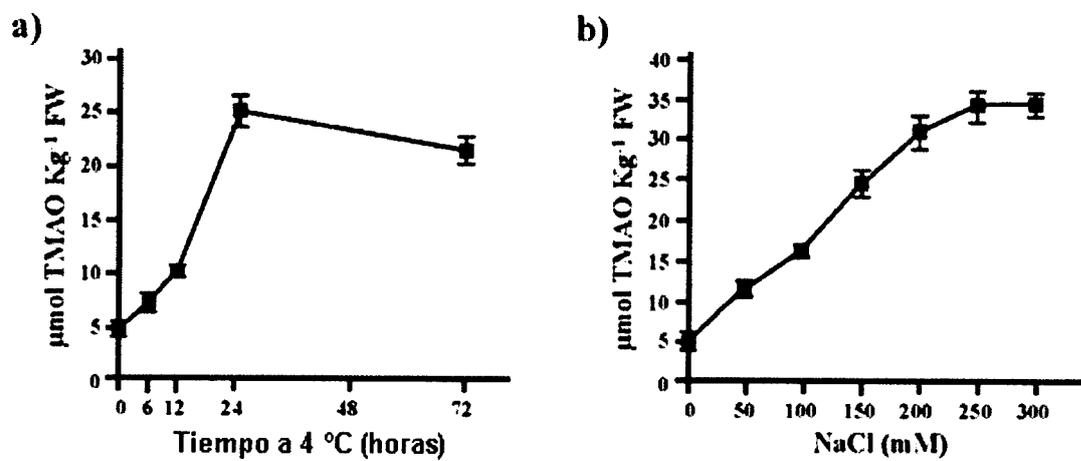


FIG. 8

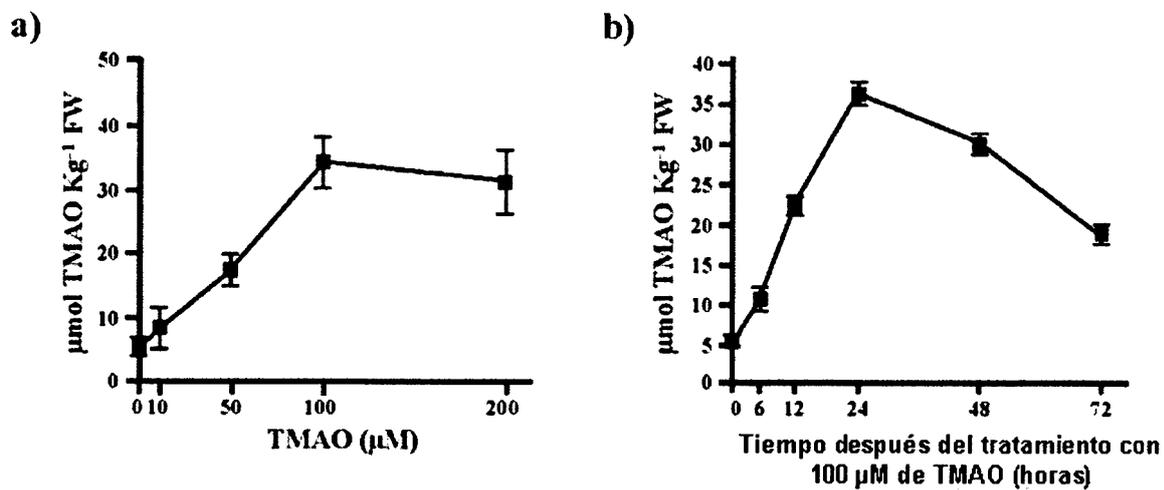


FIG. 9

ES 2 347 399 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria

5

<120> PLANTA TRANSGÉNICA RCI5 RESISTENTE AL FRIO Y ESTRES SALINO PRODUCTORA DE TMAO,
ELEMENTOS NECESARIOS PARA SU OBTENCIÓN Y USO DE COMPOSICIONES QUE CONTIENEN
TMAO PARA INDUCIR TOLERANCIA AL FRIO Y ESTRÉS SALINO

10

<130> RCI5

<160> 11

15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

20

<211> 2146

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

25

<220>

<221> CDS

<222> (18)..(1397)

30

<223> Secuencia de nucleótidos codificante del cDNA del gen RCI5

<400> 1

35	atcatcacac aaaaaaag atg gca cca gca cga acc cga gtc aac tca ctc	50
	Met Ala Pro Ala Arg Thr Arg Val Asn Ser Leu	
	1 5 10	
	aac gtg gca gtg atc gga gcc gga gcc gcc gga ctc gta gct gca aga	98
	Asn Val Ala Val Ile Gly Ala Gly Ala Ala Gly Leu Val Ala Ala Arg	
40	15 20 25	
	gag ctc cgc cgc gag aat cac acc gtc gtc gtt ttc gaa cgt gac tca	146
	Glu Leu Arg Arg Glu Asn His Thr Val Val Val Phe Glu Arg Asp Ser	
	30 35 40	
	aaa gtc gga ggt ctc tgg gta tac aca cct aac agc gaa cca gac ccg	194
	Lys Val Gly Gly Leu Trp Val Tyr Thr Pro Asn Ser Glu Pro Asp Pro	
45	45 50 55	
	ctt agc ctc gat cca aac cga acc atc gtc cat tca agc gtc tat gat	242
	Leu Ser Leu Asp Pro Asn Arg Thr Ile Val His Ser Ser Val Tyr Asp	
50	60 65 70 75	
	tct ctc cga acc aat ctc cca cga gag tgc atg ggt tac aga gac ttc	290
	Ser Leu Arg Thr Asn Leu Pro Arg Glu Cys Met Gly Tyr Arg Asp Phe	
	80 85 90	
	ccc ttc gtg cct cga cct gaa gat gac gaa tca aga gac tcg aga agg	338
	Pro Phe Val Pro Arg Pro Glu Asp Asp Glu Ser Arg Asp Ser Arg Arg	
55	95 100 105	
	tac cct agt cac aga gaa gtt ctt gct tac ctt gaa gac ttc gct aga	386
	Tyr Pro Ser His Arg Glu Val Leu Ala Tyr Leu Glu Asp Phe Ala Arg	
60	110 115 120	
	gaa ttc aaa ctt gtg gag atg gtt cga ttt aag acc gaa gta gtt ctt	434
	Glu Phe Lys Leu Val Glu Met Val Arg Phe Lys Thr Glu Val Val Leu	
	125 130 135	
	gtc gag cct gaa gat aag aaa tgg agg gtt caa tcc aaa aat tca gat	482
	Val Glu Pro Glu Asp Lys Lys Trp Arg Val Gln Ser Lys Asn Ser Asp	
65	140 145 150 155	
	ggg atc tcc aaa gat gag atc ttt gat gct gtt gtt gtt tgt aat gga	530

ES 2 347 399 A1

	Gly	Ile	Ser	Lys	Asp 160	Glu	Ile	Phe	Asp	Ala 165	Val	Val	Val	Cys	Asn 170	Gly		
5	cat His	tat Tyr	aca Thr	gaa Glu 175	cct Pro	aga Arg	gtt Val	gct Ala	cat His 180	gtt Val	cct Pro	ggt Gly	ata Ile	gat Asp 185	tca Ser	tgg Trp		578
10	cca Pro	ggg Gly	aag Lys 190	cag Gln	att Ile	cat His	agc Ser	cac His 195	aat Asn	tac Tyr	cg Arg	ggt Val	cct Pro 200	gat Asp	caa Gln	ttc Phe		626
15	aaa Lys	gac Asp 205	cag Gln	gtg Val	gtg Val	gta Val	gtg Val 210	ata Ile	gga Gly	aat Asn	ttt Phe 215	gcg Ala	agt Ser	gga Gly	gct Ala	gat Asp		674
20	atc Ile 220	agc Ser	agg Arg	gac Asp	ata Ile	acg Thr 225	gga Gly	gtg Val	gct Ala	aaa Lys	gaa Glu 230	gtc Val	cat His	atc Ile	gcg Ala	tct Ser 235		722
25	aga Arg	tcg Ser	aat Asn	cca Pro	tct Ser 240	aag Lys	aca Thr	tac Tyr	tca Ser	aaa Lys 245	ctt Leu	ccc Pro	ggg Gly	tca Ser	aac Asn 250	aat Asn		770
30	cta Leu	tgg Trp	ctt Leu	cac His 255	tct Ser	atg Met	ata Ile	gaa Glu	agt Ser 260	gta Val	cac His	gaa Glu	gat Asp 265	ggg Gly	acg Thr	att Ile		818
35	gtt Val	ttt Phe	cag Gln 270	aac Asn	ggt Gly	aag Lys	gtt Val	gta Val 275	caa Gln	gct Ala	gat Asp	acc Thr	att Ile 280	gtg Val	cat His	tgc Cys		866
40	act Thr	ggt Gly 285	tac Tyr	aaa Lys	tat Tyr	cac His	ttc Phe 290	cca Pro	ttt Phe	ctc Leu	aac Asn	acc Thr 295	aat Asn	ggc Gly	tat Tyr	att Ile		914
45	act Thr 300	ggt Val	gag Glu	gat Asp	aac Asn	tgt Cys 305	gtt Val	gga Gly	ccg Pro	ctt Leu	tac Tyr 310	gaa Glu	cat His	gtc Val	ttt Phe 315	ccg Pro		962
50	cct Pro	gcg Ala	ctt Leu	gct Ala	ccc Pro 320	ggg Gly	ctt Leu	tcc Ser	ttc Phe	atc Ile 325	ggt Gly	tta Leu	ccc Pro	tgg Trp	atg Met 330	aca Thr		1010
55	ctg Leu	caa Gln	ttc Phe 335	ttt Phe	atg Met	ttt Phe	gag Glu	ctc Leu 340	caa Gln	agc Ser	aag Lys	tgg Trp	gtg Val	gct Ala 345	gca Ala	gct Ala		1058
60	ttg Leu	tct Ser	ggc Gly 350	cg Arg	gtc Val	aca Thr	ctt Leu	cct Pro 355	tca Ser	gaa Glu	gag Glu	aaa Lys	atg Met 360	atg Met	gaa Glu	gac Asp		1106
65	gtt Val	acc Thr 365	gcc Ala	tac Tyr	tat Tyr	gca Ala	aag Lys 370	cg Arg	gag Glu	gct Ala	ttc Phe	ggg Gly 375	caa Gln	cct Pro	aag Lys	aga Arg		1154
70	tac Tyr 380	aca Thr	cat His	cg Arg	ctt Leu	ggt Gly 385	gga Gly	ggt Gly	cag Gln	gtt Val	gat Asp 390	tac Tyr	ctt Leu	aat Asn	tgg Trp	ata Ile 395		1202
75	gca Ala	gag Glu	caa Gln	att Ile	ggt Gly 400	gca Ala	ccg Pro	ccc Pro	ggt Gly	gaa Glu 405	caa Gln	tgg Trp	aga Arg	tat Tyr	cag Gln 410	gaa Glu		1250
80	ata Ile	aat Asn	ggc Gly 415	gga Gly	tac Tyr	tac Tyr	aga Arg	ctt Leu	gct Ala 420	aca Thr	caa Gln	tca Ser	gac Asp	act Thr 425	ttc Phe	cg Arg		1298
85	gat Asp	aag Lys	tgg Trp 430	gac Asp	gat Asp	gat Asp	cat His	ctc Leu 435	ata Ile	gtt Val	gag Glu	gct Ala	tat Tyr 440	gag Glu	gat Asp	ttc Phe		1346

ES 2 347 399 A1

ttg aga cag aag ctg att agt agt ctt cct tct cag tta ttg gaa tct 1394
 Leu Arg Gln Lys Leu Ile Ser Ser Leu Pro Ser Gln Leu Leu Glu Ser
 445 450 455
 5 tga agatcatgaa taattccttg aacaaatgat tgacctgtct gtgtggtggt 1447
 gtattgttct ttgttggtgt gttaaataaa agccgtcaag gtttcattgt cttttttttt 1507
 atctttgaat gtttggaanaa aaaaacaagg ttttatacaa aatgaaatca tctaagca 1567
 10 agttgtacat tttcttggtg acgcatctc tgcaactcac tttccaccat tctctttgca 1627
 gcttctgcag attctgctga cttctgagcc aattccggtg cttgcttcat ctcctctatc 1687
 15 gctttcagct cttcgcggtc tcttctcaag tcttctagtt ccatcctgag agaattcacc 1747
 aaacttcgga gagagcattc gtcacagca gcttcttgta gcctcatcgt tgcttcatta 1807
 agctcatttg taatgatctt aaccgtggtc atctctgatt catgagcttt cttcatctct 1867
 20 tcccgtaaaa cctcaatctc tgaagttgtc tctaacagct tggcttcaag agttcttgag 1927
 agctcaggct catattcttt cctcaacact agcagtttct tctctgcctc ttcaacagca 1987
 gttctataac attctcgtaa atcgcttttt tccttaacaa tattagcgtg ctcctgcaga 2047
 25 ttctgagcag ccgctagctt gagctgatga atcgcatctt tcatatccga aatctcctta 2107
 gaaagctcgt taactttggc ggagttgact tggagtgca 2146
 30 <210> 2
 <211> 459
 <212> PRT
 35 <213> *Arabidopsis thaliana*
 <400> 2
 40 Met Ala Pro Ala Arg Thr Arg Val Asn Ser Leu Asn Val Ala Val Ile
 1 5 10 15
 Gly Ala Gly Ala Ala Gly Leu Val Ala Ala Arg Glu Leu Arg Arg Glu
 20 25 30
 45 Asn His Thr Val Val Val Phe Glu Arg Asp Ser Lys Val Gly Gly Leu
 35 40 45
 50 Trp Val Tyr Thr Pro Asn Ser Glu Pro Asp Pro Leu Ser Leu Asp Pro
 50 55
 55 Asn Arg Thr Ile Val His Ser Ser Val Tyr Asp Ser Leu Arg Thr Asn
 60 65 70 75 80
 60 Leu Pro Arg Glu Cys Met Gly Tyr Arg Asp Phe Pro Phe Val Pro Arg
 85 90 95
 Pro Glu Asp Asp Glu Ser Arg Asp Ser Arg Arg Tyr Pro Ser His Arg
 100 105 110
 65 Glu Val Leu Ala Tyr Leu Glu Asp Phe Ala Arg Glu Phe Lys Leu Val
 115 120 125

ES 2 347 399 A1

Glu Met Val Arg Phe Lys Thr Glu Val Val Leu Val Glu Pro Glu Asp
 130 135 140
 5
 Lys Lys Trp Arg Val Gln Ser Lys Asn Ser Asp Gly Ile Ser Lys Asp
 145 150 155 160
 10
 Glu Ile Phe Asp Ala Val Val Val Cys Asn Gly His Tyr Thr Glu Pro
 165 170 175
 15
 Arg Val Ala His Val Pro Gly Ile Asp Ser Trp Pro Gly Lys Gln Ile
 180 185 190
 20
 His Ser His Asn Tyr Arg Val Pro Asp Gln Phe Lys Asp Gln Val Val
 195 200 205
 25
 Val Val Ile Gly Asn Phe Ala Ser Gly Ala Asp Ile Ser Arg Asp Ile
 210 215 220
 30
 Thr Gly Val Ala Lys Glu Val His Ile Ala Ser Arg Ser Asn Pro Ser
 225 230 235 240
 35
 Lys Thr Tyr Ser Lys Leu Pro Gly Ser Asn Asn Leu Trp Leu His Ser
 245 250 255
 40
 Met Ile Glu Ser Val His Glu Asp Gly Thr Ile Val Phe Gln Asn Gly
 260 265 270
 45
 Lys Val Val Gln Ala Asp Thr Ile Val His Cys Thr Gly Tyr Lys Tyr
 275 280 285
 50
 His Phe Pro Phe Leu Asn Thr Asn Gly Tyr Ile Thr Val Glu Asp Asn
 290 295 300
 55
 Cys Val Gly Pro Leu Tyr Glu His Val Phe Pro Pro Ala Leu Ala Pro
 305 310 315 320
 60
 Gly Leu Ser Phe Ile Gly Leu Pro Trp Met Thr Leu Gln Phe Phe Met
 325 330 335
 65
 Phe Glu Leu Gln Ser Lys Trp Val Ala Ala Ala Leu Ser Gly Arg Val
 340 345 350
 70
 Thr Leu Pro Ser Glu Glu Lys Met Met Glu Asp Val Thr Ala Tyr Tyr
 355 360 365
 75
 Ala Lys Arg Glu Ala Phe Gly Gln Pro Lys Arg Tyr Thr His Arg Leu
 370 375 380
 80
 Gly Gly Gly Gln Val Asp Tyr Leu Asn Trp Ile Ala Glu Gln Ile Gly
 385 390 395 400
 85
 Ala Pro Pro Gly Glu Gln Trp Arg Tyr Gln Glu Ile Asn Gly Gly Tyr

ES 2 347 399 A1

				405						410				415			
	Tyr	Arg	Leu	Ala	Thr	Gln	Ser	Asp	Thr	Phe	Arg	Asp	Lys	Trp	Asp	Asp	
				420					425					430			
5	Asp	His	Leu	Ile	Val	Glu	Ala	Tyr	Glu	Asp	Phe	Leu	Arg	Gln	Lys	Leu	
			435					440					445				
	Ile	Ser	Ser	Leu	Pro	Ser	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser						
10		450					455										

<210> 3

<211> 3227

15 <212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 3

20	atcatcacac	aaaaaagatg	gcaccagcac	gaacccgagt	caactcactc	aacgtggcag	60
	tgatcggagc	cggagccgcc	ggactcgtag	ctgcaagaga	gctccgccgc	gagaatcaca	120
25	ccgtcgtcgt	tttccaacgt	gactcaaaag	tcggaggtct	ctgggtatac	acacctaaca	180
	gcgaaccaga	cccgttagc	ctcgatccaa	accgaaccat	cgtccattca	agcgtctatg	240
	attctctccg	aaccaatctc	ccacgagagt	gcatgggtta	cagagacttc	cccttcgtgc	300
30	ctcgacctga	agatgacgaa	tcaagagact	cgagaaggta	ccctagtcac	agagaagttc	360
	ttgcttacct	tgaagacttc	gctagagaa	tcaaacttgt	ggagatgggt	cgattttaaga	420
	ccgaagtagt	tcttgtcgag	cctgaagata	agaaatggag	ggttcaatcc	aaaaattcag	480
35	atgggatctc	caaagatgag	atctttgatg	ctgttggtgt	ttgtaatgga	cattatacag	540
	aacctagagt	tgctcatggt	cctgggtactt	caatttcaga	tgttttttta	gattgaatga	600
	ttttgaagtg	aatatgtttt	gattgatgag	aaaacttggt	attttaggta	tagattcatg	660
40	gccagggag	cagattcata	gccacaatta	ccgtgttcct	gatcaattca	aagaccaggt	720
	acgttcttgc	agaatagtgt	aacagtttac	taaattttag	ttttttaatc	tttatctttt	780
	gtccataccc	ttttactgat	acttaaaatg	tgcgtttttg	acgatggaaa	caaaaagttg	840
45	ctttttctta	ttcgccaact	atgaaaaagt	gcttattttt	tcattttcat	tctgtactca	900
	cgaggagatc	ttttatttca	ctagttatca	ttctatatta	gtactttatt	ctgtatggga	960
	tgggtgttta	ggtatattgg	atggtatgag	taattcaagt	atgttatttt	gttgagtttg	1020
50	aatctatag	aatattaga	tagattcagt	tatctgacat	tgttggtctg	aaaaatttat	1080
	ggaagggtgg	ggtagtgata	ggaaattttg	cgagtggagc	tgatatcagc	agggacataa	1140
55	cgggagtggc	taaagaagtc	catatcgcgt	ctagatcgaa	tccatctaag	acatactcaa	1200
	aacttcccgg	gtcaaacaat	ctatggcttc	actctatggt	aaataacaat	taacaaattg	1260
	agagattttg	gtcatactag	atggtcactg	attcaatttt	tgcatagata	aagtgtacac	1320
60	gaagatggga	cgattgtttt	tcagaacggt	aaggttgtag	aagctgatac	cattgtgcat	1380
	tgactgggtt	acaatatatca	cttcccattt	ctcaacacca	atggctatat	tactgttgag	1440
65	gataactgtg	ttggaccgct	ttacgaacat	gtctttccgc	ctgcgcttgc	tcccgggctt	1500

ES 2 347 399 A1

tccttcacg gtttaccctg gatgggtaag tctctcattc aatctttact ttgggttgct 1560
 ttttcggatt ttttcatcgt ctaatcatat ttttatatat gatatcagac actgcaattc 1620
 5 tttatgtttg agctccaaag caagtgggtg gctgcagctt tgtctggccg ggtcacactt 1680
 ccttcagaag agaaaatgat ggaagacggt accgcctact atgcaaagcg tgaggccttc 1740
 10 gggcaaccta agagatacac acatcgactt ggtggaggtc aggttgatta ccttaattgg 1800
 atagcagagc aaattgggtg accgcccggg gaacaatgga gatatcagga aataaatggc 1860
 ggatactaca gacttgctac acaatcagac actttccgtg ataagtggga cgatgatcat 1920
 15 ctcatagttg aggcctatga ggatttcttg agacagaagc tgattagtag tcttccttct 1980
 cagttattgg aatcttgaag atcatgaata attccttgaa caaatgattg acctgtctgt 2040
 20 gtgttgttgt attgttcttt gttgttggtg taaataaaaag ccgtaagggt ttcatgtctt 2100
 ttttttttat ctttgaatgt ttggaaaaaa aaacaagggt ttatacaaaa tgaaatcatc 2160
 actaagcaag ttgtacattt tcttgttgac gccatctctg caactcactt tccaccattc 2220
 25 tctttgcagc ttctgcagat tctgctgact tctgagccaa ttccggtgct tgcttcatct 2280
 cctctatcgc tttcagggtc gcttctaact tattatccgc ttcggctctt cgtttggtga 2340
 tctcttcaag ctgagctgct atagttgcca acttcttttc gattgcagcc tctgtttccc 2400
 30 ctgctcctcg tttcaaagat tcaaactctt gaattgtgat ttttatcttt gaaccagatg 2460
 attcttcatc ttgtttcttg ctctcttgct tctgagatat catcttcatc tcttcgcgga 2520
 35 ttttctcttc agcggatttc gcctcctcca cttctcttat aacaagctct agtctctttt 2580
 cagcttcctc agcagctatc atcgcggcct ctgtttcttt cttcagactc tctatcttcc 2640
 tattcatatt tgcagcttcg tttcttgctt caatagcttc tgttttcatt tgctccagtt 2700
 40 tcaagctctc ttgcttgaga gcttccaact tttttgtttc ctcaatctct aatctctctg 2760
 cttctttctg ctgagctctc tcgcttctc ttctcaagtc ttctagtcc atcctgagag 2820
 45 aattcaccaa acttcggaga gagcattcgt catcagcagc ttcttgtagc ctcatcgttg 2880
 cttcattaag ctcatattgta atgatcttaa ccgtgttcat ctctgattca tgagctttct 2940
 tcatctcttc ccgtaaaacc tcaatctctg aagttgtctc taacagcttg gcttcaagag 3000
 50 ttcttgagag ctgaggctca tattctttcc tcaacactag cagtttcttc tctgcctctt 3060
 caacagcagt tctataacat tctcgtaaat cgtctttttc ctaacaata ttagcgtgct 3120
 55 cctgcagatt ctgagcagcc gctagcttga gctgatgaat cgcactcttc atatccgaaa 3180
 tctccttaga aagctcggtt actttggcgg agttgacttg gagtgca 3227

60 <210> 4
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> *Arabidopsis thaliana*
 65

ES 2 347 399 A1

	<400> 4	
	cgcggatcca cagagcatca tcatcatcac	30
5	<210> 5	
	<211> 26	
	<212> DNA	
10	<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>	
	<400> 5	
15	tccccgggc aacacacaga caggtc	26
	<210> 6	
	<211> 17	
20	<212> DNA	
	<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>	
	<400> 6	
25	gcaagtgggt ggctgca	17
	<210> 7	
30	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>	
35	<400> 7	
	caacacacag acaggtc	17
40	<210> 8	
	<211> 20	
	<212> DNA	
45	<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>	
	<400> 8	
50	caggtcttgg tcacatcgag	20
	<210> 9	
	<211> 19	
	<212> DNA	
55	<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>	
	<400> 9	
60	cagtcaagtt ctacaccag	19
	<210> 10	
	<211> 21	
65	<212> DNA	
	<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>	

ES 2 347 399 A1

<400> 10
gcggaacaat gtggttgctc g 21
5
<210> 11
<211> 24
<212> DNA
10 <213> *Arabidopsis thaliana*
<400> 11
15 tgctggtgcg atctttttg tgtg 24
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 347 399

② Nº de solicitud: 200802652

③ Fecha de presentación de la solicitud: **18.09.2008**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	LI, J. et al., "Subclade of flavin-monoxygenases involved in aliphatic glucosinolate biosynthesis.", PLANT PHYSIOLOGY, 2008 Nov., Vol. 148, No. 3, páginas 1721-1733, ISSN: 0032-0889, Epub.: 17.09.2008, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión.	1-11
X	WO 2008023263 A2 (UNIV. COPENHAGEN y otros) 28.02.2008, página 5, línea 25 - página 6, línea 37; página 17, líneas 10-16; página 17, línea 35 - página 22, línea 6; página 98, línea 5 - página 99, línea 31; figura 16; ejemplo 11.	1-11
X	SCHLAICH, N.L., "Flavin-containing monooxygenases in plants: looking beyond detox.", TRENDS IN PLANT SCIENCE, 2007, Vol. 12, No. 9, páginas 412-418, ISSN: 1360-1385, todo el documento, Figura 2.	6,7
A	HIBINO, T. et al., "Functional characterization of choline monooxygenase, an enzyme for betaine synthesis in plants.", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2002, Vol. 277, No. 44, páginas 41352-41360, ISSN: 0021-9258, Resultados: 'Expression of Spinach CMO in Arabidopsis', Figura 8; Discusión.	1-11
A	SCHLENK, D. et al., "Correlation of salinity with flavin-containing monooxygenase activity but not cytochrome P450 activity in the euryhaline fish (Platichthys flesus)", BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, 1996, Vol. 52, No. 5, páginas 815-818, ISSN: 0006-2952, todo el documento.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

15.10.2010

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/5



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 347 399

② Nº de solicitud: 200802652

③ Fecha de presentación de la solicitud: 18.09.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	LARSEN, B.K. et al., "Effect of salinity on flavin-containing monooxygenase expression and activity in rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).", JOURNAL OF COMPARATIVE PHYSIOLOGY. B, BIOCHEMICAL, SYSTEMIC, AND ENVIRONMENTAL PHYSIOLOGY, Jun 2001, Vol. 171, No. 5, páginas 421-429, ISSN: 0174-1578, todo el documento.	1-11
A	LANG, D.H. et al., "Isoform specificity of trimethylamine N-oxygenation by human flavin-containing monooxygenase (FMO) and P450 enzymes: selective catalysis by FMO3.", BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, 1998, Vol. 56, No. 8, páginas 1005-1012, ISSN: 0006-2952, todo el documento.	1-11
A	YANCEY, P.H., "Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses.", JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY, 2005, Vol. 208, No. 15, páginas 2819-2830, ISSN: 0022-0949, todo el documento.	12-17
A	DOAN-NGUYEN, V. et al., "The effects of cosolutes on protein dynamics: the reversal of denaturant-induced protein fluctuations by trimethylamine N-oxide.", PROTEIN SCIENCE, 2007, Vol. 16, No. 1, páginas 20-29, ISSN: 0961-8368, todo el documento.	12-17
A	CUSHMAN, J.C., "Osmoregulation in Plants: Implications for Agriculture.", AMERICAN ZOOLOGIST, 2001 Vol. 41, No. 4, páginas 758-769, ISSN: 0003-1569, todo el documento.	12-17

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

15.10.2010

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

2/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A01N 33/24 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 3/04 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01N, C12N, A01H

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, EMBL-EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.10.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	12-17	SÍ
	Reivindicaciones	1-11	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	12-17	SÍ
	Reivindicaciones	1-11	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Li, J. et al., Plant Physiol., (2008 Nov.), 148(3): 1721-33. Epub.: 17.09.2008.	17-09-2008
D02	WO 2008/023263 A2	28-02-2008
D03	Schlaich, N.L., Trends Plant Sci., (2007 Sep), 12(9): 412-8.	2007
D04	Hibino, T. et al., J. Biol. Chem., (2002), 277(44): 41352-60.	2002
D05	Schlenk, D. et al., Biochem. Pharmacol., (1996), 52(5): 815-8.	1996
D06	Larsen, B.K. et al., J. Comp. Physiol. B., (2001), 171(5): 421-29.	2001
D07	Lang, D.H. et al., Biochem. Pharmacol., (1998), 56(8):1005-12.	1998
D08	Yancey, P.H., J. Exp. Biol.,(2005), 208(15): 2819-30.	2005
D09	Doan-Nguyen, V. et al., Protein Sci., (2007), 16(1): 20-9.	2007
D10	Cushman, J.C., Amer. Zool., (2001), 41(4): 758-69.	2001

Observaciones sobre documentos:

En D1-D3 se identifican y caracterizan flavín-monooxigenasas (FMOs) de plantas.

En D4 se identifican y caracterizan una colina-monooxigenasa (CMO) de espinaca.

En D5-D7 se describen flavín-monooxigenasas (FMOs) de teleósteos y humano.

En D8 se revisa la osmoregulación en plantas.

En D9-D10 se describe al óxido de trimetilamina (TMAO) como osmoprotector.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

1.1. Reivindicaciones independientes 1, 4, 6, 10 y 11.

1.1.1. En los documentos D1-D3 se describe la identificación y caracterización de cinco flavín-monooxigenasas (FMOGS-OX1-5) procedentes de *Arabidopsis thaliana* y de sus genes codificadores. En particular, la secuencia del gen At1g12140 que codifica la flavín-monooxigenasa FMOGS-OX5 es idéntica a la secuencia del gen RCI5 (SEQ. ID. Nos 1 y 3) de la invención (cf. D1: Figura 2; D2: páginas 98-99; D3: Figura 2; Base de Datos GENBANK de NCBI, Código de Acceso (AC): BT030387). Además, en D1 se describe la obtención de plantas transgénicas que sobreexpresan la enzima FMOGS-OX5, cuya secuencia es idéntica a la flavín-monooxigenasa de la invención (SEQ. ID. Nos 1 y 2), así como la obtención de vectores que expresan FMOGS-OX5 y de microorganismos portadores de los mismos (cf. D1: Materiales y Métodos: "Heterologous Expression of FMOGS-OX Proteins in *Escherichia coli*", "Genotyping and RT-PCR of FMOGS-OX T-DNA Insertion Mutants", "FMOGS-OX Overexpression in *Arabidopsis*", "Plant Transformation". D2: página 5, línea 25 - página 6, línea 37; página 17, líneas 10-16; página 17, línea 35 - página 22, línea 6; página 98, línea 5 - página 99, línea 31; figura 16; ejemplo 11). Por consiguiente, el objeto de protección de las reivindicaciones independientes 1, 4, 6, 8, 10 y 11 y el de las reivindicaciones dependientes 2, 3, 5, 7 y 9 se considera que no es nuevo ni tiene actividad inventiva sobre la base de los documentos D1-D3.

1.2. La presente solicitud no satisface los criterios establecidos en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-11 no es nuevo ni tiene actividad inventiva de acuerdo con los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes.