



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 980**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05778218 .7**

96 Fecha de presentación : **06.09.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1941045**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.07.2008**

54

Título: **Uso de una secuencia de ácido nucleico para la generación de plantas transgénicas que tienen tolerancia a la sequía mejorada.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.08.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.08.2011

73

Titular/es: **STICHTING DIENST
LANDBOUWKUNDIG ONDERZOEK
Costerweg 50
6701 BH Wageningen, NL**

72

Inventor/es: **Aharoni, Asaph;
Dixit, Shital;
Trijatmiko, Kurniawan, Rudi;
Hiemstra, Jelle y
Pereira, Andy**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 363 980 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de una secuencia de ácido nucleico para la generación de plantas transgénicas que tienen tolerancia a la sequía mejorada

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al uso de una secuencia de ácido nucleico para la generación de plantas transgénicas que tienen tolerancia a la sequía mejorada y a un método para la generación de plantas transgénicas con tolerancia a la sequía mejorada.

Antecedentes de la invención

- 10 Las plantas constantemente enfrentan factores de estrés ambiental que afectan su supervivencia. Los factores de estrés biótico y abiótico adversos pueden reducir el crecimiento y la productividad de las plantas de cultivo. Dado que la tolerancia al estrés biótico y abiótico tiene un impacto directo sobre la productividad de la planta (rendimiento y calidad del producto), se han estudiado ampliamente mecanismos para conferir o mejorar la tolerancia al estrés y se han descrito diversos abordajes para conferir tolerancia al estrés ambiental en la técnica. Sin embargo, aunque los mecanismos más estudiados se refieren a interacciones relativas al estrés biótico o abiótico, en la naturaleza las plantas resisten y responden a múltiples factores de estrés.

- 15 Se ha estimado que los factores de estrés ambiental provocan una reducción en el rendimiento del cultivo de hasta 70% en comparación con el rendimiento en condiciones favorables (Boyer, Science 218, 443-448, 1982). Por consiguiente, la estabilidad de los cultivos con respecto a cambios en los factores ambientales es uno de los rasgos más valorados para la reproducción. Sin embargo, la reproducción tradicional se ve restringida por la complejidad de los rasgos de tolerancia al estrés, la baja varianza genética de los componentes de rendimiento y la falta de técnicas de selección eficientes. Por consiguiente, puede ser útil seguir genes específicos que codifican componentes de tolerancia al estrés en la reproducción mediante selección asistida por marcadores, así como también mediante plantas manipuladas genéticamente para ser más tolerantes al estrés.

- 20 Entre las complejidades de las reacciones al estrés ambiental en las plantas de cultivo, el uso del modelo simple de Arabidopsis ofrece una oportunidad para un análisis genético preciso de las vías de reacción al estrés comunes a la mayoría de las plantas. La importancia del modelo de Arabidopsis es evidente en ejemplos recientes de mejora de la tolerancia a la sequía, sal y congelación (Jaglo-Ottosen et al., Science 280, 104-106, 1998; Kasuga et al., Nat. Biotechnol. 17, 287-291, 1999) mediante el uso de genes identificados en Arabidopsis. Estos genes son factores de transcripción de la familia ERF/AP2 que regula la expresión de varios genes corriente abajo que confieren resistencia al estrés en distintas plantas heterólogas.

- 25 Uno de los estreses ambientales más graves que las plantas tienen que soportar a nivel mundial es el estrés por sequía o estrés por deshidratación. Cuatro décimos de las tierras del mundo destinadas a la agricultura se encuentran en regiones áridas o semiáridas. Además, también las plantas cultivadas en regiones con precipitaciones relativamente altas pueden sufrir episodios de sequía durante la estación de crecimiento. Muchas regiones destinadas a la agricultura, especialmente en países en desarrollo, tienen sistemáticamente pocas lluvias y dependen del riego para mantener los rendimientos. El agua es escasa en muchas regiones y su valor aumentará sin dudas con el calentamiento global, resultando en una necesidad aun mayor de plantas de cultivo tolerantes a la sequía que mantengan los niveles de rendimiento (o incluso que tengan rendimientos mayores) y la calidad del rendimiento en condiciones de poca disponibilidad de agua. Se ha estimado que para producir 1 kg de algodón son necesarios aproximadamente 15.000 litros de agua en la agricultura de regadío, mientras que para 1 kg de arroz son necesarios 4.000 litros. Mejorar o manipular la tolerancia de las plantas de cultivo a episodios cortos o prolongados de sequía y reducir las necesidades de agua de la agricultura de regadío es claramente un objetivo importante.

- 30 Si bien la reproducción (por ejemplo, asistida por marcadores) para la tolerancia a la sequía es posible y se está aplicando para una variedad de especies de cultivos (principalmente en cereales tales como maíz, arroz de secano, trigo, sorgo, mijo perla, pero también en otras especies tales como caupí, guandú y alubia *Phaseolus*), la misma es extremadamente difícil y tediosa porque la tolerancia o resistencia a la sequía es un rasgo complejo, determinado por la interacción de muchos loci e interacciones gen-ambiente. Por consiguiente, se buscan genes únicos, dominantes, que confieran o mejoren la tolerancia a la sequía y que puedan transferirse fácilmente a variedades de cultivos y líneas de reproducción de alto rendimiento. La mayor parte del agua se pierde a través de las hojas, por la transpiración, y muchos abordajes transgénicos se han centrado en modificar la pérdida de agua por medio del cambio de las hojas. Por ejemplo WO00/73475 describe la expresión de una enzima málica C4 NADP+ del maíz en células epidérmicas y células oclusivas del tabaco que, de acuerdo con la divulgación, aumenta la eficiencia del uso del agua de la planta modulando la apertura estomatal. Otros abordajes implican, por ejemplo, la expresión de osmoprotectores tales como azúcares (por ejemplo, enzimas biosintéticas de trehalosa) en plantas para aumentar la tolerancia al estrés hídrico, ver por ejemplo WO99/46370. Otros abordajes se han centrado en cambiar la arquitectura de las raíces de las plantas.

A la fecha, otro abordaje prometedor para mejorar la tolerancia a la sequía es la sobreexpresión de genes CBF/DREB (DREB se refiere a unión a elemento de respuesta a la deshidratación; unión DRE) que codifican varios

factores de transcripción AP2/ERF (factor de respuesta a etileno) (WO98/09521). La sobreexpresión de las proteínas CBF/DREB1 en *Arabidopsis* resultó en un aumento en la tolerancia a la congelación (también denominada como tolerancia a la deshidratación inducida por congelación) (Jaglo-Ottosen et al., Science 280, 104-106, 1998; Liu et al., Plant Cell 10, 1391-1406, 1998; Kasuga et al., Nat. Biotechnol. 17, 287-291, 1999; Gilmour et al. Plant Physiol. 124, 1854-1865, 2000) y mejoró la tolerancia de las plantas recombinantes a la deshidratación provocada por déficit hídrico o exposición a salinidad alta (Liu et al., 1998, supra; Kasuga et al., 1999, supra). Otro factor de transcripción CBF, CBF4, se ha descrito como un regulador de la adaptación a la sequía en *Arabidopsis* (Haake et al. 2002, Plant Physiology 130, 639-648).

WO 2004/031349 describe un factor de transcripción denominado G1753, que tiene la secuencia SEQ ID NO: 3, tal como se describe a continuación en la presente. Esta referencia también describe plantas de cultivo transgénicas que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la secuencia SEQ ID NO: 3. De acuerdo con esta referencia, G1753 puede usarse para crear formas enanas de plantas ornamentales y para alterar la señalización de azúcar en plantas.

A pesar de la disponibilidad de algunos genes que se ha demostrado que mejoran la tolerancia a la sequía en una cantidad de especies vegetales, tales como Brassicaceae y Solanaceae, existe la necesidad de identificar otros genes con la capacidad de conferir o mejorar la tolerancia a la sequía cuando se expresan en plantas de cultivo. En una realización, la presente invención proporciona el uso de un gen para la generación de plantas transgénicas que tienen una combinación de dos o más de los siguientes fenotipos: tolerancia a la sequía mejorada, resistencia a enfermedades mejorada y estructura de raíces mejorada.

Los estreses bióticos, como los patógenos (bacterias, hongos, virus) o plagas (insectos, nematodos), son los más comunes y normalmente varios mecanismos protegen a las plantas de la mayoría de estas amenazas. No obstante, en ciertos casos, las plantas exhiben una reacción susceptible a patógenos o plagas específicos y se consideran huéspedes para esos patógenos o plagas. La interacción huésped-patógeno ha sido caracterizada por el concepto gen por gen, donde genes específicos de la planta huésped y un patógeno/plaga interactúan para exhibir una reacción susceptible o resistente. Aunque la genética molecular de tales interacciones se ha caracterizado en los últimos años, el uso de tales genes de resistencia simples ha enfrentado dificultades por la mutabilidad versátil del sistema patógeno que produce la diversidad para superar a los genes de resistencia. En general los genes de resistencia pertenecen a pocas clases generales de proteínas compuestas por repeticiones y dominios adicionales ricos en leucina. Aunque estos genes e interacciones genéticas son interesantes para estudiar las interacciones planta-patógeno, falta aún para su empleo en la protección de los cultivos contra una diversidad y rango más amplio de patógenos. Otra forma que puede proporcionar resistencia es usar genes que participan en la protección de plantas contra un rango diverso de patógenos usando mecanismos que no dependen del reconocimiento de plantas y patógenos. Esto conferiría una resistencia específica no racial que es más amplia, ya que conferiría resistencia a un rango más amplio de patógenos.

Definiciones generales

La expresión "secuencia de ácido nucleico" (o molécula de ácido nucleico) se refiere a una molécula de ADN o ARN en forma de hebra simple o doble, particularmente un ADN que codifica una proteína o fragmento de proteína de acuerdo con la invención. Una "secuencia de ácido nucleico aislada" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que ya no se encuentra en el ambiente natural del que se aisló, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico en una célula huésped bacteriana o en el genoma nuclear o plastídico de la planta.

Los términos "proteína" o "polipéptido" se usan indistintamente y se refieren a moléculas que consisten en una cadena de aminoácidos, sin referencia a un modo de acción, tamaño, estructura tridimensional u origen específicos. Un "fragmento" o "porción" de una proteína, por consiguiente, puede designarse también como una "proteína". Una "proteína aislada" se usa para referirse a una proteína que ya no se encuentra en su ambiente natural, por ejemplo in vitro o en una célula huésped vegetal o bacteriana recombinante.

El término "gen" significa una secuencia de ADN que comprende una región (región transcrita) que se transcribe en una molécula de ARN (por ejemplo, ARNm) en una célula, unida operativamente a regiones reguladoras apropiadas (por ejemplo, un promotor). Por consiguiente, un gen puede comprender diversas secuencias unidas operativamente, tales como un promotor, una secuencia líder 5' que comprende, por ejemplo, secuencias que participan en el inicio de la traducción, una región codificante (de proteína) (ADNc o ADN genómico) y una secuencia 3' no traducida que comprende, por ejemplo, sitios de terminación de la transcripción.

Un "gen quimérico" (o gen recombinante) se refiere a cualquier gen que en general no se encuentra naturalmente en una especie, en particular un gen en el que están presentes una o más partes de la secuencia de ácido nucleico que no están asociadas entre sí naturalmente. Por ejemplo, el promotor no está asociado naturalmente con parte o la totalidad de la región transcrita ni con otra región reguladora. Se entiende que la expresión "gen quimérico" incluye constructos de expresión en los que un promotor o secuencia reguladora de la transcripción está unida operativamente a una o más secuencias codificantes o a una secuencia antisentido (complemento inverso de la hebra con sentido) o secuencia de repeticiones invertidas (con sentido y antisentido, con lo cual el transcrito de ARN forma ARN de doble hebra tras la transcripción).

La "expresión de un gen" se refiere al proceso en donde una región de ADN, que está unida operativamente a regiones reguladoras apropiadas, particularmente un promotor, se transcribe en un ARN, que es biológicamente activo, es decir, que es capaz de traducirse en una proteína o péptido biológicamente activos (o fragmento de péptido activo) o que es activo en sí mismo (por ejemplo, en el silenciamiento génico posttranscripcional o ARNi).

5 Una proteína activa en ciertas realizaciones se refiere a una proteína que tiene una función negativa dominante debido a la presencia de un dominio represor. Preferiblemente, la secuencia codificante está en orientación sentido y codifica una proteína o péptido biológicamente activos deseados o un fragmento de péptido activo. En abordajes de silenciamiento génico, la secuencia de ADN está presente preferiblemente en forma de un ADN antisentido o un ADN de repetición invertida que comprende una secuencia corta del gen objetivo en orientación antisentido o sentido

10 y antisentido. La "expresión ectópica" se refiere a la expresión en un tejido en el que el gen no se expresa normalmente.

Una "secuencia reguladora de la transcripción" se define en la presente como una secuencia de ácido nucleico que es capaz de regular la tasa de transcripción de una secuencia (codificante) unida operativamente a la secuencia reguladora de la transcripción. Una secuencia reguladora de la transcripción, tal como se define en la presente,

15 comprenderá, por consiguiente, todos los elementos secuenciales necesarios para el inicio de la transcripción (elementos promotores), para mantener y para regular la transcripción, incluidos, por ejemplo, atenuadores o potenciadores. Aunque se hace referencia mayormente a secuencias reguladoras de la transcripción corriente arriba (5') de una secuencia codificante, las secuencias reguladoras encontradas corriente abajo (3') de una secuencia codificante también están abarcadas en esta definición.

20 Tal como se usa en la presente, el término "promotor" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que tiene como función controlar la transcripción de uno o más genes localizados corriente arriba con respecto a la dirección de la transcripción del sitio de inicio de la transcripción del gen, y se identifica estructuralmente por la presencia de un sitio de unión para ARN polimerasa dependiente de ADN, sitios de inicio de la transcripción y otras secuencias de ADN, incluidos, a modo no taxativo, sitios de unión a factores de transcripción, sitios de unión a proteínas represoras y

25 activadoras y cualesquiera otras secuencias de nucleótidos que los expertos en la técnica saben que actúan directa o indirectamente para regular la cantidad de transcripción del promotor. Un promotor "constitutivo" es un promotor que está activo en la mayor parte de los tejidos en la mayoría de las condiciones fisiológicas y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que se regula fisiológicamente (por ejemplo, mediante aplicación externa de ciertos compuestos) o a través del desarrollo. Un promotor "específico de tejido" solo está activo en tipos específicos de tejidos o células.

30

Tal como se usa en la presente, la expresión "unido operativamente" se refiere a un enlace de elementos polinucleótidos en una relación funcional. Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o, mejor dicho, una secuencia reguladora de la transcripción, está unida operativamente a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la

35 secuencia codificante. Unido operativamente significa que las secuencias de ADN que se unen son típicamente contiguas y que es necesario ligar dos regiones que codifican proteínas, contiguas y en marco de lectura para producir una "proteína quimérica". Una "proteína quimérica" o "proteína híbrida" es una proteína compuesta por varios "dominios" de proteína (o motivos) que no se encuentra como tal naturalmente pero que se ligan para formar una proteína funcional, que exhibe la funcionalidad de los dominios ligados (por ejemplo, unión o represión de ADN que conduce a una función negativa dominante). Una proteína quimérica también puede ser una proteína de fusión de dos o más proteínas naturales. El término "dominio" tal como se usa en la presente significa cualquier parte(s) o dominio(s) de la proteína con una estructura o función específica que puede transferirse a otra proteína para proporcionar una nueva proteína híbrida con al menos la característica funcional del dominio. Los dominios

40 específicos también pueden usarse para identificar miembros proteicos que pertenecen a un grupo de factores de la transcripción similares, tal como ortólogos de otras especies vegetales.

45

La expresión "péptido objetivo" se refiere a secuencias de aminoácidos que dirigen una proteína a organelos intracelulares tales como plástidos, preferiblemente cloroplastos, mitocondrias o al espacio extracelular (péptido señal de secreción). Una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido objetivo puede fusionarse (en marco) con la secuencia de ácido nucleico que codifica el extremo terminal amino (extremo N terminal) de la proteína.

50 Un "constructo de ácido nucleico" o "vector" en la presente se entiende que significa una molécula de ácido nucleico hecha por el hombre resultante del uso de tecnología de ADN recombinante y que se usa para administrar ADN exógeno a una célula huésped. La estructura principal del vector puede ser por ejemplo un vector binario o superbinario (ver, por ejemplo, US5591616, US2002138879 y WO9506722), un vector cointegrado o un vector de ADN-T, tal como se conoce en la técnica y como se describe en otras partes de la presente, en el que se integra un gen quimérico o, si ya está presente una secuencia reguladora de la transcripción apropiada, solo una secuencia de ácido nucleico deseada (por ejemplo, una secuencia codificante, una secuencia antisentido o una secuencia de repeticiones invertidas) se integra corriente abajo de la secuencia reguladora de la transcripción. Los vectores generalmente comprenden elementos genéticos adicionales para facilitar su uso en la clonación molecular, tales como por ejemplo, marcadores seleccionables, múltiples sitios de clonación y similares (ver más adelante).

55

60 Una "célula huésped" o una "célula huésped recombinante" o una "célula transformada" son expresiones que se refieren a una nueva célula individual (u organismo que surge como resultado de al menos una molécula de ácido

nucleico, que comprende especialmente un gen quimérico que codifica una proteína deseada o una secuencia de ácido nucleico que tras la transcripción proporciona un ARN antisentido o un ARN repetido invertido (o ARN horquillado) para silenciamiento de un gen/familia génica objetivo, que se ha introducido en dicha célula. La célula huésped es preferiblemente una célula vegetal o una célula bacteriana. La célula huésped puede contener el constructo de ácido nucleico como una molécula replicante extracromosómica (episomal) o, más preferiblemente, comprende el gen quimérico integrado en el genoma nuclear o plasmídico de la célula huésped.

La expresión "marcador seleccionable" es una expresión conocida para un experto en la técnica y se usa en la presente para describir cualquier entidad genética que, cuando se expresa, puede usarse para seleccionar una célula o células que contienen el marcador seleccionable. Los productos génicos que son marcadores seleccionables confieren por ejemplo resistencia a antibióticos o, más preferiblemente, resistencia a herbicidas u otro rasgo seleccionable tal como un rasgo fenotípico (por ejemplo, un cambio en la pigmentación) o necesidades nutricionales. El término "reportero" se usa principalmente para referirse a marcadores visibles, tales como proteína verde fluorescente (GFP), eGFP, luciferasa, GUS y similares.

El término "ortólogo" de un gen o proteína se refiere en la presente al gen o proteína homólogos encontrados en otras especies, que tiene la misma función que el gen o proteína, pero que (generalmente) se diferencian en la secuencia desde el momento en que las especies con los genes se diferenciaron (es decir, los genes evolucionaron de un antepasado común por especiación). Por consiguiente, los ortólogos de un gen de Arabidopsis pueden identificarse en otras especies vegetales en base a comparaciones de secuencias (por ejemplo, en base a porcentajes de identidad secuencial con respecto a la secuencia total o con respecto a dominios específicos) y análisis funcionales.

Los términos "homólogo" y "heterólogo" se refieren a la relación entre una secuencia de ácido nucleico o aminoácidos y su célula huésped u organismo, especialmente en el contexto de organismos transgénicos. Por consiguiente, una secuencia homóloga se encuentra naturalmente en la especie huésped (por ejemplo, una planta de tomate transformada con un gen de tomate), mientras que una secuencia heteróloga no se encuentra naturalmente en la célula huésped (por ejemplo, una planta de tomate transformada con una secuencia de plantas de papa). Dependiendo del contexto, el término "homólogo" puede referirse alternativamente a secuencias que son descendientes de una secuencia ancestral común (por ejemplo, pueden ser ortólogos).

Las "condiciones de hibridación rigurosas" pueden usarse para identificar secuencias de nucleótidos que son sustancialmente idénticas a una secuencia de nucleótidos dada. Las condiciones de rigurosidad dependen de las secuencias y serán diferentes en circunstancias diferentes. Generalmente, las condiciones de rigurosidad se seleccionan en aproximadamente 5°C menos que el punto de fusión térmico (T_m) para las secuencias específicas a una fuerza iónica y un pH definidos. La T_m es la temperatura (a una fuerza iónica y pH definidos) en la que 50% de la secuencia objetivo se hibridiza hasta alcanzar una sonda perfectamente apareada. Típicamente las condiciones de rigurosidad se seleccionarán en una concentración de sal de aproximadamente 0,02 molar a pH 7 y una temperatura de al menos 60°C. Disminuyendo la concentración de sal y/o aumentando la temperatura aumenta la rigurosidad. Las condiciones de rigurosidad para las hibridaciones ARN-ADN (transferencias Northern usando una sonda de por ejemplo 100nt) son por ejemplo aquellas que incluyen al menos un lavado en 0,2X SSC a 63°C durante 20min, o condiciones equivalentes. Las condiciones de rigurosidad para las hibridaciones ADN-ADN (transferencias Southern usando una sonda de por ejemplo 100nt) son por ejemplo aquellas que incluyen al menos un lavado (generalmente 2) en 0,2X SSC a una temperatura de al menos 50°C, en general aproximadamente 55°C, durante 20 min, o condiciones equivalentes. Ver también Sambrook et al. (1989) y Sambrook and Russell (2001).

La "identidad secuencial" y la "similitud secuencial" pueden determinarse mediante la alineación de dos péptidos o dos secuencias de nucleótidos usando algoritmos de alineación globales o locales. Luego las secuencias pueden denominarse "sustancialmente idénticas" o "esencialmente similares" cuando (están óptimamente alineadas mediante por ejemplo los programas GAP o BESTFIT usando parámetros predeterminados) comparten al menos un cierto porcentaje mínimo de identidad secuencial (tal como se define a continuación). GAP usa el algoritmo de alineación global Needleman and Wunsch para alinear dos secuencias en toda su longitud, maximizando la cantidad de apareamientos y minimizando el número de brechas. Generalmente se usan los parámetros predeterminados de GAP, con una penalidad por creación de brecha = 50 (nucleótidos) / 8 (proteínas) y una penalización por extensión de brecha = 3 (nucleótidos) / 2 (proteínas). Para nucleótidos se usa la matriz de puntuación predeterminada nwsgapdna y para proteínas la matriz de puntuación predeterminada es Blossum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919). Las alineaciones secuenciales y las puntuaciones para porcentaje de identidad secuencial pueden determinarse usando programas informáticos, tales como GCG Wisconsin Package, Versión 10.3, comercializado por Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752 EE.UU. De forma alternativa, la similitud o identidad porcentual puede determinarse buscando en bases de datos tales como FASTA, BLAST, etc.

En el presente documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitado para significar que los artículos que preceden a la palabra están incluidos, pero los artículos que no se mencionan específicamente no están excluidos. Adicionalmente, la referencia a un elemento mediante el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que más de uno de los elementos esté presente, a menos que el contexto establezca claramente que hay uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" por consiguiente significa generalmente "al menos uno". Se comprenderá además que cuando se hace referencia a

"secuencias" en la presente, generalmente se hace referencia a las moléculas físicas reales con una cierta secuencia de subunidades (por ejemplo, aminoácidos).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 Usando etiquetado por activación, los inventores aislaron y caracterizaron un gen de *Arabidopsis*, denominado *HARDY* (*HRD*), cuya sobreexpresión resultó en varios cambios en la arquitectura de la planta y estructuras internas asociadas en comparación con el tipo silvestre. La activación de *HRD* resultó en hojas que son más gruesas en aspecto, con una estructura de planta resistente, compacta más pequeña. Es más difícil arrancar a la planta del suelo, probablemente debido a la red de raíces laterales mejorada. El gen *HRD* fue clonado y secuenciado y se descubrió que es similar a factores transcripcionales definidos como AP2/ERF (Alonso et al. 2003, Science 301, 653-657). Sin embargo, no se han descrito funciones de *HRD* y no se han sugerido usos para el gen *HRD* en la técnica.

10 La expresión constitutiva del gen *HRD* en plantas de *Arabidopsis* transgénicas mostró el mismo fenotipo que la línea etiqueta de activación original, aunque el fenotipo fue más severo. Se evaluó el *HRD* mutante de la sobreexpresión original para resistencia a condiciones de estrés abiótico y biótico y se descubrió que es considerablemente más resistente que los testigos de tipo silvestre. Adicionalmente, una estrategia de sobreexpresión condicional, usando una fusión de *HRD* con un receptor de glucocorticoides, mostró que el fenotipo puede inducirse y las plantas con fenotipo leve o casi sin fenotipo fueron resistentes a las pruebas de estrés. Los experimentos de micromatriz del *hdr* mutante, usando micromatrices de genoma de *Arabidopsis* completo, mostraron una expresión diferencial de un conjunto de genes que eran diferentes a los de la sobreexpresión de los otros genes AP2/ERF resistentes al estrés conocidos como DREB1A, indicando un mecanismo diferente para conferir resistencia general al estrés.

20 Secuencias de ácido nucleico y proteínas usadas en la invención

En la invención se usan secuencias de ácido nucleico y secuencias de aminoácidos de miembros del factor de transcripción *HARDY*.

25 La función de una proteína puede evaluarse usando una variedad de métodos conocidos, preferiblemente comparando el fenotipo de transformantes que expresan constitutivamente la proteína que se está evaluando con el fenotipo de transformantes que sobreexpresan *HRD* de la misma especie huésped (y variedad) (preferiblemente que comprende un gen codificante de *HRD* quimérico integrado establemente en el genoma del huésped), permitiendo una comparación directa del efecto funcional sobre el fenotipo de los transformantes. Se comprenderá que en cualquier experimento de transformación se observa un cierto grado de variación en el fenotipo de los transformantes, normalmente debido a efectos de posición en el genoma y/o debido a la cantidad de copias. Un experto en la técnica sabrá cómo comparar a los transformantes entre sí, por ejemplo, seleccionando eventos de una sola copia y analizando sus fenotipos. Otros métodos para determinar o confirmar la función gen/proteína in vivo incluyen la generación de mutantes knockout o estudios de expresión transitoria. Los estudios de expresión génica promotor-reportero también pueden proporcionar información sobre el patrón de expresión espacio-temporal y el rol de la proteína.

35 La (sobre)expresión constitutiva del miembro génico *HARDY* resulta en uno o más de los siguientes cambios fenotípicos en comparación con los transformantes de tipo silvestre o testigo:

Hojas más gruesas con una capa mesófila aumentada

Planta más pequeña, compacta y con aspecto resistente

Estructura de raíces más fuerte con raíces laterales mejoradas

40 Resistencia aumentada a un patógeno, por ejemplo, no específico para ninguna raza (*Verticillium*)

Tolerancia mejorada a la sequía como se demuestra por una supervivencia mayor que la de tipo silvestre

Estos fenotipos pueden utilizarse para crear plantas transgénicas o tejidos/órganos vegetales con características agronómicas modificadas y mejoradas, tales como tolerancia a la sequía mejorada y otras tal como se describe en otras partes de la presente.

45 La invención proporciona el uso de una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3 o una proteína al menos 70% idéntica a la SEQ ID NO: 3, o una proteína ortóloga para la generación de plantas transgénicas que tienen una combinación de dos o más de los fenotipos seleccionados del grupo que consiste en: tolerancia a la sequía mejorada, resistencia a enfermedades mejorada y estructura de raíces mejorada.

50 Adicionalmente, la invención proporciona un método para la generación de plantas transgénicas que tienen una combinación de dos o más de los fenotipos seleccionados del grupo que consiste en: tolerancia a la sequía mejorada, resistencia a enfermedades mejorada y estructura de raíces mejorada que comprende insertar en el genoma de la planta un gen quimérico que comprende una secuencia reguladora de la transcripción activa en

células vegetales unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3 o una proteína al menos 70% idéntica a la SEQ ID NO: 3 o una proteína ortóloga.

5 En una realización preferida dicha secuencia reguladora de la transcripción se selecciona del grupo que consiste en: un promotor constitutivo, un promotor inducible, un promotor específico de tejido y un promotor regulado por el desarrollo.

Adicionalmente, se prefiere que la secuencia reguladora de la transcripción sea un promotor inducible por estrés.

Preferiblemente la secuencia de ácido nucleico codificante usada en esta invención tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1.

10 Otros miembros similares a *HARDY* pueden identificarse in silico, por ejemplo, identificando las secuencias de ácido nucleico o proteínas en bases de datos de ácidos nucleicos o proteínas existentes (por ejemplo, GENBANK, SWISSPROT, TrEMBL) y usando programas informáticos de análisis de secuencias estándares, tales como herramientas de búsqueda de similitud secuencial (BLASTN, BLASTP, BLASTX, TBLAST, FASTA, etc.).

15 Las proteínas de *HRD* usadas en la invención, por ejemplo proporcionadas como la SEQ ID NO: 3, pueden aislarse a partir de fuentes naturales, sintetizarse de novo mediante síntesis química (usando por ejemplo un sintetizador peptídico tal como el comercializado por Applied Biosystems) o producirse mediante células huéspedes recombinantes. Las proteínas de *HRD* usadas en la invención pueden usarse para aumentar los anticuerpos mono o policlonales que pueden, por ejemplo, usarse para la detección de proteínas de *HRD* en muestras (métodos y kits de análisis inmunquímicos).

20 Las proteínas de *HRD* quiméricas o híbridas comprenden segmentos del dominio AP2 y otras partes de la proteína de *HRD*. Los dominios pueden intercambiarse (entrecruzamiento de dominios) entre las proteínas de *HRD* y otras proteínas no relacionadas, siempre que la funcionalidad de la proteína quimérica resultante sea esencialmente similar a la de *HRD*. Por consiguiente, una proteína de *HRD* quimérica puede, por ejemplo, comprender la proteína de *HRD*, incluyendo el dominio AP2 y además uno o más dominios proteicos que no se encuentran normalmente en las proteínas de *HRD*, tales como dominios estabilizantes, dominios de unión (por ejemplo, dominios de unión a hormonas, tales como los encontrados en el receptor de glucocorticoides, resultando en inducibilidad), etc. En otra realización, se proporcionan proteínas de *HRD* quiméricas que comprenden una fusión *HRD*-dominio represor, tal como la fusión *HRD*-EAR descrita más adelante. En plantas transgénicas, la sobreexpresión de estas proteínas quiméricas resulta en un fenotipo negativo dominante. La fusión de *HRD*-dominio represor también puede comprender dominios adicionales fusionados a la misma, tales como, por ejemplo, un dominio de unión a hormona (ver por ejemplo, Markel et al. 2002, Nucl. Acid Res. 30, 4709-4719).

35 También se usan secuencias de ácido nucleico (ADN genómico, ADNc, ARN) que codifican la proteína de *HRD*, tales como por ejemplo *HRD*, tal como se definió anteriormente (incluidas todas las proteínas de *HRD* quiméricas o híbridas), o cualquier proteína de *HRD* de otras especies. Debido a la degeneración del código genético varias secuencias de ácido nucleico pueden codificar la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de ácido nucleico que se proporcionan incluyen secuencias de ácido nucleico naturales, artificiales o sintéticas. Se proporciona un ejemplo de la secuencia de ácido nucleico que codifica *HRD* en la SEQ ID NO: 1 (secuencia que codifica la proteína de *HRD* de Arabidopsis) y la SEQ ID NO: 2 (secuencia de *HRD* genómico de Arabidopsis). Se comprenderá que cuando las secuencias se representan como secuencias de ADN cuando se hace referencia a ARN, la secuencia base real de la molécula de ARN es idéntica con la diferencia de que se reemplaza timina (T) por uracilo (U).

40 Será evidente que pueden usarse muchos métodos para identificar, sintetizar o aislar variantes o fragmentos de secuencias de ácido nucleico de *HRD*, tales como hibridación de ácido nucleico, tecnología de PCR, análisis in silico y síntesis de ácido nucleico y similares.

45 La secuencia de ácido nucleico, particularmente la secuencia de ADN, que codifica las proteínas de *HRD* usadas en esta invención puede insertarse en vectores de expresión para producir grandes cantidades de proteínas de *HRD* (o por ejemplo, proteínas de *HRD* quiméricas), tal como se describen más adelante. Para una expresión óptima en un huésped las secuencias de ADN de *HRD* pueden optimizarse mediante codones adaptando el uso de codones al uso más preferido en genes vegetales, particularmente a genes nativos del género o especie vegetal de interés (Bennetzen & Hall, 1982, J. Biol. Chem. 257, 3026-3031; Itakura et al., 1977 Science 198, 1056-1063) utilizando tablas de uso de codones disponibles (por ejemplo, más adaptadas a la expresión en algodón, soja o arroz). Las tablas de uso de codones para varias especies vegetales son publicadas por ejemplo por Ikemura (1993, en "Plant Molecular Biology Labfax", Croy, ed., Bios Scientific Publishers Ltd.) y Nakamura et al. (2000, Nucl. Acids Res. 28, 292) y en las principales bases de datos de secuencias de ADN (por ejemplo, EMBL en Heidelberg, Alemania). Por consiguiente, las secuencias de ADN sintéticas pueden construirse de modo que se produzcan las mismas o sustancialmente las mismas proteínas. Pueden encontrarse varias técnicas para modificar el uso de codones al uso preferido por las células huésped en patentes y bibliografía científica. El método exacto para la modificación del uso de codones no es fundamental para esta invención.

Pueden hacerse pequeñas modificaciones a una secuencia de ADN tales como las descritas anteriormente de forma rutinaria, es decir, mediante mutagénesis mediada por PCR (Ho et al., 1989, Gene 77, 51-59., White et al., 1989, Trends in Genet. 5, 185-189). Pueden hacerse modificaciones más profundas a una secuencia de ADN de forma rutinaria, mediante síntesis de ADN de novo de una región codificante deseada usando técnicas disponibles.

- 5 Además, las secuencias de ácido nucleico de *HRD* pueden modificarse de modo que el extremo N terminal de la proteína de *HRD* tenga un contexto de inicio de traducción óptimo, agregando o eliminando uno o más aminoácidos en el extremo N terminal de la proteína. Con frecuencia se prefiere que las proteínas usadas en la invención que se expresarán en células de plantas comiencen con el dipéptido Met-Asp o Met-Ala para un inicio de traducción óptimo. Por consiguiente, puede insertarse un codón Asp o Ala seguido del Met existente, o el segundo codón, Val, puede reemplazarse por un codón para Asp (GAT o GAC) o Ala (GCT, GCC, GCA o GCG). Las secuencias de ADN también pueden modificarse para eliminar sitios de empalme ilegítimos.

- 10 En una realización de la invención la expresión del gen *HRD* se regula hacia abajo en una célula, planta o tejido específico huésped, mediante por ejemplo abordajes ARNi, tal como se describe en otras partes. En otra realización, los fenotipos de pérdida de función de *HRD* (de células, tejidos o plantas enteras huésped) se generan expresando una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de una proteína de *HRD* (tal como se definió) con un dominio represor (dominante). "Pérdida de función" se refiere en la presente a la pérdida de función de la proteína de *HRD* en un tejido u organismos huésped, y abarca la función a nivel molecular (por ejemplo, pérdida de activación transcripcional de genes objetivo corriente abajo del factor de transcripción de *HRD*) y preferiblemente también a nivel fenotípico. Por ejemplo, para proporcionar pérdida de función, las fusiones de proteína de *HRD* se hacen con un dominio represor "EAR" de 12 aminoácidos tal como se describe en Hiratsu et al., 2003 (Plant J. 34 :733-739).

Estas fusiones de dominio represor a cualquiera de las proteínas de *HRD* (tal como se definieron), denominadas en la presente proteínas de fusión "*HRD*-EAR", son capaces de provocar represión de los genes objetivo corriente abajo y resultar, por consiguiente, en un mutante de pérdida de función eficaz (efecto negativo dominante).

- 25 Estas fusiones de represor también causan represión en plantas heterólogas donde los genes ortólogos aún no se han identificado. En una realización, se proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión dominio represor-proteína de *HRD* quimérica, especialmente una proteína de fusión *HRD*-EAR. Adicionalmente, se proporciona un vector que comprende dicha secuencia de ácido nucleico y una célula, tejido y/u organismo huésped que comprende el gen quimérico. Para generar una proteína de fusión *HRD*-dominio represor, la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio represor se fusiona de forma translacional con la secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia codificante de *HRD*. La proteína de fusión *HRD*-dominio represor que codifica la secuencia de ácido nucleico (especialmente *HRD*-EAR) se coloca bajo el control de promotores constitutivos o específicos (por ejemplo, específicos de tejido o regulados por el desarrollo). La expresión constitutiva proporciona una pérdida de función en todos los tejidos huésped donde *HRD* u ortólogos se expresan y son necesarios por su función. La expresión específica de la proteína de *HRD*-EAR proporciona una pérdida de función en el tejido o condición específicos, por ejemplo, cuando un promotor específico está unido operativamente a un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión *HRD*-EAR.

- Se comprenderá que las proteínas de *HRD* pueden fusionarse operativamente a otros dominios de represión disponibles en la técnica que funcionan en células vegetales. Estos incluyen dominios represores de proteínas animales, tales como el dominio represor *Drosophila* ENGRAILED (En). Por ejemplo, los 298 aminoácidos del extremo N terminal pueden fusionarse a una proteína de *HRD* de acuerdo con la invención, creando una proteína quimérica negativa dominante (ver Markel et al. 2002, Nucleic Acid Research Vol 30, 4709-4719 y Chandler and Werr 2003, Trends in Plant Science Vol. 8, 279-285). Se señala que los dominios represores pueden fusionarse a la proteína de *HRD* en el extremo C terminal o en el extremo N terminal, dependiendo del dominio. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión negativa dominante puede denominarse "gen quimérico negativo dominante" y cuando se transfiere a un genoma huésped puede denominarse "transgén negativo dominante" (ya sea integrado establemente en el genoma huésped o expresado transitoriamente). Otros dominios represores vegetales son por ejemplo los correpresores LEUNG y SEUSS de AGAMOUS, FLC y proteínas polycomb. Otros dominios represores animales incluyen por ejemplo WT1, eve, c-ErbA y v-ErbA y la caja Krüppel (ver Chandler and Werr, 2003, supra y referencias en el mismo).

- Pueden usarse los cebadores y/o sondas PCR y kits para detectar las secuencias de ADN de *HRD*. Los pares de cebadores de PCR degenerados o específicos para ampliar el ADN de *HRD* a partir de muestras pueden sintetizarse en base a la SEQ ID NO 3 como se conoce en la técnica (ver Dieffenbach and Dveksler (1995) PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, y McPherson et al. (2000) PCR- Basics: From Background to Bench, Primera edición, Springer Verlag, Alemania). Del mismo modo, los fragmentos de ADN de las SEQ ID NOS. 1-2 pueden usarse como sondas de hibridación. Un kit de detección de *HRD* puede comprender cebadores específicos de *HRD* y/o sondas específicas de *HRD* y un protocolo asociado para usar los cebadores o sonda para detectar el ADN de *HRD* en una muestra. Tal kit de detección puede utilizarse, por ejemplo, para determinar si la planta ha sido transformada con un gen *HRD* (o parte del mismo) de la invención. Debido a la degeneración del código genético, algunos codones de aminoácidos pueden reemplazarse por otros sin cambiar la secuencia de aminoácidos de la proteína.

- Pueden usarse anticuerpos que se unen específicamente a una proteína de *HRD* usada en la invención. En particular, la presente abarca los anticuerpos monoclonales o policlonales que se unen a *HRD* o a fragmentos o variantes del mismo. Un anticuerpo puede prepararse usando una proteína de *HRD* usada en la invención como un antígeno en un animal usando métodos conocidos en la técnica, como por ejemplo el descrito en Harlow and Lane "Using Antibodies: A laboratory manual" (Nueva York: Cold Spring Harbor Press 1998) y en Liddell and Cryer "A Practical Guide to Monoclonal Antibodies" (Wiley and Sons, 1991). Los anticuerpos pueden usarse posteriormente para aislar, identificar, caracterizar o purificar la proteína de *HRD* a la que se unen, por ejemplo para detectar la proteína de *HRD* en una muestra, permitiendo la formación de un inmunocomplejo y detectando la presencia del inmunocomplejo mediante, por ejemplo, ELISA (inmunoensayo ligado a enzima) o análisis por inmunotransferencia.
- También pueden usarse kits inmunológicos útiles para detectar las proteínas de *HRD*, fragmentos proteicos o epítopos en una muestra. Las muestras pueden ser células, sobrenadantes celulares, suspensiones celulares, tejidos, etc. Dicho kit comprende al menos un anticuerpo que se une a una proteína de *HRD* y uno o más reactivos de inmunodetección. Los anticuerpos también pueden utilizarse para aislar/identificar otras proteínas de *HRD*, por ejemplo mediante ELISA o transferencia Western.
- Adicionalmente, pueden usarse en la presente secuencias de ácido nucleico que comprenden el promotor de *HRD*. Las secuencias reguladoras de la transcripción se encuentran en la secuencia de aproximadamente 1 kb corriente arriba del codón ATG de la SEQ ID NO: 1. La secuencia reguladora de la transcripción de *HRD* se proporciona en la presente en la SEQ ID NO: 2, como la región 5' de 1,1 kb. Estas secuencias reguladoras de la transcripción pueden usarse para la construcción de genes quiméricos y para expresar secuencias de ácido nucleico unidas operativamente en huéspedes o células huésped. Especialmente, la secuencia reguladora de la transcripción de *HRD* puede usarse para expresión en semilla y embrión para expresión de genes para tolerancia al estrés anticipada. Se comprenderá que esta especificidad tisular de las secuencias reguladoras de la transcripción pueden mejorarse o especificarse analizando fragmentos de eliminación de las secuencias proporcionados por su capacidad para dirigir la expresión de las secuencias de ácido nucleico unidas operativamente a los mismos. Tal análisis de eliminación permite la eliminación de partes de ácido nucleico que provocan expresión no específica (de fondo). De forma similar, pueden aislarse secuencias reguladoras de la transcripción de otros genes similares a *HRD*, mediante secuenciación del ADN genómico corriente arriba del codón ATG, usando métodos conocidos tales como TAIL-PCR.

Genes quiméricos, vectores y microorganismos recombinantes usados en la invención

- En la invención, las secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas de *HRD* (incluso, por ejemplo, proteínas de fusión tales como *HRD-GR* y *HRD-EAR*), tales como se describieron anteriormente, se usan para hacer genes quiméricos, y vectores que los comprenden para transferir los genes quiméricos a una célula huésped y producir la(s) proteína(s) *HRD* en células huésped, tales como células, tejidos, órganos u organismos derivados de las células transformadas. Las células huésped son preferiblemente células vegetales pero también se prevén huéspedes microbianos (bacterias, levadura, hongos, etc.). Cualquier planta de cultivo puede ser un huésped adecuado, tal como plantas monocotiledóneas o plantas dicotiledóneas, por ejemplo maíz (especie *Zea*, por ejemplo, *Z. mays*, *Z. diploperennis* (chapule), *Zea luxurians* (teosinte guatemalteco), *Zea mays* subesp. *huehuetenangensis* (San Antonio Huista teosinte), *Z. mays* subesp. *mexicana* (teosinte mexicano), *Z. mays* subesp. *parviglumis* (teosinte de Balsas), *Z. perennis* (teosinte perenne) y *Z. ramosa*, trigo (especie *Triticum*), cebada (por ejemplo, *Hordeum vulgare*), avena (por ejemplo, *Avena sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*), centeno (*Secale cereale*), soja (*Glycine* spp, por ejemplo, *G. max*), algodón (especie *Gossypium*, por ejemplo *G. hirsutum*, *G. barbadense*), *Brassica* spp. (por ejemplo, *B. napus*, *B. juncea*, *B. oleraceae*, *B. rapa*, etc.), girasol (*Helianthus annuus*), tabaco (especie *Nicotiana*), alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (especie *Oryza*, por ejemplo, grupo de cultivares *O. sativa indica* o grupo de cultivares *japonica*), gramíneas forrajeras, mijo perla (*Pennisetum* spp. por ejemplo, *P. glaucum*), especies de árboles, especies de hortalizas, tales como *Lycopersicon* ssp (por ejemplo, *Lycopersicon esculentum*), papa (*Solanum tuberosum*, otra especie *Solanum*), berenjena (*Solanum melongena*), pimientos (*Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*), guisante, judía (por ejemplo, especie *Phaseolus*), frutos carnosos (uvas, duraznos, ciruelas, fresas, mangos), especies ornamentales (por ejemplo, las especies *Rosa*, *Petunia*, *Crisantemo*, *Azucena*, *Gerbera*), árboles leñosos (por ejemplo, especies de *Populus*, *Salix*, *Quercus*, *Eucalyptus*), especies de fibras, por ejemplo, lino (*Linum usitatissimum*) y cáñamo (*Cannabis sativa*).
- Una "planta de cultivo" se refiere en la presente a una especie vegetal que los humanos cultivan y reproducen para fines específicos. Una planta de cultivo puede cultivarse para fines alimenticios (por ejemplo, campos de cultivo), o para fines ornamentales (por ejemplo, producción de flores para corte, hierbas para céspedes, etc.). Una planta de cultivo tal como se define en la presente también incluye plantas de las que se cosechan productos que no son alimento, tales como aceite para combustible, polímeros plásticos, productos farmacéuticos, corcho y similares.
- La construcción de genes quiméricos y vectores para la introducción, preferiblemente estable, de secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de *HRD* en el genoma de células huésped, generalmente se conoce en la técnica. Para generar un gen quimérico, la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de *HRD* (o por ejemplo, una proteína de fusión *HRD*-dominio GR) se une operativamente a una secuencia promotora, adecuada para la expresión en las células huésped, usando técnicas de biología molecular estándares. La secuencia promotora ya puede estar presente en un vector de modo tal que la secuencia nucleica de *HRD* simplemente se inserta en el vector corriente abajo de la secuencia promotora. A continuación el vector se utiliza para transformar las células huésped y el gen quimérico se inserta en el genoma nuclear o en el genoma plasmídico, mitocondrial o

cloroplástico y se expresa allí usando un promotor adecuado (por ejemplo, Mc Bride et al., 1995 Bio/Technology 13, 362; US 5.693.507). En una realización, un gen quimérico comprende un promotor adecuado para expresión en células vegetales o células microbianas (por ejemplo, bacterias), unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína o proteína de fusión *HRD* usada en la invención, opcionalmente seguida por una secuencia de ácido nucleico no traducida 3'.

La secuencia de ácido nucleico de *HRD*, preferiblemente el gen quimérico *HRD*, que codifica una proteína de *HRD* funcional (o en ciertas realizaciones una proteína de fusión *HRD*-dominio GR funcional), puede insertarse establemente de forma convencional en el genoma nuclear de una única célula vegetal, y la célula vegetal transformada de este modo puede usarse de forma convencional para producir una planta transformada que tiene un fenotipo alterado debido a la presencia de la proteína de *HRD* en ciertas células en un determinado momento. En este sentido, un vector de ADN-T, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de *HRD*, puede usarse en *Agrobacterium tumefaciens* para transformar la célula vegetal, y luego puede regenerarse una planta transformada a partir de la célula vegetal transformada usando los procedimientos descritos, por ejemplo, en EP 0116718, EP 0270822, publicación PCT WO84/02913 y Solicitud de Patente Europea publicada EP 0242246 y en Gould et al. (1991, Plant Physiol. 95,426-434). La construcción de un vector de ADN-T para transformación vegetal mediada por *Agrobacterium* se conoce en la técnica. El vector de ADN-T puede ser un vector binario tal como se describe en EP 0120561 y EP 0120515 o un vector cointegrado que puede integrarse al plásmido Ti de *Agrobacterium* mediante recombinación homóloga, tal como se describe en EP 0116718.

Los vectores de ADN-T preferidos contienen cada uno un promotor unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica *HRD* entre las secuencias flanqueantes de ADN-T, o al menos ubicada a la izquierda de la secuencia flanqueante por derecha. Las secuencias flanqueantes se describen en Gielen et al. (1984, EMBO J 3, 835-845). Por supuesto, pueden usarse otros tipos de vectores para transformar la célula vegetal, usando procedimientos tales como transferencia génica directa (tal como se describe, por ejemplo en EP 0223247), transformación mediada por polen (tal como se describe, por ejemplo, en EP 0270356 y WO85/01856), transformación por protoplastos tal como se describe, por ejemplo, en US 4.684.611, transformación medida por virus de ARN vegetal (tal como se describe, por ejemplo, en EP 0067553 y US 4.407.956), transformación mediada por liposomas (tal como se describe, por ejemplo, en US 4.536.475), y otros métodos tales como los métodos descritos para transformar ciertas líneas de maíz (por ejemplo, US 6.140.553; Fromm et al., 1990, Bio/Technology 8, 833-839; Gordon-Kamm et al., 1990, The Plant Cell 2, 603-618) y arroz (Shimamoto et al., 1989, Nature 338, 274-276; Datta et al. 1990, Bio/Technology 8, 736-740) y el método para transformar monocotiledóneas en general (publicación PCT WO92/09696). Para la transformación de algodón ver también WO 00/71733 y para la transformación de arroz ver también los métodos descritos en WO92/09696, WO94/00977 y WO95/06722. Para la transformación de sorgo ver por ejemplo Jeoung JM et al. 2002, Hereditas 137: 20-8 o Zhao ZY et al. 2000, Plant Mol Biol. 44:789-98). Del mismo modo, la selección y regeneración de plantas transformadas a partir de células transformadas se conoce en la técnica. Obviamente, para diferentes especies e incluso para diferentes variedades o variedades cultivadas de una única especie, los protocolos se adaptan específicamente para regenerar transformantes a alta frecuencia.

Además de la transformación del genoma nuclear, también se incluye en la invención la transformación del genoma plastídico, preferiblemente el genoma cloroplástico. Una ventaja de la transformación del genoma plastídico es que puede reducirse el riesgo de diseminar el transgén(es). La transformación del genoma plastídico puede llevarse a cabo tal como se conoce en la técnica, ver por ejemplo Sidorov VA et al. 1999, Plant J.19: 209-216 o Lutz KA. et al. 2004, Plant J. 37 (6) :906-13.

Las plantas transformadas resultantes pueden usarse en un esquema de reproducción vegetal convencional para producir más plantas transformadas con las mismas características o para introducir la parte génica en otras variedades de la misma especie vegetal o especie relacionada. Las semillas que se obtienen de las plantas transformadas contienen el gen quimérico *HRD* como un inserto genómico estable. Las células de la planta transformada pueden cultivarse de forma convencional para producir la proteína de *HRD*, que puede recuperarse para otros usos, por ejemplo, producción de anticuerpos.

La secuencia de ácido nucleico de *HRD* se inserta en un genoma de una célula vegetal de modo que la secuencia codificante insertada esté corriente abajo (es decir, 3') y bajo el control de un promotor que puede dirigir la expresión en la célula vegetal. Esto se logra preferiblemente insertando el gen quimérico en el genoma de la célula vegetal, particularmente en el genoma nuclear o plastídico (por ejemplo, cloroplástico).

Los promotores preferidos incluyen: los promotores 35S constitutivos fuertes o promotores 35S mejorados (los "promotores 35S") del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) de CM 1841 aislados (Gardner et al., 1981, Nucleic Acids Research 9, 2871-2887), CabbB-S (Franck et al, 1980, Cell 21, 285- 294) y CabbB-JI (Hull and Howell, 1987, Virology 86,482- 493); el promotor 35S descrito por Odell et al. (1985, Nature 313, 810-812) o en US5164316, promotores de la familia de las ubiquitinas (por ejemplo, el promotor de ubiquitina de maíz de Christensen et al., 1992, Plant Mol. Biol. 18,675-689, EP 0 342 926, ver también Cornejo et al. 1993, Plant Mol.Biol. 23, 567-581), el promotor *gos2* (de Pater et al., 1992 Plant J. 2, 834-844), el promotor *emu* (Last et al., 1990, Theor. Appl. Genet. 81,581-588), promotores de actina de *Arabidopsis* tal como el promotor descrito por An et al. (1996, Plant J. 10, 107.), promotores de actina de arroz tales como el promotor descrito por Zhang et al. (1991, The Plant Cell 3, 1155-

- 1165) y el promotor descrito en US 5.641,876 o el promotor de actina 2 de arroz tal como se describe en WO070067; promotores del virus del mosaico de las nervaduras de la yuca (WO 97/48819, Verdaguer et al. 1998, Plant Mol. Biol. 37,1055-1067), la serie pPLEX de promotores del virus del raquitismo del trébol subterráneo (WO 96/06932, particularmente el promotor S7), un promotor de la alcohol deshidrogenasa, por ejemplo, pAdh1S (números de acceso de GenBank X04049, X00581), y el promotor TR1' y el promotor TR2' (el "promotor TR1'" y "el promotor TR2'", respectivamente) que dirigen la expresión de los genes 1' y 2', respectivamente, de ADN-T (Velten et al., 1984, EMBO J 3, 2723-2730), el promotor del virus del mosaico de Figwort descrito en US6051753 y en EP426641, promotores génicos de histona, tales como el promotor Ph4a748 de Arabidopsis (PMB 8: 179-191) u otros.
- De forma alternativa, puede usarse un promotor que no es constitutivo sino que es específico para uno o más tejidos u órganos de la planta (preferido de tejido / específico de tejido, incluidos promotores regulados por el desarrollo), por ejemplo preferido de hojas, preferido de epidermis, preferido de raíz, de tejido de flor, por ejemplo, preferido de tapetum o antera, preferido de semilla, preferido de vaina, etc., por el que el gen *HRD* (incluido por ejemplo el gen que codifica la proteína de fusión *HRD-GR*) se expresa solo en las células del tejido(s) u órgano(s) específico(s) y/o solo durante una cierta fase de desarrollo. Por ejemplo, el gen(es) *HRD* puede expresarse selectivamente en las hojas de una planta colocando la secuencia codificante bajo el control de un promotor inducible por luz tal como el promotor del gen de la subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa de la propia planta o de otra planta, tal como el frijol, como se describe en US 5.254.799 o Arabidopsis tal como se describe en US5034322. La elección del promotor se determina por el fenotipo que se desea lograr, tal como se describirá en más detalle más adelante.
- Para lograr la tolerancia a la sequía sería adecuado un promotor constitutivo, específico de raíz, inducible por estrés o inducible por patógeno. Un promotor inducible por estrés abiótico adecuado sería el promotor rd29A (Kasuga et. al 1999).
- Para expresión en tejidos de raíz se describe un promotor preferiblemente activo en raíces en WO00/29566. Otro promotor para expresión preferencial en raíces es el promotor ZRP (y modificaciones del mismo) como se describen en US 5.633.363.
- Otro promotor específico de raíces se proporciona en esta realización como el promotor BOUNTIFUL (Pereira et al., no publicado).
- Otra alternativa es usar un promotor cuya expresión sea inducible. Son ejemplos de promotores inducibles promotores inducibles por lesiones, tales como el promotor MPI descrito por Cordera et al. (1994, The Plant Journal 6, 141), que se induce por lesiones (tales como las causadas por insectos o lesiones físicas), o el promotor COMPTII (WO0056897) o el promotor descrito en US6031151. De forma alternativa, el promotor puede ser inducible por un químico, tal como dexametasona tal como se describe en Aoyama and Chua (1997, Plant Journal 11: 605-612) y en US6063985 o por tetraciclina (promotor TOPFREE o TOP 10, ver Gatz, 1997, Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 48: 8 9-108 y Love et al. 2000, Plant J. 21: 579-88). Otros promotores inducibles por ejemplo son inducibles por un cambio en la temperatura, tal como el promotor de choque térmico descrito en US 5.447.858, por condiciones anaeróbicas (por ejemplo, el promotor ADH1S de maíz), por luz (US6455760), por patógenos (por ejemplo, EP759085 o EP309862) o por senescencia (SAG12 y SAG13, ver US5689042). Obviamente, existe una variedad de otros promotores disponibles.
- La secuencia codificante de *HRD* (o una secuencia que codifica la proteína de *HRD* quimérica) se inserta en el genoma vegetal de modo que la secuencia codificante está corriente arriba (es decir, 5') de señales de regulación de transcripción del extremo 3' adecuadas ("extremo 3'") (es decir, señales de formación de transcripto y poliadenilación). Las señales de formación de transcripto y poliadenilación incluyen aquellas del gen CaMV 35S ("3' 35S"), el gen de la nopalina sintasa ("3' nos") (Depicker et al., 1982 J. Molec. Appl. Genetics 1, 561-573), el gen de la octopina sintasa ("3'ocs") (Gielen et al., 1984, EMBO J 3, 835-845) y el gen 7 de ADN-T ("gen 7 de 3'") (Velten and Schell, 1985, Nucleic Acids Research 13, 6981-6998), que actúan como secuencias de ADN no traducidas en 3' en células vegetales transformadas y otras.
- La introducción del vector ADN-T en *Agrobacterium* puede llevarse a cabo usando métodos conocidos, tales como electroporación o conjugación triparental.
- Una secuencia de ácido nucleico que codifica *HRD* puede insertarse opcionalmente en el genoma vegetal como una secuencia génica híbrida por la cual la secuencia del *HRD* se une dentro del marco a un gen (US 5.254.799; Vaeck et al., 1987, Nature 328, 33-37) que codifica un marcador seleccionable o puntuable, tal como por ejemplo el gen neo (o nptII) (EP 0 242 236) que codifica la resistencia a la kanamicina, de modo que la planta expresa una proteína de fusión que es fácilmente detectable.
- La transformación de las células vegetales también pueden usarse para producir la proteína(s) de *HRD* usada en la invención en grandes cantidades en cultivos de células vegetales que son resistentes a diversos estreses y pueden utilizarse para la producción de productos específicos en cultivo. Cuando se hace referencia a una célula vegetal transgénica en la presente, se refiere a una célula vegetal (o también un protoplasto vegetal) como tal en aislamiento o en cultivo tisular, o a la célula vegetal (o protoplasto) contenido en una planta o en un órgano o tejido diferenciado,

y ambas posibilidades se incluyen específicamente en la presente. Por lo tanto, una referencia a una célula vegetal en la descripción o las reivindicaciones no significa que se refiere solo a células aisladas en cultivo, sino que se refiere a cualquier célula vegetal, en cualquier parte donde pueda estar ubicada o en cualquier tipo de tejido u órgano vegetal en el que pueda estar presente.

5 Toda o parte de una secuencia de ácido nucleico de *HRD*, que codifica una proteína de *HRD* (o una proteína de *HRD* quimérica), también puede usarse para transformar microorganismos, tales como bacterias (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, etc.), hongos, virus, algas o insectos. La transformación de bacterias, con toda o parte de una secuencia de ácido nucleico de *HRD* de esta invención, incorporada a un vehículo de clonación adecuado, puede llevarse a cabo de forma convencional, preferiblemente usando técnicas de electroporación convencionales tales como las descritas en Maillon et al. (1989, FEMS Microbiol. Letters 60, 205-210.) y WO 90/06999. Para expresión en una célula huésped procarionta, el uso de codón de la secuencia de ácido nucleico, por consiguiente, puede optimizarse (tal como se describió para plantas anteriormente). La secuencias de intrón deberían eliminarse y pueden hacerse otras adaptaciones para la expresión óptima tal como se conoce.

15 Para obtener expresión mejorada en plantas monocotiledóneas tales como especies de hierba, por ejemplo, maíz o arroz, puede agregarse un intrón, preferiblemente un intrón de monocotiledónea al gen quimérico. Por ejemplo, la inserción del intrón del gen del maíz *Adh1* en la región reguladora 5' ha demostrado que mejora la expresión en el maíz (Callis et al., 1987, Genes Develop. 1: 1183-1200). De forma similar, el intrón HSP70, tal como se describe en US 5.859.347, puede usarse para mejorar la expresión. La secuencia de ADN de la secuencia de ácido nucleico de *HRD* puede cambiarse además de forma translacionalmente neutral, para modificar posibles secuencias de ADN inhibitorias presentes en la parte génica por medio de la inserción de un intrón sitio dirigido y/o introduciendo cambios en el uso del codón, por ejemplo, adaptando el uso del codón al más preferido por las plantas, preferiblemente el género vegetal relevante específico, tal como se describió anteriormente.

25 De acuerdo con una realización de esta invención, las proteínas de *HRD* (o proteínas quiméricas) se dirigen a organelos intracelulares tales como plástidos, preferiblemente cloroplastos, mitocondrias, o se secretan desde la célula, optimizando potencialmente la estabilidad y/o expresión proteica. De forma similar, la proteína puede dirigirse a vacuolas. A estos efectos, en una realización de esta invención, los genes quiméricos usados en la invención comprenden una región codificante que codifica un péptido señal u objetivo, unido a la región codificante de proteína de *HRD*. Los péptidos particularmente preferidos para incluir en las proteínas usadas en esta invención son los péptidos de tránsito para cloroplasto u otros objetivos plastídicos, especialmente regiones de péptido de tránsito duplicadas de genes vegetales cuyo producto génico se dirige a los plástidos, el péptido de tránsito optimizado de Capellades et al. (US 5.635. 618), el péptido de tránsito de ferredoxin-NADP+oxidoreductasa de la espinaca (Oelmuller et al., 1993, Mol. Gen. Genet. 237,261-272), el péptido de tránsito descrito en Wong et al. (1992, Plant Molec. Biol. 20, 81-93) y los péptidos de destinación en la solicitud de patente PCT publicada WO 00/26371. También se prefieren péptidos que señalan la secreción de una proteína unida a tal proteína fuera de la célula, tal como la señal de secreción del inhibidor de la proteinasa 11 de la papa (Keil et al., 1986, Nucl. Acids Res. 14,5641-5650), la señal de secreción del gen de alfa-amilasa 3 del arroz (Sutcliffe et al., 1991, Plant Molec. Biol. 16,579-591) y la señal de secreción de la proteína PR1 del tabaco (Cornelissen et al., 1986, EMBO J. 5,37-40). Los péptidos señal particularmente útiles incluyen el péptido de tránsito a cloroplasto (por ejemplo, Van Den Broeck et al., 1985, Nature 313, 358), o el péptido de tránsito a cloroplasto optimizado de US 5.510.471 y US 5.635.618 que provoca el transporte de la proteína hasta los cloroplastos, un péptido señal secretor o un péptido que dirige la proteína a otros plástidos, mitocondria, el RE u otros organelos. Las secuencias señal para dirigirse a organelos intracelulares o para secreción fuera de la célula vegetal o a la pared celular se encuentran en proteínas dirigidas o secretadas naturalmente, preferiblemente aquellas descritas por Klösigen et al. (1989, Mol. Gen. Genet. 217, 155-161), Klösigen and Weil (1991, Mol. Gen. Genet. 225, 297-304), Neuhaus & Rogers (1998, Plant Mol. Biol. 38., 127-144), Bih et al. (1999, J. Biol. Chem. 274, 22884- 22894), Morris et al. (1999, Biochem. Biophys. Res. Commun. 255, 328-333), Hesse et al. (1989, EMBO J. 8, 2453- 2461), Tavladoraki et al. (1998, FEBS Lett. 426,62-66.), Terashima et al. (1999, Appl. Microbiol. Biotechnol. 52, 516-523), Park et al. (1997, J.Biol. Chem. 272, 6876- 6881), Shcherban et al. (1995, Proc. Natl. Acad. Sci USA 92,9245-9249).

50 Para permitir la secreción de las proteínas de *HRD* hacia el exterior de la célula huésped transformada, un péptido señal de secreción apropiado puede fusionarse al extremo amino terminal (extremo N-terminal) de la proteína de *HRD*. Los péptidos señal putativos pueden detectarse usando análisis informatizados, usando programas tales como el programa Signal Peptide search (SignalP V1.1 o 2.0)(Von Heijne, Gunnar, 1986 y Nielsen et al., 1996).

55 En una realización, varias secuencias de ácido nucleico que codifican *HRD* se coexpresan en un único huésped. Una planta huésped con coexpresión se obtiene fácilmente transformando una planta que ya expresa la proteína de *HRD*, o cruzando plantas transformadas con diferentes proteínas de *HRD*. De forma alternativa, varias secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína de *HRD* pueden estar presentes en un único vector de transformación o pueden cotransformarse al mismo tiempo usando vectores distintos y seleccionando transformantes que comprenden ambos genes quiméricos. De forma similar, uno o más genes que codifican *HRD* pueden expresarse en una única planta junto con otros genes quiméricos, por ejemplo que codifican otras proteínas que mejoran la tolerancia a la sequía, tales como CBF1, DREB1A, los genes OsDREB del arroz (Dubouzet et al., 2003, Plant J. 33: 751), los genes SHINE (Aharoni et al. 2004, Plant Cell 16: 2463-80) u otros.

Se comprenderá que las diferentes proteínas pueden expresarse en la misma planta, o cada una puede expresarse en una única planta y luego combinarse en la misma planta cruzando las plantas únicas entre sí. Por ejemplo, en la producción de semillas híbridas, cada planta madre puede expresar una única proteína. Luego de cruzar las plantas madre para producir híbridos, ambas proteínas se combinan en la planta híbrida.

- 5 Preferiblemente, a efectos de selección pero también para opciones de control de maleza, las plantas transgénicas obtenidas por medio de la invención también se transforman con ADN que codifica una proteína que confiere resistencia a herbicidas, tal como un herbicida de amplio espectro, por ejemplo herbicidas en base a glufosinato de amonio como ingrediente activo (por ejemplo, Liberty® o BASTA; la resistencia se confiere mediante el gen PAT o bar; ver EP 0242236 y EP 0242246) o glifosato (por ejemplo, RoundUp®; la resistencia se confiere mediante los genes EPSPS, ver por ejemplo, EP0508909 y EP 0507698). El uso de genes de resistencia herbicida (u otros genes que confieren un fenotipo deseado) como el marcador seleccionable tiene además la ventaja de que puede evitarse la introducción de genes de resistencia antibiótica.

- 10 De forma alternativa, otros genes de marcador seleccionable pueden usarse, tales como genes de resistencia antibiótica. Como generalmente no se acepta retener genes de resistencia antibiótica en las plantas huéspedes transformadas, estos genes pueden eliminarse nuevamente luego de la selección de los transformantes. Existen diferentes tecnologías para eliminar los transgenes. Un método para lograr la eliminación es flanquear el gen quimérico con sitios lox y luego de la selección, cruzar la planta transformada con una planta que exprese CRE recombinasa (ver por ejemplo, EP506763B1). La recombinación específica de sitio resulta en la escisión de un gen marcador. Otros sistemas de recombinación específica de sitio es el sistema FLP/FRT descrito en EP686191 y US5527 695. Los sistemas de recombinación específica de sitio tales como CRE/LOX y FLP/FRT también pueden usarse a efectos de apilamiento de genes. Adicionalmente, se han descrito sistemas de escisión de un componente, ver por ejemplo, WO9737012 o WO9500555.

Células/plantas/semillas vegetales transformadas obtenidas mediante la invención y usos de la secuencia de ácido nucleico y proteínas de acuerdo con la invención

- 25 En la siguiente parte se describe el uso de las secuencias de *HRD* de acuerdo con la invención para generar células vegetales, plantas, semillas vegetales transgénicas y todo derivado/progenie de las mismas, con uno o más fenotipos modificados.

A) Plantas con tolerancia al estrés mejorada

- 30 Una planta transgénica tolerante al estrés puede generarse transformando una célula vegetal huésped con una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de *HRD* bajo el control de un promotor adecuado, tal como se describió anteriormente y regenerando una planta transgénica a partir de dicha célula. Los promotores preferidos son promotores que se inducen específicamente mediante estreses (abióticos y bióticos) o luego de la aplicación de compuestos químicos. En particular se prefieren los siguientes promotores:

Promotor PR10 del arroz (Hashimoto et al, 2004, Plant Cell Physiol. 45: 550-559)

- 35 Promotor AtPLA IIA de Arabidopsis (Narusaka et al, 2003, Plant Cell Physiol. 44: 1246-52)

Promotor CYP83B1 de Arabidopsis (Narusaka et al. 2004, PMB 55: 327-342)

Promotor gf-2.8 del germen de trigo (Berna & Bernier, 1999, PMB 39: 539-549)

- 40 La "tolerancia a la sequía" o "tolerancia a la sequía aumentada/mejorada" se usa en la presente para referirse a una capacidad mejorada de los transformantes (en comparación con los transformantes de tipo silvestre o testigo) para tolerar un período de sequía (privación/reducción hídrica que conduce a, por ejemplo, síntomas visibles de marchitamiento de hojas en plantas testigo) y para recuperarse posteriormente, conduciendo de este modo a una pérdida de rendimiento general reducida, ya que más plantas por m² sobreviven y/o el rendimiento de las plantas sobrevivientes no se reduce considerablemente. La tolerancia a la sequía puede evaluarse en ambientes controlados (invernadero o cámaras de crecimiento) colocando al menos aproximadamente 10 transformantes por evento de transformación y al menos 10 plantas testigo para diversos períodos de tiempo (variando desde 1-4 semanas o más) en el ambiente sin regarlos, hasta que ocurra el marchitamiento de hojas o la pérdida de la turgencia en las plantas testigo y posteriormente regar las plantas nuevamente durante 1-2 semanas, mientras se analiza su fenotipo de recuperación. Los transformantes con tolerancia a la sequía sobreviven al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, preferiblemente al menos 2-5 días más sin agua que las plantas con transformantes testigo (por ejemplo, transformados con un vector vacío) o de tipo silvestre en las mismas condiciones, y que muestran daño tisular irreversible. En otro método para estimar la tolerancia, la recuperación de los transformantes es de al menos aproximadamente 2-5 veces más alta que la de las plantas testigo (por ejemplo, con 20% de recuperación en testigo, 40-100% de supervivencia en los transformantes).

- 55 La "resistencia a enfermedades" o "resistencia a enfermedades mejorada" se usa en la presente para referirse a una capacidad mejorada de los transformantes de exhibir una reducción en los síntomas de una enfermedad en comparación con transformantes de tipo silvestre o testigo. El análisis de resistencia a enfermedades se lleva a cabo

5 con un patógeno que muestra una reacción susceptible en plantas de tipo silvestre. En una realización el patógeno es el hongo *Verticillium dahliae*, como ejemplo de una resistencia no específica de huésped. Para la selección en Arabidopsis, las plántulas se cultivan en la cámara de crecimiento a 22-24°C con 12 horas de luz, en macetas de 10 cm de diámetro que contienen una mezcla de compost:arena:perlita (2:1:1). Dos semanas después de la germinación, las plántulas se arrancan de raíz cuidadosamente y se mojan brevemente en una suspensión saturada de cultivo de *Verticillium*, y a continuación se colocan nuevamente en las macetas cubriendo las raíces con tierra. Las plantas se riegan normalmente, después de pocos días se suspende y se examinan en diversas fases para detectar síntomas de enfermedad. Las plantas se puntúan en 5 duplicados de maceta por genotipo y las puntuaciones por enfermedad se toman como la frecuencia de las plantas que sobreviven en la madurez. El ecotipo de tipo silvestre Wassilewskija no muestra supervivencia en este ensayo, mientras que los genotipos resistentes a enfermedad muestran una supervivencia que varía de 20-100%.

15 Los transformantes que expresan niveles altos de la proteína de *HRD* se seleccionan mediante, por ejemplo, análisis de cantidad de copias (análisis de transferencia Southern), niveles de transcrito de ARNm (por ejemplo, RT-PCR usando pares de cebadores de *HRD* o cebadores flanqueadores) o mediante el análisis de la presencia y el nivel de la proteína de *HRD* en diversos tejidos (por ejemplo, SDS-PAGE; ensayo ELISA, etc.). Por razones de regulación, preferiblemente se seleccionan los transformantes de una sola copia y se analizan las secuencias que flanquean el sitio de inserción del gen quimérico, preferiblemente se secuencian para caracterizar el "evento". Los eventos transgénicos con alta expresión de *HRD* se seleccionan para cruzamiento / retrocruzamiento / autofecundación adicional hasta que se obtiene un suceso selecto de alto rendimiento con un transgén *HRD* estable. Generalmente, los niveles de expresión del gen *HRD* y los niveles de proteína de *HRD* se correlacionarán con el fenotipo de tolerancia a la sequía. En una realización, se proporcionan especialmente las semillas transgénicas derivadas de tales plantas, que pueden comercializarse como "tolerantes a la sequía".

25 Los transformantes que expresan uno o más genes *HRD* de acuerdo con la invención también pueden comprender otros transgenes, tales como otros genes que confieren tolerancia a la sequía o confieren tolerancia a otros estreses bióticos o abióticos. Para obtener tales plantas con transgenes "apilados", otros transgenes pueden introgresarse en los transformantes de *HRD* o los transformantes de *HRD* pueden transformarse posteriormente con uno o más genes distintos, o de forma alternativa pueden usarse varios genes quiméricos para transformar una línea o variedad vegetal. Por ejemplo, varios genes quiméricos pueden estar presentes en un solo vector, o pueden estar presentes en diferentes vectores que se cotransforman.

30 En una realización los siguientes genes se combinan con uno o más genes *HRD* usados en la invención: Genes que codifican otros factores de transcripción de tipo AP2/ERF, preferiblemente los que tiene un "rol en la respuesta de la planta a estreses ambientales, tales como por ejemplo los genes que codifican CBF1, CBF2, CBF3 y/o CBF4 de Arabidopsis (Jaglo-Ottosen et al. 1998, Kasuga et al. 1999, supra) u ortólogos de los mismos de otras especies (Dubouzet et al. 2003, supra), los genes SHN (Aharoni et al., 2004, supra), con genes de resistencia a insectos tales como los genes de la toxina *Bacillus thuringiensis* (que codifican proteínas insecticidas, tales como genes cry, genes vip, etc., ver <http://www.biols.susx.ac.uk/home/> para una lista de genes disponibles), genes de resistencia fungicida u otros genes.

40 Los transformantes apilados, por consiguiente, pueden tener una tolerancia al estrés ambiental aún más amplia, por ejemplo, a la salinidad, estrés por frío, resistencia a insectos, resistencia a patógenos, estrés por calor, estrés hídrico, etc.

También es posible introducir o introgresar el gen *HRD* en una línea de reproducción vegetal que ya tiene una tolerancia relativamente alta a la sequía y/o a patógenos, con lo cual esta tolerancia puede deberse a un mecanismo molecular subyacente diferente (por ejemplo, arquitectura de las raíces).

B) Plantas no transgénicas que comprenden un fenotipo modificado

45 También es una realización de la invención usar métodos no transgénicos, por ejemplo, sistemas de mutagénesis tales como TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomics; McCallum et al., 2000, Nat Biotech 18:455, y McCallum et al. 2000, Plant Physiol. 123, 439-442) y selección para generar líneas vegetales que producen niveles más altos de una o más proteínas de *HRD* de acuerdo con la invención. Sin limitar el alcance de la invención, se cree que tales plantas podrían comprender mutaciones punto/delección en el promotor que son sitios de unión para proteínas represoras que harían al gen *HRD* huésped constitutivo o con expresión más alta. Preferiblemente, los niveles de proteína de *HRD* en el mutante o partes del mutante son de al menos aproximadamente 2, 5, 10, 15% o mayor en el mutante en comparación con plantas no mutantes. TILLING usa mutagénesis química tradicional (por ejemplo, mutagénesis con EMS) seguida de detección sistemática de alto rendimiento para mutaciones (por ejemplo, usando escisión de Cel 1 de heterodúplex de ADN de tipo silvestre mutante y detección usando un sistema de secuenciación en gel), ver por ejemplo, Henikoff et al. Plant Physiology Preview, 21 de mayo 2004. Por consiguiente, la presente abarca las plantas, semillas y tejidos no transgénicos que comprenden una expresión del gen *HRD* mejorada en uno o más tejidos y que comprenden uno o más de los fenotipos de *HRD* de acuerdo con la invención (por ejemplo, tolerancia a la sequía mejorada, resistencia a enfermedades mejorada, etc., todas descritas anteriormente) y métodos para generar e identificar tales plantas.

- 5 El método comprende en una realización los pasos para mutagenizar semillas vegetales (por ejemplo, mutagénesis con EMS), agrupar plantas individuales o ADN, amplificación por PCR de una región de interés, formación de heterodúplex y detección de alto rendimiento, identificación de la planta mutante, secuenciación del producto de PCR mutante. Se entenderá que otras mutagénesis y métodos de selección pueden usarse de igual forma para generar tales plantas mutantes. Las semillas, por ejemplo, pueden irradiarse o tratarse químicamente y las plantas pueden someterse a detección para un fenotipo de *HRD* modificado, tal como tolerancia a la sequía mejorada.
- 10 En otra realización de la invención, los materiales vegetales son poblaciones naturales de la especie o especies relacionadas que comprenden polimorfismos o variaciones en la secuencia de ADN en la secuencia reguladora y/o codificante del ortólogo de *HRD*. Las mutaciones en el gen *HRD* objetivo pueden someterse a detección para usar un abordaje ECOTILLING (Henikoff et al 2004, *supra*). En este método los polimorfismos naturales en líneas de reproducción o especies relacionadas se someten a detección mediante la metodología TILLING descrita anteriormente, en la que se usan plantas individuales o grupos de plantas para amplificación por PCR del *HRD* objetivo, formación de heterodúplex y análisis de alto rendimiento. A continuación pueden seleccionarse plantas individuales que tienen la mutación necesaria que pueden usarse posteriormente en el programa de reproducción para incorporar el alelo ortólogo de *HRD* para desarrollar el cultivar con el rasgo deseado.
- 15 Las plantas mutantes pueden distinguirse de las no mutantes mediante métodos moleculares, tales como la o las mutaciones presente en el ADN, niveles de proteína de *HRD*, niveles de ARN-*HRD*, etc., y mediante las características fenotípicas modificadas.
- 20 Los mutantes no transgénicos pueden ser homocigóticos o heterocigóticos para la mutación que confiere la expresión mejorada del gen(es) *HRD* endógeno(s) o para el alelo(s) de *HRD* mutante(s).

SECUENCIAS

- SEQ ID NO 1: secuencia codificante de *HRD* de *Arabidopsis thaliana*
- SEQ ID NO 2: ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* que codifica *HRD*
- SEQ ID NO 3: Secuencia de aminoácidos de *HRD* de *Arabidopsis thaliana*
- 25 SEQ ID NO 4: Proteína de dominio del receptor de glucocorticoides (GR)
- SEQ ID NO 5: Secuencia codificante del dominio GR con secuencias flanqueadoras para clonación

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Figura 1 – Fenotipo de Plantas Mutante *HRD* y 35S::*HRD*

Fenotipo de planta mutante joven de *HRD* que muestra hojas de color verde oscuro y estatura reducida.

- 30 Sección transversal de hoja de un mutante *HRD* en comparación con el tipo silvestre que muestra más capas celulares de mesófilo en el mutante *HRD*.

Figura 2 – La estructura de la raíz del mutante *HRD*, en comparación con el tipo silvestre 3 semanas después de su germinación, que muestra más raíces secundarias y terciarias abundantes más cerca de la unión del tallo o base de la raíz que proporciona una estructura fibrosa general.

- 35 Figura 3 – El mutante *HRD*, análisis de expresión y estructura de proteína de *HRD*

A) La región genómica del mutante *HRD* que muestra genes adyacentes etiquetados, descritos como similar a AP2 y aldolasa, con sus promotores ubicados 6 kb y 2.3 kb desde el tetrámero potenciador de CaMV del inserto *I-ATag*.

- 40 B) Análisis de expresión de RT-PCR de los dos genes, similar a AP2 y aldolasa, adyacente al inserto de etiqueta de activación. El ARN utilizado se realizó a partir de hojas en roseta de 2 muestras de tipo silvestre y el mutante *HRD*. La expresión del gen de aldolasa permanece sin cambios, mientras que el gen similar a AP2 se sobreexpresa en el mutante *HRD* y por lo tanto es un candidato que confiere el fenotipo.

C) Secuencia de aminoácidos de *HARDY* que muestra el dominio AP2 conservado. Los aminoácidos del cuadro sombreado son idénticos al dominio AP2 y los aminoácidos en negrita son similares al consenso de dominio AP2.

Figura 4 – Inducción de *HRD-GR* por DEX que exhibe el fenotipo de mutante *hardy*

- 45 Las líneas transformadas de *HRD-GR* se compararon con el ecotipo *Ws* de tipo silvestre y el mutante *HRD*. Los genotipos se cultivaron en condiciones de días cortos (8 horas de luz) durante 4 semanas para aumentar el número de hojas. Los genotipos fueron tratados con el DEX inductor de esteroides o no se trataron. El genotipo *HRD-GR* tratado con DEX muestra el fenotipo similar de hojas verde oscuro como el mutante *HRD*.

Figura 5 – Experimento de Tolerancia a la Sequía con *HRD* y tipo silvestre.

Plántulas de quince días de Ws de tipo silvestre, progenie de la línea mutante *HRD*, y una línea rd29-DREB1A testigo positivo (que proporciona tolerancia a la sequía; Kasuga et al. 1999, supra) se sometieron a deshidratación durante un período de 9 a 12 días. Posteriormente, se regaron las plántulas y su apariencia después de una semana (recuperación) se presenta en la imagen (además de la primera fila en 9 DDD, en la cual las fotos se tomaron directamente al final del período de deshidratación). DDD, Días de deshidratación.

Figura 6 – Tolerancia a la sequía inducible por esteroides conferida por una fusión HDR-GR

Se evaluó la resistencia a la sequía de la línea 35S::*HRD*-GR que mostró la inducción por el tratamiento de DEX 10 μ M, en comparación con el mutante *HRD* y el ecotipo Ws de tipo silvestre. Las plántulas de los tres genotipos se trataron con DEX después de la germinación y se compararon con genotipos sin tratar en un ensayo de sequía. El día en que ocurrió la muerte del tipo silvestre se contó como 1 DDMTS (días después de la muerte del tipo silvestre) y la supervivencia de otros genotipos contados hasta ese día. En las primeras dos filas el tipo silvestre se muestra con plantas muertas en todas las muestras, y la cantidad de días en los que los otros genotipos sobrevivieron más allá de esto en cada tratamiento se muestran como 1-3 DDMTS. El *HRD*-GR después de la inducción de DEX muestra una clara resistencia en comparación con el tratamiento -DEX y similar a la mostrada por el mutante *hrd* con tratamiento + o -DEX.

Figura 7 – Resistencia a las enfermedades del mutante *HRD* en comparación con el tipo silvestre.

El mutante *HRD* (A) comparado con una planta testigo (B), tratado con un patógeno de *Verticillium* (etiquetado +V) y sin tratamiento con *Verticillium* (-V). El mutante *HRD* no se ve afectado por el *Verticillium*, mientras que la planta testigo muestra un fenotipo marchitado susceptible.

EJEMPLOS

Los siguientes Ejemplos no taxativos describen el uso de genes *HRD* para modificar fenotipos vegetales. A menos que se indique lo contrario en los Ejemplos, todas las técnicas de ADN recombinante se llevan a cabo de acuerdo con protocolos estándares como los descritos en Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, y Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; y en los Volúmenes 1 y 2 de Ausubel et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, *Current Protocols*, EE.UU. Los materiales y métodos estándares para el trabajo molecular vegetal se describen en *Plant Molecular Biology Labfax* (1993) de R.D.D. Croy, publicado conjuntamente por BIOS Scientific Publications Ltd (Reino Unido) y Blackwell Scientific Publications, Reino Unido.

Ejemplo 1 – Material y Métodos

1.1 Material vegetal y experimento de tolerancia a la sequía

Todas las plantas, incluida la población de etiqueta de activación (Marsch-Martínez et al., 2002, *Plant Physiol.* 129: 1544- 1556) y las líneas transgénicas se cultivaron en el invernadero a aproximadamente 22°C y se encontraban en el ecotipo de *Arabidopsis Wassilewskija* (Ws).

Para los experimentos de sequía, el mutante *hardy* con etiqueta de activación se comparó con la línea *rd29A-DREB-1A* (proporcionando tolerancia a la sequía; Kasuga et al., -1999) ambos en el ecotipo Ws de *Arabidopsis*. El experimento se llevó a cabo en el invernadero a 22°C, las plantas se cultivaron en una mezcla de tierra que comprendía una parte de arena y perlita y dos partes de compost (una mezcla constituida por 25% de arcilla y 75% de turba con EC 1/4 1 [nitrógeno, fósforo y potasio]; Hortimea, Elst, Países Bajos). Las semillas se sembraron (después de 3 noches a 4°C) a una densidad de seis plantas por maceta de 4 cm en una bandeja de 51 macetas (recipientes Aracon; BetaTech, Gent, Bélgica). Los nutrientes (Hydroagri, Rotterdam, Países Bajos; 2,6 de CE) se suministraron 10 días después de la germinación y 2 semanas después de la germinación las plantas se sometieron a sequía (durante 9, 10, 11 o 12 días) mediante transferencia de las macetas a bandejas secas (después de secar cada maceta desde afuera). Cada 2 días en sequía, las plantas se movieron dentro de la bandeja para anular los efectos de la posición de las macetas. Posteriormente, las plantas fueron rehidratadas y se observó su recuperación después de 1 semana. Se repitieron los experimentos de comparación de la tolerancia a la sequía entre el tipo silvestre, *DREB1A* y las plantas *HRD* tres veces durante la temporada de invierno y la temporada de verano en condiciones de días cortos y días largos, respectivamente. Además, se realizó un experimento de sequía (con condiciones de crecimiento similares a las que se describieron anteriormente) con las plantas que contenían la fusión 35S::*HRD*-GR, utilizando inducción con DEX como se describe más adelante.

El agente inductor DEX 10 μ M se aplicó de tres formas diferentes a los diferentes genotipos (35S::*HRD*-GR, Ws y *HRD*) para inducir diferentes niveles de función de *HRD*: a) DEX aplicado desde el fondo de las macetas en una bandeja, b) pulverizado en la parte superior de las plantas y c) desde el fondo de las macetas y pulverizado. Se aplicó DEX en el momento de emergencia de las dos primeras hojas de la planta y se aplicó día por medio hasta el día 14 después de la germinación. A continuación las plantas se sometieron a sequía y se rehidrataron tal como se describió anteriormente y se observó la recuperación después de 1 semana.

1.2 Aislamiento de ADN flanqueador y análisis secuencial

El ADN se aisló de acuerdo con Pereira and Aarts (1998, Transposon tagging with the En-I system, Totowa, NJ, Humana Press), a partir de dos hojas o brotes florales jóvenes y se usaron 10 ng de ADN genómico para PCR anidada termo asimétrica (TAIL PCR) tal como se describe en (Marsch-Martinez et al., 2002, *supra*). Se llevó a cabo una re-PCR en general antes de la secuenciación de fragmentos amplificados y de identificar la posición del inserto en el genoma de Arabidopsis usando un algoritmo BlastN (Altschul et al. 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410). Se llevaron a cabo múltiples alineaciones de secuencias usando CLUSTAL X (Thompson et al. 1997, Nucl. Acid Res. 25, 4876-4882) y DNASTAR (DNASTAR Inc. Madison, WI) mientras los programas GENEDOC (Nicholas et al. 1997, EMBNET News 4, 1-4) y TreeView (Page, 1996, Comp. Applic. Biosci. 12: 357-358) se usaron para editar la alineación y producir el árbol filogenético, respectivamente. El análisis filogenético, incluido el análisis de remuestreo (bootstrapping), se llevó a cabo tal como lo describe Lucker et al. (2002, Eur. J. Biochem. 269, 3160-3171).

1.3 Generación de constructos de transformación vegetal y Arabidopsis transgénica

Los fragmentos que codifican los genes o secuencias reguladoras de interés se amplificaron usando ADN polimerasa de pfu de ADN genómico. En estos casos, a los fragmentos se les agregó una A en el extremo y se introdujeron en el vector pGEM-T Easy tal como lo describe el fabricante (Promega) y posteriormente se secuenciaron desde ambos lados antes de la digestión y unión al vector binario. Se llevaron a cabo PCR, digestiones restrictivas, aislamiento de ADN plasmídico y electroforesis en gel usando protocolos estándares.

Los fragmentos que abarcan las regiones codificantes de longitud completa se amplificaron (usando ADN polimerasa de pfu) a partir de ADN genómico (para *HRD*, At2g36450) para generar los constructos de sobreexpresión. El ADN genómico usado para la amplificación fue ecotipo Columbia de Arabidopsis, usando los cebadores HRDF y HRDR.

Oligonucleótidos:

HRDF (5' - CGGATCCATGCAAGGAACCTCCAAAGAC - 3') SEQ ID NO: 6

HRDR (5' - CGTCGACGGTTTGTTTAACTATCATGG - 3') SEQ ID NO: 7

El par de oligonucleótidos introdujo sitios de restricción BamHI y Sall a los fragmentos amplificados en sus 5' y 3', respectivamente, que se utilizaron para unir los fragmentos de región codificante 555bp a los sitios BamHI y Sall en el vector binario pNEW1 (un vector binario pBI121 modificado, Nayelli Marsch-Martinez y Andy Pereira, no publicado) entre un promotor 35S del virus de mosaico de la coliflor (CaMV) y un terminador de nopalina sintasa (NOS). El constructo resultante sobreexpresó el factor de transcripción At2g36450 AP2 bajo el control del promotor 35S.

Para generar los constructos promotor::GUS, se amplificó un fragmento corriente arriba del codón ATG de cada gen (1 kb de *HRD*) a partir de ADN genómico (ecotipo Columbia) usando Taq ADN polimerasa y oligonucleótidos que introdujeron sitios de restricción XbaI NcoI en 5' y 3', respectivamente. Esto permitió la unión de fragmentos a los sitios XbaI y NcoI en un vector pBinPlus modificado (van Engelen et al., 1995, Trans. Res. 4, 288-290) corriente arriba del gen reportero de β-glucuronidasa (GUS).

Para generar los constructos 35S::*HRD*-GR, se amplificó un fragmento que abarca la región codificante de longitud completa de *HRD* (usando ADN polimerasa de pfu) a partir de ADN genómico de hoja joven ecotipo Columbia de Arabidopsis usando los oligonucleótidos RP6 y RP6 para amplificar el fragmento 0,55 kb que contiene región codificante de longitud completa de *HRD*.

RP6 5' - TTATTTCTAGAATGCAAGGAACCTCCAAAGAC - 3' SEQ ID NO: 8

RP7 5' - TTATTAGATCTTGAAAATTCCACAAGTAATCG - 3' SEQ ID NO: 9

El par de oligonucleótidos introdujo los sitios de restricción XbaI y Bg/II en los fragmentos amplificados en sus 5' y 3', respectivamente, que se utilizaron para unión. El constructo 35S::*HRD*-GR se montó mediante uniones multipunto, en las que fragmentos individuales (promotor, gen *HRD*, fragmento GR, terminador) con extremos cohesivos compatibles apropiados se unieron al vector binario en una reacción. Se obtuvo un fragmento de promotor CaMV35S que se extiende desde -526 hasta el sitio de inicio de la transcripción como un fragmento *HindIII*-*XbaI* de 0,55 kb a partir de un derivado pBS-SK⁺ de pDH51 (Pietrzak et al., 1986, Nucl Acid Res 14: 5857-68). Se obtuvo un fragmento de GR como un fragmento *Bg/II*-*XhoI* de 0,85 kb a partir de pMTL23 (Seq ID 5, que codifica la Seq ID4 del dominio de proteína GR). Se obtuvo un fragmento terminador CaMV35S como un fragmento *SalI*-*EcoRI* de 0,21 kb a partir de un derivado pBS-SK⁺ de pDH51 (Pietrzak et al., 1986, *supra*). El constructo se hizo en el vector binario pMOG22 (ZENECA-MOGEN, NL) que contiene un CaMV 35S- higromicina fosfotransferasa-tNos quimérico para selección durante la transformación.

El constructo rd29A-DREB1A usado fue similar al descrito (Kasuga et al., 1999, Nat. Biotech. 17, 287- 291), excepto que la fusión génica se insertó en pBin-Plus (van Engelen et al., 1995, Trans. Res. 4, 288-290).

5 Los constructos se introdujeron en las plantas usando el método de transformación por inmersión floral (Clough and Bent, 1998, Plant J. 16, 735-743). Las semillas se colocaron en placas en medio Murashige y Skoog a media fuerza (1/2MS; Murashige y Skoog, 1962, Physiol. Plant. 15, 473-497) y las plántulas que se seleccionaron en 50 mg/L de kanamicina se transfirieron posteriormente al invernadero.

1.4 Análisis de expresión génica

10 El ARN total para Transcriptasa inversa-PCR (RT-PCR) se aisló de hojas en roseta maduras, verdes derivadas de plantas de 4 semanas de edad de mutante *hardy* con etiqueta de activación y de tipo silvestre (ecotipo WS) usando el Trizol Reagent tal como lo describe el fabricante (Invitrogen, Life Technologies). Se usó aproximadamente 1 µg de ARN total para tratamiento con ADNasa I y síntesis de ADNc (usando transcriptasa inversa SuperScriptII) tal como lo describe el proveedor (Invitrogen, Carlsbad, CA). El ADNc se diluyó 50 veces y se usó para amplificación usando oligonucleótidos específicos para el gen de actina para igualar las concentraciones de las muestras de ADNc.

RACTP1, 5'- GCGGTTTTCCCCAGTGTGTTG -3' SEQ ID NO: 10

RACTP2, 5'- TGCCTGGACCTGCTTCATCATACT -3' SEQ ID NO: 11

15 Posteriormente el ADNc diluido se utilizó para llevar a cabo una reacción por PCR usando oligonucleótidos específicos diseñados para amplificar los dos genes que flanqueaban el sitio de inserción. Los oligonucleótidos HRDF y HRDr se usaron para amplificar el gen At2g36450, y se usaron cebadores apropiados para el gen At2g36460. Las condiciones de reacción para PCR incluyeron un paso de desnaturalización de 95°C durante 3 min, seguido por 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 55°C y 1,5 min a 72°C, finalizando con un paso de elongación de 5 min a 72°C. Para la PCR testigo con oligonucleótidos de actina se usaron 30 ciclos de amplificación.

1.5 Tinción y microscopía GUS

25 Se analizaron tejidos de varios órganos de plantas cultivadas en el suelo o plántulas cultivadas en 1/2MS in vitro para sus patrones de expresión de GUS. La solución de GUS contenía 100mM de solución amortiguadora de fosfato de sodio, pH 7,0, 0,5 mg/ml de ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D glucorónico (X-Gluc, Duchefa, Países Bajos), 0,1% de Triton y 0,5 mM de cada uno de ferri/ferrocianuro de potasio. Las muestras se infiltraron al vacío y se incubaron a 37°C durante 16 a 24 h y se rebajó la concentración de clorofila en 70% de etanol. Se llevaron a cabo observaciones con el binocular (WILD M3Z de Heerbrugg Switzerland, tipo S), o con un microscopio óptico (Zeiss) y se usó una cámara RS Photometries CoolSNAP (MediaCybernetics®) para tomar imágenes digitales, con el programa informático CoolSNAP.

30 Para la Microscopía electrónica de barrido (SEM) las muestras se pegaron a un soporte de muestras con cemento conductor de carbón (Leit-C, Neubauer Chemikalien, Alemania) y posteriormente se congelaron en nitrógeno líquido. Las muestras se transfirieron al vacío hasta una cámara especial para criopreparación (Oxford cryo-system, CT 1500 HF, Eynsham, RU) en una fase de muestra a -90° C. Las criofracturas se hicieron a aproximadamente -150°C usando una hoja de bisturí fría (-196°C). Las muestras fracturadas se liofilizaron durante 3 min a -90°C al vacío (3x10⁻⁷ Pa) para eliminar la contaminación por vapor de agua. Después de que la superficie de la muestra se recubrió por barboteo con 10 nm de Platino se transfirió a la fase de muestra fría (-190°C) dentro de Cryo-FESEM (JEOL 6300F Field Emission SEM, Japón, Tokio) y posteriormente se analizó con un voltaje de aceleración de 5 kV. Las imágenes se registraron digitalmente (Orion, Bélgica).

1.6 Análisis de micromatriz

40 El ARN total se aisló usando el reactivo TRIZOL (Life Technologies, Inc.) usando dos-cuatro hojas en roseta de Arabidopsis de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se purificó usando el kit RNeasy Minelute (Qiagen, Carlsbad, CA, EE.UU.). La amplificación de ARN se llevó a cabo usando el kit Amino Allyl MessageAmp (Ambion, Austin, TX, EE.UU.). Brevemente, la síntesis de la primera hebra de ADNc se llevó a cabo mediante transcripción inversa usando 3 µg de ARN Total y 1 µl de cebador T7 Oligo(dT). El ADNds de longitud completa se sintetizó en la reacción que contenía solución amortiguadora de segunda hebra 1x, 4 µl de mezcla dNTP, 2 µl de ADN polimerasa, 1 µl de RNasa H, seguido de incubación durante 2 h a 16 °C. El ADNc se purificó aplicándolo a un cartucho filtrante equilibrado. El ADNc purificado se concentró y el volumen se ajustó hasta alcanzar 14 µl. La amplificación de ARN antisentido mediante transcripción in vitro con T7 se logró en una solución que contenía 12 µl de ATP, CTP, GTP Mix (25 mM), 3 µl de Solución aaUTP (50mM), 3 µl de Solución UTP (50mM), 4 µl de solución amortiguadora de reacción 10 x, 4 µl de mezcla enzimática T7 a 37 °C durante 8 h. A continuación el ARNa amplificado se purificó aplicándolo a un cartucho filtrante equilibrado.

50 Para hibridación usamos matriz Operon de oligonucleótido largo moteado de la Universidad de Arizona que comprende 29.000 genes de Arabidopsis (<http://www.operon.com/arrays/omad.php>). Las muestras de ARNa se acoplaron a ésteres NHS monorreactivos de Cy3 o Cy5 (Amersham Biosciences) durante 2 hrs. Después de

apacamiento con tinción y purificación, los objetivos se mezclaron con 80 μ l de solución de hibridación que contenía 2xSSC, 0,06x Liquid Blocking Reagent (Amersham Biosciences), y 0,04% de SDS. Después de calentar hasta alcanzar 95°C durante 2 min y luego enfriar en hielo, la mezcla se aplicó en el espacio intermedio entre los portaobjetos y los cubreobjetos (LifterSlip, Erie Scientific). Los portaobjetos se incubaron en una cámara de hibridación durante 9 h a 56 °C en un horno. Los portaobjetos se lavaron a TA durante 5 min en soluciones de 2xSSC con 0,5% de SDS, 0,5xSSC y 0,05xSSC secuencialmente y luego se centrifugaron durante 10 min a 1000 rpm.

Los portaobjetos hibridados se sometieron a barrido con el dispositivo analizador de barrido ScanArray Express HT (Perkin Elmer), que genera imágenes Tiff de los canales Cy3 y Cy5. El voltaje de ScanArray PMT se ajustó de 42 a 50 V dependiendo del primer signo de una señal saturada. Las imágenes de barrido se analizaron con el programa informático ScanArray Express (Perkin Elmer). Se usó el método de círculo adaptivo para la cuantificación y para la normalización de datos se usó el método LOWESS. Se eligió el método de relación entre señal y fondo para la medición de la calidad usando parámetros predeterminados (límite inferior 400 y multiplicador 1,70) y se usaron los resultados para comprobar la eficacia de los experimentos.

Para análisis adicionales, los datos se extrajeron en hojas de cálculo de Excel y se seleccionaron los valores de expresión génica del canal 1 o el canal 2 (Cy3 o Cy5) que exhibieron más de 2x fondo para la intensidad media. Además se filtraron para genes regulados considerables que exhibieron relaciones de las medias que fueron superiores a 1,5 o inferiores a 0,66 (valores Log2 +/- 0,58). Estas listas de expresión génica nos proporcionaron una lista extensa de potenciales genes regulados que se usaron adicionalmente para otras comparaciones entre tratamientos experimentales. En el análisis de tratamientos específicos (por ejemplo, sequía) los genes con valores de expresión de al menos una replicación de más de 2 veces (valores Log2 +/-1) se tomaron para compararlos con otros tratamientos.

Ejemplo 2 - Identificación del mutante *hardy* y del fenotipo característico

Sometiendo a barrido un grupo de 2000 líneas de etiqueta de activación de transposones de Arabidopsis (Marsch-Martinez et al., 2002) se identificó una planta mutante con crecimiento lento y hojas verde oscuro. Las rosetas y las hojas caulinares del mutante (denominado *hardy*, *HRD*) tenían hojas más gruesas en comparación con las plantas de tipo silvestre. El mutante floreció más tarde y tuvo un cuajado de semillas reducido. El fenotipo más sorprendente fue la dificultad para arrancar la planta madura del suelo, supuestamente debido a una estructura de raíces fuerte. Las plantas parecieron muy tolerantes a cambios en las condiciones del invernadero por consiguiente recibieron el nombre *hardy* ("resistente" en inglés). El análisis de progenie de la línea mutante *HRD* autopolinizada sugiere una mutación dominante (tres cuartos de las plantas exhibieron el fenotipo *HRD*).

Las plantas mutantes segregantes exhibieron diferencias en su patrón de crecimiento y tamaño variando de plantas con aspecto mediano a plantas muy pequeñas. Las plantas medianas se espigaron al mismo tiempo que el tipo silvestre indicando que el tiempo de florecimiento no fue muy afectado en estas plantas, mientras que en las plantas más pequeñas el espigamiento comenzó casi 5 a 6 días después en comparación con el tipo silvestre indicando que las plantas más pequeñas tuvieron un tiempo de florecimiento posterior. Sin embargo, los brotes se abrieron mucho más tarde en el mutante en comparación con su tipo silvestre. En las plantas *HRD* medianas el tallo principal se alargó hasta 5 a 6 cm de altura y tuvo una cantidad mayor de tallos secundarios de aproximadamente la misma altura que el tallo principal. La longitud del entrenudo se redujo en los tallos. La planta tenía un aspecto más frondoso y compacto. Las plantas *HRD* más pequeñas (Figura 1A) tuvieron un tallo principal y tallos secundarios muy cortos que no se alargaron mucho debido a la reducción severa en la longitud del entrenudo. Las plantas *HRD* medianas y pequeñas cuajaron muchas flores en comparación con las plantas de tipo silvestre pero tuvieron un cuajado de semillas muy bajo.

La estructura de hoja se analizó haciendo una criofractura SEM de la estructura de hoja, tal como se describió en el Ejemplo 1.5, revelando una hoja mucho más gruesa con capa empalizada adicional en comparación con la hoja de tipo silvestre (Figura 1B). Esta capa adicional probablemente proporciona a la hoja un fenotipo verde intenso debido a la densidad más alta de clorofila causada por células más pequeñas y más capas.

El fenotipo de raíces se caracterizó cultivando plantas *HRD* en arena con nutrición y retirando por lavado la arena para revelar la estructura de raíces. La estructura de raíces se analizó contando y midiendo: la cantidad y longitud de las raíces primarias, secundarias y terciarias (Tabla 1). La característica más distintiva del mutante *HRD* fue una raíz que se ramifica hasta raíces secundarias y terciarias (Tabla 1), muy cercana al tallo o base de la raíz, justo debajo del suelo (Figura 2). Esto produjo raíces secundarias y terciarias más longitudinales en la base de la raíz en comparación con las de tipo silvestre lo que originó una estructura de raíces más compleja similar al sistema de raíces fibrosas de las plantas monocotiledóneas. Por consiguiente, estas raíces tenían más área superficial para sostenerse en la base lo cual aumentó su capacidad de anclaje al suelo, haciéndolas más resistentes al momento de arrancarlas. Este fenotipo de ramificación aumentada próxima a la base de la raíz es una característica que contribuye al fenotipo de raíz más fuerte del mutante *HRD*. Es necesaria mayor fuerza para arrancar de raíz el mutante *HRD* tal como se determinó aplicando fuerza para arrancar las plantas de mutante *HRD* y de tipo silvestre de aproximadamente 4 semanas de edad. Es necesario entre 20-50% más de fuerza para arrancar del suelo el mutante *HRD* en comparación con el tipo silvestre. Se ha mostrado una relación entre la fuerza para arrancar de raíz

y el rasgo de vuelco de raíz, un rasgo importante en cereales y árboles que permite que las plantas se mantengan erguidas y resistan al vuelco (Bruce et al, 2001, J Exp Biol 52: 459-68; Bailey et al. 2002, J Exp Biol 53: 333-340).

Tabla 1: Mediciones de las raíces a un 1cm de la base de la raíz en plantas con 3 semanas de edad

Línea vegetal N=4	Raíces primarias (No. de raíces ± DE)	Raíces secundarias (No. de raíces ± DE)	Raíces terciarias (No. de raíces ± DE)	Longitud de base de raíz (cm) ± DE
<i>HRD</i> TS	1 ± 0,00	1,50 ± 0,58	0,00 ± 0,00	0,55 ± 0,06
	1 ± 0,00	4,25 ± 0,50	9,25 ± 1,26	0,28 ± 0,05

Ejemplo 3 – Un factor de transcripción génico AP2/ERF es responsable por el fenotipo del mutante *HRD*

5 El análisis de transferencia en gel de ADN mostró que el *HRD* contiene una única inserción (no se muestran los datos). El aislamiento y el análisis secuencial del ADN que flanquea el sitio de inserción indicó adicionalmente que la inserción se ubica en una región intergénica en el cromosoma 1 (Figura 3A). La ubicación del tetrámero potenciador 35S es entre un gen que codifica una proteína desconocida (4025 pares de base corriente arriba del promotor) y un gen que codifica un miembro de la familia de factores de transcripción AP2/ERF específica para vegetales (620 pares de base corriente arriba del promotor). Para examinar si estos dos genes fueron inducidos en la expresión en *HRD* en comparación con el tipo silvestre, llevamos a cabo un experimento de Transcripción inversa-PCR (RT-PCR) usando ADNc aislado a partir de tejidos de hoja de *HRD* y de tipo silvestre (Figura 3B). Los resultados mostraron que solo el gen AT2g36450 de AP2/ERF a una distancia de 6 kb desde el tetrámero potenciador 35S se indujo en las hojas del mutante *HRD* en comparación con las hojas de tipo silvestre y fue el principal candidato responsable por el fenotipo.

15 La superfamilia de factores de transcripción AP2/ERF vegetales contiene 141 miembros en Arabidopsis (Alonso et al., 2003, Science 301, 653-657) y la proteína de *HRD* contiene el dominio AP2/ERF (Figura 3C). Las búsquedas de homología de secuencias y los análisis filogenéticos a lo largo de toda la familia AP2/ERF mostraron que *HRD* es similar a una cantidad de proteínas en el arroz (no se muestran los datos). Las proteínas del arroz y de Arabidopsis contienen el dominio AP2 así como también residuos de aminoácidos similares en el extremo C- terminal.

Ejemplo 4 – Plantas transgénicas que sobreexpresan *HRD*

25 El gen corriente abajo (At2g36450), que codifica el factor de transcripción AP2/ERF, fue el principal candidato responsable por el fenotipo del mutante *HRD*. Por consiguiente, la región codificante del gen (denominada *HRD*) se clonó y se expresó constitutivamente en Arabidopsis bajo el control del promotor 35S CaMV. Todas las plantas transgénicas cultivadas (10 plantas individuales) mostraron un fenotipo semejante al de la línea de etiqueta de activación original, en particular la planta de estructura más pequeña y de hoja verde oscura *HRD* (no se muestran los datos). El fenotipo de la mayoría de las líneas 35S::*HRD* (transformantes primarios y generaciones posteriores) fue más severo en comparación con el mutante *HRD* original. En la mayoría de los casos las plantas fueron más pequeñas y en algunos casos incluso enanas (3 a 5 cm en tamaño después de la madurez) (no se muestran los datos).

30 El mismo constructo se transformó en tabaco y reveló un fenotipo de hoja verde oscuro más pequeña que mostró que el fenotipo de hoja puede conferirse en plantas heterólogas.

Ejemplo 5 -Sobreexpresión del gen *HRD* en arroz

35 Se hizo un constructo para transformación de arroz que comprende la región codificante de *HRD* bajo el control del promotor CaMV35S, en el vector binario pMOG22. Los transformantes se obtuvieron en el cultivar Nipponbare de arroz usando el sistema Agrobacterium establecido. Los callos y brotes regenerados se seleccionaron para resistencia a la higromicina a una concentración de 25mg/l.

40 Después del enraizamiento los transformantes se transfirieron al invernadero y se llevó a cabo un análisis fenotípico preliminar. A continuación se usó la progenie autofecundada para llevar a cabo ensayos fenotípicos y de tolerancia al estrés detallados. Las líneas de arroz transformadas con el constructo de sobreexpresión de *HRD* revelaron un sistema de raíces que era más largo y tenía más ramas laterales que el de tipo silvestre. Se ha descubierto que estas características son útiles para hacer que el arroz y otros cereales sean más tolerantes a la sequía (Li et al., 2005, TAG 110: 1244-52; Bruce et al. 2001 supra).

Ejemplo 6 - Inducción de expresión de *HRD* usando una fusión génica glucocorticoide

45 Para inducir la expresión del gen *HRD* en diferentes tejidos y fases de desarrollo, generamos líneas transgénicas que expresan una proteína de fusión de *HRD* y el dominio de unión a hormona del receptor de glucocorticoides de la rata (GR; bajo el control del promotor CaMV35S) (Chang et al., 1987, Nuc Acids Res, 22: 9603). Las semillas de los

transformantes primarios de 35S::*HRD-GR* (TI) se sembraron en placas que contenían medio con o sin 10µM de hormona dexametasona (DEX). Las plántulas que se sembraron en un medio complementado con DEX exhibieron un fenotipo claro tal como se observa en el mutante *HRD* con plántulas más bajas con hojas verde intenso (Fig 4).

5 Para caracterizar el mecanismo de expresión de *HRD* que confiere fenotipos diferentes, se llevaron a cabo experimentos para inducir la fusión *HRD-GR* usando inducción por dexametasona (DEX) en diferentes fases de crecimiento y partes de la planta. Las plántulas y plantas completamente crecidas que contenían el transgén 35S::*HRD-GR* exhibieron un fenotipo de tipo silvestre y ningún fenotipo similar al de los mutantes *HRD* (Fig 4). Las plántulas cultivadas en el invernadero o cámara de crecimiento se trataron con DEX en diferentes momentos después de la germinación (1 semana, 10 días después de la germinación) desde abajo mediante riego o desde arriba mediante pulverización o mediante riego y pulverización. El tratamiento temprano y el tratamiento mediante pulverización y riego generó plantas con fenotipos más fuertes tal como se monitoreó a nivel de hoja. La inducción más fuerte fue con 10uM de DEX, exhibiendo un fenotipo similar al del mutante *HRD* original. Los diferentes niveles inducidos por DEX de las líneas transgénicas 35S::*HRD-GR* se evaluaron luego para fenotipo de inducción de estrés tal como se destaca más adelante.

15 Las plantas 35S::*HRD-GR*, cuando se trataron con 10 µM de DEX desde abajo mediante riego, proporcionaron un fenotipo *HRD* leve y eran más grandes que el mutante *HRD* original. Estas plantas exhibieron hojas en roseta de color verde intenso ligeramente onduladas hacia abajo con un tallo alargado, que tenía hojas caulinares de aspecto normal y tiempo de florecimiento normal (Fig 4). El tamaño de las hojas en roseta no fue afectado considerablemente. Cuando se trataron las plantas 35S::*HRD-GR* desde arriba mediante pulverización de DEX proporcionaron un fenotipo similar a *HRD* con rosetas pequeñas, ligeramente onduladas hacia abajo de color verde intenso. Sin embargo, el tallo principal se alargaba normalmente hasta 7-8 cm de altura y el tiempo de florecimiento variaba desde normal hasta tardío en algunas plantas. Cuando las plantas 35S::*HRD-GR* se trataron desde abajo (riego) y desde arriba mediante pulverización de DEX, exhibieron un fenotipo mutante *HRD* muy fuerte con hojas en roseta muy pequeñas severamente onduladas de color verde intenso y tuvieron floración tardía.

25 Ejemplo 7 – Expresión espacial y temporal del gen *HRD*

Para examinar la expresión del gen *HRD* se generó un constructo de transformación vegetal, que unía secuencias de ADN de 1,0 kb corriente arriba (tal como en la Seq ID 2) del codón ATG previsto del gen, al gen reportero (β -glucuronidasa (GUS)). En los transformantes de *Arabidopsis* la expresión de GUS se detectó en la semilla y el embrión. Esto se corresponde con los datos de micromatriz pública sobre la expresión del gen *HRD*, sugiriendo que el gen funciona normalmente durante el desarrollo de la semilla, proporcionando tolerancia al estrés durante la maduración de la semilla.

30 Ejemplo 8 – Plantas que sobreexpresan *HRD* exhiben tolerancia a la sequía mejorada

35 Para examinar en qué medida el cambio en la superficie de la planta, como resultado de la sobreexpresión de *HRD*, afectó su capacidad de tolerancia a la sequía, se expusieron plántulas de 15 días de edad de la línea etiqueta de activación *HRD* original, un testigo resistente rd29A-DREB1A y de tipo silvestre (ecotipo Wassilewskija) a un período de 9-12 días de deshidratación (Figura 5). Posteriormente, se regaron las plántulas y se monitoreó su recuperación durante una semana. Mientras las plantas de tipo silvestre no se recuperaron de los tratamientos de deshidratación mayores a 9 días y se secaron completamente, todas las plántulas derivadas de líneas que expresaban el gen *HRD* se recuperaron y se volvieron más verdes y más fuertes.

40 Los transformantes de *HRD-GR* que exhibieron inducción por DEX del fenotipo mutante asociado a *hardy* de hojas verde oscuro se usaron para un experimento de estrés por sequía. Los genotipos TS (tipo silvestre), mutante *HRD* y 35S::*HRD-GR* se germinaron y se trataron o no con DEX. El tratamiento con DEX se proporcionó desde abajo mediante riego, mediante pulverización o mediante riego y pulverización. Después de 2 semanas de crecimiento, el agua se retuvo para todos los tratamientos y genotipos durante un período de 9-15 días. En cada intervalo diario, las plantas se volvían a regar para poder evaluar la recuperación. El día de la muerte del tipo silvestre (TS) se registró para cada tratamiento y la supervivencia de los otros genotipos y tratamientos se registró en referencia a esta fecha. Los días después de la muerte del tipo silvestre (DDMTS) se registraron tal como se muestra en la Tabla 2. La Figura 6 muestra los resultados de este experimento. El *HRD-GR* inducido con DEX exhibe un fenotipo de tolerancia a la sequía equivalente al del mutante *HRD*. La comparación de los experimentos de tratamientos con DEX desde abajo (riego a la raíz), pulverización desde arriba (hoja) y ambos tratamientos desde abajo y desde arriba mostró que la combinación de tratamientos proporcionó el fenotipo más pronunciado para tolerancia a la sequía tal como se observa en el fenotipo de hoja.

Tabla 2

Línea vegetal	1 DDMTS	2 DDMTS	3 DDMTS
TS + Dex	0,00	0,00	0,00
TS – Dex	0,00	0,00	0,00
<i>HRD</i> + Dex	93,33	92,31	96,55
<i>HRD</i> – Dex	93,10	96,43	83,33
<i>HRD-GR</i> + Dex	83,33	75,00	71,43
<i>HRD-GR</i> - Dex	0,00	0,00	0,00

De forma similar, la sobreexpresión de *HRD* en arroz también conduce a plantas con tolerancia a la sequía aumentada. Los transformantes con un constructo 35S::*HRD* son capaces de resistir el marchitamiento prolongado de las hojas en condiciones de privación hídrica en comparación con plantas testigo, tal como se evaluó mediante recuperación después de la rehidratación.

Ejemplo 9 – Plantas que sobreexpresan *HRD* exhiben tolerancia a enfermedades mejorada

Para evaluar la resistencia al estrés biótico de las líneas de sobreexpresión de *HRD* se llevó a cabo una detección para resistencia a *Veticillium dahliae*, como ejemplo de una resistencia no específica de huésped. Las plántulas se cultivaron en la cámara de crecimiento a 22-24°C con 12 horas de luz, en macetas de 10 cm de diámetro que contenían una mezcla de compost:arena:perlita (2:1:1). Dos semanas después de la germinación, las plántulas se arrancaron de raíz cuidadosamente y se mojaron brevemente en una suspensión saturada de cultivo de *Veticillium* y a continuación se colocaron nuevamente en las macetas cubriendo las raíces con tierra. Las plantas se regaron normalmente, después de pocos días se suspendió el riego y se examinaron en diversas fases para síntomas de la enfermedad. Las plantas se puntuaron en 5 duplicados de maceta por genotipo y las puntuaciones por enfermedad se tomaron como la frecuencia de las plantas que sobrevivieron en la madurez. El ecotipo de tipo silvestre *Ws* no mostró supervivencia en este ensayo, mientras que los genotipos resistentes potenciales mostraron una supervivencia que varía de 20-100%.

En experimentos de infección múltiples con *Veticillium*, el mutante *HRD* exhibió un alto nivel de resistencia sin exhibir ninguno de los síntomas de marchitamiento visibles en las plantas de tipo silvestre susceptibles testigos (Fig 7). Para confirmar el efecto del gen *HRD*, se repitieron las pruebas de resistencia en las líneas de sobreexpresión recapituladas. No se observaron síntomas de marchitamiento ni evidencias de patógenos en la madurez lo que sugiere un fenotipo de resistencia completa.

Ejemplo 10 – Análisis de micromatriz del mutante *HRD* revela genes responsables del fenotipo

Para comprender el mecanismo de las respuestas combinadas al estrés biótico y abiótico, se llevaron a cabo experimentos de micromatriz con el mutante de sobreexpresión *HRD*. En nuestros estudios para detección de genotipos de *Arabidopsis* tolerantes a la sequía, el ecotipo de tipo silvestre *Wassilewskija* (*WS*) exhibió muerte después de nueve días de privación hídrica, mientras que las líneas del sobreexpresante *rd29A::DREB1A* y de *HRD* sobrevivieron 12 días de privación hídrica. Para una evaluación uniforme del material vegetal usamos 8 días de privación hídrica para el tipo silvestre *Ws* y se cosechó una muestra de hoja para aislar el ARN y al mismo tiempo se tomaron muestras de hoja del testigo de tipo silvestre *Ws*, *rd29A::DREB1A* y *HRD* que se regaron normalmente. Para cada comparación (tipo silvestre con respecto a sobreexpresante) usamos dos replicas biológicas respectivamente. Los ARNs del testigo de tipo silvestre se etiquetaron con Cy3 y los ARNs de tipo silvestre de sequía o del sobreexpresante se etiquetaron con Cy5 en ambas replicas biológicas. También se llevaron a cabo una cantidad de replicas con intercambio de colorantes como testigo técnico. Los experimentos se llevaron a cabo tal como se describe en el Ejemplo 1.6.

En el mutante *HRD* los experimentos de micromatriz revelan 142 genes inducidos y 151 genes reprimidos considerando los genes consistentes en expresión en ambas replicas. La Tabla 3 a continuación muestra una selección del regulón *HRD* (Conjunto de genes coregulados) con genes inducidos/reprimidos más de dos veces en comparación con el tipo silvestre. Los genes inducidos se muestran en color rojo (o sombreado oscuro) y los reprimidos en color verde (sombreado claro).

El patrón de expresión de *HRD* tiene una similitud parcial con el de *DREB1A*, sugiriendo la regulación de genes que confiere el fenotipo de tolerancia al estrés. Sin embargo, una gran cantidad de genes están regulados específicamente y diferencialmente en los sobreexpresantes *HRD* y *DREB1A*, tal como se muestra para los genes inducidos en la Tabla 3. Los genes inducidos específicamente en el regulón *HRD* son un grupo de 4 TFs, proteínas

5

de señalización de Ca²⁺ así como también genes de metabolismo de trehalosa y galactinol. Los genes relacionados con el estrés biótico están representados por los genes PDF2 defensina inducidos que se demostró que son inducidos por respuestas a patógenos en una vía de jasmonato, y represión de los genes PR-5 y Bet v1 relacionados con la patogénesis. La diferencia en *HRD* y *DREB1A* en los genes con patrón de expresión alterado sugiere el mecanismo de acción o función diferente de estos dos genes AP2/ERF. Estos resultados y la comparación con datos de micromatriz publicados indican que el gen *HRD* regula un conjunto diferente de genes corriente abajo que los descritos anteriormente para otros factores de transcripción AP2/ERF. El conjunto y patrón de genes regulados diferentes confiere el fenotipo específico de las líneas del mutante *HRD* y sobreexpresante *HRD*.

Tabla 3: Genes regulados hacia arriba por la sobreexpresión de *HRD* en comparación con *DREB1A* y Sequía

Nombre	Anotación	HARDY		DREB1A		SEQUIA	
		129	130	193	195	127	128
At2g42540	proteína regulada por frío cor15a LEA	2,62	2,24	4,31	5,83	1,4	2,09
At5g50720	proteína de respuesta a ABA (HVA22e)	2,58	2,18	4,01	6,5	1,53	2,3
At5g43150	proteína expresada	2,48	1,05	1,72	1,25	2,02	1,93
At5g52310	proteína de respuesta a desecación 29A (RD29A)/LTI78	2,32	2,1	3,48	5,48	2,42	2,87
At5g15970	proteína de respuesta a estrés KIN2/COR6.6	2,25	2,58	1,08	3,82	2,06	2,2
At2g38530	LTP2: Proteína de transferencia de lípidos inespecífica 2	2,14	1,97	3,82	5,47	0,94	0,87
At3g15210	factor de unión a elementos de respuesta a etileno 4 (ERF4)	1,81	1,56	1,38	0,72	1,26	1,52
At1g78070	proteína de familia repetida WD-40	1,78	1,12	2,95	3,46	1,06	1,19
At1g20440	deshidrina (proteína inducida por frío COR47)	1,74	1,57	4,19	5,7	1,4	1,49
At1g20450	deshidrina ERD10 (proteína inducida por bajas temperaturas LTI45)	1,56	1,47	3,52	4,17	0,99	1,39
At5g07010	sulfotransferasa 3 similar a esteroides	4,65	4,71	2,51	2,01	-0,14	0
At4g30650	proteína de respuesta a sal y bajas temperaturas LTI6A	3,91	4,34	3,11	6,7	-0,29	0,27
At3g47540	quitinasa, similar a endoquitinasa básica CHB4	3,59	2,75	1,69	0,65	0,15	0,63
At4g12470	inhibidor de proteasa/alm. semilla/proteína de transferencia de lípidos (LTP)	3,44	1,29	2,71	4,56	0,06	-0,67
At2g24560	lipasa/hidrolasa con motivo GDSL, similar a la familia lipasa II EXL3	3,43	3,7	7	7,39	-0,15	0,23
At5g07000	sulfotransferasa similar a esteroides 3	3,23	4,1	0,95	1,25	-0,37	0,49
At4g12480	proteína de la familia de proteínas de transferencia de lípidos (LTP) pEARLI 1	3,15	1,14	5,66	5,7	1,16	-1,58
At1g30360	proteína de respuesta temprana al estrés por deshidratación (ERD4)	2,76	2,27	2,77	3,63	-0,36	-0,48
At1g33230	proteína expresada	2,53	2,02	3,03	4,76	0,38	0,27
At1g04240	proteína 3 inducida por ácido indolacético (IAA3)	2,51	2,12	2,56	2,2	-0,44	-0,62
At3g16400	similar a la proteína de unión a mirosinasa, motivo Kelch	2,47	2,11	2,38	2,28	0,13	1,12
At1g54410	proteína de la familia de las deshidrinas	2,47	1,41	1,78	2,96	0,18	0,12
At2g02100	proteína de fusión a defensinas vegetales (PDF2.2)	2,34	4	3,7	3,86	-1,11	-0,29
At3g09540	proteína de la familia pectato liasa	2,34	2,55	1,74	1,87	-0,75	-0,49
At5g08260	proteína de la familia serina carboxipeptidasa S10	1,97	2,05	0,99	1,17	-0,4	-0,12
At3g53990	proteína de estrés universal (USP)	1,94	1,31	3,66	3,72	-0,02	-0,08
At3g05880	proteína hidrófoba RC12A/LTI6A	1,87	1,4	2,84	4,04	0,05	0,86
At5g07030	proteína de la familia aspartil-proteasa	1,65	2,1	1,13	2,07	-0,33	-0,19
At1g08570	proteína de la familia de las tiorredoxinas	1,63	1,44	4,21	4,36	0,67	0,44
At1g24575	proteína expresada	1,51	1,19	1,89	1,45	0,5	0,5
At2g28550	factor de transcripción que contiene el dominio AP2 RAP2.7	1,3	1	1,63	0,76	-0,09	-0,06
At2g26580	factor de transcripción específico de plantas de familia YABBY	1,28	1,7	1,77	2,06	0,19	-0,1
At4g24220	proteína expresada inducida tras lesión	1,2	1,2	2,03	2,25	0,57	0,45
At5g10860	proteína que contiene el dominio CBS	1,2	1	0,88	0,8	0,25	-0,04
At1g27030	proteína expresada	4,86	5,09	5,79	5,53	-0,63	-2,36
At2g21660	proteína de unión a ARN rica en glicina (GRP7)	1,17	1,82	2,79	2,53	-1,82	-1,86
At4g19120	proteína de respuesta temprana al estrés por deshidratación (ERD3)	1,16	1,37	0,75	1,03	-1,82	-1,01
At5g01600	ferritina 1 (FER1)	3,42	1,04	1,6	-0,3	1,31	2,58
At5g22630	proteína de la familia de la prefenato deshidratasa	2,54	3,59	0,37	0	1,9	1,56

At2g41180	relacionado a proteína de unión a sigA	1,7	1,01	1,18	0,57	0,66	0,96
At2g46690	similar a la proteína inducida por ácido indol-3-acético ARG7	1,65	1,17	0,22	-0,6	0,73	0,72
At5g41400	proteína de la familia de dedos de zinc (dedo ANULAR de tipo C3HC4)	1,45	1,13	1,78	0,31	1,5	1,36
At1g54000	proteína asociada a mirosinasa, Lipasa similar a GDSL	1,17	2,56	0	0	1,14	0,63
At2g36450	proteína que contiene el dominio AP2	5,83	5,72	0	-0,3	0,19	-0,5
At2g46970	proteína hélice-bucle-hélice básica (bHLH)	2,97	3,48	-0,71	3,99	-0,73	0,31
At1g78450	proteína de familia de unión a SOUL heme	2,76	2,65	-0,99	1,01	-0,42	-0,78
At1g15550	giberelina 3 beta-hidroxilasa (GA 4)	2,57	2,38	0	0	-0,37	-0,33
At1g60140	proteína de la familia trehalosa-fosfatasa	2,2	1,76	-0,76	1,58	0,41	0,18
At3g04630	proteína expresada	2,09	1,95	1,1	-0,2	-0,93	-0,71
At2g02130	proteína de fusión a defensinas vegetales (PDF2.3)	1,97	2,23	0,34	2,13	-0,64	-0,51
At3g14210	proteína asociada a mirosinasa	1,76	1,32	-1,28	-0,6	-0,46	-0,9
At3g06035	proteína expresada (proteína anclada a GPI)	1,73	1,09	0,85	0,52	0,19	-0,16
At1g21790	proteína expresada	1,69	1,35	3,17	0	0,28	0,8
At5g44130	proteína arabinogalactánica similar a fasciclina	1,69	1,33	-0,06	0,25	-0,61	-0,72
At2g36460	fructosa-bisfosfato aldolasa	1,66	1,56	0,79	0,51	0,06	0,03
At4g30660	proteína hidrófoba RC12A/LTI6A	1,59	1,16	-0,37	0,89	-0,26	-0,4
At4g33490	proteína nucelina	1,55	1,83	-1,13	2,47	-0,1	-0,61
At2g27030	calmodulina-2/3/5 (CAM5)(TCH1)	1,41	1,48	2,19	-0,3	-0,44	-0,44
At3g50970	deshidrina xero2 (XERO2)/LTI30	1,39	1,14	8,89	0	-1,06	2,31
At2g03440	similar al precursor temprano de nodulina 12B	1,39	1,12	0,23	0,57	-0,19	-0,08
At4g15450	similar a respuesta temprana al estrés por deshidratación (ERD7)	1,38	1,73	0,77	0	0,77	0,39
At5g06710	proteína tipo cremallera de leucina-homeobox 14 (HAT14)/HD-ZIP 14	1,25	1,35	-0,24	0,2	-0,37	-2,41
At5g50335	proteína expresada	1,23	1,17	-1,05	-0,4	0,13	-0,54
At2g21010	proteína que contiene el dominio C2	1,21	1,47	0,37	0,53	0,01	0,15
At3g60530	proteína de la familia de dedos de zinc (tipo GATA)	1,19	1	2,05	0	0,48	0,24
At1g09570	fitocromo A (PHYA)	1,12	1,48	-0,32	0,6	0,04	-0,7
At1g73480	hidrolasa, similitud con lipasa del monoglicérido	1,11	1,51	-1,16	2,43	0,78	0,57
At2g28900	subunidad translocasa de membrana interna de importe mitocondrial Tim17	2,69	2,65	0,51	5,71	-1,1	-0,93
At3g56090	similar al precursor caupí2 de subunidad de ferritina	1,8	1,09	0,5	-2,7	-1,44	-0,69
At5g11420	proteína expresada	1,63	1,9	0,49	1,21	-1,4	-1,27
At4g32280	proteína de la familia AUX/IAA de respuesta a auxina	1,38	1,09	0	0	-2,57	-1,52
At2g33370	proteína ribosomal L23 60S (RPL23B)	1,3	1,14	0,26	0,68	-1,19	-1,54
At3g50740	proteína de la familia UDP-glucuronosil/UDP-glucosil transferasa	1,17	1,45	1,88	0	-1,55	-1,74
At2g47930	glucoproteína rica en hidroxiprolina	1,11	1,34	0,23	0,77	-0,97	-1,91

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Plant Research International B.V.

<120> Una planta transgénica que tiene tolerancia a la sequía mejorada

<130> PCTP176621

<140>

<141>

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 555

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana.

<400> 1

```

atgcaaggaa cctccaaaga caatggcggc cgccaccctt tgtacagggg agtaaggcag 60
cgaaaagaact caaacaaatg ggtttctgag atccgtgagc cgagaaaacc taaccgtatc 120
tggttaggaa cattctctac ccccgagatg gcggcaatag cctatgacgt ggcagctcta 180
gccctcaaag gcagtcaagc tgagctcaac ttcccaaact cagtttcctc ttgctgctcc 240
ccaacctcca tgtctccagc agacatccaa gcagcagccg cttcggccgc tgctgctttt 300
gggtgctgcta gggatgcgat tgttatggca aataataaca gccaaacaag tgggtggtgct 360
tgcataaata gtagttatga taatacaaat atgaatggat tcatggacga ggatttggtg 420
ttcgacatgc ctaatgtgct catgaatag gctgaaggaa tgcttcttag cccccctcgt 480
cctactgtct ttgatgctgc ttacgacgct gatggttttc ctggaggaga cgattacttg 540
tggaattttc catga

```

555

<210> 2

<211> 2000

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

```

agccaataca ttagttagca tatgaatcta gtacttggtc tgatttattt tctgttaatc 60
aagtttaatt aattagtta caatgtttat gcttgatttt tacatagata tccgacagcc 120
tagtagatca agtgccaacc ggcacgcacc agcagacgta ggtgatagag aaaatttgat 180
ttaattaggt gaatttcttt tttcacacac atacatctat ggtgggaaca aagattccac 240
ggtatatcga gacatgaaat ggattttotta ccctaatega tttgacaagt ttgaatgaga 300
ataatctaga aatctatta cattatatta atgtctagt gggatgataa agcctcaaag 360
aaattgacct aaacgaaaca gcaatcacac actaacttct tcttagcatt tctaagacac 420
ttttcgatgt gattattcta taaatatccg acccttcacc aagtcaactc tatattcatt 480
tctattctga aataaccatt aaccccaaag taagcaatat ataggaaata catatataca 540

```

```

ttatagtott attatgacat tggagaagtt gtggtttata cccctggaca tggagtgat 600
atatagcaac attgaaatac agtttcacaa tatgtaaata acacaaaatt ataccaaaaa 660
tattgtaa at cacacaaatg aagtagataa ttttaatttt tattgaagtg ttttcaataa 720
agtgggtgtca agatcatgag aacacatgta ttttcatgaa cctgtgatgg cgaaaacgac 780
cacttttagat agaaacatat atacatcatt tgcaacttaa ttggccacca cccaaaaaaa 840
cgcgatatcc aacaagagga gcaattaaaa agctgtcttt acagctttag ctatcatc 900
tctaagctgt gatcaattcc tcccaaacca ttttctaact ggtttgcaact ttcttcaact 960
tcttctcttc actcttcaact acgtacttca ctctccaact aacttaactg caccataaaa 1020
tggcttcgat ctcttctct ctcttctcaa actcatcact ctctctact caaaacctta 1080
atactcatta tcaatatgca aggaacotcc aaagacaatg gcggcgcca ccctttgtac 1140
aggggagtaa ggcagcgaaa gaactcaaac aaatggggtt ctgagatccg tgagccgaga 1200
aaacctaacc gtatctgggtt aggaacattc tctacccccg agatggcggc aatagoccat 1260
gacgtggcag ctctagocct caaaggcagt caagctgagc tcaacttccc aaactcagtt 1320
tcctctttgc ctgccccaac ctccatgtct ccagcagaca tccaagcagc agccgcttcg 1380
gccgctgctg cttttgggtgc tgctagggat gcgattgta tggcaaataa taacagccaa 1440
acaagtggtg tggcttgcat gaatagtagt tatgataata caaatatgaa tggattcatg 1500
gacgaggatt tggattcga catgccta atgtctcatga atatggctga aggaatgctt 1560
cttagcccc ctctctctac tgtctttgat gctgcttacg acgctgatgg ttttctgga 1620
ggagacgatt acttgtggaa ttttccatga tagttaaaca aaccaacat ataaatatgt 1680
gattttgtgt gtttctatat atgtatgtat gaaataaata aatatgggtg ctagtgatgc 1740
attgtatgca tggttaggcc cgtaagacc gtaatataag gtcgtactgt attagtttt 1800
tgtctttaa ttattctcaa tttacaatct tatctagtct gatgtaatgc caaatgta at 1860
gaatagtcaa tgccttgact gatactcatt tgtttat tttt acagatggat acaattttcg 1920
tagggcttgg tatggttgat atactaatta aatatgtcta atatgattga tatactaatt 1980
aaatatgtct aatatagaca 2000

```

<210> 3
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

```

<400> 3
Met Gln Gly Thr Ser Lys Asp Asn Gly Gly Arg His Pro Leu Tyr Arg
  1           5           10           15
Gly Val Arg Gln Arg Lys Asn Ser Asn Lys Trp Val Ser Glu Ile Arg
           20           25           30
Glu Pro Arg Lys Pro Asn Arg Ile Trp Leu Gly Thr Phe Ser Thr Pro
           35           40           45
Glu Met Ala Ala Ile Ala Tyr Asp Val Ala Ala Leu Ala Leu Lys Gly
           50           55           60
Ser Gln Ala Glu Leu Asn Phe Pro Asn Ser Val Ser Ser Leu Pro Ala
           65           70           75           80

```

ES 2 363 980 T3

Pro Thr Ser Met Ser Pro Ala Asp Ile Gln Ala Ala Ala Ala Ser Ala
 85 90 95

Ala Ala Ala Phe Gly Ala Ala Arg Asp Ala Ile Val Met Ala Asn Asn
 100 105 110

Asn Ser Gln Thr Ser Gly Val Ala Cys Met Asn Ser Ser Tyr Asp Asn
 115 120 125

Thr Asn Met Asn Gly Phe Met Asp Glu Asp Leu Val Phe Asp Met Pro
 130 135 140

Asn Val Leu Met Asn Met Ala Glu Gly Met Leu Leu Ser Pro Pro Arg
 145 150 155 160

Pro Thr Val Phe Asp Ala Ala Tyr Asp Ala Asp Gly Phe Pro Gly Gly
 165 170 175

Asp Asp Tyr Leu Trp Asn Phe Pro
 180

<210> 4

<211> 284

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: proteína de dominio del receptor de glucocorticoides (GR)

<400> 4

Thr Lys Lys Lys Ile Lys Gly Ile Gln Gln Ala Thr Ala Gly Val Ser
 1 5 10 15

Gln Asp Thr Ser Glu Asn Pro Asn Lys Thr Ile Val Pro Ala Ala Leu
 20 25 30

Pro Gln Leu Thr Pro Thr Leu Val Ser Leu Leu Glu Val Ile Glu Pro
 35 40 45

Glu Val Leu Tyr Ala Gly Tyr Asp Ser Ser Val Pro Asp Ser Ala Trp
 50 55 60

Arg Ile Met Thr Thr Leu Asn Met Leu Gly Gly Arg Gln Val Ile Ala
 65 70 75 80

ES 2 363 980 T3

Ala Val Lys Trp Ala Lys Ala Ile Leu Gly Leu Arg Asn Leu His Leu
85 90 95

Asp Asp Gln Met Thr Leu Leu Gln Tyr Ser Trp Met Phe Leu Met Ala
100 105 110

Phe Ala Leu Gly Trp Arg Ser Tyr Arg Gln Ser Ser Gly Asn Leu Leu
115 120 125

Cys Phe Ala Pro Asp Leu Ile Ile Asn Glu Gln Arg Met Ser Leu Pro
130 135 140

Cys Met Tyr Asp Gln Cys Lys His Met Leu Phe Val Ser Ser Glu Leu
145 150 155 160

Gln Arg Leu Gln Val Ser Tyr Glu Glu Tyr Leu Cys Met Lys Thr Leu
165 170 175

Leu Leu Leu Ser Ser Val Pro Lys Glu Gly Leu Lys Ser Gln Glu Leu
180 185 190

Phe Asp Glu Ile Arg Met Thr Tyr Ile Lys Glu Leu Gly Lys Ala Ile
195 200 205

Val Lys Arg Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn Trp Gln Arg Phe Tyr Gln
210 215 220

Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Met His Glu Val Val Glu Asn Leu Leu
225 230 235 240

Thr Tyr Cys Phe Gln Thr Phe Leu Asp Lys Thr Met Ser Ile Glu Phe
245 250 255

Pro Glu Met Leu Ala Glu Ile Ile Thr Asn Gln Ile Pro Lys Tyr Ser
260 265 270

Asn Gly Asn Ile Lys Lys Leu Leu Phe His Gln Lys
275 280

<210> 5

<211> 874

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial:

secuencia codificante de dominio GR con
secuencias flanqueadoras para clonación

<400> 5

```

agatctacaa agaaaaaaaaat caaaggggatt cagcaagcca ctgcaggagt ctcaacaagac 60
acttcggaaa atcctaacaa aacaatagtt cctgcagcat taccacagct caacctacc 120
ttggtgtcac tgctggagggt gattgaaccc gaggtgttgt atgcaggata tgatagctct 180
gttccagatt cagcatggag aattatgacc aactcaaca tgttagggtg ggcgcaagtg 240
attgcagcag tgaaatgggc aaaggcgata ccaggcttca gaaacttaca cctggatgac 300
caaatgaccc tgctacagta ctcatggatg tttctcatgg catttgccct gggttggaga 360
tcatacagac aatcaagtgg aaacctgctc tgctttgctc ctgatctgat tattaatgag 420
cagagaatgt ctctaccctg catgtatgac caatgtaaac acatgctggt tgtctcctct 480
gaattacaaa gattgcaggt atcctatgaa gagtatctct gtatgaaaac cttactgctt 540
ctctctcag ttcttaagga aggtctgaag agccaagagt tatttgatga gattcgaatg 600
acttatatca aagagctagg aaaagccatc gtcaaaaggg aagggaactc cagtcagaac 660
tggcaacggt ttaccaact gacaaagctt ctggactcca tgcagaggt ggttgagaat 720
ctccttacct actgcttcca gacatTTTTg gataagacca tgagtattga attcccagag 780
atggttagctg aaatcatcac taatcagata ccaaatatt caaatggaaa tatcaaaaag 840
cttctgtttc atcaaaaatg actggatcct cgag 874
    
```

<210> 6

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial:
oligonucleótido HRDf

<400> 6

```

cggatccatg caaggaacct ccaaagac 28
    
```

<210> 7

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial:
oligonucleótido HRDr

<400> 7

```

cgtcgacggt ttgtttaact atcatgg 27
    
```

<210> 8

<211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial:
 oligonucleótido RP6

<400> 8
 ttatttctag aatgcaagga acctccaaag ac 32

<210> 9
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial:
 oligonucleótido RP7

<400> 9
 ttattagatc ttggaaaatt ccacaagtaa tcg 33

<210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial:
 oligonucleótido RACTP1

<400> 10
 gcggttttcc ccagtgttgt tg 22

<210> 11
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial:
 oligonucleótido RACTP2

<400> 11
 tgccctggacc tgcttcatca tact 24

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3 o una proteína al menos 70% idéntica a la SEQ ID NO: 3, o una proteína ortóloga para la generación de plantas transgénicas que tienen una combinación de dos o más de los fenotipos seleccionados del grupo que consiste en: tolerancia a la sequía mejorada, resistencia a enfermedades mejorada y estructura de raíces mejorada.
- 10 2. Un método para la generación de plantas transgénicas que tienen una combinación de dos o más de los fenotipos seleccionados del grupo que consiste en: tolerancia a la sequía mejorada, resistencia a enfermedades mejorada y estructura de raíces mejorada, que comprende insertar en el genoma de la planta un gen quimérico que comprende una secuencia reguladora de la transcripción activa en células vegetales unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3 o una proteína al menos 70% idéntica a la SEQ ID NO: 3, o una proteína ortóloga.
- 15 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha secuencia reguladora de la transcripción se selecciona del grupo que consiste en: un promotor constitutivo, un promotor inducible, un promotor específico de tejido y un promotor regulado por el desarrollo.
4. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 2 o 3, en donde dicha secuencia reguladora de la transcripción es un promotor inducible por estrés.
5. Un método de acuerdo con cualesquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde la secuencia de ácido nucleico codificante tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1.

Fig. 1A fenotipo mutante *hardy*

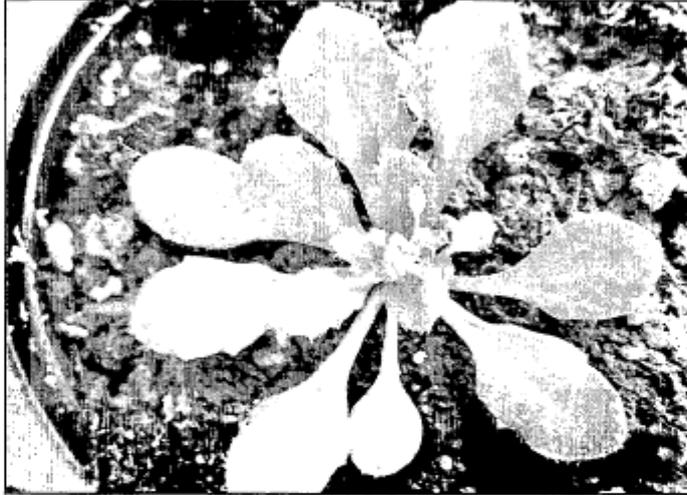


Fig. 1B

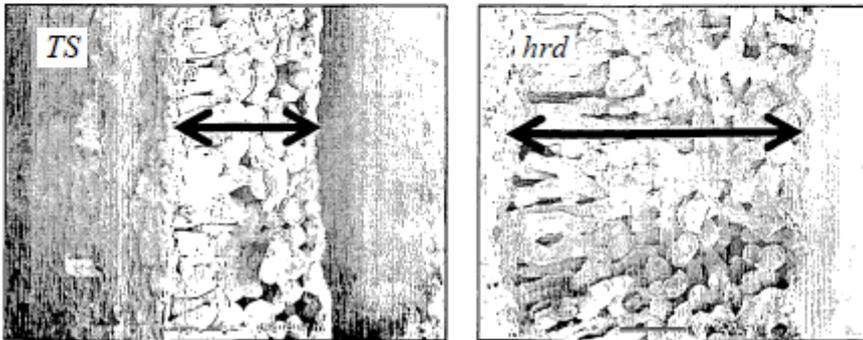


Fig. 2 Estructura de raíz del mutante *hrd*

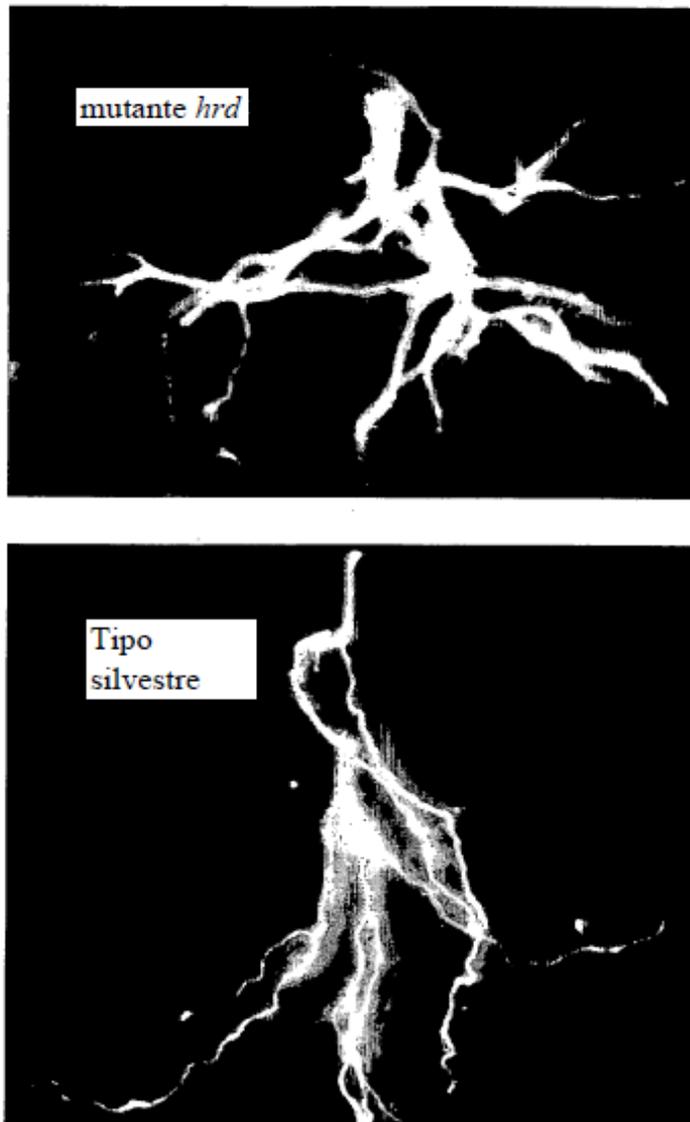


Fig. 3A Estructura genómica del mutante *hrd*

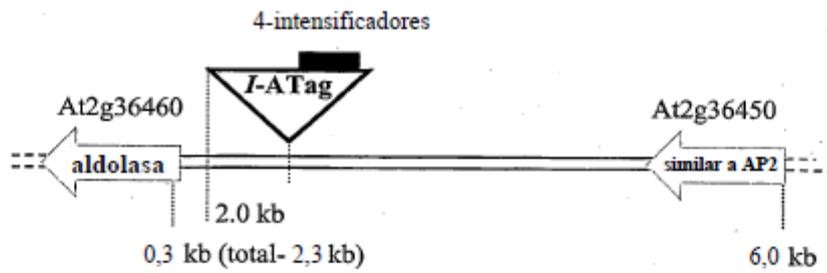


Fig. 3B Análisis por RT-PCR de genes etiquetados candidatos en el mutante *hrd*

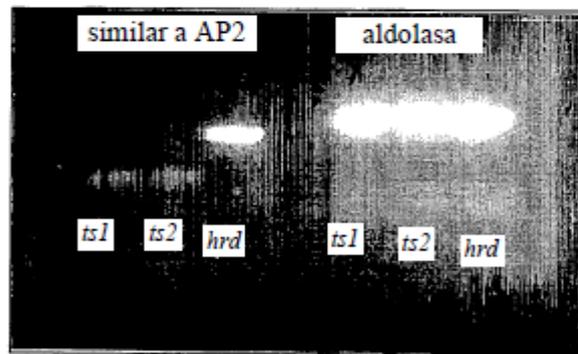


Fig. 3C Secuencia de proteína HRD que muestra el dominio AP2

MQGTSKDNGGRHPL YRGV RQRKNSN KWVSEIREPRKPNRIWLGTFSTPEM
AAIAYDVAALALKGSQAE LNFPNSVSSLPAP TSMSPADIQAAAASAAA AF
GAARDAIVMANNNSQ TSGVACMNSSYDNTNMNGFMDEDLVFDMPNVLMNM
AEGMLLSPPRPTVFDAAYDADGFP GGDDYLWNFP

Fig 4 Inducción del fenotipo mutante por DEX

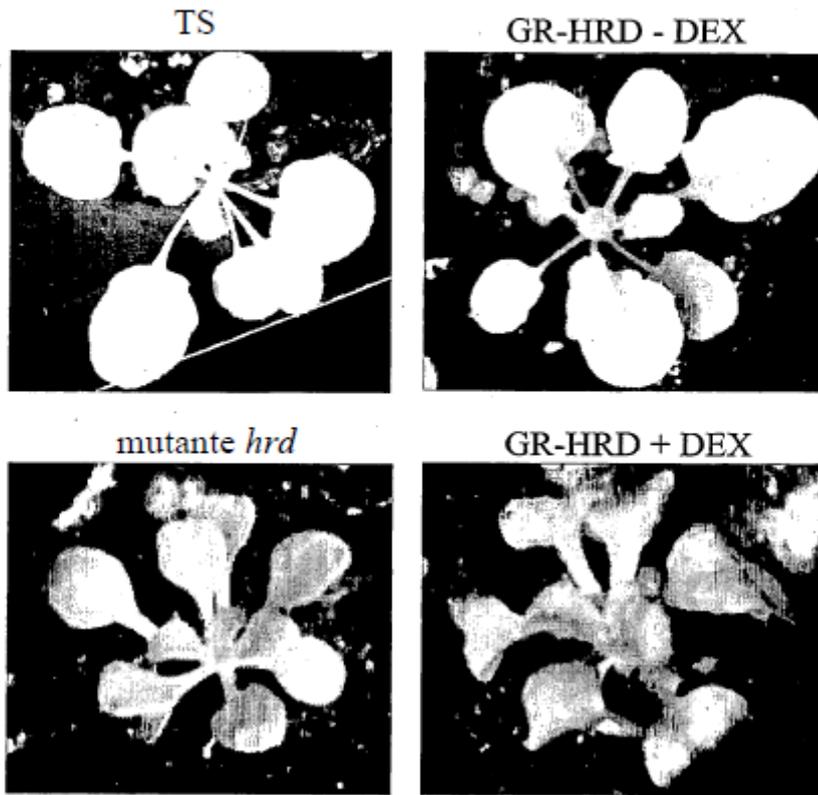


Fig 5 Resistencia a la sequía del mutante *hrd*

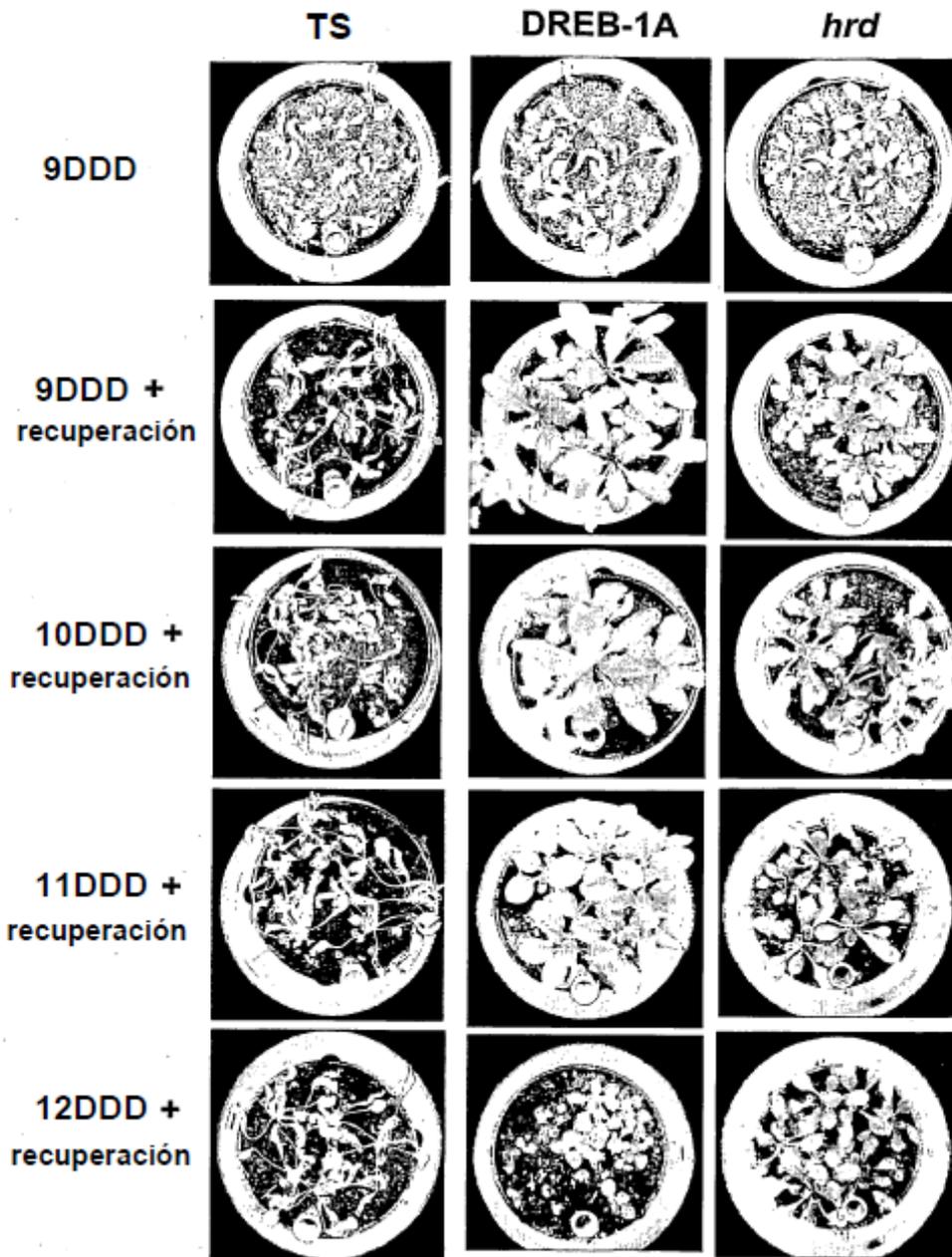


Fig 6 Inducción de la resistencia a la sequía de HRD-GR

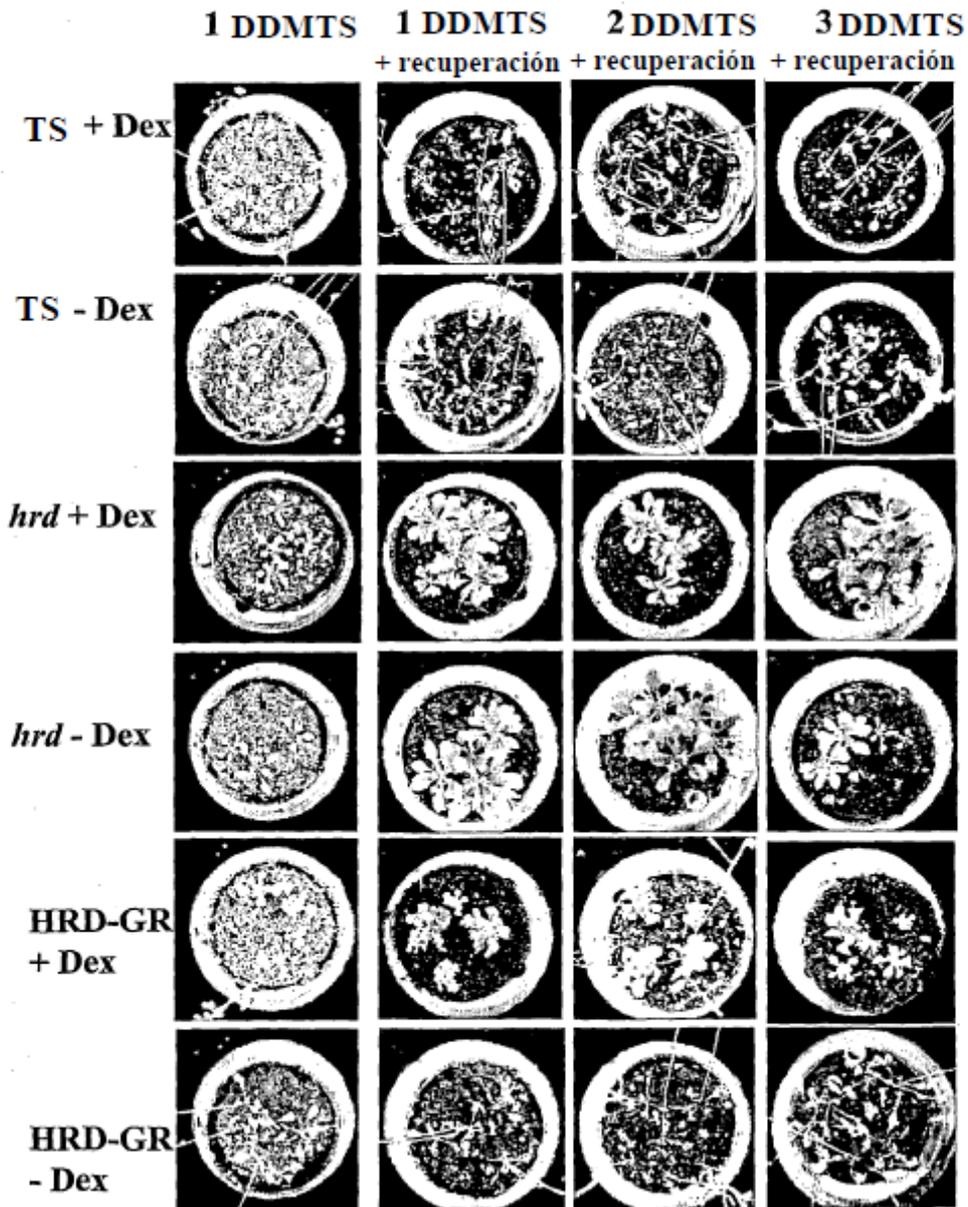


Fig 7 Resistencia a patógenos de *hrd* a *Verticillium*

