



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 912**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/29** (2006.01)  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**A01H 5/00** (2006.01)  
**A01H 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02782293 .1**  
96 Fecha de presentación : **12.11.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1451325**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.09.2004**

54 Título: **Polipéptidos del factor de transcripción relacionados con el estrés y métodos de uso en plantas.**

30 Prioridad: **09.11.2001 US 344503 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.10.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.10.2011**

73 Titular/es: **BASF PLANT SCIENCE GmbH**  
**Carl-Bosch-Strasse 38**  
**67056 Ludwigshafen, DE**

72 Inventor/es: **Chen, Ruoying;**  
**Van Thielen, Nocha y**  
**Da Costa e Silva, Oswaldo**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 365 912 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

Polipéptidos del factor de transcripción relacionados con el estrés y métodos de uso en plantas

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 5 Esta invención se relaciona en general con secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas que están asociadas con respuestas al estrés abiótico y con tolerancia al estrés abiótico en plantas.

En particular, esta invención se relaciona con secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas que les confieren a las plantas tolerancia a la sequía, al frío, y/o a la salinidad.

Estado del arte

- 10 Los estreses ambientales abióticos, tales como el estrés por sequía, el estrés por salinidad, el estrés por calor, y el estrés por frío, son los principales factores limitantes para el crecimiento y la productividad de una planta. Las pérdidas de cosechas y las pérdidas de rendimiento de las cosechas de los principales cultivos tales como arroz, maíz, algodón, y trigo provocadas por estos estreses representan un factor político y económico importante y contribuyen a la escasez de alimentos en muchos países subdesarrollados.

- 15 Las plantas se ven típicamente expuestas durante su ciclo de vida a una reducción en el contenido de agua en el ambiente. La mayoría de las plantas han desarrollado estrategias para protegerse contra estas condiciones de desecación. Sin embargo, si la severidad y la duración de las condiciones de sequía son muy grandes, los efectos sobre el desarrollo, crecimiento y rendimiento de las plantas, son profundos. Además, la mayoría de las plantas de cultivo son muy sensibles a altas concentraciones de sal en el suelo. La exposición continua a sequía y alta salinidad provoca alteraciones importantes en el metabolismo de la planta. Estos grandes cambios en el metabolismo conducen en última instancia a la muerte de las células y en consecuencia a pérdidas de productividad.

- 25 El desarrollo de plantas tolerantes al estrés es una estrategia que tiene el potencial para resolver o mediar al menos algunos de estos problemas. Sin embargo, las estrategias tradicionales de fitomejoramiento para desarrollar nuevas líneas de plantas que exhiban resistencia (tolerancia) a estos tipos de estreses son relativamente lentas y requieren de líneas resistentes específicas para cruzamiento con la línea deseada. Los recursos limitados de germoplasma para tolerancia al estrés y la incompatibilidad de los cruces entre especies de plantas relacionadas en forma alejada representan los problemas más importantes surgidos en el fitomejoramiento convencional. Adicionalmente, los procesos celulares que conducen a tolerancia a la sequía, al frío y a la salinidad en plantas modelo tolerantes a la sequía, y/o a la salinidad son de naturaleza compleja e involucran múltiples mecanismos de adaptación celular y numerosas rutas metabólicas. Este carácter multicomponentes de tolerancia al estrés no solamente ha hecho muy infructuoso el fitomejoramiento para tolerancia, sino que ha limitado también la habilidad para modificar por ingeniería genética plantas para tolerancia al estrés utilizando métodos biotecnológicos.

- 30 Por lo tanto, lo que se requiere es la identificación de los genes y las proteínas involucrados en estos procesos multicomponentes que conducen a tolerancia al estrés. La elucidación de la función de los genes expresados en plantas tolerantes al estrés no solamente mejorará nuestra comprensión de la adaptación y tolerancia de las plantas a los estreses ambientales, sino que también puede proporcionar información importante para el diseño de nuevas estrategias para la mejora de los cultivos.

- 40 Una planta modelo utilizada en el estudio de tolerancia al estrés es *Arabidopsis thaliana*. Existen al menos cuatro rutas diferentes de transducción de la señal que conducen a tolerancia al estrés en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Estas rutas están bajo el control de diferentes factores de transcripción (Shinozaki et al., 2000, Curr. Opin. Plant Biol. 3: 217 - 23). Los reguladores de genes, especialmente los factores de transcripción, involucrados en estas rutas de tolerancia son particularmente adecuados para modificar por ingeniería genética la tolerancia en plantas ya que un solo gen puede activar una cascada completa de genes que conducen al fenotipo de tolerancia. En consecuencia, los factores de transcripción son objetivos importantes en la búsqueda para identificar genes que les confieren a las plantas tolerancia al estrés.

- 45 Un factor de transcripción que ha sido identificado en el estado del arte es el factor de transcripción CBF de *Arabidopsis thaliana* (Jaglo-Ottosen et al., 1998, Science 280: 104 - 6). La sobreexpresión de este gen en *Arabidopsis* le confirió tolerancia a la sequía a esta planta (Kasuga et al., 1999, Nature Biotech. 17: 287 - 91). Sin embargo, CBF es el único ejemplo hasta la fecha de un factor de transcripción capaz de conferir tolerancia a la sequía a las plantas por sobreexpresión.

Un tipo principal adicional de estrés ambiental es el doblamiento, que se refiere al encorvamiento de brotes o tallos en respuesta al viento, la lluvia, plagas, o enfermedades. Dos tipos de doblamiento se presentan en cereales: el doblamiento de la raíz y el rompimiento del tallo. El tipo más común de doblamiento es el doblamiento de la raíz, que se presenta al principio de la temporada. El rompimiento del tallo, por su parte, se produce al final de la temporada a medida que el tallo se vuelve más frágil debido a la maduración del cultivo. El rompimiento del tallo tiene consecuencias adversas mayores sobre el rendimiento del cultivo, ya que las plantas no pueden recuperarse así como del doblamiento temprano de la raíz.

El doblamiento en cultivos de cereal está influenciado por los rasgos morfológicos de las plantas (estructurales) así como por condiciones ambientales. El doblamiento en cereales es a menudo un resultado de los efectos combinados del poder inadecuado de permanecer en pie del cultivo y de condiciones climáticas adversas, tales como lluvia, viento, y/o granizo. El doblamiento también depende de la variedad (variedad cultivada). Por ejemplo, una variedad cultivada de trigo alto, de tallo débil tiene una mayor tendencia al doblarse que una variedad cultivada semi-enana con caña más rígida. Además, la tendencia de un cultivo a doblarse depende de la resistencia especialmente de los entrenudos inferiores. Esto es debido a que los entrenudos inferiores tienen que resistir el movimiento con más fuerza. El peso de los entrenudos superiores de los tallos más las hojas y las puntas en relación con el tallo (caña) afectará la resistencia de un cultivo al doblamiento. Entre más pesadas sean las partes superiores del tallo y mayor la distancia desde su centro de gravedad hasta la base del tallo, mayor es el movimiento de las fuerzas que actúan sobre los entrenudos inferiores y las raíces. Como apoyo a este argumento, se encontró que la resistencia al rompimiento del entrenudo más inferior y la relación de brotes por raíz eran los índices más adecuados de doblamiento. Además, las características morfológicas de la planta (estructurales) tales como la altura de la planta, el espesor de las paredes, y la lignificación de las paredes celulares pueden afectar la habilidad de la planta para resistir una fuerza lateral.

El doblamiento severo es muy costoso debido a sus efectos sobre la formación del grano y los problemas y pérdidas asociadas con la cosecha. Toma aproximadamente dos veces más tiempo cosechar un cultivo doblado que uno que permanece derecho. El crecimiento secundario junto con un cultivo aplanado, hacen muy difícil el proceso de la cosecha y pueden conducir por lo tanto a una pobre calidad del grano. La pérdida de productividad proviene de un pobre llenado del grano, pérdida de las puntas y daño provocado por los pájaros. Las pérdidas de productividad son más severas cuando un cultivo se dobla durante los diez días siguientes a la aparición de la punta. Las pérdidas de productividad en esta etapa estarán en el rango entre un 15% y un 40%. El doblamiento que se presenta después de la maduración de la planta no afectará la productividad pero puede reducir la cantidad de grano cosechable. Por ejemplo, cuando se produce doblamiento después de que madura la planta, puede ocurrir quebramiento del cuello y la pérdida completa de la punta; esto conduce a menudo a pérdidas severas de la cosecha. En estos casos, los agricultores que combinan directamente su grano probablemente incurrirán en pérdidas mayores que aquellos que lo envuelven. Por lo tanto, es deseable identificar los genes expresados en las plantas resistentes al doblamiento que tienen la capacidad de conferir resistencia al doblamiento a la planta que los hospeda y a otras especies de plantas.

Aunque se ha caracterizado algunos genes que están involucrados en las respuestas al estrés en las plantas, la caracterización y clonación de los genes de las plantas que confieren tolerancia al estrés sigue siendo muy incompleta y fragmentada. Por ejemplo, ciertos estudios han identificado que el estrés por sequía y salinidad en algunas plantas puede ser debido a efectos aditivos de los genes, en contraste con otra investigación que indica que genes específicos son activados en formar transcripcional en tejidos vegetativos de plantas bajo condiciones de estrés osmótico. Aunque generalmente se asume que proteínas inducidas por estrés cumplen un papel en la tolerancia, aún no se cuenta con evidencia directa, y se desconocen las funciones de muchos genes sensibles al estrés.

Por lo tanto, existe la necesidad de identificar los genes expresados en las plantas tolerantes al estrés que tienen la capacidad de conferir tolerancia al estrés a la planta que los hospeda y a otras especies de plantas. Las plantas tolerantes al estrés recientemente generadas tendrán muchas ventajas, tales como el incremento en el rango del cual las plantas de cultivo pueden ser cultivadas, por ejemplo, disminuyendo los requerimientos de agua de una especie de planta.

#### Resumen de la invención

La presente invención se define por medio del conjunto anexo de reivindicaciones.

Esta invención satisface en parte la necesidad de identificar factores de transcripción únicos y nuevos capaces de conferir tolerancia al estrés a las plantas por sobreexpresión. La presente invención proporciona una célula de una planta transgénica transformada por medio de un Factor de Transcripción. Un ácido nucleico que codifica una Proteína Relacionada con el Estrés (TFSRP) como la caracterizada en la SEQ ID NO: 11, en donde la expresión de la secuencia de ácido nucleico en la célula de la planta resulta en una mayor tolerancia al estrés ambiental comprada con una variedad de tipo silvestre de la célula de la planta. Esto es, se describen aquí los factores de transcripción 1) Cierre de Leucina-2 (LZ-2); 2) Cierre de Leucina-3 (LZ-3); 3) Factor-2 de enlazamiento de ADN

(DBF-2) y 4) Factor-3 de enlazamiento de ADN (DBF-3) de *Physcomitrella patens*; 5) Factor-1 de Enlazamiento de ADN de *Brassica napus* (BnDBF-1) de *Brassica napus*; y 6) Factor-1 de Enlazamiento de ADN de *Oryza sativa* (OsDBF-1) y 7) Factor-2 de Enlazamiento de ADN de *Oryza sativa* (OsDBF-2) de *Oryza sativa*. De acuerdo con la reivindicación 1, la TFSRP y el ácido nucleico que la codifica son de *Physcomitrella patens*.

5 La invención proporciona en algunas modalidades que la TFSRP y el ácido nucleico que la codifica sean aquellos encontrados en miembros del género *Physcomitrella*. La invención prevé que el estrés ambiental pueda ser de alta salinidad, sequía y baja temperatura. En modalidades preferidas, el estrés ambiental es sequía.

10 Se divulga además una semilla producida por una planta transgénica transformada por un ácido nucleico que codifica una TFSRP, en donde la planta es una línea genéticamente pura para mayor tolerancia al estrés ambiental comparada con una variedad de tipo silvestre de la planta. Se divulga además una semilla producida por una planta transgénica que expresa y/o reprime una TFSRP, en donde la planta es una línea genéticamente pura para mayor tolerancia al estrés ambiental comparada con una variedad de tipo silvestre de la planta.

15 También se hace referencia a un producto agrícola producido, por cualquiera de las plantas transgénicas, partes de la planta o semillas descritas más adelante. También se divulga una TFSRP aislada como se describe más adelante. Se divulga adicionalmente un ácido nucleico aislado que codifica una TFSRP, en donde el ácido nucleico que codifica una TFSRP codifica para una TFSRP como se describen más adelante.

20 La invención proporciona además un vector aislado de expresión recombinante que contiene un ácido nucleico que codifica una TFSRP como se describe más adelante, en donde la expresión del vector en una célula huésped resulta en una mayor tolerancia al estrés ambiental seleccionado de uno o más del grupo que consiste de alta salinidad, sequía y baja temperatura comparado con una variedad de tipo silvestre de la célula huésped. La invención dada a conocer proporciona además una célula huésped que contiene al vector y una planta que contiene la célula huésped.

25 La invención proporciona además un método para producir una planta transgénica con un ácido nucleico que codifica una TFSRP como se define en la reivindicación 10, en donde la expresión del ácido nucleico en la planta resulta en una mayor tolerancia al estrés ambiental seleccionado de uno más del grupo que consiste de alta salinidad, sequía y baja temperatura comparado con una variedad de tipo silvestre de la planta que comprende: (a) la transformación de una célula de una planta con un vector de expresión que contiene al ácido nucleico que codifica una TFSRP, y (b) la generación a partir de la célula de la planta de una planta transgénica con una mayor tolerancia al estrés ambiental seleccionado de uno o más del grupo que consiste de alta salinidad, sequía y baja temperatura comparado con una variedad de tipo silvestre de la planta.

35 También se describe un método para producir una planta transgénica que tiene una mayor tolerancia al estrés ambiental comparado con una variedad de tipo silvestre de la planta que comprende la represión de la expresión de una TFSRP en la planta. La expresión de la TFSRP puede ser reprimida en la planta por medio de la introducción de un ácido nucleico antisentido para TFSRP. El ácido nucleico antisentido para TFSRP puede contener nucleótidos modificados para incrementar su estabilidad. La TFSRP y el ácido nucleico que codifica TFSRP pueden ser como se describe más adelante.

40 Se describe adicionalmente un método para identificar una nueva TFSRP, que comprende (a) elevar una respuesta a un anticuerpo específico para una TFSRP, o un fragmento de la misma, como se describe más adelante; (b) seleccionar material de TFSRP putativa con el anticuerpo, en donde el enlazamiento específico del anticuerpo con el material indica la presencia de una TFSRP potencialmente nueva; e (c) identificar a partir del material enlazado una nueva TFSRP en comparación con TFSRP conocida. Alternativamente, se puede utilizar hibridación con sondas de ácido nucleico como se describe más abajo para identificar nuevos ácidos nucleicos para TFSRP.

45 También se describen métodos para modificar la tolerancia al estrés de una planta que comprenden, la modificación de la expresión de una TFSRP en la planta, en donde la TFSRP es como se describe más adelante. Este método puede ser llevado a cabo de tal manera que se incremente o se disminuya la tolerancia al estrés. Preferiblemente, se incrementa la tolerancia al estrés en una planta a través del incremento en la expresión de una TFSRP.

Se describen métodos adicionales para incrementar la resistencia de una planta al doblamiento que comprenden, la transformación de una célula de una planta con un casete de expresión que contiene un ácido nucleico para TFSRP y la generación de una planta a partir de la célula de la planta.

50 Breve descripción del dibujo

La Figura 1 muestra un diagrama del vector de expresión de una planta pBPSJH001 que contiene al súper promotor que dirige la expresión del ácido nucleico que codifica para TFSRP ("Gen Deseado"). Los componentes son: el gen

de resistencia aacCI (Hajdukiewicz et al., 1994, Plant Mol. Biol. 25: 989 - 94), el promotor NOS (Becker et al., 1996, Plant Mol. Biol. 20: 1195 - 97), el terminador g7T (Becker et al., 1992, ver más arriba), y el terminador NOSpA (Jefferson et al., 1987, EMBO J. 6: 3901 - 7).

#### Descripción detallada de la invención

5 La presente invención se relaciona con un nuevo género de las TFSRP y los ácidos nucleicos que codifican la TFSRP que son importantes para la modulación de la respuesta de una planta a un estrés ambiental. Más particularmente, la sobreexpresión de estos ácidos nucleicos los que codifican TFSRP en una planta resulta en la mayor tolerancia de la planta a un estrés ambiental.

10 La presente invención se relaciona con una célula de una planta transgénica transformada por medio de un ácido nucleico que codifica para TFSRP, en donde la expresión de la secuencia de ácido nucleico en la célula de la planta resulta en una mayor tolerancia al estrés ambiental comparado con una variedad de tipo silvestre de la célula de la planta. La invención se relaciona además con partes de una planta transgénica y con plantas transgénicas que contienen las células de la planta descritas aquí.

15 Las plantas transgénicas y las partes de la planta tienen mayor tolerancia al estrés ambiental comparadas con una variedad de tipo silvestre de la planta o parte de la planta. Las partes de la planta incluyen, pero no se limitan a, tallos, raíces, óvulos, estambres, hojas, embriones, regiones meristemáticas, tejido de callo, gametofitos, esporofitos, polen, microesporas, y similares. También se proporcionan semilla de la planta producida por una planta transgénica transformada por medio de un ácido nucleico que codifica para TFSRP, en donde la semilla contiene al ácido nucleico que codifica para TFSRP, y en donde la planta es de una línea genéticamente pura para mayor tolerancia al estrés ambiental seleccionado de uno o más del grupo de alta salinidad, sequía y baja temperatura comparado con una variedad de tipo silvestre de la planta. La invención provee además una semilla producida por una planta transgénica que expresa una TFSRP, en donde la semilla contiene la TFSRP, y en donde la planta es una línea para incrementar la tolerancia al estrés ambiental seleccionado de uno o más del grupo de alta salinidad, sequía y baja temperatura comparado con una variedad de tipo silvestre de la planta. Se describe además un producto agrícola producido por cualquiera de las plantas transgénicas descritas más adelante, partes de la planta, y semillas de la planta. Los productos agrícolas incluyen, pero no se limitan a, extractos de planta, proteínas, aminoácidos, carbohidratos, grasas, aceites, polímeros, vitaminas, y similares.

20 Como se lo utiliza aquí, el término "variedad" se refiere a un grupo de plantas dentro de una especie que comparten caracteres constantes que los separan de la forma típica y de otras variedades posibles dentro de esa especie. Aunque posee al menos un rasgo distintivo, una variedad se caracteriza también por algunas variaciones entre individuos dentro de la variedad, con base principalmente en la segregación mendeliana de rasgos entre la descendencia de generaciones sucesivas. Una variedad es considerada una "línea genéticamente pura" para un rasgo particular si es genéticamente homocigota para ese rasgo en la medida en que, cuando la variedad de la línea genéticamente pura es autopolinizada, no se observa una cantidad significativa de segregación independiente del rasgo entre la descendencia. En la presente invención, el rasgo surge de la expresión transgénica de una o más secuencias de ADN introducidas en una variedad de la planta.

30 Aquí se describe por primera vez que las TFSRP de *Physcomitrella patens*, LZ-2, LZ-3, DBF-2, y DBF-3; la TFSRP de *Brassica napus*, BnDBF-1; y las TFSRP de *Oryza sativa*, OsDBF-1y OsDBF-2, son útiles para incrementar la tolerancia de una planta al estrés ambiental. Como se lo utiliza aquí, el término polipéptido se refiere a una cadena de al menos cuatro aminoácidos unidos por medio de enlaces peptídicos. La cadena puede ser lineal, ramificada, circular o combinaciones de las mismas. De acuerdo con la presente invención la TFSRP es una proteína del Factor-3 de Enlazamiento de ADN de *Physcomitrella patens* (DBF-3) como se define en la SEQ ID NO: 12. También se describen las TFSRP aisladas seleccionadas del grupo que consiste de LZ-2, LZ-3, DBF-2, DBF-3, BnDBF-1, OsDBF-1, y OsDBF-2, y homólogos de las mismas. También se describen TFSRP de: 1) una proteína de Cierre de Leucina-2 de *Physcomitrella patens* (LZ-2) como se define en la SEQ ID NO: 3; 2) una proteína de Cierre de Leucina-3 de *Physcomitrella patens* (LZ-3) como se define en la SEQ ID NO: 6; 3) una proteína del Factor-2 de Enlazamiento de ADN de *Physcomitrella patens* (DBF-2) como se define en la SEQ ID NO: 9; 4) un Factor-1 de Enlazamiento de ADN de *Brassica napus* (BnDBF-1) como se define en la SEQ ID NO: 14, 6) un Factor-1 de Enlazamiento de ADN de *Oryza sativa* (OsDBF-1) como se define en la SEQ ID NO: 16, y 7) un Factor-2 de Enlazamiento de ADN de *Oryza sativa* (OsDBF-2) como se define en la SEQ ID NO: 18, y homólogos y ortólogos de las mismas. Los homólogos y ortólogos de las secuencias de aminoácidos se definen más adelante.

40 Las TFSRP de la presente invención se producen preferiblemente por medio de técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, se clona una molécula de ácido nucleico que codifica al polipéptido en un vector de expresión (como se describe más adelante), se introduce el vector de expresión en una célula huésped (como se describe más adelante), y se expresa la TFSRP en la célula huésped. Se puede aislar luego la TFSRP de las células por medio de un esquema apropiado de purificación utilizando técnicas estándar de purificación de polipéptidos. Para los propósitos de la invención, el término "polinucleótido recombinante" se refiere a un polinucleótido que ha sido

alterado, reordenado, o modificado por medio de ingeniería genética. Los ejemplos incluyen a cualquier polinucleótido clonado, y polinucleótidos que están enlazados o únicos a secuencias heterólogas. El término "recombinante" no se refiere a alteraciones a polinucleótidos que resulten de eventos de origen natural, tales como mutaciones espontáneas. En forma alternativa a la expresión recombinante, un polipéptido TFSRP, o un péptido del mismo, pueden ser sintetizados químicamente utilizando técnicas estándar de síntesis de péptidos. Además, se puede aislar una TFSRP nativa de las células (por ejemplo, de *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, u *Oryza sativa*), por ejemplo utilizando un anticuerpo anti-TFSRP, que puede ser producido por medio de técnicas estándar utilizando una TFSRP o un fragmento de la misma.

La invención provee además un ácido nucleico aislado que codifica una TFSRP, es decir una proteína del Factor-3 de Enlazamiento de ADN de *Physcomitrella patens* (DBF-3) como la definida en la SEQ ID NO: 11. Se describe además ácido nucleico que codifica para TFSRP seleccionado de 1) un ácido nucleico de Cierre de Leucina-2 de *Physcomitrella patens* (LZ-2) como se define en la SEQ ID NO: 2; 2) un ácido nucleico de Cierre de Leucina-3 de *Physcomitrella patens* (LZ-3) como se define en la SEQ ID NO: 5; 3) un ácido nucleico del Factor-2 de Enlazamiento de ADN de *Physcomitrella patens* (DBF-2) como se define en la SEQ ID NO: 8; 4) un ácido nucleico del Factor-1 de Enlazamiento de ADN de *Brassica napus* (BnDBF-1) como se define en la SEQ ID NO: 13, 6) un ácido nucleico del Factor-1 de Enlazamiento de ADN de *Oryza sativa* (OsDBF-1) como se define en la SEQ ID NO: 15, y 7) un ácido nucleico del Factor-2 de Enlazamiento de ADN de *Oryza sativa* (OsDBF-2) como se define en la SEQ ID NO: 17, y homólogos y ortólogos de los mismos. Los homólogos y ortólogos de las secuencias de nucleótidos se definen más adelante.

De acuerdo con la reivindicación 1 el ácido nucleico y el polipéptido son de una planta de *Physcomitrella patens* (*P. patens*).

Como se lo utiliza aquí, el término "estrés ambiental" se refiere a condiciones por debajo del óptimo asociadas con alta salinidad, sequía y baja temperatura o combinaciones de las mismas. El estrés ambiental se puede seleccionar de uno o más del grupo que consiste de alta salinidad, sequía, o baja temperatura, o combinaciones de las mismas, y en particular, se pueden seleccionar de uno o más del grupo que consiste de alta salinidad, bajo contenido de agua, o baja temperatura.

Como se lo utiliza aquí también, el término "ácido nucleico" y polinucleótido" se refieren a ARN o ADN que sea lineal o ramificado, monocatenario o bicatenario, o un híbrido de los mismos. El término también abarca híbridos de ARN/ADN. Estos términos también abarcan una secuencia no traducida localizada en ambos extremos 3' y 5' de la región de codificación del gen: aproximadamente al menos 1000 nucleótidos secuencia arriba del extremo 5' de la región de codificación y aproximadamente al menos 200 nucleótidos secuencia abajo del extremo 3' de la región de codificación del gen. Se pueden utilizar también bases menos comunes, tales como inosina, 5-metilcitosina, 6-metiladenina, hipoxantina y otras para el apareamiento antisentido de dsARN y ribozima. Por ejemplo, se ha demostrado que polinucleótidos que contienen análogos de propino C-5 de uridina y citidina enlazan ARN con gran afinidad y para ser potentes inhibidores antisentido de expresión génica. También pueden hacerse en otras modificaciones, tales como la modificación de la columna vertebral del fosfodiéster, o la 2'-hidroxi en el grupo del azúcar ribosa del ARN. Los polinucleótidos antisentido y los ribozimas pueden consistir enteramente de ribonucleótidos, o pueden contener ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos mezclados. Los polinucleótidos pueden ser producidos por cualquier medio, incluyendo preparaciones genómicas, preparaciones de ADNc, síntesis *in vitro*, RT-PCR, y transcripción *in vitro* o *in vivo*.

Una molécula "aislada" de ácido nucleico es una que está sustancialmente separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico (es decir, secuencias que codifican otros polipéptidos). Preferiblemente, un ácido nucleico "aislado" está libre de algunas de las secuencias que flanquean naturalmente al ácido nucleico (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en su replicón de origen natural. Por ejemplo, un ácido nucleico clonado es considerado aislado. En diferentes modalidades, la molécula aislada de ácido nucleico para TFSRP puede contener aproximadamente menos de 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb, ó 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean naturalmente la molécula de ácido nucleico en ADN genómico de la célula a partir de la cual se deriva el ácido nucleico (por ejemplo, una célula de *Physcomitrella patens*, una célula de *Brassica napus*, o una célula de *Oryza sativa*). Un ácido nucleico es considerado también aislado si ha sido alterado por medio de intervención humana, o colocado en un sitio o localización que no sea su sitio natural, o si es introducido en una célula por medio de agroinfección. Además, una molécula "aislada" de ácido nucleico, tal como una molécula de ADNc, puede estar libre de algo del otro material celular con el cual se encuentra naturalmente asociado, o medio de cultivo cuando es producido por medio de técnicas recombinantes, o precursores químicos u otros compuestos químicos cuando se lo sintetiza químicamente.

Específicamente excluidos de la definición de "ácidos nucleicos aislados" están: cromosomas de origen natural (tales como extensiones del cromosoma), bibliotecas del cromosoma artificial, bibliotecas genómicas, y bibliotecas de ADNc que existen ya sea como una preparación de ácido nucleico *in vitro* o como una preparación de células huésped transfectadas/transformadas, en donde las células huésped son ya sea una preparación heterogénea *in*

*in vitro* o sembrada en placa como una población heterogénea de colonias individuales. También se excluyen específicamente las bibliotecas anteriores en donde un ácido nucleico especificado constituye menos del 5% del número de insertos de ácido nucleico en las moléculas del vector. Se excluyen específicamente además el ADN genómico de células completas o preparaciones de ARN de células completas (incluidas preparaciones de células completas que son cortadas mecánicamente o digeridas enzimáticamente). Incluso se excluyen específicamente además las preparaciones de células completas encontradas ya sea como una preparación *in vitro* o como una mezcla heterogénea separada por electroforesis en donde el ácido nucleico no ha sido separado adicionalmente de los ácidos nucleicos heterólogos en el medio de electroforesis (por ejemplo, separando adicionalmente por medio de escisión una única banda de una población de bandas heterogéneas en un gel de agarosa o transferencia sobre nylon).

Una molécula de ácido nucleico de la presente invención, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 11 o una porción de la misma, puede ser aislada utilizando técnicas estándar de biología molecular y la información de la secuencia suministrada aquí. Por ejemplo, se puede aislar ADNc para TFSRP de *P. patens* a partir de una biblioteca de *P. patens* utilizando toda o una porción de una de las secuencias de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, y SEQ ID NO: 10. Además, se puede aislar una molécula de ácido nucleico que abarca toda o una porción de una de las secuencias de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 17 por medio de la reacción en cadena de la polimerasa utilizando iniciadores oligonucleótidos diseñados con base en esta secuencia. Por ejemplo, se puede aislar ARNm de células de planta (por ejemplo, por medio del procedimiento de extracción de guanidinio-tiocianato de Chirgwin et al., 1979, *Biochemistry* 18: 5294 - 5299), y se puede preparar ADNc utilizando transcriptasa reversa (por ejemplo, transcriptasa reversa Moloney MLV, disponible de Gibco/BRL, Bethesda, MD; o transcriptasa reversa AMV, disponible de Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL). Se pueden diseñar iniciadores sintéticos de oligonucleótido para amplificación por reacción en cadena de la polimerasa con base en una de las secuencias de oligonucleótido mostrada en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, y SEQ ID NO: 17. Se puede amplificar una molécula de ácido nucleico de la invención utilizando ADNc o, alternativamente, ADN genómico, como plantilla y iniciadores apropiados de oligonucleótido de acuerdo con técnicas estándar de amplificación por PCR. La molécula de ácido nucleico así amplificada puede ser clonada en un vector apropiado y caracterizara por medio de análisis de la secuencia de ADN. Adicionalmente, se pueden preparar oligonucleótidos correspondientes a una secuencia de nucleótidos para TFSRP por medio de técnicas estándar de síntesis, por ejemplo, utilizando un sintetizador automatizado de ADN.

En una modalidad preferida, una molécula aislada de ácido nucleico de la invención incluye una de las secuencias de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 11. Estos ADNc pueden incluir secuencias que codifican las TFSRP, (es decir, la "región de codificación"), así como secuencias 5' no traducidas y secuencias 3' no traducidas. Debe entenderse que la SEQ ID NO: 11 incluye tanto regiones de codificación como regiones 5' y 3' no traducidas. Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico pueden incluir únicamente la región de codificación de cualquiera de las secuencias en la SEQ ID NO: 11. Para la secuencia SEQ ID NO: 11, las regiones de codificación son las siguientes: la región de codificación del DBF-3 incluyen los nucleótidos 14 - 637 de la SEQ ID NO: 11. Por lo tanto, la presente invención incluye los ácidos nucleico para TFSRP que contienen los nucleótidos 14 - 637 de la SEQ ID NO: 11. La presente invención también incluye los ácidos nucleico que codifican TFSRP que codifican las TFSRP como se describe aquí.

Además, se describen moléculas de ácido nucleico que pueden incluir una porción de la región de codificación de una de las secuencias en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 17, por ejemplo, un fragmento que puede ser utilizado como sonda o iniciador o un fragmento que codifica una porción biológicamente activa de una TFSRP. Las secuencias de nucleótidos determinadas a partir de la clonación de los genes para TFSRP de *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, y *Oryza sativa* permiten la generación de sondas e iniciadores diseñados para uso en la identificación y/o clonación de homólogos de TFSRP en otros tipos de células y organismos, así como homólogos de TFSRP de otros musgos y especies relacionadas. La porción de la región de codificación puede codificar también un fragmento biológicamente activo de una TFSRP.

Como se lo utiliza aquí, el término "porción biológicamente activa de una TFSRP pretende incluir una porción, por ejemplo, un dominio/motivo, de una TFSRP que participa en la modulación de la tolerancia al estrés en una planta, y más preferiblemente, tolerancia a la sequía o tolerancia a la sal. Para los propósitos de la presente invención, modulación de la tolerancia al estrés se requiere al menos a un incremento o disminución del 10% en la tolerancia al estrés de una planta transgénica que comprende un casete de expresión de TFSRP (o un vector de expresión) comparado con la tolerancia al estrés de una planta de control no transgénica. Los métodos para cuantificar la tolerancia al estrés se suministran al menos en el Ejemplo 7 más adelante. En una modalidad preferida, la porción biológicamente activa de una TFSRP incrementa la tolerancia de una planta a un estrés ambiental.

Las porciones biológicamente activas de una TFSRP incluyen péptidos que contienen secuencias de aminoácidos derivadas de la secuencia de aminoácidos de una TFSRP, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 18, o la

secuencia de aminoácidos de un polipéptido idéntico a una TFSRP, que incluye menos aminoácidos de una TFSRP de longitud completa o el polipéptido de longitud completa que es idéntico a una TFSRP, y exhibe al menos una actividad de una TFSRP. Típicamente, las porciones biológicamente activas (por ejemplo, péptidos que tienen, por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100, o más aminoácidos de longitud) contienen un dominio un motivo con al menos una actividad de una TFSRP. Además, otras porciones biológicamente activas en las cuales otras regiones del polipéptido son suprimidas, pueden ser preparadas por medio de técnicas recombinantes y evaluadas por una o más de las actividades descritas aquí. Preferiblemente, las porciones biológicamente activas de una TFSRP incluyen uno o más dominios/motivos seleccionados o porciones de los mismos que tienen una actividad biológica tal como enlazamiento de ADN. Los dominios de enlazamiento del ADN de los polipéptidos abarcan los siguientes aminoácidos: el dominio de enlazamiento del ADN del LZ-2 abarca los aminoácidos 280 - 340 de la SEQ ID NO: 3; el dominio de enlazamiento del ADN del LZ-3 abarca los aminoácidos 254 - 318 de la SEQ ID NO: 6; el dominio de enlazamiento del ADN del DBF-2 abarca los aminoácidos 51 - 121 y 253 - 322 de la SEQ ID NO: 9; y el dominio de enlazamiento del ADN del DBF-3 abarca los aminoácidos 79 - 198 de la SEQ ID NO: 12. Por lo tanto, la presente invención incluye las TFSRP que incluyen los aminoácidos 79 - 198 de la SEQ ID NO: 12.

Como se lo utiliza aquí, un "polipéptido quimérico" o "polipéptido de fusión" de la TFSRP incluye una TFSRP operativamente enlazada a un polipéptido que no es TFSRP. Un TFSRP se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a una TFSRP, mientras que un polipéptido que no es TFSRP se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un polipéptido que no es sustancialmente idéntico a el TFSRP, por ejemplo, un polipéptido que es diferente del TFSRP y se deriva del mismo organismo o de un organismo diferente. Como se lo utiliza aquí con relación al polipéptido de fusión, el término "operativamente enlazado" tiene el propósito de indicar que el polipéptido TFSRP y el polipéptido que no es TFSRP están fusionados entre sí de tal manera que ambas secuencias cumplen con la función propuesta atribuida a la secuencia utilizada. El polipéptido que no es TFSRP puede ser fusionado al terminal o al terminal C del TFSRP. Por ejemplo, en una modalidad, el polipéptido de fusión es un polipéptido de la fusión GST-TFSRP en la cual las secuencias de TFSRP se fusionan con el terminal C de las secuencias de GST. Tales polipéptidos de fusión pueden facilitar la purificación de los TFSRP recombinantes. En otra modalidad, el polipéptido de fusión es un TFSRP que contiene una secuencia señal heteróloga en su terminal N. En ciertas células huésped (por ejemplo, células huésped de mamífero), se puede incrementar la expresión y/o la secreción de un TFSRP a través del uso de una secuencia señal heteróloga.

Preferiblemente, se produce un TFSRP quimérico o un polipéptido de fusión por medio de técnicas estándar de ADN recombinante. Por ejemplo, se ligan en el marco fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias de polipéptidos de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo por medio del empleo de terminales de extremo romo o de extremo escalonado para ligación, digestión con enzima de restricción para proveer terminales apropiados, rellenando de extremos cohesivos según sea conveniente, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar una unión indeseable y ligación enzimática. En otra modalidad, el gen de fusión puede ser sintetizado por medio de técnicas convencionales incluidos sintetizadores automatizados de ADN. Alternativamente, se puede llevar a cabo amplificación por PCR de fragmentos de genes utilizando iniciadores ancla que dan lugar a voladizos complementarios entre dos fragmentos consecutivos de genes que pueden ser posteriormente hibridados y amplificados nuevamente para generar una secuencia génica quimérica. Ver, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992. Además, se encuentran comercialmente disponibles muchos vectores de expresión que ya codifican una estructura funcional de fusión (por ejemplo, un polipéptido GST). Un ácido nucleico que codifica para TFSRP puede ser clonado en un vector de expresión tal de manera que la estructura funcional de fusión se enlaza en el marco al TFSRP.

Además de fragmentos y polipéptidos de fusión de los TFSRP descritos aquí, la presente descripción incluye homólogos y análogos de los TFSRP de origen natural y ácidos nucleico que codifican TFSRP en una planta. Los "homólogos" se definen aquí como dos ácidos nucleicos o polipéptidos que tienen secuencias similares, o sustancialmente idénticas, secuencias de nucleótidos o de aminoácidos, respectivamente. Los homólogos incluyen variantes alélicas, ortólogos, parálogos, agonistas, y antagonistas de los TFSRP como se define aquí más adelante. El término "homólogo" abarca además moléculas de ácido nucleico que difieren de una de las secuencias de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, y SEQ ID NO: 17 (y porciones de las mismas) decidido a la degeneración del código genético y por lo tanto codifican al mismo TFSRP que aquel codificado por las secuencias de nucleótidos mostradas en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 17. Como se lo utiliza aquí un TFSRP de "origen natural" se refiere a una secuencia de aminoácidos de TFSRP que se presenta en la naturaleza. Preferiblemente, un TFSRP de origen natural contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, y SEQ ID NO: 18.

Un agonista del TFSRP puede retener sustancialmente las mismas, o un subconjunto, de las actividades biológicas del TFSRP. Un antagonista del TFSRP puede inhibir una o más de las actividades de la forma de origen natural del TFSRP. Por ejemplo, el agonista de TFSRP puede enlazarse competitivamente con un miembro secuencia arriba o secuencia abajo de la cascada metabólica componente de la membrana celular que incluye al TFSRP, o se enlaza

con un TFSRP que media el transporte de compuestos a través de tales membranas, lo que impide que se presente una translocación.

Las moléculas de ácido nucleico correspondientes a variantes alélicas naturales y análogos, ortólogos y parálogos de un ADNc para TFSRP pueden ser aisladas con base en su identidad con los ácidos nucleicos para TFSRP de *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, u *Oryza sativa* descritos aquí utilizando los ADNc para TFSRP, o una porción de los mismos, como sonda de hibridación de acuerdo con técnicas estándar de hibridación bajo condiciones rigurosas de hibridación.

Los homólogos del TFSRP pueden ser identificados por medio de selección de bibliotecas combinatorias de mutantes, por ejemplo, mutantes de truncamiento, del TFSRP para actividad agonista o antagonista de TFSRP. En una modalidad, se genera una biblioteca abigarrada de variantes de TFSRP por medio de mutagénesis combinatorial a nivel del ácido nucleico y es codificada por una biblioteca génica abigarrada. Se puede producir una biblioteca abigarrada de variantes de TFSRP, por ejemplo, por medio de ligación enzimática de una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en las secuencias génicas de tal manera que un conjunto degenerado de secuencias potenciales de TFSRP pueda ser expresada como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de polipéptidos de fusión mayores (por ejemplo, para despliegue en fagos) que contienen el conjunto de secuencias de TFSRP allí dentro. Existen una variedad de métodos que pueden ser utilizados para producir bibliotecas de homólogos potenciales de TFSRP a partir de una secuencia degenerada de oligonucleótidos. La síntesis química de una secuencia génica degenerada puede ser llevada a cabo en un sintetizador automatizado de ADN, y se liga luego el gen sintético en un vector de expresión apropiado. El uso de un conjunto degenerado de genes permite suministrar, en una mezcla, todas las secuencias que codifican el conjunto deseado de secuencias potenciales de TFSRP. Los métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados son conocidos en el arte. Ver, por ejemplo, Narang, S. A., 1983, *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al., 1984, *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al., 1984, *Science* 198:1056; Ike et al., 1983, *Nucleic Acid Res.* 11:477.

Además, se pueden utilizar bibliotecas de fragmentos de las regiones de codificación de TFSRP para generar una población abigarrada de fragmentos de TFSRP para detección y posterior selección de homólogos de un TFSRP. En una modalidad, se puede generar una biblioteca de fragmentos de secuencias de codificación por medio del tratamiento de un fragmento bicatenario de la PCR de una secuencia de codificación de TFSRP con una nucleasa bajo condiciones en donde se presenta la formación de una muesca únicamente aproximadamente una vez por molécula, desnaturalizando el ADN bicatenario, renaturalizando el ADN para formar ADN bicatenario, que puede incluir pares sentido/antisentido de diferentes productos amellados, removiendo porciones monocatenarias de dúplex reformados por medio de tratamiento con nucleasa S1, y ligando la biblioteca del fragmento resultante en un vector de expresión. Por medio de este método, se puede derivar una biblioteca de expresión que codifica fragmentos internos, del terminal N y del terminal C de diferentes tamaños del TFSRP.

Se conocen diferentes técnicas en el arte para la selección de productos génicos de bibliotecas combinatoriales elaboradas por medio de mutaciones o truncamientos puntuales, y por selección de bibliotecas de ADNc para productos génicos que tienen una propiedad seleccionada. Tales técnicas son adaptables para sección rápida de las bibliotecas de genes generadas por medio de la mutagénesis combinatorial de homólogos de TFSRP. Las técnicas más ampliamente utilizadas, que son sensibles para el análisis de alto rendimiento, para selección de bibliotecas grandes de genes típicamente incluyen clonación de la biblioteca de genes en vectores de expresión replicables, transformando células apropiadas con la biblioteca resultante de vectores, y expresando los genes combinatoriales bajo condiciones en las cuales la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica al gen cuyo producto fue detectado. La mutagénesis recursiva de conjunto (REM), una nueva técnica que mejora la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, puede ser utilizada en combinación con los ensayos de selección para identificar homólogos de TFSRP (Arkin y Yourvan, 1992, *PNAS* 89: 7811 - 7815; Delgrave et al., 1993, *Polypeptide Engineering* 6(3): 327 - 331). Se pueden explotar los ensayos basados en células para analizar una biblioteca abigarrada de TFSRP, utilizando métodos bien conocidos en el arte. La presente descripción proporciona además un método para la identificación de un nuevo TFSRP, que comprende (a) elevar una respuesta de anticuerpos específicos a un TFSRP, o un fragmento del mismo, como se describe aquí; (b) seleccionar material putativo de TFSRP con el anticuerpo, en donde el enlazamiento específico del anticuerpo con el material indica la presencia de un TFSRP potencialmente nuevo; y (c) analizar el material enlazado en comparación con TFSRP conocido, para determinar su novedad.

Como se estableció anteriormente, la presente descripción se relaciona con los TFSRP y homólogos de los mismos. Para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de dos secuencias de aminoácidos (por ejemplo, una de las secuencias de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, y SEQ ID NO: 18 y una forma mutante de las mismas), se alinean las secuencias para propósitos de una comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir huecos en la secuencia de un polipéptido para alineación óptima con el otro polipéptido o ácido nucleico). Se comparan luego los residuos aminoácidos con las correspondientes posiciones de los aminoácidos. Cuando una posición en una secuencia (por ejemplo, una de las secuencias de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, y SEQ ID NO: 18) es ocupada

por el mismo residuo aminoácido que la posición correspondiente en la otra secuencia (por ejemplo, una forma mutante de la secuencia seleccionada del polipéptido de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, y SEQ ID NO: 18), entonces las moléculas son idénticas en esa posición. Se puede hacer el mismo tipo de comparación entre dos secuencias de ácidos nucleicos.

5 El porcentaje de identidad de secuencia entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, el porcentaje de identidad de secuencia = número de posiciones idénticas / número total de posiciones x 100). Preferiblemente, los homólogos aislados de aminoácidos incluidos en la presente invención son aproximadamente al menos 80 - 85%, 85 - 90% ó 90 - 95%, y lo más preferible aproximadamente al menos 96%, 97%, 98%, 99% o más, idénticos a una secuencia completa de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 12. El aún otra modalidad, los homólogos aislados de aminoácidos incluidos en la presente invención son aproximadamente al menos 80 - 85%, 85 - 90% ó 90 - 95%, y lo más preferible aproximadamente al menos 96%, 97%, 98%, 99% o más, idénticos a una secuencia completa de aminoácidos codificada por una secuencia completa de ácido nucleico como la mostrada en la SEQ ID NO: 11.

15 Se prefiere adicionalmente que el homólogo aislado del ácido nucleico de la invención codifique un TFSRP, o una porción del mismo, es decir al menos 76% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, y que actúe como un modulador de una respuesta al estrés ambiental en una planta.

20 Para los propósitos de la invención, el porcentaje de identidad de la secuencia entre dos secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos puede ser determinado utilizando el paquete de software Vector NTI 6.0 (PC) (InforMax, 7600 Wisconsin Ave., Bethesda, MD 20814). Se utilizan una penalización por abertura de hueco de 15 y una penalización por extensión de hueco de 6,66 para determinar el porcentaje de identidad de dos ácido nucleicos. Se utilizan una penalización por abertura de hueco de 10 y una penalización por extensión de hueco de 0,1 para determinar el porcentaje de identidad de dos polipéptidos. Todos los otros parámetros se establecen con los ajustes predeterminados. Para propósitos de una alineación múltiple (algoritmo Clustal W), la penalización por abertura de hueco es de 10, y la penalización por extensión de hueco es de 0,05 con una matriz blosum62. Debe entenderse que para los propósitos de determinar la identidad de la secuencia cuando se compara una secuencia de ADN con una secuencia de ARN, un nucleótido de timidina es equivalente a un nucleótido de uracilo.

30 Adicionalmente se describe un ácido nucleico aislado que contiene un polinucleótido que hibrida al polinucleótido de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 17 bajo condiciones rigurosas. Mas particularmente, una molécula aislada de ácido nucleico de la invención es al menos de 15 nucleótidos de longitud e hibrida bajo condiciones rigurosas a la molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 17. El ácido nucleico es al menos de 30, 50, 100, 250 o más nucleótidos de longitud. Preferiblemente, un homólogo aislado de ácido nucleico contiene una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo condiciones altamente rigurosas a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 17 y funciones como moduladora de la tolerancia al estrés en una planta. La sobreexpresión del homólogo aislado de ácido nucleico en una planta incrementa la tolerancia de la planta a un estrés ambiental. El homólogo aislado de ácido nucleico codifica un TFSRP que actúa como un factor de transcripción.

40 Como se lo utiliza aquí con relación a hibridación de ADN a ADN para transferencia, el término "condiciones rigurosas" se refiere a la hibridación durante la noche a 60°C en solución de Denhart 10X, SSC 6X, SDS al 0,5% y 100 mg/ml de ADN desnaturizado de esperma de salmón. Se lavan las transferencias secuencialmente a 62°C durante 30 minutos cada vez en SSC/SDS al 0,1% 3X, seguido por SSC/SDS al 0,1% 1X y finalmente SSC/SDS al 0,1% 0,1X. Como se lo utiliza aquí también, "condiciones altamente rigurosas" se refiere a hibridación durante la noche a 65°C en solución de Denhart 10X, SSC 6X, SDS al 0,5% y 100 mg/ml de ADN desnaturizado de esperma de salmón. Se lavan las transferencias secuencialmente a 65°C durante 30 minutos cada vez en SSC/SDS al 0,1% 3X, seguido por SSC/SDS al 0,1% 1X y finalmente SSC/SDS al 0,1% 0,1X. Los métodos para hibridaciones de ácido nucleico están descritos en Meinkoth y Wahl, 1984, Anal. Biochem. 138: 267 - 284; Ausubel et al. Eds., 1995, Current Protocols in Molecular Biology, Capítulo 2, Greene Publishing y Wiley-Interscience, New York; y Tijssen, 1993, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization with Nucleic Acid Probes, Parte I, Capítulo 2, Elsevier, New York. Preferiblemente, una molécula aislada de ácido nucleico hibrida bajo condiciones rigurosas o altamente rigurosas a la secuencia de la SEQ ID NO: 11 que corresponde a una molécula de ácido nucleico de origen natural. Como se lo utiliza aquí, una molécula de ácido nucleico de "origen natural" se refiere a una molécula de ARN o ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que se presenta en la naturaleza (por ejemplo, que codifica un polipéptido natural). En una modalidad, el ácido nucleico codifica un TFSRP de origen natural de *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, u *Oryza sativa*.

Utilizando los métodos anteriormente descritos, y otros conocidos por aquellos capacitados en el arte, alguien ordinariamente capacitado en el arte puede aislar homólogos de los TFSRP que contienen una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID

NO: 16, o SEQ ID NO: 18. Un subconjunto de estos homólogos es de variantes alélicas. Como se lo utiliza aquí, el término "variante alélica" se refiere a una secuencia de nucleótidos que contiene polimorfismos que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de un TFSRP y que existen dentro de una población natural (por ejemplo, una especie o variedad de una planta). Tales variaciones alélicas naturales pueden resultar típicamente en una varianza del 1 - 5% en un ácido nucleico para TFSRP. Las variantes alélicas pueden ser identificadas por medio de secuenciación de la secuencia de ácido nucleico de interés en una cantidad de plantas diferentes, que pueden ser fácilmente llevadas a cabo por medio del uso de sondas de hibridación para identificar al mismo locus genético para TFSRP en esas plantas.

Además, se pretende que moléculas de ácido nucleico que codifican los TFSRP de la misma o de otras especies tales como análogos, ortólogos y parálogos de TFSRP, estén dentro del alcance de la presente invención. Como se lo utiliza aquí, el término "análogos" se refiere a dos ácidos nucleicos que tienen la misma función o una función similar, pero que han evolucionado en forma separada en organismos no relacionados. Como se lo utiliza aquí, el término "ortólogos" se refiere a dos ácido nucleico de diferentes especies, pero que han evolucionado a partir de un gen ancestral común por especiación. Normalmente, los ortólogos codifican polipéptidos que tienen la misma función o funciones similares. Como se lo utiliza aquí también, el término " parálogos" se refiere a dos ácido nucleicos que están relacionados por medio de duplicación dentro de un genoma. Los parálogos usualmente tienen diferentes funciones, pero estas funciones pueden estar relacionadas (Tatusov, R. L. et al., 1997, Science 278 (5338): 631 - 637). Los análogos, ortólogos y parálogos de un TFSRP de origen natural pueden diferir del TFSRP de origen natural por medio de modificaciones posteriores a la traducción, por diferencias de la secuencia de aminoácidos, o por ambos. Las modificaciones posteriores a la traducción posteriores a la traducción incluyen derivatización química *in vivo* y *in vitro* de polipéptidos, por ejemplo, acetilación, carboxilación, fosforilación, o glicosilación, y tales modificaciones pueden presentarse durante la síntesis de polipéptidos o el procesamiento o después de tratamiento con enzimas modificadoras aisladas. En particular, los ortólogos de la invención generalmente exhibirán al menos 80 - 85%, más preferiblemente, 85 - 90% ó 90 - 95%, y lo más preferible 95%, 96%, 97%, 98% o incluso 99% de identidad o identidad de secuencia con todo o parte de una secuencia de aminoácidos de TFSRP de origen natural y exhibirá una función similar a una TFSRP. Preferiblemente, un ortólogo de TFSRP como el divulgado aquí funciona como un modulador de una respuesta al estrés ambiental en una planta y/o actúa como un factor de transcripción. Más preferiblemente, un ortólogo de TFSRP incrementa la tolerancia al estrés de una planta. Los ortólogos de TFSRP mantienen la habilidad para participar en el metabolismo de compuestos necesario para la construcción de membranas celulares en una planta, o en el transporte de moléculas a través de estas membranas.

Además de las variantes de origen natural de una secuencia de TFSRP que pueden existir en la población, el experto en la material se dará cuenta además que pueden introducirse cambios por medio de mutación en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 17, conduciendo por lo tanto a cambios en la secuencia de aminoácidos del TFSRP codificado, sin alterar la actividad funcional del TFSRP. Por ejemplo, las sustituciones de nucleótidos que conducen a sustituciones de aminoácidos en residuos aminoácidos "no esenciales" puede hacerse en una secuencia de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 17. Un residuo aminoácido "no esencial" es un residuo que puede ser alterado a partir de la secuencia de tipo silvestre de uno de los TFSRP sin alterar la actividad de dicho TFSRP, mientras que se requiere un residuo aminoácido "esencial" para la actividad de TFSRP. Otros residuos aminoácidos, sin embargo, (por ejemplo, aquellos que no están conservados o únicamente semiconservados en el dominio que tiene actividad de TFSRP) pueden no ser esenciales para la actividad y por lo tanto probablemente son sensibles a alteración sin alterar la actividad de TFSRP.

También se describen moléculas de ácido nucleico que codifican los TFSRP que contiene cambios en residuos aminoácidos que no son esenciales para la actividad de TFSRP. Tales TFSRP difieren en la secuencia de aminoácidos de una secuencia contenida en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 18 que aún retiene al menos una de las actividades de TFSRP descritas aquí. En una modalidad, la molécula aislada de ácido nucleico incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido, en donde el polipéptido incluye una secuencia de aminoácidos aproximadamente al menos 50% idéntica a una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 18. Preferiblemente, el polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico es aproximadamente al menos 50 - 60% idéntica a una de las secuencias de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 18, más preferiblemente aproximadamente al menos 60 - 70% idéntica a una de las secuencias de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 18, incluso más preferiblemente aproximadamente al menos 70 - 75%, 75 - 80%, 80 - 85%, 85 - 90%, 90 - 95% idéntica a una de las secuencias de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 18, y lo más preferible aproximadamente al menos 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a una de las secuencias de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 18. Los homólogos de TFSRP participan en la respuesta de tolerancia al estrés en una planta, o más particularmente, participan en la transcripción de un polipéptido involucrado en una respuesta de tolerancia al estrés en una planta, y/o actúa como un factor de transcripción.

Una molécula aislada de ácido nucleico que codifica un TFSRP que tiene identidad de secuencia con una secuencia de polipéptidos de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 18 puede ser creada por medio de la introducción de una o más sustituciones, adiciones o supresiones de nucleótidos en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 17, respectivamente, de tal manera que se introducen una o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos en el polipéptido codificado. Se pueden introducir mutaciones en una de las secuencias de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 17 por medio de técnicas estándar, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Preferiblemente, se hacen sustituciones conservadoras de aminoácidos en uno o más residuos aminoácidos no esenciales predichos. Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es una en la cual el residuo aminoácido es reemplazado con un residuo aminoácido que tiene una cadena lateral similar.

Las familias de residuos aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en el arte. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina), y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un residuo aminoácido no esencial predicho en un TFSRP es preferiblemente reemplazado con otro residuo aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Alternativamente, en otra modalidad, se pueden introducir mutaciones en forma aleatoria a lo largo de todo o parte de una secuencia que codifica para TFSRP, tal como por medio de mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden ser seleccionados por una actividad de TFSRP descrita aquí para identificar mutantes que retienen actividad de TFSRP. Después de la mutagénesis de una de las secuencias de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 17, el polipéptido codificado puede ser expresado en forma recombinante y la actividad del polipéptido puede ser determinada por medio del análisis de la tolerancia al estrés de una planta que expresa al polipéptido como se describe en el Ejemplo 7.

Adicionalmente, se pueden crear ácidos nucleico optimizados para TFSRP. Preferiblemente, un ácido nucleico optimizado para TFSRP codifica un TFSRP que enlaza con ADN, funciones como un factor de transcripción, y/o modula una tolerancia de la planta a un estrés ambiental, y más preferiblemente incrementa la tolerancia de la planta a un estrés ambiental por su sobreexpresión en la planta. Como se lo utiliza aquí, "optimizado" se refiere a un ácido nucleico que es modificado por ingeniería genética para incrementar su expresión en una planta o animal dado. Para proporcionar ácidos nucleicos optimizados de una planta para TFSRP, la secuencia de ADN del gen puede ser modificada para 1) incluir codones preferidos por medio de genes de la planta altamente expresados; 2) incluir un contenido de A+T en una composición base de nucleótidos a aquella sustancialmente encontrada en plantas; 3) formar una secuencia de iniciación de la planta, 4) eliminar secuencias que provoquen desestabilización, poliadenilación inapropiada, degradación y terminación de ARN, o aquella forma de horquillas de estructura secundaria o sitios de empalme de ARN. La mayor expresión de ácidos nucleicos para TFSRP en plantas puede ser lograda utilizando la frecuencia de distribución del uso del codón en plantas en general o una planta particular. Los métodos para optimizar la expresión de ácido nucleico en plantas pueden ser encontrados en EPA 0359472; EPA 0385962; Solicitud PCT No. WO 91/16432; Patente de los Estados Unidos No. 5.380.831; Patente de los Estados Unidos No. 5.436.391; Perlack et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 3324 - 3328; y Murray et al., 1989, Nucleic Acids Res. 17: 477 - 498.

Como se lo utiliza aquí, "frecuencia del uso de codones preferidos" se refiere a la preferencia exhibida por una célula huésped específica en el uso de codones de nucleótidos para especificar un aminoácido dado. Para determinar la frecuencia de uso de un codón particular en un gen, el número de ocurrencias en ese codón en el gen se divide por el número total de ocurrencias de todos los codones que especifican el mismo aminoácido en el gen. En forma similar, la frecuencia de uso de codones preferidos exhibida por una célula huésped puede ser calculada promediando la frecuencia de uso del codón preferido en un gran número de genes expresados por la célula huésped. Es preferible que este análisis se limite a genes que sean altamente expresados por la célula huésped. El porcentaje de desviación de la frecuencia del uso del codón preferido para un gen sintético a partir de aquel empleado por una célula huésped se calcula primero determinando el porcentaje de desviación de la frecuencia de uso de un solo codón de aquel de la célula huésped seguido por la obtención de la desviación promedio sobre todos los codones. Como se define aquí, este cálculo incluye codones únicos (es decir, ATG y TGG). En términos generales, la desviación promedio total del uso del codón de un gen optimizado de aquel de una célula huésped se calcula utilizando la ecuación  $1A = n = 1 \sum Z X_n - Y_n X_n$  veces  $100/Z$  donde  $X_n$  = frecuencia de uso para el codón  $n$  en la célula huésped;  $Y_n$  = frecuencia de uso para el codón  $n$  en el gen sintético;  $n$  representa un codón individual que especifica un aminoácido; y el número total de codones es  $Z$ . La desviación total de la frecuencia de uso del codón,  $A$ , para todos los aminoácidos debe ser preferiblemente ser aproximadamente menor al 25%, y más preferiblemente aproximadamente menor al 10%.

Por lo tanto, se puede optimizar un ácido nucleico para TFSRP de tal manera que su frecuencia de distribución del uso del codón se desvíe, preferiblemente, no más del 25% de aquel de los genes e la planta altamente expresados y, más preferiblemente, aproximadamente no más del 10%. Además, se tiene en cuenta el porcentaje del contenido de G+C de la tercera base degenerada (las monocotiledóneas parecen favorecer G+C en su posición, mientras que las dicotiledóneas no). También se reconoce que el nucleótido XCG (donde X es A, T, C, o G) es el codón menos preferido en dicotiledóneas mientras que se evita el codón XTA tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas. Los ácidos nucleicos optimizados para TFSRP también tienen preferiblemente índices de evitar al doblete CG y TA que se aproximan a aquellos de la planta huésped escogida (es decir, *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, u *Oryza sativa*). Más preferiblemente estos índices se desvían de aquel del huésped aproximadamente no más del 10 - 15%.

Además de las moléculas de ácido nucleico que codifican los TFSRP descritas anteriormente, se hace referencia a moléculas aisladas de ácido nucleico que son antisentido a las mismas. Se piensa que los polinucleótidos antisentido inhiben la expresión génica de un polinucleótido objetivo enlazando específicamente al polinucleótido objetivo e interfiriendo con la transcripción, el empalme, transporte, traducción, y/o la estabilidad del polinucleótido objetivo. En el estado del arte se describen métodos para dirigir el polinucleótido antisentido hacia el ADN cromosómico, hacia un transcripto primario de ARN, o hacia un ARNm procesado. Las regiones objetivo pueden incluir sitios de empalme, codones de inicio de la traducción, codones de terminación de la traducción, y otras secuencias dentro del marco de lectura abierto.

El término "antisentido", como se lo utiliza aquí, se refiere a un ácido nucleico que contienen un polinucleótido que es suficientemente complementario con toda o una porción de un gen, transcripto primario, o ARNm procesado, para interferir con la expresión del gen endógeno. Polinucleótidos "complementarios" son aquellos que son capaces de apareamiento de bases de acuerdo con las reglas estándar de complementariedad de Watson-Crick. Específicamente, las purinas se aparearán con pirimidinas para formar una combinación de guanina apareada con citosina (G:C) y adenina apareada ya sea con timina (A:T) en el caso del ADN, o adenina apareada con uracilo (A:U) en el caso del ARN. Se entiende que dos polinucleótidos pueden hibridarse entre sí incluso si no son completamente complementarios entre sí, con tal que cada uno tenga al menos una región que sea sustancialmente complementaria con la otra. El término "ácido nucleico antisentido" incluye casete de expresión de ARN monocatenario así como de ADN bicatenario que pueden ser transcritos para producir un ARN antisentido. Ácidos nucleicos antisentido "activos" son moléculas de ARN antisentido que son capaces de hibridarse selectivamente con un transcripto primario o ARNm que codifica un polipéptido que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 18.

El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a una cadena entera que codifica TFSRP, o únicamente a una porción de la misma. Una molécula de ácido nucleico antisentido puede ser antisentido con una "región de codificación" de la cadena de codificación de una secuencia de nucleótidos que codifica un TFSRP. El término "región de codificación" se refiere a la región de la secuencia de nucleótidos que contiene codones que son traducidos en residuos aminoácidos (por ejemplo, la región entera de codificación de LZ-2 que incluye los nucleótidos 61 - 1470 de la SEQ ID NO: 2). La molécula de ácido nucleico antisentido es antisentido con una "región no codificadora" de la cadena de codificación de una secuencia de nucleótidos que codifica un TFSRP. El término "región no codificadora" se refiere a secuencias 5' y 3' que flanquean la región de codificación que no son traducidas en aminoácidos (es decir, también denominadas como regiones no traducidas 5' y 3'). La molécula de ácido nucleico antisentido puede ser complementaria a la región entera de codificación del ARNm para la TFSRP, pero más preferiblemente es un oligonucleótido que es antisentido únicamente a una porción de la región de codificación o no codificadora del ARNm para TFSRP. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede ser complementario a la región que rodea al sitio de inicio de la traducción del ARNm del TFSRP. Un oligonucleótido antisentido puede ser, por ejemplo, aproximadamente de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 nucleótidos de longitud. Típicamente, las moléculas antisentido incluyen un ARN que tiene 60 - 100% de identidad de secuencia con al menos 14 nucleótidos consecutivos de las SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 17, o un polinucleótido que codifica las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 18. Típicamente, la identidad de secuencia será al menos 70%, más preferiblemente al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% y lo más preferible 99%.

Un ácido nucleico antisentido puede ser construido utilizando síntesis química y reacciones de ligación enzimática utilizando procedimientos conocidos en el arte. Por ejemplo, un ácido nucleico antisentido (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido) puede ser sintetizado químicamente utilizando nucleótidos de origen natural o nucleótidos modificados de diferente manera diseñados para incrementar la estabilidad biológica de las moléculas o para incrementar la estabilidad física del dúplex formado entre los ácido nucleico sentido y antisentido, por ejemplo, se pueden utilizar derivados fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. Los ejemplos de nucleótidos modificados que pueden ser utilizados para generar el ácido nucleico antisentido incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-iodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-

metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurine. Alternativamente, el ácido nucleico antisentido puede ser producido biológicamente utilizando un vector de expresión dentro del cual se ha subclonado un ácido nucleico en una orientación antisentido (es decir, el ARN transcrito a partir del ácido nucleico insertado será de una orientación antisentido a un ácido nucleico objetivo de interés, descrito adicionalmente en la siguiente subsección).

La molécula de ácido nucleico antisentido descrita puede ser una molécula ácido nucleico  $\alpha$ -anomérico. Una molécula ácido nucleico  $\alpha$ -anomérico forma un híbrido bicatenario específico con ARN complementario en el cual, contrariamente a las unidades  $\beta$  usuales, las cadenas corren paralelas entre sí (Gaultier et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15: 6625 - 6641). La molécula de ácido nucleico antisentido puede incluir también un 2'-o-metilribonucleótido (Inoue et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15: 6131 - 6148) o un análogo químico de ARN-ADN (Inoue et al., 1987, FEBS Lett. 215: 327 - 330).

Las moléculas antisentido de ácido nucleico descritas se administran típicamente a una célula o se generan *in situ* de tal manera que hibriden o se enlacen con ARNm celular y/o ADN genómico que codifica un TFSRP para inhibir así la expresión del polipéptido, por ejemplo, por medio de la inhibición de la transcripción y/o de la traducción. La hibridación puede ser por medio de complementariedad convencional de nucleótidos para formar un dúplex estable, o, por ejemplo, en el caso de una molécula de ácido nucleico antisentido que se enlaza con dúplex de ADN, a través de interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. La molécula antisentido puede ser modificada para que se enlace específicamente con un receptor o un antígeno expresado sobre una superficie seleccionada de la célula, por ejemplo, por medio del enlazamiento de la molécula de ácido nucleico antisentido con un péptido o un anticuerpo que se enlaza con un receptor o antígeno de la superficie de la célula. También se puede suministrar la molécula de ácido nucleico antisentido a las células utilizando los vectores descritos aquí. Para lograr suficientes concentraciones intracelulares de las moléculas antisentido, se prefieren las construcciones del vector en las cuales la molécula de ácido nucleico antisentido se coloca bajo el control de un promotor procariota, viral, o eucariota fuerte (incluida una planta).

Como una alternativa a los polinucleótidos antisentido, se pueden utilizar ribozimas, polinucleótidos sentido, o ARN bicatenario (ARNds) para reducir la expresión de un polipéptido TFSRP. Por "ribozima" se entiende una enzima catalítica basada en ARN con actividad de ribonucleasa que es capaz de escindir ácido nucleico monocatenario, por ejemplo un ARNm, con el cual tiene una región complementaria. Se pueden utilizar ribozimas (por ejemplo, ribozimas cabeza de martillo descritas en Haselhoff y Gerlach, 1988, Nature 334: 585 - 591) para escindir catalíticamente transcritos de ARNm para TFSRP para inhibir así la traducción del ARNm. Se puede diseñar un ribozima que tenga especificidad por un ácido nucleico que codifique TFSRP con base en la secuencia de nucleótidos de un ADNc para TFSRP, como el divulgado aquí (es decir, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 17) o sobre la base de una secuencia heteróloga que es aislada de acuerdo con los métodos enseñados en esta invención. Por ejemplo, se puede construir un derivado de un ARN para L-19 IVS de *Tetrahymena* en el cual la secuencia de nucleótidos del sitio activo es complementaria a la secuencia de nucleótidos que es escindida en un ARNm que codifica para TFSRP. Ver, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4.987.071 y 5.116.742 para Cech et al. Alternativamente, el ARNm para TFSRP puede ser utilizado para seleccionar un ARN catalítico que tenga actividad específica de ribonucleasa a partir de una reserva de moléculas de ARN. Ver, por ejemplo, Bartel, D. y Szostak, J. W., 1993, Science 261: 1411 - 1418. El ribozima puede contener una porción que tenga al menos 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 ó 20 nucleótidos, y más preferiblemente 7 u 8 nucleótidos, que tenga 100% de complementariedad con una porción del ARN objetivo. Los métodos para elaborar ribozimas son conocidos por aquellos capacitados en el arte. Ver, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6.025.167; 5.773.260; y 5.496.698.

El término "ARNds", como se lo utiliza aquí se refiere a híbridos de ARN que contienen dos cadenas de ARN. Los ARNds pueden ser de estructura lineal o circular. En una modalidad preferida, el ARNds es específico para un polinucleótido que codifique ya sea el polipéptido de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o la SEQ ID NO: 18, o un polipéptido que tenga al menos 76% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o la SEQ ID NO: 18. Los ARN que hibridan pueden ser sustancial o completamente complementarios. Como se la utiliza aquí, la frase "sustancialmente complementaria" se refiere a los ARN de hibridación en donde los dos ARN que hibridan son alineados en forma óptima utilizando el programa BLAST como se describió anteriormente, las porciones que hibridan son al menos 95% complementarias. Preferiblemente, el ARNds será al menos de 100 pares de bases de longitud. Típicamente, los ARN que hibridan serán de longitud idéntica sin extremos salientes 5' ó 3' y sin huecos. Sin embargo, se pueden utilizar los ARNds que tienen salientes 5' ó 3' de hasta 100 nucleótidos.

El ARNds puede incluir ribonucleótidos o análogos de ribonucleótido, tales como residuos de 2'-O-metil ribosilo, o combinaciones de los mismos. Ver, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4.130.641 y 4.024.222. En

la Patente de los Estados Unidos No. 4.283.393 se describe un ácido polirribonucleico: ácido polirribocitidílico del ARNds. Los métodos para elaborar y utilizar ARNds son conocidos en el arte. Un método comprende la transcripción simultánea de dos hebras complementarias de ADN, ya sea *in vivo*, o en una mezcla de reacción única *in vitro*. Ver, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5.795.715. En una modalidad, se puede introducir ARNds en una planta o en una célula de una planta directamente por medio de procedimientos de transformación estándar. Alternativamente, el ARNds puede expresarse en una célula de una planta por medio de la transcripción de dos ARN complementarios.

Otros métodos para la inhibición de la expresión del gen endógeno, tales como la formación de una triple hélice (Moser et al., 1987, Science 238: 645 - 650 y Cooney et al., 1988, Science 241: 456 - 459) y co-supresión (Napoli et al., 1990, The Plant Cell 2: 279 - 289) son conocidos en el arte. Para la co-supresión de genes endógenos de la planta se han utilizado los ADNc de longitud parcial y completa. Ver, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4.801.340, 5.034.323, 5.231.020 y 5.283.184; Van der Kroll et al., 1990, The Plant Cell 2: 291 - 299, Smith et al., 1990, Mol. Gen. Genetics 224: 477 - 481; y Napoli et al., 1990, The Plant Cell 2: 279 - 289.

Para una supresión sentido, se cree que la introducción de un polinucleótido sentido bloquea la transcripción del correspondiente gen objetivo. El polinucleótido sentido tendrá al menos 65% de identidad de secuencia con el gen o ARN de la planta objetivo. Preferiblemente, el porcentaje de identidad es al menos del 80%, 90%, 95% o más. El polinucleótido sentido introducido no necesita ser de longitud completa con relación al gen o transcrito objetivo. Preferiblemente, el polinucleótido sentido tendrá al menos 65% de identidad de secuencia con al menos 100 nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, o la SEQ ID NO: 7. Las regiones de identidad pueden contener intrones y y/o exones y regiones no traducidas. El polinucleótido sentido introducido puede estar presente en la célula de la planta en forma transitoria, o puede estar integrado en forma estable en un cromosoma de una planta o en un replicón extracromosómico.

Alternativamente, se puede inhibir la expresión del gen para TFSRP dirigiendo las secuencias complementarias de nucleótidos a la región reguladora de una secuencia de nucleótidos para TFSRP (por ejemplo, un promotor y/o reforzador para el TFSRP) para formar estructuras de triple hélice que eviten la transcripción de un gen para TFSRP en células objetivo. Ver en general, Helene, C., 1991, Anticancer Drug Des. 6(6): 569 - 84; Helene, C. et al., 1992, Ann. N. Y. Acad. Sci. 660: 27 - 36; y Maher, L. J., 1992, Bioassays 14(12): 807 - 15.

Además de los ácidos nucleicos para TFSRP y de los polipéptidos descritos anteriormente, la descripción enseña estos ácidos nucleicos y polipéptidos unidos a una estructura funcional. Estas unidades estructurales incluyen, pero no se limitan a, unidades estructurales para detección, unidades estructurales para hibridación, unidades estructurales para purificación, unidades estructurales para suministro, unidades estructurales para reacción, unidades estructurales para enlazamiento, y similares. Un grupo típico de ácidos nucleicos que tienen unidades estructurales unidas son sondas e iniciadores. Las sondas y los iniciadores típicamente contienen un oligonucleótido sustancialmente aislado. El oligonucleótido típicamente contiene una región de una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo condiciones rigurosas con aproximadamente al menos 12, preferiblemente aproximadamente 25, más preferiblemente aproximadamente 40, 50 ó 75 nucleótidos consecutivos de una hebra sentido de una de las secuencias expuestas en la SEQ ID NO: 2 SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 17, una secuencia antisentido de una de las secuencias expuestas en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 17, o mutantes de origen natural de las mismas. Se pueden utilizar iniciadores con base en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 17 en reacciones PCR para homólogos del clon de TFSRP. Se pueden utilizar sondas con base en el TFSRP y secuencias de nucleótidos para detectar transcritos o secuencias genómicas que codifican los mismos polipéptidos o sustancialmente idénticos. En modalidades preferidas, la sonda contiene además un grupo marcado unido a la misma, por ejemplo el grupo marcador puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un cofactor enzimático. Tales sondas pueden ser utilizadas como parte de un kit de prueba marcador genómico para identificar células que expresan un TFSRP, por ejemplo para la medición de un nivel de un ácido nucleico que codifica TFSRP, en una muestra de células, por ejemplo, para detectar los niveles de ARNm para TFSRP o para determinar si un gen genómico para TFSRP ha sido mutado o suprimido.

En particular, un método útil para determinar si el nivel de transcripción del gen (un indicador de la cantidad de ARNm disponible para traducción al producto génico) es llevar a cabo una transferencia tipo Northern. Para referencia, ver, por ejemplo, Ausubel et al., 1988, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: New York. La información de una transferencia tipo Northern demuestra al menos parcialmente el grado de transcripción del gen transformado. El ARN celular total puede ser preparado a partir de células, tejidos, u órganos por medio de diferentes métodos, todos bien conocidos en el arte, tal como aquellos descritos en Bormann, E. R. et al., 1992, Mol. Microbiol. 6: 317 - 326. Para evaluar la presencia o cantidad relativa de polipéptido traducida a partir de este ARNm, se pueden emplear técnicas estándar, tales como una transferencia tipo Western. Estas técnicas son bien conocidas por una persona ordinariamente capacitada en el arte. Ver, por ejemplo, Ausubel et al., 1988, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: New York.

La descripción enseña además un vector aislado de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico para TFSRP como se describe más arriba, en donde la expresión del vector en una célula huésped resulta en una mayor tolerancia al estrés ambiental comparado con una variedad de tipo silvestre de la célula huésped. Como se lo utiliza aquí, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico con el cual ha sido enlazado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de ADN bicatenario en el cual pueden ligarse segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde pueden ligarse segmentos adicionales de ADN en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la cual son introducidos (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) se integran en el genoma de una célula huésped después de la introducción en la célula huésped, y por lo tanto son replicados junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales están operativamente enlazados. Tales vectores son denominados aquí como "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en la forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" pueden ser utilizados en forma intercambiable ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector.

Los vectores de expresión recombinante de la invención contienen un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para expresión del ácido nucleico en una célula huésped, lo cual significa que los vectores de expresión recombinante incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas sobre la base de las células huésped que son utilizadas para expresión, que están operativamente enlazadas a la secuencia de ácido nucleico que es expresada. Como se lo utiliza aquí con respecto a un vector de expresión recombinante, "operativamente enlazada" se entiende como aquella secuencia de nucleótidos de interés que está enlazada a la(s) secuencia(s) reguladora(s) en una forma que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula huésped donde se introduce el vector en la célula huésped). El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, reforzadores, y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras son descritas, por ejemplo, en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990); y Gruber y Crosby, en: *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, eds. Glick y Thompson, Capítulo 7, 89 - 108, CRC Press: Boca Raton, Florida, incluidas las referencias citadas allí. Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células huésped y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos únicamente en ciertas células huésped o bajo ciertas condiciones. Se apreciará por aquellos capacitados en el arte que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la escogencia de la célula huésped que va a ser transformada, el nivel de expresión deseado de polipéptido, etc. Los vectores de expresión pueden ser introducidos en células huésped para producir así polipéptidos o péptidos, incluidos polipéptidos o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos como los descritos aquí (por ejemplo, los TFSRP, formas mutantes de los TFSRP, polipéptidos de fusión, etc.).

Los vectores de expresión recombinante pueden ser diseñados para la expresión de los TFSRP en células procariotas o eucariotas. Por ejemplo, los genes para TFSRP pueden ser expresados en células bacterianas tales como *C. glutamicum*, células de insecto (utilizando vectores de expresión de baculovirus), levadura y otras células de hongos (ver Romanos, M. A. et al., 1992, *Foreign gene expression in yeast: a review*, *Yeast* 8: 423 - 488; van den Hondel, C. A. M. J. J. et al., 1991, *Heterologous gene expression in filamentous fungi*, en: *More Gene Manipulations in Fungi*, J. W. Bennet & L. L. Lasure, eds., p. 396 - 428; Academic Press: San Diego; y van den Hondel, C. A. M. J. J. & Punt, P. J., 1991, *Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi*, en: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, Peberdy, J. F. et al., eds., p. 1 - 28, Cambridge University Press: Cambridge), algas (Falcitore et al., 1999, *Marine Biotechnology* 1(3): 239 - 251), ciliados de los tipos: Holotrichia, Peritrichia, Spirotrichia, Suctorina, Tetrahymena, Paramecium, Colpidium, Glaucocystis, Platyophrya, Potomacusa, Pseudocostatum, Euplotes, Engelmanniella, y Stylonychia, especialmente del género Stylonychia lemnae con vectores siguiendo un método de transformación como el descrito en la Solicitud PCT No. WO 98/01572, y células de plantas multicelulares (ver Schmidt, R y Willmitzer, L., 1988, *High efficiency Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Arabidopsis thaliana leaf and cotyledon explants*, *Plant Cell Rep.* 583 - 586; *Plant Molecular Biology and Biotechnology*, C Press, Boca Raton, Florida, chapter 6/7, S.71 - 119 (1993); F. F. White, B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, en: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. Kung y R Wu, 128 - 43, Academic Press: 1993; Potrykus, 1991 *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42: 205 - 225 y las referencias citadas allí), o células de mamífero. Las células huésped adecuadas son discutidas adicionalmente en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press: San Diego, CA (1990). Alternativamente, el vector de expresión recombinante puede ser transcrito y traducido *in vitro*, por ejemplo utilizando secuencias reguladoras del promotor T7 y polimerasa T7.

La expresión de polipéptidos en procariotas es más a menudo llevada a cabo con vectores que contienen promotores inducibles o constitutivos que dirigen la expresión ya sea de polipéptidos de fusión o que no son de fusión. Los vectores de fusión añaden una cantidad de aminoácidos a un polipéptido codificado allí, usualmente al terminal amino del polipéptido recombinante pero también al terminal C o fusionado dentro de regiones adecuadas en los polipéptidos. Tales vectores de fusión típicamente sirven tres propósitos: 1) incrementar la expresión de un polipéptido recombinante; 2) incrementar la solubilidad de un polipéptido recombinante; y 3) ayudar en la purificación

de un polipéptido recombinante actuando como un ligando en purificación por afinidad. A menudo, en vectores de expresión por fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítico en la unión de la estructura funcional de fusión y el polipéptido recombinante para permitir la separación del polipéptido recombinante de la estructura funcional de fusión después de la purificación del polipéptido de fusión. Tales enzimas, y sus secuencias de reconocimiento del cognato, incluyen al Factor Xa, trombina, y enteroquinasa.

Los vectores típicos de expresión por fusión incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D. B. y Johnson, K. S., 1988, Gene 67: 31 - 40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA), y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fusionan glutatona S-transferasa (GST), el polipéptido de enlazamiento de maltosa E, o polipéptido A, respectivamente, con el polipéptido recombinante objetivo. En una modalidad, la secuencia de codificación de la TFSRP se clona dentro de un vector de expresión pGEX para crear un vector que codifica un polipéptido de fusión que contiene, desde el terminal N hasta el terminal C, un sitio de escisión X del polipéptido con GST-trombina. El polipéptido de fusión puede ser purificado por cromatografía de afinidad utilizando resina de glutatona-agarosa. El TFSRP recombinante no fusionado a GST puede ser recuperado por escisión del polipéptido de fusión con trombina.

Los ejemplos de vectores de expresión adecuados inducibles que no son de fusión de *E. coli* incluyen pTrc (Amann et al., 1988, Gene 69: 301 - 315) y pET 11d (Studier et al., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60 - 89). La expresión génica objetivo del vector pTrc se basa en la transcripción de la ARN polimerasa del huésped de un promotor híbrido de fusión *trp-lac*. La expresión génica objetivo del vector pET 11d se basa en la transcripción de un promotor de fusión T7 *gn10-lac* mediada por una ARN polimerasa viral co-expresada (T7 *gnl*). Esta polimerasa viral es suministrada por cepas huésped BL21(DE3) o HMS174(DE3) de un profago residente  $\lambda$  que alberga un gen T7 *gnl* bajo el control transcripcional del promotor *lacUV 5*.

Una estrategia para maximizar la expresión del polipéptido recombinante es expresar el polipéptido en una bacteria huésped con una capacidad debilitada para escindir proteolíticamente al polipéptido recombinante (Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119 - 128). Otra estrategia es alterar la secuencia del ácido nucleico que va a ser insertado en un vector de expresión de modo que los codones individuales para cada aminoácido sean aquellos preferencialmente utilizados en la bacteria escogida para expresión, tal como *C. glutamicum* (Wada et al., 1992, Nucleic Acids Res. 20: 2111 - 2118). Tal alteración de las secuencias de ácido nucleico de la invención puede ser llevada a cabo por medio de técnicas estándar de síntesis de ADN.

En otra modalidad, el vector de expresión de TFSRP es un vector de expresión de levadura. Los ejemplos de vectores para expresión en levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSecl (Baldari et al., 1987, EMBO J. 6: 229 - 234), pMFa (Kurjan y Herskowitz, 1982, Cell 30: 933 - 943), pJRY88 (Schultz et al., 1987, Gene 54: 113 - 123), y pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Los vectores y métodos para la construcción de vectores apropiados para uso en otros hongos, tales como el hongo filamentoso, incluyen aquellos detallados en: van den Hondel, C. A. M. J. & Punt, P. J., 1991, "Gene transfer systems y vector development for filamentous fungi", en: Applied Molecular Genetics of Fungi, J. F. Peberdy, et al., eds., p. 1 - 28, Cambridge University Press: Cambridge.

Alternativamente, los TFSRP pueden ser expresados en células de insecto utilizando vectores de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus disponibles para expresión de polipéptidos en células de insecto cultivadas (por ejemplo, células Sf 9) incluyen la serie pAc (Smith et al., 1983, Mol. Cell BioL 3: 2156 - 2165) y la serie pVL (Lucklow y Summers, 1989, Virology 170: 31 - 39).

Un ácido nucleico para TFSRP descrito aquí puede ser expresado en células de mamífero utilizando un vector de expresión de mamífero. Los ejemplos de vectores de expresión de mamífero incluyen pCDM8 (Seed B., 1987, Nature 329: 840) y pMT2PC (Kaufman et al., 1987, EMBO J. 6: 187 - 195). Cuando se utilizan en células de mamífero, las funciones de control del vector de expresión son a menudo suministradas por elementos reguladores virales. Por ejemplo, los promotores comúnmente utilizados se derivan de polioma, Adenovirus 2, citomegalovirus, y Virus del Simio 40. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariontas como eucariotas, ver los capítulos 16 y 17 de Sambrook, J., Fritsh, E. F., y Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Un vector de expresión recombinante de mamífero descrito aquí es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico preferencialmente en un tipo de célula particular (por ejemplo, se utilizan elementos reguladores específicos del tejido para expresar el ácido nucleico). Los elementos reguladores específicos del tejido son conocidos en el arte. Los ejemplos no limitantes de promotores adecuados específicos del tejido incluyen el promotor de albúmina (específico del hígado; Pinkert et al., 1987, Genes Dev. 1: 268 - 277), promotores específicos linfocitos (Calame y Eaton, 1988, Adv. ImmunoL 43: 235 - 275), en particular promotores de receptores de células T (Winoto y Baltimore, 1989, EMBO J. 8: 729 - 733) e inmunoglobulinas (Banerji et al., 1983, Cell 33: 729 - 740; Queen y Baltimore, 1983, Cell 33: 741 - 748), promotores específicos neuronales (por ejemplo, el promotor del neurofilamento; Byrne y Ruddle, 1989, PNAS 86: 5473 - 5477), promotores específicos del páncreas (Edlund et al., 1985, Science 230: 912 -

916), y promotores específicos de la glándula mamaria (por ejemplo, el promotor del suero de la leche, Patente de los Estados Unidos No. 4.873.316 y la Publicación de la Solicitud Europea No. 264.166). Los promotores regulados de desarrollo también son abarcados, por ejemplo, los promotores *hox* de múrido (Kessel y Gruss, 1990, Science 249: 374 - 379) y el promotor fetopolipéptido (Campes y Tilghman, 1989, Genes Dev. 3: 537 - 546).

5 Para transfección estable de células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y de la técnica de transfección utilizada, únicamente una pequeña fracción de células puede integrar el ADN foráneo dentro de su genoma. Con el propósito de identificar y seleccionar estos integrantes, se introduce generalmente un gen que codifique un marcador seleccionable (por ejemplo, de resistencia a los antibióticos) dentro de las células huésped  
10 junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a los fármacos, tales como G418, higromicina, y metotrexato, o en plantas que confieran resistencia a un herbicida tales como glifosato o glufosinato. Se pueden introducir moléculas de ácido nucleico que codifiquen un marcador seleccionable en una célula huésped sobre el mismo vector como aquel que codifica un TFSRP o puede ser introducido sobre un vector separado. Las células transfectadas en forma estable con la molécula introducida de  
15 ácido nucleico pueden ser identificadas, por ejemplo, por selección del fármaco (por ejemplo, sobrevivirán las células que han incorporado al gen marcador seleccionable, mientras que las otras células morirán).

En una modalidad preferida de la presente invención, los TFSRP se expresan en plantas y en células de plantas tal como células de plantas unicelulares (por ejemplo algas) (Ver Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology 1(3): 239 - 251 y las referencias citadas allí) y células de plantas de plantas superiores (por ejemplo, las espermatofitas, tales como plantas de cultivo). Un TFSRP puede ser "introducido" en una célula de una planta por cualquier medio,  
20 incluida transfección, transformación o transducción, electroporación, bombardeo de partículas, agroinfección, y similares. Un método de transformación conocido por aquellos capacitados en el arte es la inmersión de una planta en floración dentro de una solución de *Agrobacterias*, en donde las *Agrobacterias* contienen al ácido nucleico para TFSRP, seguido por fitomejoramiento de los gametos transformados.

Otros métodos adecuados para transformar o transfectar células huésped incluidas de plantas pueden ser encontrados en Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, y otros manuales de laboratorio tales como  
25 Methods in Molecular Biology, 1995, Vol. 44, Agrobacterium protocols, ed: Gartland y Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey. Como la tolerancia al estrés biótico y abiótico es un rasgo general deseado para ser heredado en una amplia variedad de plantas como el maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, soja, cacahuete, algodón, colza y canola, yuca, pimiento, girasol y tagetes, plantas solanáceas como la patata, tabaco, berenjena, y tomate, especie *Vicia*, guisantes, alfalfa, plantas de arbusto (café, cacao, té), especie *Salix*, árboles (palma aceitera, coco), hierbas perennes, y cultivos de forraje, estas plantas de cultivo son también plantas objetivo preferidas para modificación por medio de ingeniería genética como una modalidad adicional de la presente invención. Los cultivos forrajeros incluyen, pero no se limitan a, Heno de trigo, Alpiste, Bromo, Heno de centeno silvestre, Heno azul, Dáctilo aglomerado, Alfalfa, Salfoin, Loto, Trébol híbrido, Trébol rojo, y Trébol de olor.

En una modalidad de la presente invención, la transfección de un TFSRP en una planta se logra por medio de transferencia génica mediada por *Agrobacterium*. La transformación de plantas mediada por *Agrobacterium* puede ser llevada a cabo utilizando, por ejemplo, la cepa GV3101 (pMP90) (Koncz y Schell, 1986, Mol. Gen. Genet 204: 383 - 396) o LBA4404 (Clontech) de *Agrobacterium tumefaciens*. La transformación puede ser llevada a cabo por  
40 medio de técnicas de transformación y regeneración estándar (Deblaere et al., 1994, Nucl. Acids. Res. 13: 4777 - 4788; Gelvin, Stanton B. y Schilperoot, Robert A, Plant Molecular Biology Manual, 2nd Ed. - Dordrecht : Kluwer Academic Publ., 1995. - en Sect., Ringbuc Centrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R.; Thompson, John E., Methods in Plant Molecular Biology y Biotechnology, Boca Raton : CRC Press, 1993 360 S., ISBN 0-8493-5164-2). Por ejemplo, la colza puede ser transformada a través de transformación del cotiledón o del hipocotiledón (Moloney et al., 1989, Plant Cell Report 8:238-242; De Block et al., 1989, Plant Physiol. 91: 694 - 701). El uso de antibióticos para *Agrobacterium* y la selección de plantas dependen del vector binario y de la cepa de *Agrobacterium* utilizada para transformación. La selección de colza se lleva a cabo normalmente utilizando kanamicina como marcador seleccionable de la planta. La transferencia génica mediada por *Agrobacterium* a lino puede ser llevada a cabo utilizando, por ejemplo, una técnica descrita por Mlynarova et al., 1994, Plant Cell Report 13: 282 - 285. Adicionalmente, la transformación de la soja puede ser llevada a cabo utilizando, por ejemplo, una técnica descrita en la Patente Europea No. 0424 047, la Patente de los Estados Unidos No. 5.322.783, la Patente Europea No. 0397 687, la Patente de los Estados Unidos No. 5.376.543, o la Patente de los Estados Unidos No. 5.169.770. La transformación del maíz puede ser lograda por medio de bombardeo de partículas, aceptación de ADN mediada por polietilén glicol o a través de la técnica de fibra de carburo de silicio. (Ver, por ejemplo, Freeling y Walbot "The maize handbook" Springer Verlag: New York (1993) ISBN 3-540-97826-7). Un ejemplo específico de transformación de maíz se encuentra en la Patente de los Estados Unidos No. 5.990.387, y un ejemplo específico de transformación de trigo puede ser encontrado en la Solicitud PCT No. WO 93/07256.

De acuerdo con la presente invención, el TFSRP introducido puede ser mantenido en la célula de una planta en forma estable si es incorporado en un replicón autónomo no cromosómico o integrado dentro de los cromosomas de

la planta. Alternativamente, el TFSRP introducido puede estar presente sobre un vector no replicante extra cromosómico y ser expresado en forma transitoria o activa en forma transitoria.

En una modalidad, se puede crear un microorganismo recombinante homólogo en donde el TFSRP es integrado dentro de un cromosoma, se prepara un vector que contiene al menos una porción de un gen para TFSRP dentro del cual se ha introducido una supresión, adición, o sustitución para alterar de este modo, por ejemplo, romper funcionalmente, al gen para TFSRP. Preferiblemente, el gen para TFSRP es un gen de *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, o un gen para TFSRP de *Oryza sativa*. El vector se diseña de tal manera que, después de recombinación homóloga, se rompa funcionalmente el gen endógeno para TFSRP (es decir, no codifique más un polipéptido funcional; también denominado como un vector desactivador). Alternativamente, el vector puede ser diseñado de tal manera que, después de recombinación homóloga, se mute o altere el gen endógeno para TFSRP pero aún codifique un polipéptido funcional (por ejemplo, la región reguladora secuencia arriba puede ser alterada para alterar por lo tanto la expresión del gen endógeno para TFSRP). Para crear una mutación puntual a través de recombinación homóloga se pueden utilizar híbridos de ADN-ARN en una técnica conocida como quimeroplastia (Cole-Strauss et al., 1999, *Ácido nucleico Research* 27(5): 1323 - 1330 y Kmiec, 1999, *Gene therapy American Scientist* 87(3): 240 - 247). Los procedimientos de recombinación homóloga en *Physcomitrella patens* también son bien conocidos en el arte y su uso está contemplado aquí.

Mientras que en el vector de recombinación homóloga, la porción alterada del gen para TFSRP está flanqueada en sus extremos 5' y 3' por una molécula adicional de ácido nucleico del gen para TFSRP para permitir que ocurra la recombinación homóloga entre el gen exógeno para TFSRP transportado por el vector y un gen endógeno para TFSRP, en un microorganismo o planta. La molécula adicional de flanqueo de ácido nucleico para TFSRP es de longitud suficiente para recombinación homóloga exitosa con el gen endógeno. Típicamente, desde varios cientos de pares de bases hasta kilobases de ADN de flanqueo (tanto en los extremos 5' y 3') están incluidos en el vector. Ver por ejemplo, Thomas, K. R., y Capecchi, M. R., 1987, *Cell* 51: 503 para una descripción de vectores de recombinación homóloga o Strepp et al., 1998, *PNAS*, 95 (8): 4368 - 4373 para recombinación con base en ADNc en *Physcomitrella patens*. Se introduce el vector en un microorganismo o célula de una planta (por ejemplo, a través de ADN mediado por polietilén glicol), y se seleccionan células en las cuales el gen introducido para TFSRP se ha recombinado en forma homóloga con el gen endógeno para TFSRP utilizando técnicas conocidas en el arte.

En otra modalidad, se pueden producir microorganismos recombinantes que contienen sistemas seleccionados que permiten la expresión regulada del gen introducido. Por ejemplo, la inclusión de un gen para TFSRP sobre un vector colocándolo bajo el control del operón lac permite la expresión del gen para TFSRP únicamente en presencia de IPTG. Tales sistemas reguladores son bien conocidos en el arte.

Ya sea que esté presente en un vector extracromosómico no replicante o en un vector que esté integrado en un cromosoma, el polinucleótido TFSRP reside preferiblemente en un casete de expresión de una planta. Un casete de expresión de una planta contiene preferiblemente secuencias reguladoras capaces de dirigir la expresión génica en células de plantas que están relativamente enlazadas de tal manera que cada secuencia pueda cumplir su función, por ejemplo, la terminación de la transcripción por medio de señales de poliadenilación. Las señales preferidas de poliadenilación son aquellas que se originan a partir del ADN-t de *Agrobacterium tumefaciens* tal como el gen conocido como octopina sintasa del plásmido Ti pTiACH5 (Gielen et al., 1984, *EMBO J.* 3: 835) o equivalentes funcionales del mismo pero también son adecuados todos los otros terminadores funcionalmente activos en plantas. Ya que la expresión génica de una planta muy a menudo no está limitada sobre los niveles transcripcionales, un casete en expresión de una planta preferiblemente contiene otras secuencias operativamente enlazadas como responsables de la traducción tales como la secuencia multiplicadora que contiene la secuencia líder 5' no traducida del virus del mosaico del tabaco que mejora la relación de polipéptido por ARN (Gallie et al., 1987, *Nucl. Acids Research* 15: 8693 - 8711). Los ejemplos de vectores de expresión de la planta incluyen aquellos detallados en: Becker, D. et al., 1992, *New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border*, *Plant Mol. Biol.* 20: 1195 - 1197; Bevan, M. W., 1984, *Binary Agrobacterium vectors for plant transformation*, *Nucl. Acid. Res.* 12: 8711 - 8721; y *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*; en: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering y Utilization, eds.: Kung y R Wu, Academic Press, 1993, S. 15 - 38.

La expresión génica en plantas debe estar operativamente enlazada a un promotor apropiado que confiere expresión génica de manera específica oportuna al tejido o a la célula. Los promotores útiles en los casetes de expresión de la invención incluyen a cualquier promotor que sea capaz de iniciar la transcripción en una célula de una planta. Tales promotores incluyen, pero sin limitarse a, aquellos que pueden ser obtenidos de plantas, virus de plantas, y bacterias que contienen genes que se expresan en plantas, tales como *Agrobacterium* y *Rhizobium*.

El promotor puede ser constitutivo, inducible, preferido en etapa de desarrollo, preferido por un tipo de célula, preferido por el tejido, o preferido por el órgano. Los promotores constitutivos son activos bajo la mayoría de las condiciones. Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen a los promotores CaMV 19S y 35 S (Odell et al., 1985, *Nature* 313: 810 - 812), al promotor 35S del CaMV sX (Kay et al., 1987, *Science* 236: 1299 - 1302), al promotor Sep1, al promotor de actina del arroz (McElroy et al., 1990, *Plant Cell* 2: 163 - 171), al promotor de actina

de *Arabidopsis*, al promotor de ubiquitina (Christensen et al., 1989, Plant Molec. Biol. 18: 675 - 689); pEmu (Last et al., 1991, Theor Appl Genet 81: 581 - 588), al promotor 35S del virus del mosaico de escrofularia, al promotor Smas (Velten et al., 1984, EMBO J 3: 2723 - 2730), al promotor GRP1-8, al promotor de cinamil alcohol deshidrogenasa (Patente de los Estados Unidos No. 5.683.439), promotores del T-ADN de *Agrobacterium*, tales como manopina sintasa, nopalina sintasa, y octopina sintasa, la pequeña subunidad del promotor de ribulosa bifosfato carboxilasa (ssuRUBISCO), y similares.

Los promotores inducibles son activos bajo ciertas condiciones ambientales, tales como la presencia o la ausencia de un nutriente o metabolito, calor o frío, luz, ataque de patógenos, condiciones anaeróbicas, y similares. Por ejemplo, el promotor hsp80 de *Brassica* es inducido por choque térmico; el promotor PPDK es inducido por luz; el promotor PR-1 de tabaco, *Arabidopsis*, y maíz pueden ser inducidos por infección con un patógeno; y el promotor Adh1 es inducido por hipoxia y estrés por frío. La expresión génica en una planta puede ser facilitada también a través de un promotor inducible (Para una revisión, ver Gatz, 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48: 89 - 108). Los promotores químicamente inducibles son especialmente adecuados si se quiere que la expresión génica se presente en una forma específica en el tiempo. Los ejemplos de tales promotores son un promotor inducible por ácido salicílico (Solicitud PCT No. WO 95/19443), un promotor inducible por tetraciclina (Gatz et al., 1992, Plant J. 2:397-404), y un promotor inducible por etanol (Solicitud PCT No. WO 93/21334).

En una modalidad preferida de la presente invención, el promotor inducible es un promotor inducible por estrés. Los promotores inducible por estrés incluyen, pero no se limitan a, Cor78 (Chak et al., 2000, Planta 210: 875 - 883; Hovath et al., 1993, Plant Physiol. 103: 1047 - 1053), Cor15a (Artus et al., 1996, PNAS 93(23): 13404 - 09), Rci2A (Medina et al., 2001, Plant Physiol. 125: 1655 - 66; Nylander et al., 2001, Plant Mol. Biol. 45: 341 - 52; Navarre y Goffeau, 2000, EMBO J. 19: 2515 - 24; Capel et al., 1997, Plant Physiol. 115: 569 - 76), Rd22 (Xiong et al., 2001, Plant Cell 13: 2063 - 83; Abe et al., 1997, Plant Cell 9: 1859 - 68; Iwasaki et al., 1995, Mol. Gen. Genet. 247: 391 - 8), cDet6 (Lang y Palve, 1992, Plant Mol. Biol. 20: 951 - 62), ADH1 (Hoeren et al., 1998, Genetics 149: 479 - 90), KAT1 (Nakamura et al., 1995, Plant Physiol. 109: 371 - 4), KST1 (Müller-Röber et al., 1995, EMBO 14: 2409 - 16), Rha1 (Terry et al., 1993, Plant Cell 5: 1761 - 9; Terry et al., 1992, FEBS Lett. 299(3): 287 - 90), ARSK1 (Atkinson et al., 1997, GenBank Accession # L22302 y Solicitud PCT No. WO 97/20057), PtxA (Plesch et al., GenBank Acceso # X67427), SbHRGP3 (Ahn et al., 1996, Plant Cell 8: 1477 - 90), GH3 (Liu et al., 1994, Plant Cell 6: 645 - 57), el promotor del gen PRP1 inducible por un patógeno (Ward et al., 1993, Plant. Mol. Biol. 22: 361 - 366), el promotor hsp-80 inducible por calor de tomate (Patente de los Estados Unidos No. 5.187.267), promotor alfa-amilasa inducible por frío de patata (Solicitud PCT No. WO 96/12814), o el promotor pinII inducible por lesiones (Patente Europea No. 375091). Para otros ejemplos de promotores inducibles por sequía, frío, y sal, tales como el promotor RD29A, ver Yamaguchi-Shinozaki et al., 1993, Mol. Gen. Genet. 236: 331 - 340.

Los promotores preferidos en etapa de desarrollo son preferencialmente expresados en ciertas etapas de desarrollo. Los promotores preferidos de órganos y tejidos incluyen a aquellos que se expresan preferencialmente en ciertos tejidos u órganos, tales como hojas, raíces, semillas, o xilema. Los ejemplos de promotores preferidos de tejidos y promotores preferidos de órganos incluyen, pero no se limitan a, preferidos de la fruta, preferidos del óvulo, preferidos de tejido de machos, preferidos de la semilla, preferidos del integumento, preferidos de tubérculos, preferidos del tallo, preferidos del pericarpio, y preferidos de las hojas, preferidos del estigma, preferidos del polen, preferidos de la antera, preferidos de los pétalos, preferidos del sépalo, preferidos del pedicelo, preferidos del de la silicua, preferidos el vástago, promotores preferidos e la raíz, y similares. Los promotores preferidos de la semilla son preferencialmente expresados durante el desarrollo y/o germinación de la semilla. Por ejemplo, los promotores preferidos de la semilla pueden ser preferidos del embrión, preferidos del endospermo, y preferidos del recubrimiento e la semilla. Ver Thompson et al., 1989, BioEssays 10: 108. Los ejemplos de promotores preferidos de la semilla incluyen, pero no se limitan a, celulosa sintasa (celA), Cim1, gamma-zeína, globulina-1, zeína (cZ19B 1) de 19 kD de maíz, y similares.

Otros promotores adecuados preferidos el tejido o preferidos de órganos incluyen el promotor del gen de la napina de colza (Patente de los Estados Unidos No. 5.608.152), al promotor de USP de Vicia faba (Baeumlein et al., 1991, Mol Gen Genet. 225(3): 459 - 67), al promotor de oleosina de *Arabidopsis* (Solicitud PCT No. WO 98/45461), al promotor de faseolina de *Phaseolus vulgaris* (Patente de los Estados Unidos No. 5.504.200), al promotor de Bce4 de *Brassica* (Solicitud PCT No. WO 91/13980), o al promotor de B4 de leguminosa (LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2(2): 233 - 9), así como promotores que confieren expresión específica a la semilla en plantas monocotiledóneas como el maíz, cebada, trigo, centeno, arroz, etc. Los promotores adecuados para tener en cuenta son el promotor del gen lpt2 o lpt1 de cebada (Solicitud PCT No. WO 95/15389 y Solicitud PCT No. WO 95/23230) o aquellos descritos en la Solicitud PCT No. WO 99/16890 (promotores del gen hordeína de cebada, del gen de la glutelina del arroz, del gen de la orzina del arroz, del gen de la prolamina del arroz, del gen de la gliadina del trigo, el gen de la glutelina del trigo, el gen de la glutelina de la avena, el gen de la kasirina del sorgo, y el gen de la secalina del centeno).

Otros promotores útiles en los casetes de expresión incluyen, pero no se limitan al promotor principal de la proteína de enlazamiento clorofila a/b, promotores de histona, al promotor de Ap3, al promotor de  $\beta$ -conglucina, al promotor de

napina, al promotor de la lectina de soja, al promotor de la zeína de 15 kD de maíz, al promotor de la zeína de 22 kD, al promotor de la zeína de 27 kD, al promotor de zeína g, los promotores de cera, de apergaminado 1, de apergaminado 2 y de bronceado, al promotor de Zm13 (Patente de los Estados Unidos No. 5.086.169), los promotores de poligalacturonasa de maíz (PG) (Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.412.085 y 5.545.546), y al  
 5 promotor de SGB6 (Patente de los Estados Unidos No. 5.470.359), así como promotores sintéticos u otros promotores naturales.

Se puede obtener flexibilidad adicional en el control de la expresión génica heteróloga en plantas por medio del uso de dominios de enlazamiento de ADN y elementos de respuesta de fuentes heterólogas (es decir, dominios de enlazamiento de ADN de fuentes diferentes a plantas). Un ejemplo de tal dominio de enlazamiento de ADN  
 10 heterólogo es el dominio de enlazamiento del ADN de LexA (Brent y Ptashne, 1985, Cell 43: 729 - 736).

También se describe un vector de expresión recombinante que contiene una molécula de ADN para TFSRP divulgado aquí clonado en el vector de expresión en una orientación antisentido. Es decir, la molécula de ADN está operativamente enlazada a una secuencia reguladora en una forma que permite la expresión (por medio de transcripción de la molécula de ADN) de una molécula de ARN que es antisentido a una ARNm para TFSRP. Las  
 15 secuencias reguladoras operativamente enlazadas a una molécula de ácido nucleico clonada en la orientación antisentido pueden ser escogidas para que dirijan la expresión continua de la molécula de ARN antisentido en una variedad de tipos de células. Por ejemplo, los promotores virales y/o reforzadores, o las secuencias reguladoras pueden ser escogidos para que dirijan la expresión constitutiva, específica del tejido, o específica del tipo de célula de ARN antisentido. El vector de expresión antisentido puede estar en la forma de un plásmido recombinante, fagémido, o virus atenuado en donde se producen ácidos nucleicos antisentido bajo el control de una región reguladora de alta eficiencia. La actividad de la región reguladora puede ser determinada por medio del tipo de célula dentro de la cual se introduce el vector. Para una discusión de la regulación de la expresión génica utilizando genes antisentido, ver Weintraub, H. et al., 1986, Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews -  
 20 Trends in Genetics, Vol. 1(1); y Mol et al., 1990, FEBS Letters 268: 427 - 430.

Otro aspecto de la invención se relaciona con células huésped dentro de las cuales se ha introducido un vector de expresión recombinante de la invención. Los términos "célula huésped" y "célula huésped recombinante" se utilizan aquí indistintamente. Se cree que tales términos se refieren no solamente a la célula objetivo en particular sino que también se aplican a la progenie o progenie potencial de tal célula. Debido a que pueden ocurrir ciertas modificaciones en generaciones sucesivas ya sea por una mutación o por influencias ambientales, tal progenie  
 25 puede, en realidad, no ser idéntica a la célula original, pero estar aún incluida dentro del alcance del término como se lo utiliza aquí. Una célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, una TFSRP puede ser expresada en células bacterianas tales como *C. glutamicum*, células de insecto, células de hongos, o células de mamífero (tales como células de ovario de hámster chino (CHO) o células COS), algas, ciliados, células de plantas, hongos, u otros microorganismos como *C. glutamicum*. Otras células huésped adecuadas son conocidas por aquellos capacitados en el arte.  
 30  
 35

Una célula huésped de la invención, tal como una célula huésped procariota o eucariota en cultivo, puede ser utilizada para producir (es decir, expresar) una TFSRP. Por lo tanto, la descripción enseña métodos para la producción de los TFSRP utilizando las células huésped descritas aquí. El método puede comprender el cultivo de la célula huésped de la invención (dentro de la cual se ha introducido un vector de expresión recombinante que  
 40 codifica un TFSRP, o dentro de cuyo genoma se ha introducido un gen que codifica un TFSRP alterado o de tipo silvestre) en un medio adecuado hasta que se produce TFSRP. El método puede comprender además el aislamiento de los TFSRP del medio o de la célula huésped.

Otro aspecto de la descripción se relaciona con TFSRP aislados, y con porciones biológicamente activas de los mismos. Un polipéptido "aislado" o "purificado" o una porción biológicamente activa del mismo están libres de algo del material celular cuando se lo produce por medio de técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u otros compuestos químicos cuando se lo sintetiza químicamente. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de TFSRP en las cuales se separa del polipéptido de algunos de los componentes celulares de las células en las cuales es producido en forma natural o recombinante. La expresión "sustancialmente libre de material celular" puede incluir preparaciones de un TFSRP que tenga aproximadamente al menos 30% (en peso seco) de material que no sea TFSRP (también llamado aquí como un "polipéptido contaminante"), más preferiblemente aproximadamente menos del 20% de material que no sea de TFSRP, aún más preferiblemente aproximadamente menos del 10% de material que no es de TFSRP, y lo más preferible aproximadamente menos del 5% de material que no es de TFSRP.  
 45  
 50

Cuando el TFSRP o una porción biológicamente activa del mismo sea producida en forma recombinante, también está preferiblemente sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa aproximadamente menos del 20%, más preferiblemente aproximadamente menos del 10%, y lo más preferible aproximadamente menos del 5% del volumen de la preparación del polipéptido. La expresión "sustancialmente libre de precursores químicos o de otros componentes químicos" incluye preparaciones de TFSRP en las cuales se  
 55

separa el polipéptido de los precursores químicos o de otros compuestos químicos que estén involucrados en la síntesis del polipéptido. La expresión "sustancialmente libre de precursores químicos o de otros compuestos químicos" puede incluir preparaciones de un TFSRP que tenga aproximadamente menos del 30% (en peso seco) de precursores químicos o de compuestos químicos que no sean TFSRP, más preferiblemente aproximadamente menos del 20% de precursores químicos o de compuestos químicos que no sean TFSRP, aún más preferiblemente aproximadamente menos del 10% de precursores químicos o de compuestos químicos que no sean TFSRP, y lo más preferible aproximadamente menos del 5% de precursores químicos o de compuestos químicos que no sean TFSRP. Los polipéptidos aislados, o porciones biológicamente activas de los mismos, preferiblemente carecen de polipéptidos contaminantes del mismo organismo del cual se deriva TFSRP. Típicamente, tales polipéptidos son producidos por medio de expresión recombinante, por ejemplo, de un TFSRP de *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, u *Oryza sativa* en plantas diferentes a *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, u *Oryza sativa*, o microorganismos tales como *C. glutamicum*, ciliados, algas u hongos.

Las moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, homólogos de polipéptidos, polipéptidos de fusión, iniciadores, vectores, y de células huésped descritas aquí pueden ser utilizadas en uno o más de los siguientes métodos: identificación de *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, u *Oryza sativa* y organismos relacionados; mapeo de genomas de organismos relacionados con *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, u *Oryza sativa*; identificación y localización de secuencias de interés de *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, u *Oryza sativa*; estudios evolucionarios; determinación de regiones de TFSRP requeridas para el funcionamiento; modulación de una actividad de TFSRP; modulación del metabolismo de una o más funciones celulares; modulación del transporte transmembrana de uno o más compuestos; modulación de la resistencia al estrés; y modulación de la expresión de ácido nucleico para PKSRP.

El musgo *Physcomitrella patens* representa un miembro de los musgos. Está relacionado con otros musgos tales como *Ceratodon purpureus* que es capaz de crecer en ausencia de luz. Los musgos tipo *Ceratodon* y *Physcomitrella* comparten un alto grado de identidad de secuencia sobre la secuencia de ADN y el nivel de polipéptido permitiendo el uso de selección heteróloga de moléculas de ADN con sondas que evolucionan de otros musgos u organismos, permitiendo así la derivación de una secuencia de consenso adecuada para selección heteróloga o anotación y predicción funcional de funciones génicas en otras especies. La habilidad para identificar tales funciones puede tener por lo tanto relevancia significativa, por ejemplo, la predicción de especificidad del sustrato de enzimas. Además, estas moléculas de ácido nucleico pueden servir como puntos de referencia para el mapeo de genomas de musgo, o de genomas de organismos relacionados.

Las moléculas de ácido nucleico para TFSRP tienen una variedad de usos. Lo más importante, el ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos de la presente invención pueden ser utilizados para transformar plantas, induciendo por lo tanto tolerancia a estreses tales como sequía, alta salinidad, frío, o doblamiento. Se suministra una planta transgénica transformada por un ácido nucleico para TFSRP, en donde la expresión de la secuencia de ácido nucleico en la planta resulta en mayor tolerancia al estrés ambiental comparado con una variedad de tipo silvestre de la planta. La planta transgénica puede ser una monocotiledónea o una dicotiledónea. La invención permite además que la planta transgénica pueda ser seleccionada de maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, soja, cacahuete, algodón, colza, canola, yuca, pimiento, girasol, tagetes, plantas solanáceas, patata, tabaco, berenjena, tomate, especie Vicia, guisantes, alfalfa, café, cacao, té, especie Salix, palma aceitera, coco, hierbas perennes, y cultivos de forraje, por ejemplo.

En particular, la presente invención describe el uso de la expresión de DBF-3 de *Physcomitrella patens* para modificar por ingeniería genética la tolerancia a la sequía, la tolerancia a la sal, y luego la tolerancia del frío de las plantas. Esta estrategia ha sido demostrada aquí para *Arabidopsis thaliana*, Colza/Canola, soja, maíz, y trigo, pero su aplicación no está restringida a estas plantas. Por lo tanto, la invención provee una planta transgénica que contienen un TFSRP tal como DBF-3 como se define en la SEQ ID NO: 12, en donde la planta tiene una mayor tolerancia a un estrés ambiental seleccionado de sequía, mayor salinidad, o baja temperatura. En modalidades preferidas, el estrés ambiental es sequía o baja temperatura.

Por lo tanto, la invención provee un método para producir una planta transgénica con un ácido nucleico que codifica para TFSRP, en donde la expresión del(de los) ácido(s) nucleico(s) en la planta resulta en una mayor tolerancia a dicho estrés ambiental comparado con una variedad de tipo silvestre de la planta que comprende: (a) la introducción en una célula de una planta de un vector de expresión que contiene un ácido nucleico para TFSRP, y (b) la generación a partir de la célula de la planta de una planta transgénica con una mayor tolerancia al estrés ambiental comparado con una variedad de tipo silvestre de la planta. La célula de la planta incluye, pero no se limita a, un protoplasto, una célula productora de gametos, y una célula que se regenera en una planta completa. Como se lo utiliza aquí, el término "transgénico" se refiere a cualquier planta, célula de una planta, callo, tejido de una planta, o parte de una planta, que contiene todo o parte de al menos un polinucleótido recombinante. En muchos casos, todo o parte del polinucleótido recombinante está integrado en forma estable dentro de un cromosoma o elemento extracromosómico estable, de modo que será transmitido a generaciones sucesivas. En modalidades preferidas, el

ácido nucleico para TFSRP codifica una proteína que comprende las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 18.

La descripción también enseña un método para modular la tolerancia de la planta a un estrés ambiental que comprende, la modificación de la expresión de un ácido nucleico que codifica para TFSRP en la planta. La tolerancia de la planta al estrés ambiental puede ser aumentada o disminuida como se logra por medio del incremento o la disminución de la expresión de un TFSRP. Preferiblemente, la tolerancia de la planta al estrés ambiental se incrementa incrementando la expresión de un TFSRP. La expresión de un TFSRP puede ser modificada por medio de cualquier método conocido por aquellos capacitados en el arte. Los métodos para incrementar la expresión de los TFSRP pueden ser utilizados en donde la planta sea o bien transgénica o no transgénica. En los casos donde la planta es transgénica, la planta puede ser transformada con un vector que contiene cualquiera de los ácido nucleico los anteriormente descritos que codifica para TFSRP, o la planta puede ser transformada con un promotor que dirija la expresión de TFSRP nativo en la planta, por ejemplo. La invención prevé que este promotor pueda ser específico para el tejido, regulado por desarrollo, o inducible por estrés. Alternativamente, las plantas no transgénicas pueden tener expresión de TFSRP nativo modificado por medio de la inducción de un promotor nativo. La expresión de DBF-3 como se define en la SEQ ID NO: 11, en plantas objetivo puede ser lograda por medio de, pero sin limitarse a, uno de los siguientes ejemplos: (a) un promotor constitutivo, (b) un promotor inducible por estrés, (c) un promotor químicamente inducido, y (d) sobreexpresión del promotor modificado por ingeniería genética por ejemplo con factores de transcripción derivados de un dedo de zinc (Greisman y Pabo, 1997, Science 275: 657).

La transcripción del TFSRP puede ser modulada utilizando factores de transcripción derivados de los dedos de zinc (ZFP) como se describe en Greisman y Pabo, 1997 Science 275:657 y manufacturados por Sangamo Biosciences, Inc. Estos ZFP incluyen tanto un dominio de reconocimiento de ADN y un dominio funcional que provoca la activación o represión de un ácido nucleico objetivo tal como un ácido nucleico para TFSRP. Por lo tanto, se pueden crear los ZFP de activación y represión que específicamente reconozcan los promotores de TFSRP descritos anteriormente y utilizados para incrementar o disminuir la expresión de TFSRP en una planta, modulando así la tolerancia al estrés de la planta. La descripción también se relaciona con la identificación de los homólogos de LZ-2 como se define en la SEQ ID NO: 2, LZ-3 como se define en la SEQ ID NO: 5, DBF-2 como se define en la SEQ ID NO: 8, DBF-3 como se define en la SEQ ID NO: 11, BnDBF-1 como se define en la SEQ ID NO: 13, OsDBF-1 como se define en la SEQ ID NO: 15, o OsDBF-2 como se define en la SEQ ID NO: 17 en una planta objetivo así como el promotor del homólogo. Se describe además un método para incrementar la expresión de un gen de interés dentro de una célula huésped comparado con una variedad de tipo silvestre de la célula huésped, en donde se transcribe el gen de interés en respuesta a un TFSRP, que comprende: (a) transformar la célula huésped con un vector de expresión que contiene al ácido nucleico que codifica para TFSRP, y (b) expresar el TFSRP dentro de la célula huésped, incrementando así la expresión del gen transcrito en respuesta al TFSRP, comparado con una variedad de tipo silvestre de la célula huésped.

Además de introducir las secuencias de ácido nucleico para TFSRP en plantas transgénicas, estas secuencias pueden también ser utilizadas para identificar un organismo como *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, *Oryza sativa*, o un familiar cercano de los mismos. También, pueden ser utilizados para identificar la presencia de *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, *Oryza sativa*, o una familiar los mismos en una población mixta de microorganismos. Se describen secuencias de ácido nucleico de una cantidad de genes de *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, y *Oryza sativa*. Por medio del sondeo de ADN genómico extraído de un cultivo de una población única o mixta de microorganismos bajo condiciones rigurosas con una sonda que abarca una región de un gen que es única para este organismo, se puede comprobar si este organismo está presente.

Además, las moléculas de ácido nucleico y de polipéptido pueden servir como marcadores para regiones específicas del genoma. Esto tiene utilidad no solamente en el mapeo del genoma, sino también en estudios funcionales de de polipéptidos de *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, o *Oryza sativa*. Por ejemplo, para identificar la región del genoma con la cual se enlaza un polipéptido particular de enlazamiento del ADN de *Physcomitrella patens*, el genoma de *Physcomitrella patens* podría ser digerido, y los fragmentos incubados con el polipéptido de enlazamiento del ADN. Aquellos fragmentos que enlazan al polipéptido pueden ser sondados adicionalmente con las moléculas de ácido nucleico de la invención, preferiblemente con marcadores fácilmente detectables. El enlazamiento de tal molécula de ácido nucleico con el fragmento de genoma permite la localización del fragmento con el mapa del genoma de *Physcomitrella patens*, y, cuando se lleva a cabo múltiples veces con diferentes enzimas, facilita una determinación rápida de la secuencia de ácido nucleico con la cual se enlaza el polipéptido. Además, las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden ser suficientemente idénticas a las secuencias de especies relacionadas de tal manera que estas moléculas de ácido nucleico pueden servir como marcadoras para la construcción de un mapa genómico en musgos relacionados.

Las moléculas de ácido nucleico para TFSRP son también útiles para estudios evolucionarios y estructurales del polipéptido. Los procesos metabólicos y de transporte en los cuales participan las moléculas de la invención son utilizados por medio de una gran variedad de células procariotas y eucariotas; por medio de la comparación de las secuencias de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención con aquellas que codifican enzimas

5 similares de otros organismos, se puede evaluar la relación evolucionaria de los organismos. En forma similar, tal comparación permite una valoración de qué regiones de la secuencia están conservadas y cuáles no, que puede ayudar a determinar aquellas regiones del polipéptido que son esenciales para el funcionamiento de la enzima. Este tipo de determinación es valiosa para estudios de modificación genética del polipéptido y puede dar una indicación de lo que puede tolerar el polipéptido en términos de mutagénesis sin pérdida de la función.

La manipulación de las moléculas de ácido nucleico para TFSRP puede resultar en la producción de los TFSRP que tienen diferencias funcionales de los TFSRP de tipo silvestre. Estos polipéptidos pueden ser mejorados en eficiencia o actividad, pueden estar presentes en mayor número en la célula de lo usual, o pueden disminuir en eficiencia o actividad.

10 Existen una serie de mecanismos por medio de los cuales la alteración de un TFSRP puede afectar directamente la respuesta al estrés y/o la tolerancia al estrés. En el caso de plantas que expresen los TFSRP, un mayor transporte puede conducir a una mejor repartición de sal y/o de soluto dentro del tejido y los órganos de la planta. Ya sea aumentando el número o la actividad de moléculas transportadoras que exportan moléculas iónicas desde la célula, puede ser posible afectar la tolerancia a la sal de la célula.

15 El efecto de la modificación genética en plantas, *C. glutamicum*, hongos, algas, o ciliados sobre la tolerancia al estrés puede ser evaluado por medio del crecimiento de microorganismos modificados o planta bajo condiciones inferiores a las adecuadas y luego analizando las características de crecimiento y/o el metabolismo de la planta. Tales técnicas de análisis son bien conocidas por alguien capacitado en el arte, e incluyen peso seco, peso húmedo, síntesis de polipéptidos, síntesis de carbohidratos, síntesis de lípidos, tasas de evapotranspiración, siembra general y/o rendimiento del cultivo, floración, reproducción, colocación de la semilla, crecimiento de la raíz, tasas de respiración, tasas de fotosíntesis, etc. (Aplicaciones de HPLC en Bioquímica en: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol. 17; Rehm et al., 1993, Biotechnology, vol. 3, Capítulo III: Product recovery y purificación, páginas 469 - 714, VCH: Weinheim; Belter, P. A. et al., 1988, Bioseparations: downstream processing for biotechnology, John Wiley y Sons; Kennedy, J. F. y Cabral, J. M. S., 1992, Recovery processes for biological materials, John Wiley y Sons; Shaeiwitz, J. A. y Henry, J. D., 1988, Biochemical separations, en: Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, vol. B3, Capítulo 11, páginas 1 - 27, VCH: Weinheim; y Dechow, F. J., 1989, Separation y purificación techniques in biotechnology, Noyes Publications.

25 Por ejemplo, los vectores de expresión de levadura que contienen los ácido nucleico descritos aquí, o los fragmentos de los mismos, pueden ser construidos y transformados en *Saccharomyces cerevisiae* utilizando protocolos estándar. Las células transgénicas resultantes pueden ser evaluadas luego para el fallo o alteración de su tolerancia al estrés por sequía, sal, y temperatura. En forma similar, los vectores de expresión de la planta que contienen los ácidos nucleico divulgados aquí, o fragmentos de los mismos, pueden ser construidos y transformados dentro de una célula de una planta apropiada tal como *Arabidopsis*, soja, colza, maíz, trigo, *Medicago truncatula*, etc., utilizando protocolos estándar. Las células transgénicas resultantes y/o las plantas derivadas de las mismas pueden ser luego ensayadas por la falla o alteración de su tolerancia la sequía, sal, temperatura, y doblamiento.

30 La modificación por ingeniería genética de uno o más genes para TFSRP puede resultar también en TFSRP que tienen actividades alteradas que impactan indirectamente la respuesta al estrés y/o tolerancia al estrés de algas, plantas, ciliados u hongos u otros microorganismos como *C. glutamicum*. Por ejemplo, los procesos bioquímicos normales de metabolismo resultan en la producción de una variedad de productos (por ejemplo, peróxidos de hidrógeno y otras especies reactivas de oxígeno) que pueden interferir activamente con estos mismos procesos metabólicos. Por ejemplo, se sabe que el peroxinitrito nitra cadenas laterales de tirosina, inactivando así algunas enzimas que tienen tirosina en el sitio activo (Groves, J. T., 1999 Curr. Opin. Chem. Biol. 3(2): 226 - 235). Aunque estos productos son típicamente excretados, las células pueden ser genéticamente alteradas para transportar más productos de lo que es típico para una célula de tipo silvestre. Por medio de la optimización de la actividad de uno o más TFSRP que están involucrados en la exportación de moléculas específicas, tal como moléculas de sal, puede ser posible mejorar la tolerancia al estrés de la célula.

40 Adicionalmente, las secuencias divulgadas aquí, o fragmentos de las mismas, pueden ser utilizadas para generar mutaciones desactivadas en los genomas de diferentes organismos, tales como bacterias, células de mamífero, células de levadura, y células de plantas (Girke, T., 1998, The Plant Journal 15: 39 - 48). Las células desactivadas resultantes pueden ser luego evaluadas por su habilidad o capacidad para tolerar diferentes condiciones de estrés, su respuesta a diferentes condiciones de estrés, y el efecto sobre el fenotipo y/o el genotipo de la mutación. Para otros métodos de inactivación de genes, ver la Patente de los Estados Unidos No. 6.004.804 "Non-Chimeric Mutational Vectors" y Puttaraju et al., 1999, Spliceosome-mediated ARN trans-splicing as a tool for gene therapy, Nature Biotechnology 17: 246 - 252.

55 Las estrategias de mutagénesis anteriormente mencionadas para los TFSRP que resultan en mayor resistencia a la tolerancia no pretenden constituirse en limitantes; las variaciones sobre estas estrategias serán fácilmente evidentes para alguien capacitado en el arte. Utilizando tales estrategias, e incorporando los mecanismos divulgados aquí, se

pueden utilizar las moléculas de ácido nucleico y de polipéptido para generar algas, ciliados, plantas, hongos, u otros microorganismos como *C. glutamicum* que expresan moléculas mutadas de polipéptido y de ácido nucleico para TFSRP de tal manera que se mejora la tolerancia al estrés.

5 La presente invención también provee anticuerpos que se enlazan específicamente con un TFSRP, o una porción del mismo, como los codificados por un ácido nucleico descrito aquí. Se pueden elaborar los anticuerpos por medio de muchos métodos bien conocidos. Ver, por ejemplo Harlow y Lane, "Antibodies; A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, (1988). En resumen, se puede inyectar antígeno purificado en un animal en una cantidad y en intervalos suficientes para obtener una respuesta inmune. Los anticuerpos pueden ser ya sea purificados directamente, o se pueden obtener células de bazo del animal. Las células pueden ser luego fusionadas con una línea de células inmortales y secretadas por secreción del anticuerpo. Los anticuerpos pueden ser usados para seleccionar bibliotecas de clones de ácido nucleico para células que secretan al antígeno. Aquellos clones positivos pueden ser luego secuenciados. Ver, por ejemplo, Kelly et al., 1992, *Bio/Technology* 10: 163 - 167; Bebbington et al., 1992, *Bio/Technology* 10: 169 - 175).

15 Las frases "se enlaza selectivamente" y "se enlaza específicamente" con el polipéptido se refiere a una reacción de enlazamiento que es determinante de la presencia del polipéptido en una población heterogénea de polipéptidos y otros compuestos biológicos. Por lo tanto, bajo las condiciones diseñadas del inmunoensayo, los anticuerpos especificados enlazados a un polipéptido particular no se enlazan en una cantidad suficiente con otros polipéptidos presentes en la muestra. El enlazamiento selectivo de un anticuerpo bajo tales condiciones puede requerir un anticuerpo que es seleccionado por su especificidad por un polipéptido particular. Una variedad de formatos de inmunoensayo pueden ser utilizados para seleccionar anticuerpos que se enlazan selectivamente con un polipéptido particular. Por ejemplo, se utilizan rutinariamente inmunoensayos ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos selectivamente inmunoreactivos con un polipéptido. Ver Harlow y Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Publications, New York, (1988), para una descripción de formatos de inmunoensayos y de condiciones que pueden ser utilizadas para determinar el enlazamiento selectivo.

25 En algunos casos, es deseable preparar anticuerpos monoclonales de diferentes huéspedes. Una descripción de técnicas para la preparación de tales anticuerpos monoclonales puede ser encontrada en Stites et al., eds., "Basic y Clinical Immunology", (Lange Medical Publications, Los Altos, Calif., Fourth Edition) y las referencias citadas allí, y en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual," (Cold Spring Harbor Publications, New York, 1988).

## EJEMPLOS

### 30 Ejemplo 1

#### *Crecimiento de cultivos de Physcomitrella patens*

Para este estudio, se utilizaron plantas de la especie *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. de la colección de la sección de estudios genéticos de la Universidad de Hamburgo. Se originan en la cepa 16/14 recolectada por H.L.K. Whitehouse en Gransden Wood, Huntingdonshire (Inglaterra), que fue subcultivada a partir de una espora por Engel (1968, *Am. J. Bot.* 55, 438 - 46). La proliferación de las plantas fue llevada a cabo por medio de esporas y por medio de regeneración de los gametofitos. El protonema desarrollado a partir de la espora haploide como un cloronema rico en cloroplastos y un caulonema bajo en cloroplastos, sobre el cual se formaron brotes formados aproximadamente después de 12 días. Estos crecieron para producir gametóforos que producen anteridios y arquegonios. Después de la fertilización, resultó el esporofito diploide con una seta corta y la cápsula de la espora, en los cuales maduraron las meiosporas.

45 Se llevó a cabo el cultivo en una cámara climática a una temperatura ambiente de 25°C y una intensidad de luz de 55 micromols<sup>-1</sup>m<sup>2</sup> (luz blanda; tubo fluorescente TL 65 W/25 de Philips) y un cambio luz/día de 16/8 horas. El musgo fue o bien modificado en cultivo líquido utilizando medio Knop de acuerdo con Reski y Abel (1985, *Planta* 165: 354 - 358) o cultivado sobre medio sólido Knop utilizando agar Oxoid al 1% (Unipath, Basingstoke, Inglaterra). Los protonemas utilizados para el aislamiento de ARN y ADN fueron cultivados en cultivos líquidos aireados. Los protonemas fueron cortados cada 9 días y transferidos a medio de cultivo fresco.

### Ejemplo 2

#### *Aislamiento del ADN total de plantas*

50 Los detalles para el aislamiento del ADN total con relación a la elaboración de un gramo de peso fresco de material de la planta. Los materiales utilizados incluyen los siguientes amortiguadores: amortiguador CTAB: bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetilamonio al 2% (p/v) (CTAB); Tris HCl 100 mM pH 8,0; NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM; amortiguador N-Laurilsarcosina: N-laurilsarcosina al 10% (p/v); Tris HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 20 mM.

Se trituró el material de la planta bajo nitrógeno líquido en un mortero para producir un polvo fino y se lo transfirió a tubos Eppendorf de 2 ml. Se cubrió luego el material congelado de la planta con una capa de 1 ml de amortiguador de descomposición (1 ml de amortiguador CTAB, 100 ml de amortiguador N-laurilsarcosina, 20 ml de β-mercaptoetanol, y 10 ml de solución de proteinasa K, 10 mg/ml) y se incubó a 60°C durante una hora con agitación continua. Se distribuyó el homogenato obtenido en dos tubos Eppendorf (2 ml) y se extrajo dos veces por medio de agitación con el mismo volumen de cloroformo/isoamil alcohol (24:1). Para la separación de fases, se llevó a cabo una centrifugación a 8000 x g y temperatura ambiente durante 15 minutos en cada caso. Se precipitó luego el ADN a -70°C durante 30 minutos utilizando isopropanol enfriado con hielo. Se sedimentó el ADN precipitado a 4°C y 10.000 g durante 30 minutos y se resuspendió en 180 ml de amortiguador TE (Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6). Para purificación adicional, se trató el ADN con NaCl (concentración final 1,2 M) y precipitó nuevamente a -70°C durante 30 minutos utilizando dos veces el volumen de etanol absoluto. Después de una etapa de lavado con etanol al 70%, se secó el ADN y posteriormente recogió en 50 ml de H<sub>2</sub>O + ARNasa (concentración final de 50 mg/ml). Se disolvió el ADN durante la noche a 4°C, y posteriormente se llevó a cabo la digestión con ARNasa a 37°C durante 1 hora. El almacenamiento del ADN se hizo a 4°C.

### 15 Ejemplo 3

#### *Aislamiento de ARN total y poli-(A)+ ARN y construcción de biblioteca de ADNc de Physcomitrella patens*

Para la investigación de transcritos, se aislaron tanto el ARN total como poli(A)+ ARN. Se obtuvo el ARN total a partir de protonemas de 9 días de tipo silvestre de acuerdo con el método GTC (Reski et al., 1994, Mol. Gen. Genet., 244: 352 - 359). Se aisló el poli(A)+ ARN utilizando Dyna BeadsR (Dyna, Oslo, Noruega) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después de la determinación de la concentración del ARN o del poli(A)+ ARN, se precipitó el ARN por medio de la adición de volúmenes de 1/10 de acetato de sodio 3 M pH 4,6 y 2 volúmenes de etanol y se almacena a -70°C.

Para la construcción de una biblioteca de ADNc, se logró la síntesis de la primera hebra utilizando transcriptasa inversa del Virus de Leucemia de Múrido (Roche, Mannheim, Alemania) e iniciadores oligo-d(T), la síntesis de la segunda hebra por medio de incubación con enzima Klenow de ADN polimerasa I y digestión con ARNasa H a 12°C (2 horas), 16°C (1 hora), y 22°C (1 hora). Se detuvo la reacción por medio de incubación a 65°C (10 minutos) y posteriormente se la transfirió sobre hielo. Se despuntaron las moléculas de ADN bicatenario por medio de T4-ADN-polimerasa (Roche, Mannheim) a 37°C (30 minutos). Se removieron los nucleótidos por medio de extracción en fenol/cloroformo y columnas rotatorias Sefadex G50. Se ligaron adaptadores EcoRI (Pharmacia, Freiburg, Alemania) a los extremos del ADNc por medio de T4-ADN-ligasa (Roche, 12°C, durante la noche) y fosforilaron por medio de incubación con proteína quinasa (Roche, 37°C, 30 minutos). Se sometió esta mezcla a separación sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión. Se eluyeron las moléculas de ADN mayores a 300 pares de bases del gel, se extrajo con fenol, se concentró sobre columnas Elutip-D (Schleicher y Schuell, Dassel, Alemania), y se las ligó a los brazos del vector y empacó en fagos ZAPII lambda o fagos ZAPExpress lambda utilizando el Gigapack Gold Kit (Stratagene, Ámsterdam, Países Bajos), utilizando el material y siguiendo las instrucciones del fabricante.

### Ejemplo 4

#### *Secuenciación y anotación de la función de los EST de Physcomitrella patens*

Se utilizaron bibliotecas de ADNc como se describe en el Ejemplo 3 para la secuenciación del ADN de acuerdo con métodos estándar, y en particular, por medio del método de terminación de la cadena utilizando el Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit de ABI PRISM (Perkin-Elmer, Weiterstadt, Alemania). Se llevó a cabo una secuenciación aleatoria posterior a la recuperación preparativa del plásmido a partir de bibliotecas de ADNc a través de escisión de masa *in vivo*, nueva transformación, y posterior siembra en placa de DH10B sobre placas de agar (los detalles del material y los protocolos es de Stratagene, Ámsterdam, Países Bajos). Se preparó el ADN del plásmido a partir de cultivos de *E. coli* que crecieron durante la noche en caldo de cultivo Luria que contenía ampicilina (Ver Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) sobre un robot de preparación de ADN de Qiagene (Qiagen, Hilden) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Se utilizaron iniciadores de secuenciación con las siguientes secuencias de nucleótidos:

5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3' SEQ ID NO: 19

5'-CTAAAGGGAACAAAAGCTG-3' SEQ ID NO: 20

5'-TGTA AACGACGGCCAGT-3' SEQ ID NO: 21

Se procesaron y anotaron las secuencias utilizando el paquete del software EST-MAX suministrado comercialmente por Bio-Max (Múnich, Alemania). El programa incorpora prácticamente todos los métodos bioinformáticos

importantes para la caracterización funcional y estructural de secuencias de polipéptido. Los algoritmos más importantes incorporados en EST-MAX son: FASTA (Búsquedas en bases de datos de secuencias muy sensibles con estimados de significación estadística; Pearson W. R., 1990, Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA, *Methods Enzymol.* 183: 63 - 98); BLAST (Búsquedas en bases de datos de secuencias muy sensibles con estimados de significación estadística; Altschul S. F. et al., Basic local alignment search tool, *Journal of Molecular Biology* 215: 403 - 10); PREDATOR (Predicción altamente precisa de la estructura secundaria de secuencias individuales y múltiples, Frishman, D. y Argos, P., 1997, 75% accuracy in polypeptide secondary structure prediction, *Polypeptides*, 27: 329 - 335); CLUSTALW (Alineación se múltiples secuencias; Thompson, J. D. et al., 1994, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673 - 4680); TMAP (Predicción de la región transmembrana de secuencias alineadas en forma múltiple; Persson, B. y Argos, P., 1994, Prediction of transmembrane segments in polypeptides utilizing multiple sequence alignments, *J. Mol. Biol.* 237: 182 - 192); ALOM2 (Predicción de la región transmembrana de secuencias individuales; Klein, P. et al., Prediction of polypeptide function from sequence properties: A discriminate analysis of a database. *Biochim. Biophys. Acta* 787: 221 - 226 (1984). Versión 2 por Dr. K. Nakai); PROSEARCH (Detección de los patrones de secuencia del polipéptido PROSITE; Kolakowski L. F. Jr. et al., 1992, ProSearch: fast searching of polypeptide sequences with regular expression patterns related to polypeptide structure y function, *Biotechniques* 13: 919 - 921); BLIMPS (Búsquedas de similitud contra una base de datos de bloques sin la introducción de huecos; J. C. Wallace y Henikoff S., 1992); y PATMAT (Un programa de búsqueda y extracción para secuencia, patrón y consultas en bloque y bases de datos; CABIOS 8: 249 - 254. Escrito por Bill Alford.).

### Ejemplo 5

*Identificación de los ORF de Physcomitrella patens correspondientes a LZ-2, LZ-3, DBF-2, y DBF-3*

Los ADNc parciales de *Physcomitrella patens* (los EST) correspondientes a PpLZ-2 (SEQ ID NO: 1), PpLZ-3 (SEQ ID NO: 4), PpDBF-2 (SEQ ID NO: 7), y PpDBF-3 (SEQ ID NO: 10) fueron identificados en el programa de secuenciación del EST de *Physcomitrella patens* utilizando el programa EST-MAX a través del análisis BLAST como se muestra en las Tablas 1 - 4.

Tabla 1

Grado de identidad y de similitud de los aminoácidos de PpLZ-2 y otras proteína homólogas (Se utilizó un programa de comparación por parejas: penalización por hueco: 10; penalización por extensión del hueco: 0,1; matriz de puntuación: blosum62)					
Swiss-Prot #	Q99090	P93839	P93405	Q03462	Q9LKT9
Nombre de la proteína	Proteína CPRF-2 inducible por luz	G/HBF-1	Proteína BZIP	Proteína 1 de Heterodimerización Opaque2 (OHP1)	Proteína hipotética T32B20.C.
Especie	<i>Petroselinum Crispum</i> (Perejil) ( <i>Petroselinum hortense</i> )	<i>Glycine max</i> (Soja)	<i>Oryza sativa</i> (Arroz)	<i>Zea mays</i> (Maíz)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Berro oreja de ratón)
% de identidad	29%	28%	27%	27%	28%
% de similitud	38%	34%	36%	34%	36%

Tabla 2

Grado de identidad y de similitud de los aminoácidos de PpLZ-3 y otras proteína homólogas (Se utilizó un programa de comparación por parejas: penalización por hueco: 10; penalización por extensión del hueco: 0,1; matriz de puntuación: blosum62)					
Swiss-Prot #	P93839	Q99090	Q03462	Q41757	Q41786
Nombre de la proteína	G/HBF-1	Proteína CPRF-2 inducible por luz	Proteína 1 de Heterodimerización Opaque2 (OHP1)	Proteína 1B de Heterodimerización Opaque-2	Proteína 2 de Heterodimerización Opaque2
Especie	Glycine max (Soja)	Petroselinum Crispum (Perejil)	Zea mays (Maíz)	Zea mays (Maíz)	Zea mays (Maíz)
% de identidad	35%	31%	28%	27%	30%
% de similitud	45%	39%	38%	37%	40%

Tabla 3

Grado de identidad y de similitud de los aminoácidos de PpDBF-2 y otras proteína homólogas (Se utilizó un programa de comparación por parejas: penalización por hueco: 10; penalización por extensión del hueco: 0,1; matriz de puntuación: blosum62)					
Swiss-Prot #	022523	Q96327	Q9LKG4	P50580	Q9UQ80
Nombre de la proteína	Proteína GBP16 de enlazamiento de ADN	Proteína Putativa G2P de enlazamiento de ADN nuclear (ATG2)	Proteína putativa de enlazamiento de ADN	Proteína 1 asociada con proliferación	Proteína del ciclo celular
Especie	Oryza sativa (Arroz)	Arabidopsis thaliana (Berro oreja de ratón)	Atriplex hortensis (Espinaca de montaña)	Mus musculus (Ratón)	Homo sapiens (Humano)
% de identidad	75%	74%	74%	46%	46%
% de similitud	84%	82%	84%	59%	59%

Tabla 4

Grado de identidad y de similitud de los aminoácidos de PpDBF-3 y otras proteína homólogas (Se utilizó un programa de comparación por parejas: penalización por hueco: 10; penalización por extensión del hueco: 0,1; matriz de puntuación: blosum62)					
Swiss-Prot #	026807	Q9KQK0	Q9KSM0	Q9VGV4	Q9RUK6
Nombre de la proteína	Regulador transcripcional	Proteína relacionada con PILB	Proteína relacionada con PILB	Proteína CG6584	Proteína relacionada con MSRA
Especie	Methanobacterium thermoautotrophicum	Vibrio cholerae	Vibrio cholerae	Drosophila melanogaster (Mosca de la fruta)	Deinococcus radiodurans
% de identidad	45%	38%	40%	36%	34%
% de similitud	53%	49%	47%	44%	42%

**Ejemplo 6**

5 *Clonación del ADNc de longitud completa que codifica para LZ-2, LZ-3, DBF-2, DBF-3, BnDBF-1, OsDBF-1, y OsDBF-2*

Los clones de longitud completa correspondientes a PpDBF-2 (SEQ ID NO: 8) y PpDBF-3 (SEQ ID NO: 11) fueron obtenidos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores específicos de los genes (Ver la Tabla 5) y el EST original como molde ya que ellos eran de longitud completa. Las condiciones para la reacción están descritas más adelante bajo el título "Amplificación de longitud completa".

- 10 Para aislar los clones de longitud completa que codifican para PpLZ-2 (SEQ ID NO: 2), y PpLZ-3 (SEQ ID NO: 5) de *Physcomitrella patens*, se crearon bibliotecas de ADNc con el kit de amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech Laboratories) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó ARN total aislado como se describe en el Ejemplo 3 como molde. Se trataron los cultivos antes del aislamiento del ARN de la siguiente forma: Estrés por Salinidad: 2, 6, 12, 24, 48 horas con medio suplementado con NaCl 1 M; Estrés por frío: 4°C para los mismos intervalos de tiempo
- 15 que para la sal; Estrés por sequía: se incubaron los cultivos sobre papel filtro seco para los mismos intervalos de tiempo mencionados arriba. Se extrajo luego el ARN y utilizó para aislamiento.

Protocolo de 5' RACE

- 20 Las secuencias de EST de PpLZ-2 (SEQ ID NO: 1) y PpLZ-3 (SEQ ID NO: 4) identificadas a partir de la búsqueda en la base de datos como se describe en el Ejemplo 5 fueron utilizadas para diseñar oligos para RACE (Ver la Tabla 5). Las secuencias extendidas para estos genes fueron obtenidas llevando a cabo una Amplificación Rápida de los Extremos del ADNc por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (RACE PCR) utilizando el kit de PCR Advantage 2 (Clontech Laboratories) y el kit de amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech Laboratories) utilizando un Termociclador Biometra T3 siguiendo las instrucciones del fabricante.

- 25 Las secuencias obtenidas a partir de las reacciones de RACE contenían al extremo 5' de las regiones de codificación de longitud completa de PpLZ-2, y PpLZ-3 y fueron utilizadas para diseñar oligos para la clonación de longitud completa de los genes respectivos (Ver a continuación bajo el título "Amplificación de longitud completa").

Amplificación de longitud completa

- 30 Los clones de longitud completa correspondientes a PpDBF-2 (SEQ ID NO: 8) y PpDBF-3 (SEQ ID NO: 11) fueron obtenidos por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores específicos del gen (Ver la Tabla 5) y el EST original como molde. Las condiciones para la reacción fueron condiciones estándar con PWO ADN polimerasa (Roche). La PCR fue realizada de acuerdo con condiciones estándar y los protocolos del fabricante (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press,

Cold Spring Harbor, NY, Termociclador T3 de Biometra). Los parámetros para la reacción fueron: cinco minutos a 94°C seguido por cinco ciclos de un minuto a 94°C, un minuto a 50°C y 1,5 minutos a 72°C. Esto fue seguido por veinticinco ciclos de un minuto a 94°C, un minuto a 65°C, y 1,5 minutos a 72°C.

5 Los clones para PpLZ-2 (SEQ ID NO: 2), y PpLZ-3 (SEQ ID NO: 5) fueron aislados por repetición del método RACE pero utilizando los iniciadores específicos del gen como se presenta en la Tabla 5.

10 Los fragmentos amplificados fueron extraídos del gel de agarosa con un kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen) y ligados dentro del vector TOPO pCR 2.1 (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los vectores recombinantes fueron transformados en células Top10 (Invitrogen) utilizando condiciones estándar (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Las células transformadas fueron seleccionadas sobre agar LB que contenía 100 mg/ml de carbenicilina, 0,8 mg de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido) y 0,8 mg de IPTG (isopropiltio-β-D-galactósido) y cultivadas durante la noche a 37°C. Se seleccionaron y utilizaron las colonias blancas para inocular 3 ml de LB líquido que contenía 100 mg/ml de ampicilina y se las cultivó durante la noche a 37°C. Se extrajo el ADN del plásmido utilizando el kit Spin Miniprep de QIAprep (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los análisis de clones posteriores y el mapeo de restricción fueron llevados a cabo de acuerdo con técnicas estándar de biología molecular (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Tabla 5

Gen	Sitios en el producto final	Método de aislamiento	Iniciadores Race	Iniciador para RT-PCR
PpDBF-2	XmaI/EcoRV	PCR del clon original del EST		<b>RC023 (SEQ ID NO:22)</b> 5'ATCCCGGGACGCG ATGTCGGATGATGAG GTGA3'  <b>RC024 (SEQ ID NO:23)</b> 5'CTGATATCAGTCTA GGCTGAAGTGTCCAT TGT3'
PpDBF-3	XmaI/ EcoRV	PCR del clon original del EST		<b>RC333 (SEQ ID NO:24)</b> 5'ATCCCGGGCGTCGC AGTTTACGTGTGTTT ACC3'  <b>RC018 (SEQ ID NO:25)</b> 5'CTGATATCTACCTA GTTCCTCTCTTCTTGC TTC3'
PpLZ-2	XmaI/SacI	5' RACE y RT-PCR para el clon FL	<b>RC048 (SEQ ID NO:26):</b> 5'GCCCAGTCAT GGCGACTGCAGC AC3'	<b>RC336 (SEQ ID NO:27)</b> 5'ATCCCGGGTCAAG CTACGACGCCTCAAT CTTC3'  <b>RC337 (SEQ ID NO:28)</b> 5'GCGAGCTCTCGTCA TCAGTTAGCATTGGC GTCGT3'

(continuación)

Gen	Sitios en el producto final	Método de aislamiento	Iniciadores Race	Iniciador para RT-PCR
PpLZ-3	Xmal/SacI	5' RACE y RT-PCR para el clon de longitud completa	<b>RC060 (SEQ ID NO:29)</b> 5'TAGCGCTCATG GGTGCGCATTGA AC3'	<b>RC379 (SEQ ID NO:30)</b> 5'ATCCCGGGAGTTCC TCCACATTCCCGAC AATC3'  <b>RC380 (SEQ ID NO:31)</b> 5'GCGAGCTCGCCCTG AACTCTCGCTCTCGC TTG3'

Recolección del tejido, aislamiento del ARN, y construcción de la biblioteca de ADNc

- 5 Se cultivaron plantas de canola y de arroz bajo una variedad de condiciones y tratamientos, y se recolectaron diferentes tejidos en diferentes etapas de desarrollo. El crecimiento de la planta y la recolección fueron hechos en una forma estratégica de tal manera que la probabilidad de recolectar todos los genes expresables en al menos una o más de las bibliotecas resultantes sea mayor. Se aisló el ARNm como se describe en el Ejemplo 3 de cada una de las muestras recolectadas, y se construyeron bibliotecas de ADNc. No se utilizaron etapas de amplificación en el
- 10 proceso de producción de la biblioteca con el propósito de minimizar la redundancia de genes dentro de la muestra y para retener la información de la expresión. Todas las bibliotecas fueron generadas 3' a partir de ARNm purificado sobre columnas de oligo dT. Se tomaron al azar colonias de la transformación de la biblioteca de ADNc en *E. coli* y se las colocó en placas de microtitulación.

Hibridación de la sonda

- 15 Se aisló el ADN del plásmido de las colonias de *E. coli* y luego se lo colocó sobre membranas. Se hibridaron secuencialmente una batería de 288 oligonucleótidos de 7-mer marcados en forma radioactiva con <sup>33</sup>P con estas membranas. Para incrementar el rendimiento, se procesaron membranas por duplicado. Después de cada hibridación, se capturó la imagen de una transferencia durante un barrido para obtención de una fosforoimagen para generar un perfil de hibridación para cada oligonucleótido. Esta imagen de datos sin procesar fue transferida
- 20 automáticamente a través de LIMS a un computador. La identidad absoluta fue mantenida por medio de la formación de un código de barras para el casete, filtro, y orientación de la imagen dentro del casete. Los filtros fueron luego tratados utilizando condiciones relativamente suaves para retirar las sondas enlazadas y retornarlas a las cámaras de hibridación para otra ronda de hibridación. Se repitió el ciclo de hibridación y formación de imágenes hasta completar el grupo de 288 oligómeros.
- 25 Después de completar las hibridaciones, se generó un perfil para cada mancha (que representa un inserto de ADNc), como aquel de los 288 oligonucleótidos de 7-mer marcados en forma radioactiva con <sup>33</sup>P enlazados a esa mancha particular (inserto de ADNc), y en qué medida. Este perfil se define como la firma generada a partir de ese clon. Cada firma de un clon fue comparada con todas las otras firmas generadas a partir del mismo organismo para
- 30 identificar grupos de firmas relacionadas. Este proceso "clasifica" todos los clones de un organismo dentro de grupos antes de la secuenciación.

Aislamiento del gen

- Los clones fueron clasificados en diferentes grupos con base en sus firmas que tengan idéntica o similar hibridación. Un grupo debe ser indicativo de la expresión de un gen individual o familia de genes. Un subproducto de este análisis es un perfil de expresión para la abundancia de cada gen en una biblioteca particular. Se utilizó una ruta de
- 35 secuenciación del extremo 5' para predecir la función de los clones particulares por medio de búsquedas de motivos y de similitudes en bases de datos de secuencias.

- La secuencia de ADN de longitud completa de la DBF-3 de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO: 8) fue sometida a alineación contra bases de datos patentadas de cónfigos de canola, arroz, y soja con un valor E de E-10. (Altschul, Stephen et al. Gapped BLAST y PSI\_BLAST: una nueva generación del programa de búsqueda de bases de datos de proteína. Nucleic Acids Res. 25: 3389 - 3402). Todos los aciertos de cónfigos fueron analizados para las
- 40 secuencias putativas de longitud completa, y los clones más largos que representan los cónfigos putativos de longitud completa fueron completamente secuenciados. Tres de tales cónfigos aislados de la base de datos patentada de cónfigos son BnDBF-1, OsDBF-1, y OsDBF-2. La homología de las secuencias de aminoácidos para

BnDBF-1, OsDBF-1, y OsDBF-2-1 con el estado del arte más cercano está indicada en la Tabla 6, Tabla 7, y Tabla 8, respectivamente.

Tabla 6

Grado de identidad y de similitud de los aminoácidos de BnDBF-1 y una proteína similar (se utilizó comparación por parejas: penalización por hueco: 10; penalización por extensión del hueco: 0,1; matriz de puntuación: blosum62)					
Nombre del gen	Secuencias de las bases públicas de datos	Nombre de la proteína	Especie	Identidad de secuencia (%)	Similitud de secuencia (%)
BnDBF-1	AAK93755	Proteína desconocida	Arabidopsis thaliana	75%	81%

5

Tabla 7

Grado de identidad y de similitud de los aminoácidos de OsDBF-1 y una proteína similar (se utilizó comparación por parejas: penalización por hueco: 10; penalización por extensión del hueco: 0,1; matriz de puntuación: blosum62)					
Nombre del gen	Secuencias de las bases públicas de datos	Nombre de la proteína	Especie	Identidad de secuencia (%)	Similitud de secuencia (%)
OsDBF-1	AAG51964	Regulador transcripcional putativo	Arabidopsis thaliana	56%	66%

Tabla 8

Grado de identidad y de similitud de los aminoácidos de OsDBF-2 y una proteína similar (se utilizó comparación por parejas: penalización por hueco: 10; penalización por extensión del hueco: 0,1; matriz de puntuación: blosum62)					
Nombre del gen	Secuencias de las bases públicas de datos	Nombre de la proteína	Especie	Identidad de secuencia (%)	Similitud de secuencia (%)
OsDBF-2	AAK93755	Proteína desconocida	Arabidopsis thaliana	59%	70%

### Ejemplo 7

- 10 *Modificación por medio de ingeniería genética de plantas de Arabidopsis tolerantes al estrés que expresan los genes LZ-3, DBF-2 y DBF-3 y reprimen LZ-2*

Construcción del vector binario:

- 15 El vector pLMNC53 (Mankin, 2000, PhD thesis, University of North Carolina) fue digerido con HindIII (Roche) y se rellenó el extremo romo con enzima Klenow y los dNTP 0,1 mM (Roche) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este fragmento fue extraído del gel de agarosa con un kit de extracción en gel de QIAquick (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El fragmento purificado fue luego digerido con EcoRI (Roche) de acuerdo con las instrucciones el fabricante. Este fragmento fue extraído del gel de agarosa con un kit de extracción en gel de QIAquick (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones el fabricante. El fragmento resultante de 1,4 kilobases, el casete de gentamicina, incluían al promotor NOS, al gen aacCI, y al terminador g7.

5 El vector pBlueScript fue digerido con EcoRI y SmaI (Roche) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se extrajo el fragmento resultante de un gel de agarosa con un Kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El vector pBlueScript digerido y los fragmentos del casete de gentamicina fueron ligados con T4 ADN Ligasa (Roche) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, uniendo los dos sitios EcoRI respectivos y uniendo el sitio HindIII de extremo romo con el sitio SmaI.

10 Se transformó el vector recombinante (pGMBS) en células Top10 (Invitrogen) utilizando condiciones estándar. Se seleccionaron las células transformadas sobre agar LB que contenía 100 µg/ml de carbenicilina, 0,8 mg de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido) y 0.8 mg de IPTG (isopropiltio-β-D-galactósido), y cultivadas durante la noche a 37°C. Se seleccionaron y utilizaron las colonias blancas para inocular 3 ml de LB líquido que contenía 100 mg/ml de ampicilina y se las cultivó durante la noche a 37°C. Se extrajo el ADN del plásmido utilizando el kit Spin Miniprep de QIAprep (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los análisis de clones posteriores y el mapeo de restricción fueron llevados a cabo de acuerdo con técnicas estándar de biología molecular (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY).

15 Tanto el vector pGMBS como el vector p1bxSuperGUS fueron digeridos con XbaI y KpnI (Roche) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, cortando el casete de gentamicina de pGMBS y produciendo la columna vertebral del vector p1bxSuperGUS. Se extrajeron los fragmentos resultantes de un gel de agarosa con un kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Estos dos fragmentos fueron ligados con T4 ADN ligasa (Roche) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

20 Se transformó el vector recombinante resultante (pGMBS) en células Top10 (Invitrogen) utilizando condiciones estándar. Se seleccionaron las células transformadas sobre agar LB que contenía 100 mg/ml de carbenicilina, 0,8 mg de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido) y 0.8 mg de IPTG (isopropiltio-β-D-galactósido), y cultivadas durante la noche a 37°C. Se seleccionaron y utilizaron las colonias blancas para inocular 3 ml de LB líquido que contenía 100 mg/ml de ampicilina y se las cultivó durante la noche a 37°C. Se extrajo el ADN del plásmido utilizando el kit Spin Miniprep de QIAprep (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los análisis de clones posteriores y el mapeo de restricción fueron llevados a cabo de acuerdo con técnicas estándar de biología molecular (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY).

Subclonación de PpLZ-2, PpLZ-3, PpDBF-2, y PpDBF-3 en el vector binario

30 Se subclonaron los fragmentos que contenían los diferentes factores de transcripción a partir de los vectores PCR2.1 TOPO recombinantes por medio de digestión doble con enzimas de restricción (Ver la Tabla 9) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se cortó el fragmento resultante del gel de agarosa con un Kit de extracción en gel QIAquick (QIAgen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y ligó dentro de los factores binarios pBPSJH001, escindidos con enzimas apropiadas (Ver la Tabla 9) y desfosforiló antes de la ligación. Los derivados del vector recombinante resultante pBPSJH001 contenían los factores e transcripción PpLZ-3, PpDBF-2, y PpDBF-3 en orientación sentido y PpLZ-2 en orientación antisentido bajo el control del súper promotor constitutivo.

Tabla 9

Se enlistan los nombres de diferentes constructos de los factores de transcripción de <i>Physcomitrella patens</i> utilizados para la transformación de la planta			
Gen	Enzimas usadas para generar un fragmento de gen	Enzimas usadas para restringir pBPSJH001	Constructo del vector binario
PpLZ-2	SmaI/Ecl136	SmaI/Ecl136	pBPSLVM017
PpLZ-3	XmaI/SacI	XmaI/Ecl136	pBPSLVM067
PpDBF-2	XmaI/EcoRV	XmaI/Ecl136	pBPSSH004
PpDBF-3	XmaI/EcoRV	XmaI/Ecl136	pBPSLVM011

Los vectores recombinantes fueron transformados en C58C1 y PMP90 de *Agrobacterium tumefaciens* de acuerdo a condiciones estándar (Hoefgen y Willmitzer, 1990).

Transformación de la planta

5 Se cultivaron plantas del ecotipo C24 de *Arabidopsis thaliana* y se las transformó de acuerdo con condiciones estándar (Bechtold, 1993, Acad. Sci. Paris. 316: 1194 - 1199; Bent et al., 1994, Science 265: 1856 - 1860).

Selección de plantas transformadas

10 Se esterilizaron semillas T1 de acuerdo a protocolos estándar (Xiong et al., 1999, Plant Molecular Biology Reporter 17: 159 - 170). Las semillas fueron sembradas en placa sobre medio de Murashige y Skoog (MS) (Sigma-Aldrich), agar al 0,6%, y suplementado con sacarosa al 1%, 150 mg/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich), y 2 µg/ml de benomilo (Sigma-Aldrich). Las semillas sobre placas fueron vernalizadas durante cuatro días a 4°C. Las semillas fueron germinadas en una cámara climática a una temperatura ambiente de 22°C y una intensidad de luz de 40 micromols<sup>-1m-2</sup> (luz blanca; tubo fluorescente TL 65 W/25 de Philips) y 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad del ciclo diario. Se seleccionaron las plántulas transformadas después de 14 días y se las transfirió a placas de agar al 0,6% con medio de MS, suplementado con sacarosa al 1% y se les permitió recuperarse durante cinco - siete días.

15 Selección por tolerancia a la sequía

20 Se transfirieron plántulas T1 a papel filtro estéril seco en una caja de Petri y se les permitió secarse durante dos horas con una RH del 80% (humedad relativa) en una Cabina de Crecimiento Sanyo MLR-350H, micromols<sup>-1m-2</sup> (luz blanca; tubo fluorescente TL 65 W/25 de Philips). Se disminuyó luego la RH hasta el 60%, y se secaron las plántulas durante ocho horas más. Se removieron luego las plántulas y se las colocó sobre placas de agar al 0,6% con medio MS suplementado con 2 µg/ml de benomilo (Sigma-Aldrich) y 0.5 g/L de MES (Sigma-Aldrich) y se hizo la calificación después de cinco días.

25 Bajo condiciones de estrés por sequía, las plantas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan PpDBF-3 mostraron una tasa de supervivencia del 42% (5 sobrevivientes de 12 plantas estresadas) para la selección por estrés, mientras el control no transformado mostró una tasa de supervivencia del 6% (1 sobreviviente de 18 plantas). Vale la pena mencionar que estos análisis fueron realizados con plantas T1. Los resultados serán mejores cuando se encuentre un expresador homocigoto fuerte.

Se seleccionan las plantas transgénicas que contienen PpLZ-2, PpLZ-3, o PpDBF-2 por su tolerancia mejorada a la sequía demostrando que la expresión del transgén confiere tolerancia a la sequía.

Tabla 10

Resumen de los ensayos de estrés por sequía			
Nombre del gen	Ensayo de estrés por sequía		
	Número de supervivientes	Número total de plantas	Porcentaje de supervivientes
PpDBF-3	5	12	42%
Control	1	18	6%

30

Selección por tolerancia al estrés

35 Se movieron las plántulas a cajas de Petri que contenían agar al 0,6% en medio de MS suplementado con sacarosa al 2% y 2 µg/ml de benomilo. Después de cuatro días, se incubaron las plántulas a 4°C durante 1 hora y luego se las cubrió con hielo picado. Se colocaron luego las plántulas en una Cámara Ambiental Environmental Specialist ES2000 y se incubó durante 3,5 horas comenzando a -1,0°C, disminuyendo 1°C por hora. Se incubaron las plántulas a -5,0°C durante 24 horas y luego se permitió que se descongelaran a 5°C durante 12 horas. Se retiró el agua y se clasificaron las plántulas después de 5 días.

Las plántulas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan PpLZ-3 mostraron una tasa de supervivencia del 40% (4 sobrevivientes de 10 plantas estresadas); mientras que el control no transformado mostró una tasa de supervivencia

del 0% (0 sobrevivientes de 22 plantas analizadas). Vale la pena mencionar que estos análisis fueron realizados con plantas T1. Los resultados serán mejores cuando se encuentra un expresador homocigoto fuerte.

Las plantas transgénicas que contienen PpLZ-2, PpDBF-2, o PpDBF-3 se seleccionan por su tolerancia mejorada al frío demostrando que la expresión del transgén confiere tolerancia al frío.

5

Tabla 11

Resumen de los ensayos de estrés por sequía			
Nombre del gen	Ensayo de estrés por sequía		
	Número de supervivientes	Número total de plantas	Porcentaje de supervivientes
PpLZ-3	4	10	40%
Control	0	22	0%

#### Selección por tolerancia a la sal

10 Las plántulas se transfieren a papel filtro remojado en medio de MS y se colocan sobre agar al 0,6% en medio de MS suplementado con 2 µg/ml de benomilo la noche anterior de la selección por tolerancia a la sal. Para la selección por tolerancia a la sal, se mueve el papel filtro con las plántulas a pilas de papel filtro estéril, remojadas en NaCl 50 mM, en una caja Petri. Después de dos horas, se mueve el papel filtro con las plántulas a pilas de papel filtro estéril, se remojan con NaCl 200 mM, en una caja de Petri. Después de dos horas, se mueve el papel filtro con las plántulas a pilas de papel filtro estéril, remojado en NaCl 600 mM, en una caja de Petri. Después de 10 horas, se mueven las plántulas a cajas de Petri que contienen agar al 0,6% en MS suplementado con 2 µg/ml de benomilo. Se califican las plántulas después de cinco días.

15

Se seleccionan las plántulas transgénicas por su tolerancia mejorada a la sal, demostrando que la expresión del transgén confiere tolerancia a la sal.

#### Ejemplo 8

##### *Detección de los transgenes LZ-2, LZ-3, DBF-2 y DBF-3 en las líneas transgénicas de Arabidopsis*

20 Se homogenizaron una hoja de una planta silvestre y una hoja de una planta transgénica de *Arabidopsis* en 250 µl del amortiguador bromuro de Hexadeciltrimetil amonio (CTAB) (CTAB al 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 8 mM, y Tris 20 mM pH 8,0) y 1 µl de β-mercaptoetanol. Se incubaron las muestras a 60 - 65°C durante 30 minutos y se añadieron luego 250 µl de cloroformo a cada muestra. Las muestras fueron sometidas a agitación tipo vórtice durante 3 minutos y centrifugadas durante 5 minutos a 18.000 x g. Se recogió el sobrenadante de cada muestra, y se añadieron 150 µl de isopropanol. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 15 minutos, y se centrifugó durante 10 minutos a 18.000 x g. Se lavó cada pella con etanol al 70%, se secó, y resuspendió en 20 µl de TE. Luego, se utilizaron 2,5 ml de la suspensión anterior en 50 µl de una reacción PCR utilizando *Taq* ADN polimerasa (Roche Molecular Biochemicals) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se utilizó el vector plásmido binario con cada gen clonado en él como control positivo, y se utilizó el ADN genómico C24 de tipo silvestre como control negativo en las reacciones PCR. Se analizaron diez microlitros de cada reacción PCR sobre gel de agarosa al 0,8%/bromuro de etidio. El programa de la PCR para la detección de LZ-2, DBF-2, y DBF-3 fue el siguiente: 1 ciclo de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 75°C y 3 minutos a 72°C, seguido por 14 ciclos del mismo ciclo excepto que la temperatura de la hibridación disminuyó 1 °C cada ciclo hasta 62°C; y luego 16 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62°C, y 3 minutos a 72°C. El programa de la PCR para LZ-3 fue de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 62°C, y 1 minuto a 72°C, seguido por 5 minutos a 72°C. Los iniciadores específicos del gen, y el tamaño de las bandas amplificadas (Tamaño del Producto Génico) se enlistan a continuación.

35

PpLZ-2:

RC336: 5'ATCCCGGGTCAAGCTACOACGCCTCAATCTTCC3' (SEQ ID NO: 27) y

RC337: 5'GCGAGCTCTCGTCATCAGTTAGCATTGGCGTCGT3' (SEQ ID NO: 28).

PpLZ-3:

RC1183: 5'GCACCGAGGAGCTGCGTGCGATGAA 3' (SEQ ID NO: 32) y

RC1184: 5' CGCTTAAGGTCACCGCCTGGTAGG 3' (SEQ ID NO: 33).

PpDBF-2

5 RC023: 5'ATCCCGGGACGCGATGTCGGATGATGAGGTGA3' (SEQ ID NO: 22) y

RC024: 5'CTGATATCAGTCTAGGCTGAAGTGTCCATTGT3' (SEQ ID NO: 23).

PpDBF-3

RC333: 5' ATCCCGGGCGTTCGAGTTTACGTGTGTTCCACC 3' (SEQ ID NO: 24) y

RC018: 5' CTGATATCTACCTAGTTCCTCTCTTCTTGCTTC 3' (SEQ ID NO: 25).

10 Se amplificaron exitosamente los transgenes a partir de las líneas transgénicas T1, pero no de la C24 de tipo silvestre. Este resultado indica que las plantas transgénicas T1 contienen al menos una copia de los transgenes. No hubo indicación de la existencia ya sea de genes muy similares o idénticos en el control no transformado de *Arabidopsis thaliana* que podría ser amplificado por medio de este método.

#### Ejemplo 9

15 *Detección del ARNm del transgén LZ-2, LZ-3, DBF-2, y DBF-3 en líneas transgénicas de Arabidopsis*

Se detectó la expresión del transgén utilizando RT-PCR. Se aisló el ARN total de plantas tratadas para estrés utilizando un procedimiento adaptado de (Verwoerd et al.,1989, Nuc. Acids Res. 17: 2362). Se recolectaron muestras de hojas (50 - 100 mg) y se las molió hasta un polvo fino en nitrógeno líquido. Se resuspendió el tejido molido en 500 µl de una mezcla 1:1 a 80°C, de fenol con amortiguador de extracción (LiCl 100 mM, Tris 100 mM pH 8, EDTA 10 mM, SDS al 1%), seguido por una breve agitación tipo vórtice para mezclar. Después de la adición de 250 ml de cloroformo, se sometió a agitación tipo vórtice cada muestra. Se centrifugaron luego las muestras durante 5 minutos a 12.000 x g. Se removió la fase acuosa superior a un tupo Eppendorf limpio. Se precipitó el ARN por medio de la adición de 1/10º del volumen de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol al 95%. Se mezclaron las muestras por inversión de los tubos y se los colocó sobre hielo durante 30 minutos. Se precipitó el ARN por centrifugación a 12.000 x g durante 10 minutos. Se removió el sobrenadante y se secaron al aire brevemente las pellas. Se resuspendieron las pellas de la muestra de ARN en 10 ml de agua tratada con DEPC.

Para remover el ADN contaminante de las muestras, se trató cada una con ADNasa libre de ARNasa (Roche) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se sintetizó el ADNc a partir del ARN total utilizando el Superscript First Strand cDNA Synthesis System para RT-PCT (Gibco-BRL) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La amplificación por la PCR de un fragmento específico del gen a partir del ADNc sintetizado se realizó utilizando *Taq* ADN polimerasa (Roche) e iniciadores específicos del gen (Ver el Ejemplo 8 para iniciadores) en la siguiente reacción: 1X amortiguador para PCR, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, cada iniciador 0,2 mM, los dNTP 0,2 mM, 1 unidad de polimerasa, 5 ml de ADNc de la reacción de síntesis. Se llevó a cabo la amplificación bajo las siguientes condiciones: desnaturalización, 95°C, 1 minuto; hibridación, 62°C, 30 segundos; extensión, 72°C, 1 minuto, 35 ciclos; extensión, 72°C, 5 minutos; mantener, 4°C, hasta terminar. Se corrieron los productos PCR sobre un gel de agarosa al 1%, coloreada con bromuro de etidio, y se visualizaron bajo luz UV utilizando el sistema de documentación en gel Quantity-One (Bio-Rad). Se detectó la expresión de los transgenes en la línea transgénica T1.

Estos resultados indicaron que los transgenes se expresan en las líneas transgénicas y sugirió fuertemente que su producto génico mejoró la tolerancia al estrés de las plantas en las líneas transgénicas. De acuerdo con la declaración anterior, no se podría detectar la expresión de genes endógenos muy similares o idénticos por medio de este método. Estos resultados están de acuerdo con los datos del Ejemplo 8.

#### Ejemplo 10

*Modificación por ingeniería genética de plantas de soja tolerantes al estrés por medio de la sobreexpresión del gen para LZ-2, LZ-3, DBF-2 o DBF-3*

Se utilizan los constructos pBPSLVM017, pBPSLVM067, pBPSSH004, y pBPSLVM011 para transformar soja como se describe más adelante.

5 Se esteriliza la superficie de las semillas de soja con etanol al 70% durante 4 minutos a temperatura ambiente con agitación continua, seguido por Clorox al 20% (v/v) suplementado con Tween al 0,05% (v/v) durante 20 minutos con agitación continua. Luego, se lavan las semillas 4 veces con agua destilada y se las coloca sobre papel filtro estéril humedecido en una caja de Petri a temperatura ambiente durante 6 a 39 horas. Se retira el recubrimiento de las semillas, y se separan los cotiledones del eje del embrión. Se examina el eje del embrión para cerciorarse de que la región meristemática no esté dañada. Se recogen los ejes de los embriones extirpados en una caja de Petri estéril medio abierta y se los seca al aire hasta que el contenido de humedad sea menor al 20% (peso fresco) en una caja de Petri sellada hasta su uso posterior.

15 Se prepara un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* a partir de una sola colonia en medio sólido LB más los antibióticos apropiados (por ejemplo 100 mg/l de estreptomina, 50 mg/l de kanamicina) seguido por el crecimiento de la colonia individual en medio LB líquido hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,8. Luego, se precipita el cultivo de bacterias a 7000 rpm durante 7 minutos a temperatura ambiente, y se resuspende en medio de MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con acetosiringona 100 mM. Los cultivos de bacterias se incuban en este medio de pre-inducción durante 2 horas a temperatura ambiente antes de usarlos. El eje de embriones de semillas cigóticas de soja con un contenido de humedad aproximadamente del 15% se embeben durante 2 horas a temperatura ambiente con el cultivo en suspensión pre-inducido de *Agrobacterium*. Los embriones se remueven del cultivo de imbibición y son transferidos a cajas de Petri que contienen medio de MS sólido suplementado con sacaros al 2% y se incuban durante 2 días en la oscuridad a temperatura ambiente. Alternativamente, se colocan los embriones en la parte superior de papel de filtro estéril humedecido (medio de MS líquido) en una caja de Petri y se incuba bajo las condiciones descritas más arriba. Después de este período, se transfieren los embriones ya sea a medio de MS líquido o sólido suplementado con 500 mg/L de carbenicilina o 300 mg/L de cefotaxima para matar las *Agrobacteria*. Se usa el medio líquido para humedecer el papel filtro estéril. Se incuban los embriones durante 4 semanas a 25°C, bajo 150  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$  y un período de luz de 12 horas. Una vez que las plántulas producen raíces, se transfieren a suelo Metromix estéril. Se lava el medio de las plantas *in vitro* antes de transferir las plantas al suelo. Se mantienen las plantas bajo una cubierta plástica durante 1 semana para favorecer el proceso de aclimatación. Luego se transfieren las plantas a una sala de crecimiento donde se las incuba a 25°C, bajo 150  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$  de intensidad de luz y un período de luz de 12 horas aproximadamente durante 80 días.

30 Se seleccionan las plantas transgénicas por su tolerancia mejorada a la sequía, sal, y/o al frío de acuerdo a los métodos de selección descritos en el Ejemplo 7, demostrando que la expresión del transgén confiere tolerancia al estrés.

### Ejemplo 11

35 *Modificación por ingeniería genética de plantas de colza/canola tolerantes al estrés por medio de la sobreexpresión del gen para LZ-2, LZ-3, DBF-2 o DBF-3*

Los constructos pBPSLVM017, pBPSLVM067, pBPSSH004, y pBPSLVM011 se utilizan para transformar colza/canola como se describe más adelante.

40 El método para transformación de una planta descrito aquí es aplicable a *Brassica* y a otros cultivos. Se esteriliza la superficie de semillas de canola con etanol al 70% durante 4 minutos a temperatura ambiente con agitación continua, seguido por Clorox al 20% (v/v) suplementado con Tween al 0,05% (v/v) durante 20 minutos con agitación continua. Luego, se lavan las semillas 4 veces con agua destilada y se las coloca sobre papel filtro estéril humedecido en una caja de Petri a temperatura ambiente durante 18 horas. Se retira el recubrimiento de las semillas, y se las seca al aire durante la noche en una caja de Petri estéril medio abierta. Durante este período, las semillas pierden aproximadamente 85% de su contenido de agua. Se almacenan luego las semillas a temperatura ambiente en una caja de Petri sellada hasta su uso posterior. Los constructos de ADN y la inhibición de los embriones son como se describe en el Ejemplo 10. Las muestras de las plantas transgénicas primarias (TO) se analizan por medio de PCR para confirmar la presencia de T-ADN. Estos resultados se confirman por medio de hibridación tipo Southern en la cual se somete a electroforesis al ADN sobre un gel de agarosa al 1% y se lo transfiere a una membrana de nylon cargada positivamente (Roche Diagnostics). Se utiliza un PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics) para preparar una sonda marcada con digoxigenina por medio de PCR, y se la utiliza como de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

50 Se seleccionan las plantas transgénicas por su tolerancia mejorada al estrés de acuerdo con el método de selección descrito en el Ejemplo 7, demostrando que la expresión del transgén confiere tolerancia al estrés.

**Ejemplo 12**

*Modificación por ingeniería genética de plantas de maíz tolerantes al estrés por medio de la sobreexpresión del gen para LZ-2, LZ-3, DBF-2 o DBF-3*

5 Los constructos pBPSLVM017, pBPSLVM067, pBPSSH004, y pBPSLVM011 se utilizan para transformar maíz como se describe más adelante.

10 La transformación del maíz (*Zea Mays L.*) se realiza con el método descrito por Ishida et al., 1996, Nature Biotech. 14745 - 50. Se co-cultivan embriones inmaduros con *Agrobacterium tumefaciens* que transporta vectores "súper binarios", y se recuperan plantas transgénicas a través de organogénesis. Este procedimiento provee una eficiencia de transformación entre 2,5% y 20%. Se seleccionan las plantas transgénicas por su tolerancia mejorada a la sequía, sal, y/o al frío de acuerdo al método de selección descrito en el Ejemplo 7, demostrando que la expresión del transgén confiere tolerancia al estrés.

**Ejemplo 13**

*Modificación por ingeniería genética de plantas de trigo tolerantes al estrés por medio de la sobreexpresión del gen para LZ-2, LZ-3, DBF-2 o DBF-3*

15 Los constructos pBPSLVM017, pBPSLVM067, pBPSSH004, y pBPSLVM011 se utilizan para transformar trigo como se describe más adelante.

20 La transformación del trigo se realiza con el método descrito por Ishida et al., 1996, Nature Biotech. 14745 - 50. Se co-cultivan embriones inmaduros con *Agrobacterium tumefaciens* que transporta vectores "súper binarios", y se recuperan plantas transgénicas a través de organogénesis. Este procedimiento provee una eficiencia de transformación entre 2,5% y 20%. Se seleccionan las plantas transgénicas por su tolerancia mejorada al estrés de acuerdo al método de selección descrito en el Ejemplo 7, demostrando que la expresión del transgén confiere tolerancia al estrés.

**Ejemplo 14**

25 *Monitoreo de los cambios en la concentración de ARNm de PpLZ-2, PpDBF-2, y PpDBF-3 en cultivos de Physcomitrella patens tratados contra el frío*

Preparación de una lámina portaobjetos con un microarreglo de ADN

30 Se llevó a cabo una amplificación por PCR en placas de 96 pozos de los EST seleccionados de *Physcomitrella patens* clonados en el vector pBluescript. Se empleó el juego amortiguador para PCR (Boehringer Mannheim) para la reacción PCR. Cada mezcla de reacción para PCR contiene 10 µl del amortiguador para PCR sin MgCl<sub>2</sub>, 10 µl de MgSO<sub>4</sub>, 3 µl del iniciador SK-Fwd (MWG-Biotech, Secuencia: 5'-CGCCAAGCGCGCAAT7AACCCrCACT-3') (SEQ ID NO: 34), 3 µl del iniciador SK-Rev (MWG-Biotech, Secuencia: 5'GCGTAATACGACTCACTATAGGCGCA-3') (SEQ ID NO: 35), 2 µl de dNTP, 1 µl de Taq ADN polimerasa (Roche), 72 µl de agua y 1 µl de molde de ADN. Después de desnaturalizar a 95°C durante tres minutos, se llevaron a cabo las reacciones PCR con 35 ciclos de tres etapas consecutivas que incluyen: desnaturalización a 95°C durante 45 segundos, hibridación a 63°C durante 45 segundos, y alargamiento a 72°C durante 60 segundos. El último alargamiento fue a 72°C durante 10 minutos. Se purificaron luego los productos PCR con el kit de purificación para PCR de QIAquick (Qiagen, Inc.), se eluyó con agua y se midió la concentración de ADN a 260 nm en un espectrofotómetro.

40 Se secaron de dos a cinco µg de cada producto PCR y disolvieron en 50 µl de DMSO. Se formatearon luego los productos PCR de las placas de 96 pozos a placas de 384 pozos para impresión. Se empleó el formato de arreglos Microarray GenIII (Molecular Dynamics) para imprimir los productos PCR en portaobjetos para microarreglos (Molecular Dynamics) con el formato recomendado por el fabricante. Las manchas impresas eran aproximadamente de 290 mm de diámetro y estaban espaciadas aproximadamente 320 mm de centro a centro. Después de la impresión, se dejó la lámina portaobjetos en la cámara libre de polvo durante una hora hasta sequedad. Se llevó a cabo un entrecruzamiento con UV con 600 µJ/mm. Las laminas portaobjeto entrecruzadas estaban listas para  
45 hibridación y fueron almacenadas en la oscuridad y en cámaras secas.

Síntesis de sondas de microarreglos

Se extrajo el ARN total de cultivos de *Physcomitrella patens* tratados para el frío (12 horas a 4°C en la oscuridad) de acuerdo con el método de extracción del ARN descrito en Ausubel et al. (Curr. Prot. in Mol. Biol., 1987, J. Wiley y Sons, New York).

- 5 Se aplicó el kit Oligotex ARNm midi (Qiagen Inc.) para aislar el ARNm del ARN total con una aproximación que combina tanto al lote como al protocolo estándar siguiendo las recomendaciones del fabricante. Después del enlazamiento del ARN total con Oligotex, se centrifugó la muestra a 14000 x g para separar el Oligotex:ARNm con la fase líquida en vez de correrla a través de una columna. Después de cuatro lavadas con amortiguador OW2 como se describe en el protocolo para lotes, se resuspendió el Oligotex:ARNm en 400 ml de OW2 y luego recolectado por la columna como el protocolo estándar. Se eluyó el ARNm de acuerdo con el protocolo estándar.
- 10 Se sintetizaron sondas de ADNc marcadas con Cy3 y Cy5 de ARNm con Sistema de Escogencia Superscript para síntesis de ADNc (Gibco BRL). Tanto el iniciador oligo-(dT)<sub>25</sub> (Genosys Biotechnologies) como el iniciador Nonúmero (Amersham Pharmacia Biotech) fueron mezclados con ARNm hasta alcanzar un volumen total de 20 µl. La mezcla fue primero calentada a 70°C durante 10 minutos y luego dejada a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de transferirla a hielo. Una vez está la muestra sobre hielo, se añadió lo siguiente: 8 µl del Amortiguador para la
- 15 Síntesis de la Primera Hebra, 4 ml de DTT 0,1 M, 2 µl de dNTP (Amersham Pharmacia Biotech), 2 µl de Cy3- o Cy5-dCTP (Amersham Pharmacia Biotech), 2 µl del inhibidor ARNasa (Gibco BRL), y 2 µl de la Transcriptasa Inversa SuperScript II. La síntesis de la primera hebra se realizó a 42°C durante 8 horas, y luego se calentó la mezcla a 94°C durante tres minutos después de la reacción.
- 20 Después de la síntesis de la primera hebra, se añadieron 4 µl de hidróxido de sodio 2,5 M a la reacción y se incubó la mezcla a 37°C durante diez minutos. Luego, se añadieron 20 µl de MOPS 2 M (pH 5,0) y 500 µl del amortiguador PB (Qiagen Inc.) a cada reacción. Se purificó luego la sonda por medio del Kit de Purificación para PCR QIAquick (Qiagen Inc.) con el protocolo suministrado por el fabricante.

Hibridación del microarreglo de ADNc y lavados

- 25 Se mezclaron las sondas purificadas marcadas con Cy3 y Cy5 y se secó al vacío hasta un volumen final de 9 µl. Luego, se añadieron 9 µl de Solución de Hibridación para el Microarreglo (Amersham Pharmacia Biotech) y 18 µl de Formamida (Sigma) a las sondas de ADNc hasta un volumen final de 36 ml. Se aplicó la mezcla al portaobjetos con el microarreglo impreso que fue luego cubierto con cubreobjetos limpio libre de polvo, asegurándose de que no quede aire atrapado. Se llevó a cabo la hibridación en una cámara de hibridación a 42°C durante 16 a 20 horas.
- 30 Después de la hibridación, se lavaron las láminas portaobjeto dos veces con 0,5X SSC, SDS al 0,2% a temperatura ambiente durante 5 minutos y 15 minutos. Se llevaron a cabo lavados rigurosos dos veces con 0,25X SSC, SDS al 0,1% a 55°C durante 10 y 30 minutos, respectivamente. Después de los lavados, se enjuagaron brevemente las láminas portaobjeto con agua Millipore y se secó bajo nitrógeno comprimido.

Escaneo y análisis de datos del microarreglo

- 35 Los microarreglos de ADNc fueron escaneados utilizando el Escáner de microarreglos GenIII (Molecular Dynamics) equipado con dos canales de láser. Se observaron primero las imágenes escaneadas y ajustadas con el software ImageQuant (Molecular Dynamics) y luego fueron analizadas por medio del software ArrayVision (Molecular Dynamics). Se extrajo la intensidad de la señal para cada mancha por medio del software ArrayVision (Molecular Dynamics) y se la transfirió a Excel (Microsoft). Se normalizaron los datos obtenidos dividiendo la diferencia del valor de la intensidad y del fondo y la diferencia del valor del control y el fondo. Se obtuvo luego la relación dividiendo los
- 40 datos normalizados.

El nivel de transcripción de PpLZ-2 disminuyó 3 veces y los niveles de transcripción de PpDBF-2 y PpDBF-3 aumentaron de 2 a 5 veces y 5 veces cuando se los compara con controles no tratados, respectivamente (Ver la Tabla 12).

Tabla 12

Resumen de los experimentos con microarreglos		
Nombre del gen	Veces que se presentó represión	Veces que hubo inducción
PpLZ-2	3	-

PpDBF-2	-	3,5
PpDBF-3	-	5

### Ejemplo 15

#### *Identificación de genes homólogos y heterólogos*

5 Las secuencias divulgadas de genes pueden ser utilizadas para identificar genes de ADNc o bibliotecas genómicas que sean homólogos o heterólogos con LZ-2, LZ-3, DBF-2, DBF-3, BnDBF-1, OsDBF-1, o OsDBF-2. Los genes homólogos (por ejemplo los clones de ADNc de longitud completa) pueden ser aislados a través de hibridación de ácido nucleico utilizando, por ejemplo, bibliotecas de ADNc. Dependiendo de la abundancia del gen de interés, se siembran en placa de 100.000 hasta 1.000.000 bacteriófagos recombinantes y se los transfiere a membranas de nylon. Después de la desnaturalización con álcali, se inmoviliza el ADN sobre la membrana, por ejemplo, por medio de entrelazamiento con UV. La hibridación se lleva a cabo en condiciones de alta rigurosidad. En solución acuosa la hibridación y el lavado se realizan con una fuerza iónica de NaCl 1 M y a una temperatura de 68°C. Las sondas de hibridación se generan, por ejemplo, por medio de marcación por transcripción de muescas radioactivas (<sup>32</sup>P) (High Prime, Roche, Mannheim, Alemania). Las señales se detectan por medio de autorradiografía.

10  
15 Los genes parcialmente homólogos o heterólogos que están relacionados pero no son idénticos pueden ser identificados en una forma análoga al procedimiento anteriormente descrito utilizando condiciones de hibridación y de lavado de baja rigurosidad. Para hibridación acuosa, se mantiene la fuerza iónica normalmente con NaCl 1 M mientras se disminuye progresivamente la temperatura desde 68 a 42°C.

20 El aislamiento de secuencias de genes con homología (o identidad/similitud de secuencia) únicamente en un dominio distinto de (por ejemplo 10 - 20 aminoácidos) puede ser llevado a cabo utilizando sondas sintéticas de oligonucleótidos marcadas en forma radioactiva. Los oligonucleótidos marcados en forma radioactiva se preparan por fosforilación del extremo 5' de dos oligonucleótidos complementarios con proteína quinasa T4. Se hibridan y ligan los oligonucleótidos complementarios para formar concatémeros. Los concatémeros bicatenarios son luego marcados en forma radioactiva, por ejemplo, por transcripción de muescas. La hibridación se lleva a cabo normalmente con condiciones de baja rigurosidad utilizando altas concentraciones de oligonucleótido.

25 Solución de hibridación de oligonucleótidos:

6 x SSC

Fosfito de sodio 0,01 M

EDTA 1 mM (pH 8)

SDS al 0,5 %

30 100 µg/ml de ADN desnaturalizado de esperma de salmón

Leche en polvo sin grasa al 0,1 %

35 Durante la hibridación, se reduce la temperatura lentamente hasta 5-10°C por debajo de la T<sub>m</sub> estimada del oligonucleótido o hasta temperatura ambiente seguido por etapas de lavado y autorradiografía. El lavado se realiza con baja rigurosidad tal como 3 etapas de lavado utilizando 4 x SSC. Los detalles adicionales están descritos en Sambrook, J. et al., 1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press o Ausubel, F.M. et al., 1994, "Current Protocols in Molecular Biology," John Wiley & Sons.

### Ejemplo 16

#### *Identification of Homologous Genes by Screening Expression Libraries with Antibodies*

40 Los clones de ADNc pueden ser utilizados para producir proteína recombinante por ejemplo en *E. coli* (por ejemplo sistema pQE QIAexpress de Qiagen). Las proteínas recombinantes son luego purificadas normalmente por afinidad a través de cromatografía de afinidad de Ni-NTA (Qiagen). Las proteínas recombinantes son utilizadas luego para producir anticuerpos específicos, por ejemplo, por medio del uso de técnicas estándar para inmunización de conejos.

Los anticuerpos son purificados por afinidad utilizando una columna de Ni-NTA saturada con el antígeno recombinante como lo describen Gu et al., 1994, *BioTechniques* 17: 257 - 262. El anticuerpo puede ser utilizado para seleccionar bibliotecas de expresión de ADNc para identificar genes homólogos o heterólogos a través de una selección inmunológica (Sambrook, J. et al., 1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press o Ausubel, F. M. et al., 1994, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons).

### Ejemplo 17

#### *Mutagénesis in vivo*

La mutagénesis *in vivo* de microorganismos puede ser realizada por medio el paso del AND del plásmido (o de otro vector) a través de *E. coli* o de otros microorganismos (por ejemplo *Bacillus* spp. o levadura tal como *Saccharomyces cerevisiae*) que son afectados en sus capacidades para mantener la integridad de su información genética. Las cepas mutadores típicas tienen mutaciones en los genes para el sistema de reparación del ADN (por ejemplo, mutHLS, mutD, mutT, etc.; para referencia, ver Rupp, W. D., 1996, DNA repair mechanisms, en: *Escherichia coli and Salmonella*, p. 2277 - 94, ASM: Washington.). Tales cepas son bien conocidas por aquellos capacitados en el arte. El uso de tales cepas se ilustra, por ejemplo, en Greener, A. y Callahan, M., 1994, *Strategies* 7: 32 - 34. La transferencia de moléculas mutadas de ADN dentro de plantas se hace preferiblemente después de selección y ensayos en microorganismos. Las plantas transgénicas se generan de acuerdo con diferentes ejemplos dentro del presente documento.

### Ejemplo 18

#### *Análisis in vitro de la función de gene de Physcomitrella en organismos transgénicos*

La determinación de la actividad y de los parámetros cinéticos de las enzimas está bien establecida en el arte. Los experimentos para determinar la actividad de cualquier enzima alterada dada deben ser adaptados para la actividad específica de la enzima de tipo silvestre, que está dentro de la capacidad de un experto en la materia. Una visión de conjunto sobre las enzimas en general, así como los detalles específicos relacionados con la estructura, cinéticas, principios, métodos, aplicaciones y ejemplos para la determinación de muchas actividades enzimáticas puede ser encontrada, por ejemplo, en las siguientes referencias: Dixon, M., y Webb, E. C., 1979, *Enzymes*. Longmans: London; Fersht, 1985, *Enzyme Structure and Mechanism*. Freeman: New York; Walsh, 1979, *Enzymatic Reaction Mechanisms*. Freeman: San Francisco; Price, N. C., Stevens, L., 1982, *Fundamentals of Enzymology*. Oxford Univ. Press: Oxford; Boyer, P. D., ed., 1983, *The Enzymes*, 3rd ed. Academic Press: New York; Bisswanger, H., 1994, *Enzymkinetik*, 2nd ed. VCH: Weinheim (ISBN 3527300325); Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J., Graßl, M., eds., 1983 - 1986, *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed., vol. I - XII, Verlag Chemie: Weinheim; y en Ullmann's *Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 1987, vol. A9, *Enzymes*. VCH: Weinheim, p. 352 - 363.

La actividad de las proteínas que se enlazan con ADN puede ser medida por medio de diferentes métodos bien establecidos, tales como ensayos de desplazamiento de la banda de ADN (también llamados ensayos de retardo en gel). El efecto de tales proteínas sobre la expresión de otras moléculas puede ser medido utilizando ensayos de genes reporteros (tales como aquellos descritos en Kolmar, H. et al., 1995, *EMBO J.* 14: 3895 - 3904 y las referencias citadas allí). Sistemas de prueba con un gen reportero son bien conocidos y establecidos para aplicaciones tanto en células procariontas como eucariotas, utilizando enzimas tales como  $\beta$ -galactosidasa, proteína fluorescente verde, y varias otras.

La determinación de la actividad de proteínas de transporte de membrana puede ser llevada a cabo de acuerdo con técnicas tales como aquellas descritas en Gennis, R. B., 1989, Pores, Channels y Transporters, in *Biomembranes, Molecular Structure and Function*, páginas 85 - 137, 199 - 234 y 270 - 322, Springer. Heidelberg.

### Ejemplo 19

#### *Purificación del producto deseado a partir de organismos transformados*

La recuperación del producto deseado a partir de material de la planta (es decir, *Physcomitrella patens* o *Arabidopsis thaliana*), hongos, algas, ciliados, células de *C. glutamicum*, u otras célula bacterianas transformadas con las secuencias de ácido nucleico descritas aquí, o el sobrenadante de los cultivos anteriormente descritos puede ser llevado a cabo por medio de diferentes métodos bien conocidos en el arte. Si el producto deseado no es secretado a partir de las células, las células pueden ser recolectadas del cultivo por medio de centrifugación a baja velocidad, y las células pueden ser lisadas por medio de técnicas estándar, tales como fuerza mecánica o sonicación. Los órganos de las plantas pueden ser separados mecánicamente de otros órganos o tejidos. Después de la homogenización, se remueven los residuos celulares por centrifugación, y se retiene la fracción del sobrenadante que contiene las proteínas solubles para una purificación adicional del compuesto deseado. Si el producto es

secretado a partir de las células deseadas, entonces se remueven las células del cultivo por medio de centrifugación a baja velocidad, y se retiene la fracción sobrenadante para purificación adicional.

5 La fracción del sobrenadante obtenida a través de cualquier de cualquier método de purificación es sometida a cromatografía con una resina adecuada, en la cual o bien la molécula deseada es retenida sobre una resina para cromatografía mientras que muchas de las impurezas en la muestra no lo son, o donde las impurezas son retenidas por la resina mientras que la muestra no lo es. Tales etapas de cromatografía pueden ser repetidas cuantas veces sea necesario, utilizando las mismas o diferentes resinas para cromatografía. Alguien capacitado en el arte estaría bien versado en la selección de resinas apropiadas para cromatografía y en su aplicación más eficaz para purificar una molécula particular. El producto purificado puede ser concentrado por medio de filtración o ultrafiltración, y almacenado a una temperatura a la cual sea mayor la estabilidad del producto.

10 Existe una amplia variedad de métodos de purificación conocidos en el arte y el anterior método de purificación no debe ser considerado como limitante. Tales técnicas de purificación están descritas, por ejemplo, en Bailey, J. E. & Ollis, D. F., 1986, *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill: New York. Adicionalmente, la identidad y la pureza de los compuestos aislados pueden ser evaluadas por medio de técnicas estándar en el arte. Estas incluyen cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), métodos espectroscópicos, métodos de coloración, cromatografía en capa delgada, NIRS, ensayos enzimáticos, o microbiológicos. Tales métodos de análisis son revisados en: Patek et al., 1994, *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 133 - 140; Malakhova et al., 1996, *Biotekhnologiya* 11: 27 - 32; Schmidt et al., 1998, *Bioprocess Engineer* 19: 67 - 70; *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 1996, vol. A27, VCH: Weinheim, páginas 89 - 90, páginas 521 - 540, páginas 540 - 547, páginas 559 - 566, 575 - 581, y páginas 581 - 587; Michal, G., 1999, *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*, John Wiley and Sons; Fallon, A. et al., 1987, *Applications of HPLC in Biochemistry en: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 17.

#### Apéndice

Secuencia de nucleótidos para LZ-2 parcial de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO: 1)

GCACCAGGAGGAGCCTTACATCAGTGCAGCCGAGCTTCGATTATATCCTCACTCC  
 GGAAGCTCAGATTTCTCCGCGCCCATGGGGACAAGTGAGGAACTTCAGGTTGTG  
 CACGAGCAACGATCCGAGTGTGTAGTGGAGGGCGCGTTGAACCCTTTGTTCTCA  
 GGTATGCGTGACGACAATGAAGCGATTACTGCCCATGCTCGAATAGCCGGTAAC  
 CCTGTGCGCCTGACACCCTGGATGGGGTTAGATATCCCCAGGAATACGAATAC  
 ATTTTAAAACACAAGCTGGAGATGGCTTGTGCTGCAGTCGCCATGACTCGGGCA  
 AAGGCAAGACAGACAAGAGGATCAGCGGAAGCTAGTGTTGGGCGAGCAGAACC  
 ATCACCAAAAATCCAAGCATCTGGAACACTTCCTCCGAAAGGAAAAACATCAGC  
 TTGTAACCTTCCTGCTGCGGAGAAATCCGATGCAGATGTGGGAAAGAGTCGACC  
 AATCACCAGCGGCTCGGAAGTCTCTGAAGATGAAGAACATGACGAGCAGAACG  
 GAAAGACAGCACCTGGTGACATCAAACGCGTCAAGAGGATGCTGTCTAACC GCG  
 AATCTGCCAGAAGATCTCGTAAAGAAAACAGGCCA

25

Secuencia de nucleótidos para LZ-2 de longitud completa de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO: 2)

GCCCTTATCCC GGGTCAAGCTACGACGCCTCAATCTTCCCCCAATCTCCCCCCC  
 AAGATATGGAACACTCATCTTCCGTGACGATCTCGTGGGCACATTCTGGGACGA

TTCTGCCGATCTTGTAGACAAGGCAGCAGCATCCACGACGATTAACAGGAGTGC  
 ATCCGAATGGTCTTTTCAAGAATTTCTTAAAGACAGCCACTCCGCTGCCGCTGGC  
 CCAGGGGCCCTCAAGCTGCGGCCTGCTTGCAAGAGCCGGTTCCTGATGGAGCAT  
 GGCGATGTCAAGGTGTGCGAACCCGAGGCACAGAAAAGTGAAGGAATCTCTCAGG  
 GCTGAGGAGGAAGATGTAGGTGAGGAGCCTTACATCAGTGCAGCCGAGCTTCGA  
 TTATATCCTCACTCCGGAAGCTCAGATTTCTCCGCGCCCATGGGGACAAGTGAGG  
 AACTTCAGGTTGTGGACGACAACGATCCGAGTGTTGTAGTGGAGGGCGCGTTGA  
 ACCCTTTGTTCTCAGGTATGCGTGACGACAATGAAGCGATTACTGCCCATGCTCG  
 AATAGCCGTAACCCTGTCGCGCCTGACACCCTGGATGGGGTTAGATATCCCA  
 GGAATACGAATACATTTTAAAAACAAGCTGGAGATGGCTTGTGCTGCAGTCGC  
 CATGACTCGGGCAAAGGCAAGACAGACAAGAGGATCAGCGGAAGCTAGTGTTG  
 GGCGAGCAGAACCATCACCAAAAATCCAAGCATCTGGAACACTTCTCCGAAAG  
 GAAAAACATCAGCTTGTAACCTTCTGCTGCGGAGAAATCCGATGCAGATGTGG  
 GAAAGAGTCGACCAATCACCAGCGGCTCGGAAGTCTCTGAAGATGAAGAACATG  
 ACGAGCAGAACGGAAAGACAGCACCTGGTGACATCAAACGCGTCAAGAGGATG  
 CTGTCTAACCGCGAATCTGCCAGAAGATCTCGTAGAAGAAAACAGGCCCATTTG  
 AGTGAGCTGGAAATGCAGGTAGCTCAATTGAGGGTTGAGAATACAAATCTGTTG  
 CAGAGACTCCAAGATATCAGTCAAAGTTCCAAGAAGCAGCTATTGACAATCGT  
 GTTCTCACGGCAGATTGCGAAGCCTTACGTGCCAAGGTGAATATGGCAGCACGA  
 GATTTGATGGCGAGGCATGGACAAATTCCTGGTGGACAATTTATCTTGGAACCA  
 GCTTGAGATATGTGTTGCCTTACGAAATGCAGCCCGTCCCGATGAATCCGCGCA  
 GTATATGCAGCAGGTAAAGGAAAATACTCCTTTAGCACACCAGGATCACCAACA  
 GAGTAGTACTGGTCTGGGTAAGATGGGACGTACCCCGTTCGATGCAGCGCGTTGC  
 CAGCTTGGAGCATCTGCAGAAGCGCATCCGGAGCGGCGTGACTTGCAAACTCC  
 CTCCGGGAACAGCTACTGGGAGATGGAGGGCCAGCCATGGTGGAAACAACATGA  
 CATCTAAACAATTGATTTCTTAAAGAGTTTCGTTTTTACTAAGTTTGTTATTATAAT  
 TGTGTTTAAACTATATTGCTGTGACTCACTCCACGACGCCAATGCTAACTGATGA  
 CGAGAGCTCGCAAGGGC

Secuencia deducida de aminoácidos de LZ-2 de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO: 3)

MEHSSSVDDLVGTFWDDSADLVDKAAASTTINRSASEWSFQEFKDSHSAAGPGA  
 LKLRPACKSRFLMEHGDVKVCEPEAQVKESLRAEEEDVGEEPYISAAELRLYPHSG  
 SSDFSAPMGTSEELQVVDDNDPSVVVEGALNPLFSGMRDDNEAITAHARIAGNPVAP  
 DTLDGVRYPOEYIYILKHKLEMACAAVAMTRAKARQTRGSAEASVGRAEPSPKIQA

SGTLPPKGKTSACNLPAAEKSDADVGKSRPITSGSEVSEDEEHDEQNGKTAPGDIKR  
 VKRMLSNRESARRSRRRKQAHLSELEMQVAQLRVENTNLLQRLQDISQKFQEAID  
 NRVLTAADCEALRAKVNMAARDLMARHGQIPGGQFILEPSLRYVLPYEMQPVADESA  
 QYMQQVKENTPLAHQDHQSSSTGLGKMGRTPSMQRVASLEHLQKRIRSGVTCNTPS  
 GNSYWEMEGPAMVEQHDI\*

Secuencia de nucleótidos para LZ-3 parcial de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO: 4)

GCACGAGCCAAAATGATGCGGATAAAAAATATTCCAATTTCCCCTCTGCTGCGTT  
 ATCTGCGGGTGACTGTGGTGGTCAAGACTATGAGGACATCCTTAAGCAGAAGTT  
 GGAAAGGGCGTGCGCTGCAGCGGCTCTCTCTAGAGTGAATGGCGAGGGTGAAT  
 AATCGGCACCAGATCGGTTGGAGCTATTTGTCAGAAGAGTTTTGCTATCGAATCA  
 TCTGCCGCTAGTGCTTGTCCAAGTGGAGTTCAATGCGCACCCATGAGCGCTAAGT  
 CTCCTTCTCCAAAACCTGAAGTGGATGCATCAACCGGGAAGGTCAAACCTTACGA  
 CCAGTGGTTCGGAACCTTCTGATGACGACGAACATGATTTGTAAACCAAAGCCT  
 ACCAGGCGGTGACCTTAAGCGTGTGAAGAGAATGTTGTCAAACCGTGAATCTGC  
 CCGACGCTCGCGCAGAAGGAAACAGGCACACTTGAGTGATCTAGAAATGCAGGT  
 TGCGCAATTGCGAGTTGAAAATACTACGCTTATGCAAAGATTGCAAGAGATTAC  
 CCACATGCATAAAGATGCATCTGTGACAACCGAATTCTAAAGGCAGATGTGGA  
 GCGGTTGCGTGCTAAGGTGAAAATGGCTGAAGACATGGTGGCCCGTCAAGGACA  
 GCCCATGTCAAATCTCATTCCCGACCCAGTTTAAGCTTTATGACACCGTTCAATG  
 TGAATGATATGGAAAGACCATTTCTGCAACA

Secuencia de nucleótidos para LZ-3 de longitud completa de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO: 5)

ATCCCGGGAGTTCCTCCACATTTCCCGACAATCTATTTTTCTTTAGAATATGGATC  
 GCATATCTTCCGTTGACGACATCCTGAGCGCATACTGGAACGAGTCGTCTATGAC  
 TTCTCCTGTGAAGGGCAGCATGAACCGCAGTGCTTCTGAGTTCGCTTTTCAAGAA  
 TTTATTAAGGAGAACATGACTGCCACATCTTGCTTCGGAGGCCGCTCCAAGAGCC  
 GCTTCTATCAATCGCAGGCGGATGAGGGGAAAGCTCTTAACGATCAAAGTCGTG  
 ACAATCTTATGATCTCGGCAAAATCTGAATCAGAGTTCACCTCCTCCGATGTTTCG  
 AAGCACCGAGGAGCTGCGTGCGATGAATAACGTCGTGGACCCTGTTGAAGTCGA  
 CGATATGTGGGGATTGAGGGGGCGCTGAACCCCTCTTCTCCCGTGTCCAAAAT  
 GATGCGGATAAAAAATATTCCAATTTCCCCTCTGCTGCGTTATCTGCGGGTGACT  
 GTGGTGGTCAAGACTATGAGGACATCCTTAAGCAGAAGTTGGGAAGGGCGTGCG  
 CTGCAGCGGCTCTCTCTAGAGTGAATGGCGAGGGTGAATAAATTGGACAATCGG

5

TTGGAGCTATTTGTCAGAAGAGTTTTGCTATCGAATCATCTGCCGCTAGTGCTTG  
 TCCAAGTGGAGTTCAATGCGCACCCATGAGCGCTAAGTCTCCTTCTCCAAAACCT  
 GAAGTGGATGCATCAACCGGGAAGGTCAAACCTTACGACCAGTGGTTCGGAACCT  
 TCTGATGACGACGAACATGATTTGTTAAACCAAAGCCTACCAGGCGGTGACCTT  
 AAGCGTGTGAAGAGAATGTTGTCAAACCGTGAATCTGCCCGACGCTCGCGCAGA  
 AGGAAACAGGCACACTTGAGTGATCTAGAAATGCAGGTTGCGCAATTGCGAGTT  
 GAAAATACTACGCTTATGCAAAGATTGCAAGAGATTACCCACATGCATAAAGAT  
 GCATCTGTCGACAACCGAATTCTAAAGGCAGATGTGGAGGCGTTGCGTGCTAAG  
 GTGAAAATGGCTGAAGACATGGTGGCCCGTCAAGGACAGCCCATGTCAAATCTC  
 ATTCCCGACCCAGTTTAAGCTTTATGACACCGTTCAATGTGAATGATATGGAAA  
 GACCATTTCTGCAACAGATGAGGCACAGTTCATGCTACGCCATGATCAGCAAC  
 AGCAGCCTGCTAGTGGCATTAGGGGTAAGATGGGACGTGCACCTTCAATGCAAC  
 GGGTTGCCAGCCTGGAGCATCTGACGAAGCGTATCCGCAACGGGAGTTCCTGCA  
 ACGTACCGGCTTGGGGTGGCTGGGACATGGACAGACCTGCCATGGTACAGGAAC  
 ACGGCATCTGATCAATGTTTCCGCGCTGACTATGTAGTAGAATCGATGTAACCTA  
 CATTTACTCCGCTTATTTCAAGCGAGAGCGAGGTTTCAGGGCGAGCTCGC

Secuencia deducida de aminoácidos de LZ-3 de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO: 6)

MDRISSVDDILSAYWNESSMTSPVKGSMNRSASEFAFQEFIKENMTATSCFGGRSKS  
 RFYQSQADEGKALNDQSRDNLMSAKSESEFTPPMFASTEELRAMNNVDPVEVDDI  
 VGIEGALNPLFSRVQNDADKKYSNFPASAALSAGDCGGQDYEDILKQKLGRACAAAA  
 LSRVNGEGAIIGQSVGAICQKSFAIESSAASACPSGVQCAPMSAKSPSPKPEVDASTG  
 KVKLTTSGSELSDDDEHDLLNQSLPGGDLKRVKRMLSNRESARRSRRRKQAHLSDL  
 EMQVAQLRVENTTLMQRLQEITHMHKDasVDNRILKADVEALRAKVKMAEDMVA  
 RQGQPMSNLIPDPSLSFMTPFNVNDMERPFLLQMRHSSMLRHDQQQPASGIRGKM  
 GRAPSMQRVASLEHLTKRIRNGSSCNVPAWGGWMDRPMVQEHGI\*

Secuencia de nucleótidos para la DBF-2 parcial de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO: 7)

TACCTTCTGAATGCATCGTCACGTCTGTTCTCTTTCCAGGCCTGATAGCGAAGCG  
 CAACTTCTGGCAGCTGTATGAGCAGCAGCCAGTACATCGCGGCACGACCAGTTA  
 CAGGTCCTTCGCTAAGAACATGGGTGTGTGCAACGACGGCTATAAAACCATCAA  
 CATGGCAGCCTAGATCTATTTTGACAATGTCATTTGCTGCAAGAACAGATTCGTC  
 GCTGGCCAAAGGCGAGAAGTGGCATAACGGTGTGTTGACAGAGACACAAGTGGG  
 AAATGCAACTCCCTTGTCAATTTTTTTCTTGGAGTTCTTGTACATGAGCGCTGTTA

GATCGCGAATCGAAGAATCGCCCTTCTCGCAAAGGTCGACGATCTTCGCTCCTGG  
 CTTGCAATCGGCCAGGACTGCTTGAAGGCCTTGTTAGCGACCTCGGCCGCGCAC  
 TTATACTTGGTGACGACATCCGGCGACGTCAAGTCGAGCTCCTTCTCCTCTTTCA  
 CCTCATCATCCGACATCGCGTCACGCGGGTTTCAAACAAAACCGAGCTCCTCTC  
 AACTCCTGACCCTCACTGCCTTGAACAGGTAGAAAACGCAGCTCAGTCACCTCA  
 ACACGGCTCTGAGCAATGCGCAAGACGAAAAAAAATCTACAACCTGAGGCCACC  
 GTGTAGCAGAGCAAAAGAGGGGGTGTCCGAGAACGCTCGTGCCAGGGAACGAC  
 AGACAACGATGCAGGGGCTCCGCCGAGGACTTGTGTCAAGCTGGTGC

Secuencia de nucleótidos para la DBF-2 de longitud completa de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO: 8)

GGCACCAGCACCCCTCTTTTGCTCTGCTACACGGTGGCCTCAGTTGTAGATTTTT  
 TTTTCGTCTTGCGCATTGCTCAGAGCCGTGTTGAGGTGACTGAGCTGCGTTTTCTA  
 CCTGTTCAAGGCAGTGAGGGTCAGGAGTTGAGAGGAGCTCGTTTTGTTTTGAAA  
 CCCGCGTGACGCGATGTCGGATGATGAGGTGAAAGAGGAGAAGGAGCTCGACTT  
 GACGTCGCCGGATGTCGTCACCAAGTATAAGTGC GCGGCCGAGGTCGCTAACAA  
 GGCCTTGCAAGCAGTCCTGGCCGATTGCAAGCCAGGAGCGAAGATCGTCGACCT  
 TTGCGAGAAGGGCGATTCTTCGATTTCGCGATCTAACAGCGCTCATGTACAAGAA  
 CTCCAAGAAAAAATTGACAAGGGAGTTGCATTTCCCACTTGTGTCTCTGTCAAC  
 AACACCGTATGCCACTTCTCGCCTTTGGCCAGCGACGAATCTGTTCTTGCAGCAA  
 ATGACATTGTCAAATAGATCTAGGCTGCCATGTTGATGGTTTTATAGCCGTCGT  
 TGCACACACCCATGTTCTTAGCGAAGGACCTGTAACCTGGTCGTGCCGCGGATGTT  
 CTGGCTGCTGCTCATAAGCTGCAGAAGTTGCGCTTCGCTAGTCAGGCCTGGAA  
 AGAAGAACAAGGACGTGACCGATGCAATTCAGAAGGTAGCGGCTGCCTACGATT  
 GCAAGATTGCCGAGGGTGTGTTGAGTCATCAGCTCAAGCAGTTTGTATCGATGC  
 TAACAAAGTAATCCTGAGTGTATCGAACCTGAAACGCGTGTAGATGATGCCGA  
 GTTCGAGGAAAACGAGGTCTATGCAATTGACATCGTGACCAGTACGGGTGATGG  
 AAAGCCCAAGTTGTTAGATGAGAAGCAGACCACAGTGTATAAGAGGGCTGTGGA  
 CAAGAATTATCACCTGAAAATGAAGGCATCAAGATTCATCTTCAGCGAAATCAA  
 TACCAAGTCCCTATTATGCCTTTCACTGCTAGAGCTCTAGAAGAGAAGAGGGCC  
 CGCCTTGGTATCGTGGAGTGTGTTAACCATGAACTGCTTCAGCCCTACCCTGTTT  
 TTCACGAAAAGCCCGGTGACTGCGTAGCCACATTAAGTTCACTGTATTGCTCAT  
 GCCCAACGATCCGATAAGATAACTGGTCTGCCACTTCAAGAATGTCAGTCGAC  
 CAAAGTTCCCGAGGACCCAGAGATCAAAGCTTGGTTGGCTTTGGGTACTAAGTC  
 CAAAAGAAGGGTGGTGGTAAGAAGAAAAAGGTAAGAAAGGCGACGCCATGA

TTGAGGACTCGTCTGAAACAGCCGCGAGAGTCAGCCACAGGAACTACTGATACAA  
 TGGACACTTCAGCCTAGACTTCACAGAACAGAGTGGATTGAGAGTCGTACCCAT  
 GCACCATTTACGAACCCTAAACTCCGTGCAGTCTAAGTTCATCTCTGGTGCTC  
 ATATTCGTGCACCATTTAGTTTTGCTCCTGACTCTAGCGATAGTCCTGTCTGGTA  
 ACCATAAACCTATTGGACATATCCCGACAATGCTGTTGCTTGTCAAATCCCTG  
 TGCTCCATCAAGATGAAAAGCTCTTTTTTAAACCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
 AAAA

Secuencia deducida de aminoácidos de DBF-2 de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO: 9)

MSDDEVKEEKELDLTSPDVVTKYKCAADEVANKALQAVLADCKPGAKIVDLCEKGD  
 SSIRDLTALMYKNSKKKIDKGVAFPTCVSVNNTVCHFSPLASDESFLAANDIVKIDLG  
 CHVDGFIAVVAHTHVLSEGPVTGRAADVLAHAHTAAEVALRLVRPGKKNKDVTDAI  
 QKVAAYDCKIAEVLVSHQLKQFVIDANKVILSVSNPETRVDDAEFEENEVYAIIVT  
 STGDGKPKLLDEKQTTVYKRAVDKNYHLKMKASRFIFSEINTKFPIMPFTARALEEK  
 RARLGIVECVNHELLQPYPVLHEKPGDCVAHIKFTVLLMPNGSDKITGLPLQECQSTK  
 VPEDPEIKAWLALGTKSKKKGGGKGGKGGKGDAMIEDSSETAAESATGTTDTMDTS  
 A\*

Secuencia de nucleótidos para la DBF-3 parcial de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO: 10)

CGGCACCAGAAAATGGTTGCCGAGAGTGTGTTGGTGTGTAGGAGCAGTGTCTGTC  
 GGGGCTGGATTGCAGAGCTTTGTTGGAGAGGGCGCGAAGAGAGAGTCAGCAGG  
 GCCAGGGAGAAGCGTGTGTTTTGGGAGCTCAGGTGCAGAAGATGGGAGCGGGTAT  
 GTCCGCGCGGTTCGGATGTGCGACCTGCAGCAGTTCGAAAGCTTCAGGAGATGT  
 CAGTGAGCAGACTGACTATAAAACATTCAGTGATGAGGAATGGAAGAAGCGTCT  
 GTCTCAACAGCAATTCTACGTCGCACGCAAGAAAGGCACCGAAAGACCTTTCAC  
 TGGAGAGTACTGGAACACCAAAACAGCAGGAACATACCTATGCGTTTGTGTAA  
 GACACCATTGTTTCAGCTCAAAGACCAAGTTCGACAGTGGTACCGGATGGCCATC  
 TTAATATGACACCATAGGTGACAATGTGAAGTCACACATGGATTGGTTCGATACCC  
 TTCATGCCCCGCACTGAGGTTGTGTGTGCTGTGTGCGATGCTCATCTGGGTCATG  
 TCTTCGACGATGGGCCGAGGCCTACTGGCAAACGTTATTGTATCAACAGCGCGG  
 CGATTGATTTGAAGGCCGAAAGCAGAAGAGAGGGACTAGTACGTCAGGGTTTGG  
 AAAGGGGGAATGGAAATCAAT

5

Secuencia de nucleótidos para DBF-3 de longitud completa de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO: 11)

ATCCCGGGAGAAAATGGTTGCCGAGAGTGTGTTGGTGTGTAGGAGCAGTGTCTGT  
 CGGGGCTGGATTGCAGAGCTTTGTTGGAGAGGGCGCGAAGAGAGAGTCAGCAGG  
 GCCAGGGAGAAGCGTGTTTTTGGGAGCTCAGGTGCAGAAGATGGGAGCGGGTAT  
 GTCCGCGCGGTCCGATGTGCGACCTGCAGCAGTCCGAAAGCTTCAGGAGATGT  
 CAGTGAGCAGACTGACTATAAAACATTCAAGTGTGAGGAATGGAAGAAGCGTCT  
 GTCTCAACAGCAATTCTACGTCGCACGCAAGAAAGGCACCGAAAGACCTTTTAC  
 TGGAGAGTACTGGAACACCAAAACAGCAGGAACATACCTATGCGTTTTGTTGTA  
 GACACCATTTGTTGAGCTCAAAGACCAAGTTCGACAGTGGTACCGGATGGCCATC  
 TTAATGACACCATAGGTGACAATGTGAAGTACACATGGATTGGTTCGATACCC  
 TTCATGCCCCGCACTGAGGTTGTGTGTGCTGTGTGCGATGCTCATCTGGGTGATG  
 TCTTCGACGATGGGCCGAGGCCTACTGGCAAACGTTATTGTATCAACAGCGCGG  
 CGATTGATTTGAAGCCGAGAAGCAAGAAGAGAGGAACTAGGTAGATATCAG

Secuencia deducida de aminoácidos de DBF-3 de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO: 12)

MVAESVLVCRSSVVGAGLQSFVGEKRESAGPGRSVFLGAQVQKMGAGMSARSD  
 VRPAAVPKASGDVSEQTDYKTFSDDEWKKRLSQQQFYVARKKGTERTPFTGEYWNT  
 KTAGTYLCVCKTPLFSSKTKFDSGTGWPSYYDTIGDNVKSMDWSIPFMPRTEVV  
 CAVCD AHLGHVFDGPRPTGKRYCINSAIDLKAEKQEERN\*

Secuencia de nucleótidos para BnDBF-1 de *Brassica napus* (SEQ ID NO:13)

CGAAGAACGAAAGAGATAAAAGAGCAACAATGGCGTTGAACGTCATCTCATCAT  
 CATCTTCAGCCACTTCCATTTCCATGACCTTTGCTTCCACCATCAGAGCCTTCGTT  
 AGACCTTCTCTCTCCCTCAGAACCACTCCATTTGCTCGCTCTCCGTCGAAGCTTAA  
 CCTCCTTCTCTCCCCGCTCTCCTTCATCATTTCCTCCGCTCCGCTTCGTAGCCG  
 AGGCTTCCACGGTGGTCGTGTCACAGCAATGTCTTCTCCTGCTCCCGGATCGGTG  
 AATAAGCCAGAGGAAGAATGGCGTGCATTCTGTCTCCTGAGCAATTCAGGATC  
 CTGAGGCAGAAAGGCACCGAATATCCAGGAACAGGAGAATACAACAACTATT  
 CGAAGACGGCATCTATTATGTGAGGATGTGGGACTCCTCTTTACAAATCCGCC  
 ACCAAATTCGACTCCGTTGTGGCTGGCCAGCTTTCTTTGACGGCCTTCCCGGTG  
 CTATAAACCGAACTCCTGATCCAGATGGGAGAAGAATCGAGATCACTTGTGCGG  
 CTTGTGGGGGACATCTCGGCCATGTTTTCAAAGGAGAAGGTTTCCCTACACCTAC  
 CGATGAGCGACACTGTGTGAACAGTGTCTCTCAAGTTCGCACCAGGGAATCA  
 AGACTTGTAATAATGTTCTTGGTGTGTGTAATGCTTCTGTCTATGTCTTGTGTGT

5

CCTGCTCGTTATAACCAGTGTTTAGTTCCATTAATGTCGTTGAATCAAAAAAAAAA  
 AA

A



GTGACCCGTGATTTCGTGAACACAAACACCATCGCCATGGGCTTCAATATTCTGAG  
AACCACTTCCATCTCCACTCCTATCTCTTCCCAAATCCAAACCCATTTTCTCAA  
CTCTTCTTCGTTCTTCTCCTTCCACCATTTTCCCCCAAAGTCCGTTACTCCCACC  
ACTCTTTTCGTTTCTGCCACCCCTTCTTCACTCTCCATCCCAAGCTTGGTTTTCTG  
GGTGGGATTGTGGCCATGGCCGCACCTGGCTCTCTCCGCAAATCCGAGGAAGAG  
TGGCGCGCAATTCTCTCCCCTGAACAGTTTCGGATCCTCAGGCAAAAGGGCACCG  
AGTTCCCTGGAACAGGAGAGTATGACAAGTTCTATGAAGAGGGAGTTTACAAC  
GTGCTGGTTGTGGGACTCCACTCTACAGGTCCATAACAAAATTCAATTCTGGTTG  
TGGCTGGCCAGCCTTCTATGAGGGGATTCCCGGAGCCATAAATCGCAATCCGGA  
TCCTGATGGGATGAGGACAGAAATAACGTGTGCTGCTTGTGGGGGACATCTAGG  
TCACGCTTTTAAAGGAGAAGGATTTCCAACACCCACTAACGAACGCCATTGTGTC  
AATAGCATTTCGCTGAAATTTGCGCCAGCCAATTCTTATTCTTAATAAAAATTGAG  
TCTGCTGTTTGGACGTGACTACTTAAGTACCCAACATCGGTAAAAAAATTATGCA  
ATGTACTTATATTATGAATGAAGTTAAAAAAAATGATGGAGAGAGAGAGACC  
GACACGCAGCGGCCGC

Secuencia deducida de aminoácidos de OsDBF-2 de *Oryza sativa* (SEQ ID NO: 18)

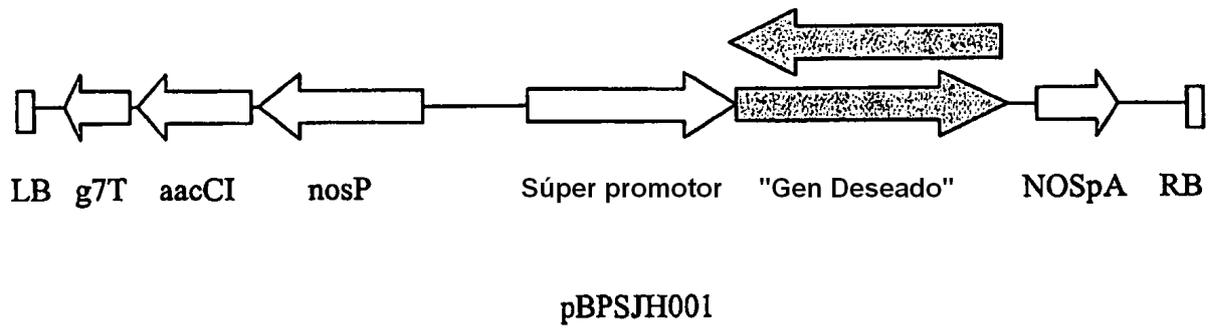
MGFNILRTTSISTPISSSKSKPIFSTLLRSPSTIFPPKSVTPPTLTVSATPFFTLHPKLGFR  
GGIVAMAAPGSLRKSEEWRAILSPEQFRILRQKGTEFPGTGEYDKFYEEGVYNCAG  
CGTPLYRSITKFNSGCGWPAFYEGIPGAINRNPDPDGMRTTEITCAACGGHLGHVFKG  
EGFPTPTNERHCVNSISLKFAPANSYS\*

## REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico aislado, donde el ácido nucleico comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste de:
  - a) el polinucleótido como se define en la SEQ ID NO: 11,
  - 5 b) un polinucleótido que codifica al polipéptido como se define en la SEQ ID NO: 12, y
  - c) un polinucleótido complementario a un polinucleótido de cualquiera de a) o b) anterior.
- 10 2. Un ácido nucleico aislado, en donde el ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos 76% de identidad de secuencia con un polipéptido como el definido en la SEQ ID NO: 12, en donde la identidad de la secuencia define un número de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100, en donde el ácido nucleico codifica un polipéptido que confiere tolerancia al estrés a plantas cuando el ácido nucleico es sobreexpresado en las plantas, y en donde dicho estrés es seleccionado de uno o más del grupo que consiste de alta salinidad, sequía y baja temperatura.
3. Un vector que comprende un ácido nucleico de la Reivindicación 1.
- 15 4. Un ácido nucleico aislado como el definido en la Reivindicación 1, en donde el ácido nucleico codifica un polipéptido que actúa como un factor de transcripción capaz de conferir tolerancia al estrés a plantas, y en donde dicho estrés es seleccionado de uno o más del grupo que consiste de alta salinidad, sequía y baja temperatura.
5. Una célula de una planta transgénica que comprende un ácido nucleico de cualquiera de las Reivindicaciones 1, 2 ó 4 en un casete de expresión de una planta.
6. Una planta transgénica que comprende una célula de una planta de la Reivindicación 5.
- 20 7. Una semilla de una planta producida por la planta de la Reivindicación 6, en donde la semilla de la planta comprende el ácido nucleico como el definido en cualquiera de las Reivindicaciones 1, 2 ó 4 en una expresión de una planta.
8. La semilla de la Reivindicación 7, en donde dicho ácido nucleico codifica un polipéptido que actúa como un factor de transcripción capaz de conferir tolerancia al estrés a plantas, y en donde el estrés es seleccionado de uno o más del grupo que consiste de alta salinidad, sequía y baja temperatura.
- 25 9. La semilla de la Reivindicación 7, en donde dicha semilla es una línea genéticamente pura para una mayor tolerancia al estrés ambiental comparado con una variedad de tipo silvestre de la semilla, en donde dicho estrés es seleccionado de uno o más del grupo que consiste de alta salinidad, sequía y baja temperatura.
- 30 10. Un método para producir una planta transgénica que contiene un ácido nucleico, en donde la planta tiene una mayor tolerancia al estrés ambiental comparada con una planta de control no transgénica que comprende la transformación de una célula de una planta con un vector de expresión que contiene dicho ácido nucleico y generando a partir de la célula de la planta la planta transgénica, en donde dicho ácido nucleico codifica un polipéptido que actúa como un factor de transcripción capaz de conferir tolerancia al estrés a plantas, en donde dicho ácido nucleico es seleccionado el grupo que consiste de:
  - 35 a) el polinucleótido como el definido en la SEQ ID NO: 11,
  - b) un polinucleótido que codifica al polipéptido como el definido en la SEQ ID NO: 12,
  - c) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos 76% de identidad de secuencia con el polipéptido como el definido en la SEQ ID NO: 12, en donde la identidad de la secuencia define un número de posiciones idénticas /número total de posiciones x 100 y
  - 40 d) un polinucleótido complementario a un polinucleótido de cualquiera de a) hasta d) anteriores, y en donde dicho estrés es seleccionado de uno o más del grupo que consiste de alta salinidad, sequía y baja temperatura.
11. La planta de la Reivindicación 6, en donde la planta es una monocotiledónea o una dicotiledónea.

12. La planta de la Reivindicación 6, en donde la planta es seleccionada del grupo que consiste de maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, soja, cacahuete, algodón, colza, canola, yuca, pimiento, girasol, tagetes, plantas solanáceas, patata, tabaco, berenjena, tomate, especie Vicia, guisantes, alfalfa, café, cacao, té, especie Salix, palma aceitera, coco, hierbas perennes, y un cultivo de forraje.
- 5 13. El método de la Reivindicación 10, en donde la tolerancia al estrés de la planta se incrementa incrementando la expresión del ácido nucleico en la planta, en donde dicho estrés es como el definido en la reivindicación 10.
14. El método de la Reivindicación 10, en donde dicho vector de expresión comprende además un promotor que está operativamente enlazado a la secuencia de ácido nucleico que va a ser expresada.
- 10 15. El método de la Reivindicación 14, en donde el promotor es específico del tejido, regulado por desarrollo o es inducible por estrés.

FIGURA 1



## REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 Este listado de referencias citado por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento europeo de la patente. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación, no se pueden excluir los errores o las omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad en este sentido.

## Documentos de patente citados en la descripción

- WO 9116432 A [0059]
- US 5380831 A [0059]
- US 5436391 A [0059]
- US 4987071 A [0068]
- US 5116742 A, Cech [0068]
- US 6025167 A [0068]
- US 5773260 A [0068]
- US 5496698 A [0068]
- US 4130641 A [0070]
- US 4024222 A [0070]
- US 4283393 A [0070]
- US 5795715 A [0070]
- US 4801340 A [0071]
- US 5034323 A [0071]
- US 5231020 A [0071]
- US 5283184 A [0071]
- WO 9801572 A [0078]
- US 4873316 A [0086]
- EP 264166 A [0086]
- EP 0424047 A [0090]
- US 5322783 A [0090]
- EP 0397687 A [0090]
- US 5376543 A [0090]
- US 5169770 A [0090]
- US 5990387 A [0090]
- WO 9307256 A [0090]
- US 5683439 A [0097]
- WO 9519443 A [0098]
- WO 9321334 A [0098]
- WO 9720057 A [0098]
- US 5187267 A [0098]
- WO 9612814 A [0098]
- EP 375091 A [0098]
- US 5608152 A [0100]
- WO 9845461 A [0100]
- US 5504200 A [0100]
- WO 9113980 A [0100]
- WO 9515389 A [0100]
- WO 9523230 A [0100]
- WO 9916890 A [0100]
- US 5086169 A [0101]
- US 5412085 A [0101]
- US 5545546 A [0101]
- US 5470359 A [0101]
- US 6004804 A [0123]

Literatura citada en la descripción que no es de patente:

- Shinozaki et al. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2000, vol. 3, 217 - 23 [0007]
- 5 • Jaglo-Ottosen et al. *Science*, 1998, vol. 280, 104 - 6 [0008]
- Kasuga et al. *Nature Biotech.*, 1999, vol. 17, 287 - 91 [0008]
- Hajdukiewicz et al. *Plant Mol. Biol.*, 1994, vol. 25, 989 - 94 [0024]
- Becker et al. *Plant Mol. Biol.*, 1996, vol. 20, 1195 - 97 [0024]
- Jefferson et al. *EMBOJ.*, 1987, vol. 6, 3901 - 7 [0024]
- 10 • Chirgwin et al. *Biochemistry*, 1979, vol. 18, 5294 - 5299 [0035]
- Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, 1992 [0041]
- Narang, S. A. *Tetrahedron*, 1983, vol. 39, 3 [0044]
- Itakura et al. *Annu. Rev. Biochem.*, 1984, vol. 53, 323 [0044]
- Itakura et al. *Science*, 1984, vol. 198, 1056 [0044]
- 15 • Ike et al. *Ácido nucleico Res.*, 1983, vol. 11, 477 [0044]
- Arkin ; Yourvan. *PNAS*, 1992, vol. 89, 7811 - 7815 [0046]
- Delgrave et al. *Polypeptide Engineering*, 1993, vol. 6 (3), 327 - 331 [0046]
- Meinkoth ; Wahl. *Anal. Biochem.*, 1984, vol. 138, 267 - 284 [0052]
- Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing and Wiley-Interscience, 1995 [0052]
- 20 • Tijssen. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization with Ácido nucleico Probes.* Elsevier, 1993 [0052]
- Tatusov, R.L. et al. *Science*, 1997, vol. 278 (5338), 631 - 637 [0054]
- Perlack et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 3324 - 3328 [0059]
- Murray et al. *Nucleic Acids Res.*, 1989, vol. 17, 477 - 498 [0059]
- 25 • Gaultier et al. *Nucleic Acids Res.*, 1987, vol. 15, 6625 - 6641 [0066]
- Inoue et al. *Nucleic Acids Res.*, 1987, vol. 15, 6131 - 6148 [0066]
- Inoue et al. *FEBS Lett.*, 1987, vol. 215, 327 - 330 [0066]
- Haselhoff ; Gerlach. *Nature*, 1988, vol. 334, 585 - 591 [0068]
- Bartel, D. ; Szostak, J. W. *Science*, 1993, vol. 261, 1411 - 1418 [0068]
- 30 • Moser et al. *Science*, 1987, vol. 238, 645 - 650 [0071]
- Cooney et al. *Science*, 1988, vol. 241, 456 - 459 [0071]

- Napoli et al. *The Plant Cell*, 1990, vol. 2, 279 - 289 [0071]
- Van der Kroll et al. *The Plant Cell*, 1990, vol. 2, 291 - 299 [0071]
- Smith et al. *Mol. Gen. Genetics*, 1990, vol. 224, 477 - 481 [0071]
- Helene, C. *Anticancer Drug Des.*, 1991, vol. 6 (6), 569 - 84 [0073]
- 5 • Helene, C. et al. *Ann. N.Y.Acad. Sci.*, 1992, vol. 660, 27 - 36 [0073]
- Maher, L. J. *Bioassays*, 1992, vol. 14 (12), 807 - 15 [0073]
- Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, 1988 [0075]
- Bormann, E. R. et al. *Mol. Microbiol.*, 1992, vol. 6, 317 - 326 [0075]
- Goeddel. *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*. Academic Press, 1990, vol. 185 [0077] [0078]
- 10 • Gruber ; Crosby. *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. CRC Press, 89 - 108 [0077]
- Romanos, M. A. et al. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, 1992, vol. 8, 423 - 488 [0078]
- Heterologous gene expression in filamentous fungi. van den Hondel, C. A. M. J. J. et al. *More Gene Manipulations in Fungi*. Academic Press, 1991, 396 - 428 [0078]
- 15 • Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi. van den Hondel, C. A. M. J. J. ; Punt, P. J. et al. *Applied Molecular Genetics of Fungi*. Cambridge University Press, 1991, 1 - 28 [0078]
- Falciatore et al. *Marine Biotechnology*, 1999, vol. 1 (3), 239 - 251 [0078] [0088]
- Schmidt,R ; Willmitzer, L. High efficiency *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* leaf and cotyledon explants. *Plant Cell Rep.*, 1988, 583 - 586 [0078]
- *Plant Molecular Biology and Biotechnology*. C Press, 1993, 71 - 119 [0078]
- 20 • *Techniques for Gene Transfer*. F.F. White ; B. Jenes et al. *Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization*. Academic Press, 1993, vol. 1, 128 - 43 [0078]
- Potrykus. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.*, 1991, vol. 42, 205 - 225 [0078]
- Smith, D. B. ; Johnson, K. S. *Gene*, 1988, vol. 67, 31 - 40 [0080]
- Amann et al. *Gene*, 1988, vol. 69, 301 - 315 [0081]
- 25 • Studier et al. *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*. Academic Press, 1990, vol. 185, 60 - 89 [0081]
- Gottesman, S. *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*. Academic Press, 1990, vol. 185, 119 - 128 [0082]
- Wada et al. *Nucleic Acids Res.*, 1992, vol. 20, 2111 - 2118 [0082]
- 30 • Baldari et al. *EMBO J.*, 1987, vol. 6, 229 - 234 [0083]
- Kurjan ; Herskowitz. *Cell*, 1987, vol. 30, 933 - 943 [0083]
- Schultz et al. *Gene*, 1987, vol. 54, 113 - 123 [0083]
- Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi. van den Hondel, C. A. M. J. J. ; Punt, P. J. et al. *Applied Molecular Genetics of Fungi*. Cambridge University Press, 1991, 1- 28 [0083]

- Smith et al. *Mol. Cell Biol*, 1989, vol. 3, 2156 - 2165 [0084]
- Lucklow ; Summers. *Virology*, 1989, vol. 170, 31 - 39 [0084]
- Seed B. *Nature*, 1987, vol. 329, 840 [0085]
- Kaufman et al. *EMBO J.*, 1987, vol. 6, 187 - 195 [0085]
- 5 • Sambrook, J. ; Fritsh, E. F. ; Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0085]
- Pinkert et al. *Genes Dev.*, 1987, vol. 1, 268 - 277 [0086]
- Calame ; Eaton. *Adv. Immunol.*, 1988, vol. 43, 235 - 275 [0086]
- Winoto ; Baltimore. *EMBO J.*, 1989, vol. 8, 729 - 733 [0086]
- 10 • Banerji et al. *Cell*, 1983, vol. 33, 729 - 740 [0086]
- Queen ; Baltimore. *Cell*, vol. 33, 741-748 [0086]
- Byrne ; Ruddle. *PNAS*, 1989, vol. 86, 5473 - 5477 [0086]
- Edlund et al. *Science*, 1985, vol. 230, 912 - 916 [0086]
- Kessel ; Gruss. *Science*, 1990, vol. 249, 374 - 379 [0086]
- 15 • Campes ; Tilghman. *Genes Dev.*, 1989, vol. 3, 537 - 546 [0086]
- Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press [0089]
- Agrobacterium protocols. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, 1995, vol. 44 [0089]
- Koncz ; Schell. *Mol. Gen. Genet*, 1986, vol. 204, 383 - 396 [0090]
- Deblaere et al. *Nucl. Acids. Res.*, 1994, vol. 13, 4777 - 4788 [0090]
- 20 • Gelvin, Stanton B.; Schilperoort, Robert A. *Plant Molecular Biology Manual*. Kluwer Academic Publ., 1995 [0090]
- Glick, Bernard R. ; Thompson, John E. *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. CRC Press, 1993, 360 S [0090]
- Moloney et al. *Plant Cell Report*, 1989, vol. 8, 238 - 242 [0090]
- De Block et al. *Plant Physiol.*, 1989, vol. 91, 694 - 701 [0090]
- 25 • Mlynarova et al. *Plant Cell Report*, 1994, vol. 13, 282 - 285 [0090]
- Freeling ; Walbot. *The maize handbook*. Springer Verlag, 1993 [0090]
- Cole-Strauss et al. *Nucleic Acids Research*, 1999, vol. 27 (5), 1323 - 1330 [0092]
- Kmiec. *Gene therapy American Scientist*, 1999, vol. 87 (3), 240 - 247 [0092]
- Thomas, K. R. ; Capecchi, M. R. *Cell*, 1987, vol. 51, 503 [0093]
- 30 • Strepp et al. *PNAS*, 1998, vol. 95 (8), 4368 - 4373 [0093]
- Gielen et al. *EMBO J.*, 1984, vol. 3, 835 [0095]

- Gallie et al. *Nucl. Acids Research*, 1987, vol. 15, 8693 - 8711 [0095]
- Becker, D. et al. New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border. *Plant Mol. Biol.*, 1992, vol. 20, 1195 - 1197 [0095]
- 5 • Bevan, M. W. Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucl. Acid. Res.*, 1984, vol. 12, 8711 - 8721 [0095]
- Vectors for Gene Transfer in Higher Plants. Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization. Academic Press, 1993, vol. 1, 15 - 38 [0095]
- Odell et al. *Nature*, 1985, vol. 313, 810 - 812 [0097]
- Kay et al. *Science*, 1987, vol. 236, 1299 - 1302 [0097]
- 10 • McElroy et al. *Plant Cell*, 1990, vol. 2, 163 - 171 [0097]
- Christensen et al. *Plant Molec. Biol.*, 1989, vol. 18, 675 - 689 [0097]
- Last et al. *Theor Appl Genet*, 1991, vol. 81, 581 - 588 [0097]
- Velten et al. *EMBOJ*, 1984, vol. 3, 2723 - 2730 [0097]
- Gatz. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1997, vol. 48, 89 - 108 [0098]
- 15 • Gatz et al. *Plant J.*, 1992, vol. 2, 397 - 404 [0098]
- Chak et al. *Planta*, 2000, vol. 210, 875 - 883 [0098]
- Hovath et al. *Plant Physiol.*, 1993, vol. 103, 1047 - 1053 [0098]
- Artus et al. *PNAS*, 1996, vol. 93 (23), 13404 - 09 [0098]
- Medina et al. *Plant Physiol.*, 2001, vol. 125, 1655 - 66 [0098]
- 20 • Nylander et al. *Plant Mol. Biol.*, 2001, vol. 45, 341 - 52 [0098]
- Navarre ; Goffeau. *EMBOJ*, 2000, vol. 19, 2515 - 24 [0098]
- Capel et al. *Plant Physiol.*, 1997, vol. 115, 569 - 76 [0098]
- Xiong et al. *Plant Cell*, 2001, vol. 13, 2063 - 83 [0098]
- Abe et al. *Plant Cell*, 1997, vol. 9, 1859 - 68 [0098]
- 25 • Iwasaki et al. *Mol. Gen. Genet.*, 1995, vol. 247, 391 - 8 [0098]
- Lang ; Palve. *Plant Mol. BioL*, 1992, vol. 20, 951 - 62 [0098]
- Hoeren et al. *Genetics*, 1998, vol. 149, 479 - 90 [0098]
- Nakamura et al. *Plant Physiol.*, 1995, vol. 109, 371 - 4 [0098]
- Müller-Röber et al. *EMBO*, 1995, vol. 14, 2409 - 16 [0098]
- 30 • Terryn et al. *Plant Cell*, 1993, vol. 5, 1761 - 9 [0098]
- Terryn et al. *FEBS Lett.*, 1992, vol. 299 (3), 287 - 90 [0098]
- Ahn et al. *Plant Cell*, 1996, vol. 8, 1477 - 90 [0098]

- Liu et al. *Plant Cell*, 1994, vol. 6, 645 - 57 [0098]
- Ward et al. *Plant. Mol. Biol.*, 1993, vol. 22, 361 - 366 [0098]
- Yamaguchi-Shinozalei et al. *Mol. Gen. Genet.*, 1993, vol. 236, 331 - 340 [0098]
- Thompson et al. *BioEssays*, 1989, vol. 10, 108 [0099]
- 5 • Baeumlein et al. *Mol Gen Genet.*, 1991, vol. 225 (3), 459 - 67 [0100]
- Baeumlein et al. *Plant Journal*, 1992, vol. 2 (2), 233 - 9 [0100]
- Brent ; Ptashne. *Cell*, 1985, vol. 43, 729 - 736 [0102]
- Weintraub, H. et al. Antisense ARN as a molecular tool for genetic analysis. *Reviews - Trends in Genetics*, 1986, vol. 1 [0103]
- 10 • Mol et al. *FEBS Letters*, 1990, vol. 268, 427 - 430 [0103]
- Greisman ; Pabo. *Science*, 1997, vol. 275, 657 [0113] [0114]
- *Biochemistry en: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, 1993, vol. 17 [0120]
- Product recovery and purification. Rehm et al. *Biotechnology*. VCH, 1993, vol. 3, 469 - 714 [0120]
- Belter, P. A. et al. *Bioseparations: downstream processing for biotechnology*. John Wiley and Sons, 1988 [0120]
- 15 • Kennedy, J. F. ; Cabral, J. M. S. *Recovery processes for biological materials*. John Wiley and Sons, 1992 [0120]
- *Biochemical separations*. Shaeiwitz, J. A.; Henry, J. D. *Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. VCH, 1988, vol. B3, 1 - 27 [0120]
- Dechow, F. J. *Separation and purification techniques in biotechnology*. Noyes Publications, 1989 [0120]
- Groves, J. T. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1999, vol. 3 (2), 226 - 235 [0122]
- 20 • Girke, T. *The Plant Journal*, 1998, vol. 15, 39 - 48 [0123]
- Puttaraju et al. Spliceosome-mediated ARN trans-splicing as a tool for gene therapy. *Nature Biotechnology*, 1999, vol. 17, 246 - 252 [0123]
- Harlow ; Lane. *A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 [0125]
- Kelly et al. *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 163 - 167 [0125]
- 25 • Bebbington et al. *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 169 - 175 [0125]
- Harlow ; Lane. *Antibodies, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Publications, 1988 [0126] [0127]
- *Basic and Clinical Immunology*. Lange Medical Publications, 1988 [0127]
- Engel. *Am. J. Bot.*, 1968, vol. 55, 438 - 46 [0128]
- Reski ; Abel. *Planta*, 1985, vol. 165, 354 - 358 [0129]
- 30 • Sambrook et al. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989, ISBN 0-87969-309-6 [0131] [0134]
- Reski et al. *Mol. Gen. Genet.*, 1994, vol. 244, 352 - 359 [0132]
- Pearson W. R. Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol.*, 1990, vol. 183, 63 - 98 [0135]

- Altschul S. F. et al. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, vol. 215, 403 - 10 [0135]
- Frishman, D. ; Argos, P. 75% accuracy in polypeptide secondary structure prediction. *Polypeptides*, 1997, vol. 27, 329 - 335 [0135]
- 5 • Thompson, J. D. et al. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 1994, vol. 22, 4673 - 4680 [0135]
- Persson, B. ; Argos, P. Prediction of transmembrana segments in polypeptides utilizing multiple sequence alignments. *J. Mol. Biol.*, 1994, vol. 237, 182 - 192 [0135]
- 10 • Klein, P. et al. Prediction of polypeptide function from sequence properties: A discriminate analysis of a database. *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, vol. 787, 221 - 226 [0135]
- Kolakowski L. F. Jr. et al. ProSearch: fast searching of polypeptide sequences with regular expression patterns related to polypeptide structure and function. *Biotechniques*, 1992, vol. 13, 919 - 921 [0135]
- Bill Alford. A searching and extraction program for sequence, pattern and block queries and databases. *CABIOS*, vol. 8, 249 - 254 [0135]
- 15 • Sambrook et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0145] [0147] [0158] [0160]
- Altschul, Stephen et al. Gapped BLAST and PSI\_BLAST: a new generation of protein database search program. *Nucleic Acids Res.*, vol. 25, 3389 - 3402 [0152]
- Mankin. *PhD thesis*, 2000 [0156]
- 20 • Bechtold. *Acad. Sci. Paris.*, 1993, vol. 316, 1194 - 1199 [0164]
- Bent et al. *Science*, 1994, vol. 265, 1856 - 1860 [0164]
- Xiong et al. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1999, vol. 17, 159 - 170 [0165]
- Verwoerd et al. *Nuc. Acids Res.*, 1989, vol. 17, 2362 [0178]
- Ausubel et al. *Curr. Prot. in Mol. Biol.* J. Wiley and Sons, 1987 [0194]
- 25 • Sambrook, J. et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0205] [0206]
- Ausubel, F. M. et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, 1994 [0205] [0206]
- Gu et al. *BioTechniques*, 1994, vol. 17, 257 - 262 [0206]
- ADN repair mechanisms. Rupp, W. D. *Escherichia coli and Salmonella*. ASM, 1996, 2277-94 [0207]
- 30 • Greener, A. ; Callahan, M. *Strategies*, 1994, vol. 7, 32 - 34 [0207]
- Dixon, M. ; Webb, E.C. *Enzymes*. Longmans, 1979 [0208]
- *Enzyme Structure and Mechanism*. Freeman, 1979 [0208]
- Walsh. *Enzymatic Reaction Mechanisms*. Freeman, 1979 [0208]
- Price, N. C.; Stevens, L. *Fundamentals of Enzymology*. Oxford Univ. Press, 1983 [0208]
- 35 • *The Enzymes*. Academic Press, 1983 [0208]
- Bisswanger, H. *Enzymkinetik*. VCH, 1994 [0208]

- Methods of Enzymatic Analysis. Verlag Chemie, 1983, vol. I-XII [0208]
- Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Enzymes. VCH, 1987, vol. A9, 352 - 363 [0208]
- Kolmar, H. et al. *EMBO J.*, 1995, vol. 14, 3895 - 3904 [0209]
- 5 • Pores, Channels and Transporters. Gennis, R. B. Biomembranes, Molecular Structure and Function. Springer, 1989, 85-137199-234270-322 [0210]
- Bailey, J. E. ; Ollis, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals. McGraw-Hill, 1986 [0213]
- Patek et al. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, vol. 60, 133 - 140 [0213]
- Malakhova et al. *Biotekhnologiya*, 1996, vol. 11, 27 - 32 [0213]
- Schmidt et al. *Bioprocess Engineer*, 1998, vol. 19, 67 - 70 [0213]
- 10 • Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. VCH, 1996, vol. A27, 89-90521-540540-547559-566575-581581-587 [0213]
- Michal, G. Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology. John Wiley and Sons, 1999 [0213]
- 15 • Fallon, A. et al. *Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, 1987, vol. 17 [0213]