

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 915**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C07K 14/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04759580 .6**
96 Fecha de presentación: **15.04.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1641930**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.04.2006**

54 Título: **SECUENCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAN PROTEÍNAS ASOCIADAS CON RESPUESTAS AL ESTRÉS ABIÓTICO Y CÉLULAS VEGETALES Y PLANTAS CON TOLERANCIA INCREMENTADA A ESTRÉS AMBIENTAL.**

30 Prioridad:
15.04.2003 EP 03008080
02.05.2003 EP 03009728
01.08.2003 EP 03016672
30.09.2003 EP 03022225

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.11.2011

73 Titular/es:
BASF PLANT SCIENCE GMBH
CARL-BOSCH-STRASSE 38
67056 LUDWIGSHAFEN, DE

72 Inventor/es:
PUZIO, Piotr;
CHARDONNENS, Agnes;
SHIRLEY, Amber;
WANG, Xi-Qing;
SARRIA-MILLAN, Rodrigo;
MCKERSIE, Bryan y
CHEN, Ruoying

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

ES 2 368 915 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

Secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas asociadas con respuestas al estrés abiótico y células vegetales y plantas con tolerancia incrementada a estrés ambiental

5 Esta invención se relaciona en general con secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas que están asociadas con respuestas a la sequedad y tolerancia a la sequedad en plantas.

Esta invención se relaciona adicionalmente con células vegetales transformadas con un ácido nucleico codificante de una Proteína Relacionada con el Estrés (SRP) y da como resultado una tolerancia y/o resistencia incrementadas a la sequedad en comparación con una célula vegetal de tipo silvestre correspondiente no transformada.

10 En particular, esta invención se relaciona con secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas que confieren tolerancia y/o resistencia a las plantas frente a sequedad, calor, frío y/o salinidad, especialmente alterando la actividad metabólica que lleva a la tolerancia y/o resistencia de las plantas a sequedad, calor, frío y/o salinidad. La invención también tiene relación con métodos para producir, seleccionar y cultivar tales células vegetales o plantas y un método para detectar estrés en células vegetales o plantas.

15 Las tensiones ambientales abióticas tales como tensiones por sequedad, estrés por salinidad, estrés por calor y estrés por frío, son factores limitantes principales del crecimiento y productividad de las plantas (Boyer. 1982. Science 218, 443-448). Las pérdidas en cultivos y pérdidas en el rendimiento de cultivos de cultivos principales tales como arroz, maíz y trigo causadas por estas tensiones representan un factor económico y político significativo y contribuyen a la escasez de alimentos en muchos países subdesarrollados.

20 Las plantas están expuestas típicamente durante su ciclo vital a condiciones de contenido de agua ambiental reducido. La mayor parte de las plantas han desarrollado estrategias para protegerse a sí mismas contra estas condiciones de baja cantidad de agua o de secación (sequía). Sin embargo, si la severidad y duración de las condiciones de sequía es demasiado grande, los efectos sobre el desarrollo de las plantas, crecimiento y rendimiento de la mayor parte de las plantas de cultivo son profundos. Una exposición continua a la sequía causa alteraciones principales en el metabolismo de las plantas. Estos grandes cambios en el metabolismo finalmente
25 llevan a la muerte celular y consecuentemente a la pérdida de rendimiento.

El desarrollo de plantas tolerantes al estrés es una estrategia que tiene potencial para resolver o mediar en al menos algunos de estos problemas (McKersie and Leshem, 1994 Stress and Stress Coping in Cultivated Plants, Kluwer Academic Publishers). Sin embargo, las estrategias de reproducción tradicional de plantas para desarrollar nuevas
30 líneas de plantas que exhiban resistencia (tolerancia) a estos tipos de tensiones son relativamente lentas y requieren líneas específicas resistentes para cruzar con la línea deseada. Los recursos de germoplasma limitados para la tolerancia al estrés y la incompatibilidad en cruces entre especies vegetales relacionadas de forma distante representan problemas significativos encontrados en la reproducción convencional. Adicionalmente, los procesos celulares que llevan a la tolerancia a la sequedad, frío y salinidad son complejos en su naturaleza e involucran
35 mecanismos múltiples de adaptación celular y numerosas rutas metabólicas (McKersie and Leshem, 1994. Stress and Stress Coping in Cultivated Plants, Kluwer Academic Publishers). Esta naturaleza multicomponentes de la tolerancia al estrés no solamente ha hecho que los cruces en búsqueda de tolerancia sean principalmente no exitosos, sino que también ha limitado la capacidad de diseñar genéticamente plantas con tolerancia al estrés utilizando métodos biotecnológicos.

40 Las tensiones por sequía, calor, frío y salinidad tienen una influencia común importante para el crecimiento de las plantas y es la disponibilidad del agua. Las plantas están expuestas durante su ciclo vital completo a condiciones de contenido ambiental de agua reducido. La mayor parte de las plantas han desarrollado estrategias para protegerse a sí mismas contra estas condiciones. Sin embargo, si la severidad de duración de las condiciones de sequía son demasiado grandes, los efectos sobre el desarrollo, crecimiento y rendimiento de las plantas de la mayor parte de
45 las plantas de cultivo son profundos. Puesto que un contenido de sal alto en algunos suelos da como resultado menos agua disponible para el consumo celular, su efecto es similar a los observados bajo las condiciones de sequía. Adicionalmente, bajo temperaturas de congelación, las células vegetales pierden agua como resultado de la formación de hielo que comienza en el apoplasto y extrae agua del simplasto (McKersie and Leshem, 1994. Stress and Stress Coping in Cultivated Plants, Kluwer Academic Publishers). De manera común, los mecanismos de respuesta molecular de una planta a cada una de estas condiciones de estrés son similares.

50 Los resultados de la investigación actual indican que la tolerancia a la sequedad es una característica cuantitativa compleja y que no hay disponible todavía un marcador de diagnostico real. Las concentraciones altas de sal o la deshidratación pueden causar daño a nivel celular durante el estrés por sequía pero la lesión precisa no está completamente clara (Bray, 1997. Trends Plant Sci. 2, 48-54). Esta falta de entendimiento del mecanismo hace difícil diseñar un enfoque transgénico para mejorar la tolerancia a la sequía. Sin embargo, una consecuencia importante
55 del daño puede ser la producción de radicales oxígenos reactivos que producen lesiones celulares, tales como peroxidación de lípidos o modificación de proteínas y ácidos nucleicos. Se han descrito detalles de la química de los

radicales libres del oxígeno y su reacción con componentes celulares tales como las membranas celulares (McKersie and Leshem, 1994. Stress and Stress Coping in Cultivated Plants, Kluwer Academic Publishers).

Es el objetivo de esta invención identificar nuevos genes únicos capaces de conferir tolerancia al estrés a plantas por expresión o sobreexpresión.

5 Es un objetivo adicional de esta invención identificar, producir y reproducir nuevas células vegetales o plantas únicas tolerantes y/o resistentes al estrés y métodos para inducir y detectar la tolerancia y/o resistencia al estrés en plantas o células vegetales. Es un objetivo adicional identificar nuevos métodos para detectar la tolerancia y/o resistencia al estrés en plantas o células vegetales. También es un objetivo de esta invención identificar nuevos genes únicos capaces de conferir tolerancia al estrés a plantas por expresión o sobreexpresión.

10 La presente invención proporciona una célula vegetal transformada con un ácido nucleico que codifica una Proteína Relacionada con el Estrés (SRP) si da como resultado una tolerancia y/o resistencia incrementadas a la sequía en comparación con las células vegetales tipo silvestre correspondientes no transformadas.

La presente invención proporciona una célula vegetal transgénica transformada por un ácido nucleico que codifica una Proteína Relacionada con el Estrés (SRP), seleccionado del grupo consistente de:

15 a) molécula de ácido nucleico que codifica los polipéptidos mostrados en SEQ ID No: 2, lo que confiere una tolerancia incrementada a la sequedad en comparación con una variedad tipo silvestre de la célula huésped;

b) molécula de ácido nucleico que comprende una de las moléculas de ácido nucleico mostradas en SEQ ID No: 1

20 c) molécula de ácido nucleico cuya secuencia puede deducirse a partir de una secuencia de polipéptidos codificada por una molécula de ácido nucleico de (a) o (b) como resultado de la degeneración del código genético y que confiere una tolerancia incrementada a la sequía en comparación con una variedad tipo silvestre de la célula huésped;

d) molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos 50% de identidad con la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de (a) a (c) que confiere una tolerancia incrementada a la sequía en comparación con una variedad tipo silvestre de la célula huésped,

25 e) una molécula de ácido nucleico que hibridiza con una molécula de ácido nucleico de (a) a (c) bajo condiciones de hibridación restrictivas y que confiere una actividad metabólica alterada en un organismo o una parte del mismo,

o que comprende una secuencia que es complementaria a las anteriores.

Para el propósito de la presente invención el término Fig. 1a, 1b o 1c involucra y significa la SEQ ID No: 1 a 556 y el término secuencia de consenso mostrado en la Figura 2 significa SEQ ID No: 557 a 560

30 Particularmente, el término Fig. 1a significa SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269 y/o 270, el término Fig. 1b significa SEQ ID NO: 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289 y/o 290,

45 El término Fig. 1c significa SEQ ID NO: 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489,

ES 2 368 915 T3

490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555 y/o 556,

y el término secuencia de consenso mostrado en la Figura 2 significa SEQ ID NO: 557, 558, 559 y/o 560.

5 Con mayor precisión, cuando los polipéptidos o proteínas de acuerdo con la Figura 1 a se mencionan, entonces las SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 10 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268 y/o 270 son lo indicado;

cuando los polipéptidos o proteínas de acuerdo con la Figura 1 b se mencionan, entonces la SEQ ID NO 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286, 288 y/o 290 son lo indicado;

15 cuando los polipéptidos o proteínas de acuerdo con la Figura 1c se mencionan, entonces la SEQ ID NO 292, 294, 296, 298, 300, 302, 304, 306, 308, 310, 313, 315, 317, 319, 321, 323, 325, 327, 329, 331, 333, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 351, 353, 355, 357, 359, 361, 363, 365, 367, 369, 371, 373, 375, 377, 379, 381, 383, 385, 387, 389, 391, 393, 395, 397, 399, 401, 403, 405, 407, 409, 411, 413, 415, 417, 419, 421, 423, 425, 427, 429, 431, 433, 435, 437, 439, 441, 443, 445, 447, 449, 451, 453, 455, 457, 459, 461, 463, 465, 467, 469, 471, 473, 475, 477, 479, 481, 483, 485, 487, 489, 491, 493, 495, 497, 499, 501, 503, 505, 507, 509, 511, 513, 515, 517, 519, 521, 523, 526, 20 528, 530, 532, 534, 536, 538, 540, 542, 544, 546, 548, 550, 552, 554 y/o 556 son lo indicado. Mas precisamente, cuando los polipéptidos o proteínas de acuerdo con la Figura 1 a son mencionados, entonces la SEQ ID NO 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 25 169, 171, 173, 175, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263, 265, 267 y/o 269 son lo indicado;

cuando los polinucleótidos o moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la Figura 1 b son mencionados, entonces la SEQ ID NO 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287 y/o 289 son lo indicado;

30 cuando los polinucleótidos o moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la Figura 1 c son mencionados , entonces la SEQ ID NO 291, 293, 295, 297, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 314, 316, 318, 320, 322, 324, 326, 328, 330, 332, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 348, 350, 352, 354, 356, 358, 360, 362, 364, 366, 368, 370, 372, 374, 376, 378, 380, 382, 384, 386, 388, 390, 392, 394, 396, 398, 400, 402, 404, 406, 408, 410, 412, 414, 416, 418, 420, 422, 424, 426, 428, 430, 432, 434, 436, 438, 440, 442, 444, 446, 448, 450, 452, 454, 456, 458, 460, 462, 464, 466, 35 468, 470, 472, 474, 476, 478, 480, 482, 484, 486, 488, 490, 492, 494, 496, 498, 500, 502, 504, 506, 508, 510, 512, 514, 516, 518, 520, 522, 524, 525, 527, 529, 531, 533, 535, 537, 539, 541, 543, 545, 547, 549, 551, 553 y/o 555 son lo indicado.

40 Tal como se utiliza aquí, el término “metabolitos” se refiere a sustancias intermedias, preferiblemente de bajo peso molecular, que se presentan durante el anabolismo y catabolismo en una célula o planta, en otras palabras, una sustancia producida o consumida por el metabolismo.

El término “actividad metabólica alterada” se refiere al cambio (incremento o decremento) de la cantidad, concentración o actividad (significando aquí la concentración efectiva para propósitos de reacciones químicas y otras acciones de masas) de un metabolito en un volumen específico con respecto a un volumen correspondiente (por ejemplo en un organismo, un tejido, una célula o un compartimiento de una célula) de un tipo de control, referencia o 45 silvestre que incluye la creación de novo de la actividad o expresión, medida por ejemplo por uno de los métodos descritos aquí más adelante, que cambia (se incrementa o decrementa) en comparación con una célula vegetal tipo silvestre correspondiente no transformada.

Los términos “incrementados”, “elevado”, “extendido”, “potenciado”, “mejorado” o “amplificado” se relacionan con un cambio correspondiente en una propiedad en un organismo, una parte de un organismo tal como un tejido, semilla, 50 raíz, hoja, flor etc., o en una célula y son intercambiables. Preferiblemente, la actividad global en el volumen se incrementa o potencia en algunos casos si el incremento o potenciamiento está relacionado con el incremento o potenciamiento de una actividad de un producto genético, independientemente de si la cantidad de producto genético o la actividad específica del producto genético o ambas se incrementa o potencia o si la cantidad, estabilidad y eficacia en la traducción de la secuencia de ácido nucleico o del gen que codifica para el producto 55 genético se incrementa o potencia. Los términos “reducción”, “disminución” o “eliminación” se relacionan con un cambio correspondiente en una propiedad en un organismo, una parte de un organismo tal como un tejido, semilla,

5 raíz, hoja, flor, etc., o en una célula. Preferiblemente, la actividad global en el volumen es reducida, disminuida o eliminada en algunos casos si la reducción, disminución o eliminación está relacionada con la reducción, disminución o eliminación de una actividad de un producto genético, independientemente de si la cantidad de producto genético o la actividad específica del producto genético o ambos se reduce, disminuye o elimina o si la cantidad, estabilidad o eficacia en la traducción de la secuencia de ácido nucleico o de gen que codifica al producto genético se reduce, disminuye o elimina.

10 Los términos "incremento" o "disminución" se relacionan con un cambio correspondiente de una propiedad en un organismo o en una parte de un organismo, tal como un tejido, semilla, raíz, hoja, flor, etc., o en una célula. Preferiblemente, la actividad global en el volumen se incrementa en los casos en que el incremento se relaciona con el incremento de una actividad de un producto genético, independientemente de si la cantidad del producto genético o la actividad específica del producto genético o ambas se incrementan o se generan o si la cantidad, estabilidad y eficacia de la traducción de la secuencia de ácidos nucleicos o del gen que codifica para el producto genético se incrementa.

15 "Cambio de una propiedad" se entiende que la actividad, a nivel de expresión o cantidad de un producto genético o del contenido metabólico cambia en un volumen específico con respecto al volumen correspondiente de un tipo de control, referencia o silvestre, incluyendo la creación de novo de la actividad o expresión.

20 Los términos "incremento" o "disminución" incluyen el cambio de dicha propiedad solamente partes del sujeto de la presente invención, por ejemplo, la modificación puede encontrarse en un compartimiento de una célula tal como un organelo, o en una parte de una planta, tal como un tejido, semilla, raíz, hoja, flor, etc., pero no es detectable si el sujeto completo, esto es, la célula o la planta completas, es sujeto de prueba. Preferiblemente, el incremento o descenso se encuentra a nivel celular, así que el término "incremento de una actividad" o "incremento de un contenido de metabolitos" se relaciona con un incremento celular en comparación con una célula tipo silvestre.

25 De acuerdo con lo anterior, el término "incremento" o "disminución" significa que la actividad específica de una enzima así como la cantidad de un compuesto o metabolito, por ejemplo de un polipéptido, una molécula de ácido nucleico o el producto químico fino de la invención o un ARNm o ADN codificantes puede incrementarse o disminuirse en un volumen.

30 Los términos "tipo silvestre", "control" o "referencia" son intercambiables y pueden ser una célula o una parte de un organismo tal como un organelo o un tejido, o un organismo, en particular un microorganismo o una planta, que no ha sido modificado o tratado de acuerdo con el proceso aquí descrito de acuerdo con la invención. De acuerdo con lo anterior. La célula o una parte de un organismo tal como un organelo o un tejido, o un organismo, en particular un microorganismo o una planta utilizada como tipo silvestre, control o referencia corresponde a la célula, organismo o parte de los mismos tanto como sea posible y está en cualquier otra propiedad excepto como resultado del proceso de la invención en cuanto a que es materia idéntica de la invención en cuanto sea posible. Así, el tipo silvestre, control o referencia se trata de forma idéntica o tan idéntica como sea posible, y siendo que solamente las condiciones o propiedades podrían ser diferentes lo que no influye en la calidad de la propiedad probada.

35 Preferiblemente, cualquier comparación se lleva a cabo bajo condiciones análogas. El término "condiciones análogas" significa que todas las condiciones tales como, por ejemplo, condiciones de cultivo o crecimiento, condiciones de ensayo (tales como composición de regulador, temperatura, sustratos, cepa patogénica, concentraciones y similares) se mantienen idénticas entre los experimentos que van a ser comparados.

40 La "referencia", "control" o "tipo silvestre" es preferiblemente un sujeto, por ejemplo, un organelo, una célula, un tejido, un organismo, en particular una planta o un microorganismo, que no ha sido modificado o tratado de acuerdo con el proceso aquí descrito de la invención y está en cualquier otra propiedad que sea similar al objeto de la invención tanto como sea posible. La referencia, control o tipo silvestre está en su genoma, transcriptoma, proteoma o metaboloma tan similar como sea posible al objeto de la presente invención. Preferiblemente, el término "referencia-", "control-" o "tipo silvestre-" organelo, -célula, -tejido o -organismo, en particular planta o microorganismo, se refiere a un organelo, célula, tejido u organismo, en particular planta o microorganismo, que es cercanamente idéntico desde el punto de vista genético al organelo, célula, tejido u organismo, en particular microorganismo o planta, de la presente invención o una parte de la misma preferiblemente 95%, más preferido 98%, aún más preferidos 99,00% , en particular, 99,10%, 99,30%, 99,50%, 99,70%, 99,90%, 99,99%, 99, 999% o más. Lo más preferiblemente el "referencia", "control", o "tipo silvestre" es un sujeto, por ejemplo un organelo, una célula, un tejido, un organismo, que es genéticamente idéntico al organismo, célula u organelo utilizado de acuerdo con el proceso de la invención excepto en que las moléculas de ácidos nucleicos responsables o que confieren actividad o el producto genético codificado por las mismas están enmendados, manipulados, intercambiados o introducidos de acuerdo con el proceso de la invención.

55 Preferiblemente, la referencia, control o tipo silvestre difiere del objeto de la presente invención solamente en la actividad celular del polipéptido de la invención, por ejemplo como resultado de un incremento en el nivel de la molécula de ácido nucleico de la presente invención o un incremento de la actividad específica del polipéptido de la

invención, por ejemplo, por o en la expresión del nivel o actividad de una proteína que tiene la actividad de una Proteína Relacionada con Estrés (SRP) o sus homólogos, sus causas bioquímicas o genéticas y la actividad metabólica alterada.

5 En algunos casos, un control, referencia o tipo silvestre que difiere del objeto de la presente invención solamente por no estar sujeto al proceso de la invención no puede proveerse, un control, referencia o tipo silvestre puede ser un organismo en el cual la causa de la modulación de una actividad que confiere la actividad metabólica o expresión alterada de la molécula de ácido nucleico de la invención se describe aquí y ha sido desactivada o inutilizada, por ejemplo, bloqueando la expresión del producto genético responsable, por ejemplo, por inhibición antisentido, por inactivación de un activador o agonista, por activación de un inhibidor o antagonista, por inhibición a través de la adición de anticuerpos inhibidores, por la adición de compuestos activos tales como por ejemplo hormonas, introduciendo mutantes dominantes negativos, etc. Una producción genética puede ser bloqueada por ejemplo introduciendo mutaciones en el punto de inactivación, lo que lleva a una inhibición de la actividad enzimática o a una desestabilización o una inhibición de la capacidad para enlazarse a cofactores, etc.

15 De acuerdo con lo anterior, un sujeto de referencia preferido es el sujeto de partida del presente proceso de la invención. Preferiblemente, la referencia y el sujeto de la invención se comparan después de la estandarización y la normalización, por ejemplo, con la cantidad total de ARN, ADN, o proteína o actividad o expresión de los genes de referencia, como genes de mantenimiento, tales como la ubiquitina, actina o proteínas ribosómicas.

20 Existe una serie de mecanismos a través de los cuales una modificación de una proteína, por ejemplo, el polipéptido de la invención puede directa o indirectamente afectar al rendimiento, producción y/o eficiencia en la producción del aminoácido.

25 Por ejemplo, el número de moléculas o la actividad específica del polipéptido o de la molécula de ácido nucleico puede incrementarse. Pueden producirse cantidades mayores del producto químico fino si el polipéptido o el ácido nucleico de la invención se expresa de novo en un organismo que carezca de la actividad de dicha proteína. Sin embargo, también es posible incrementar la expresión del gen que está presente de forma natural en los organismos, por ejemplo modificando la regulación del gen, o incrementando la estabilidad del correspondiente ARNm o del correspondiente producto genético codificado por la molécula de ácido nucleico de la invención, o introduciendo genes homólogos desde otros organismos que se regulen de manera diferente, por ejemplo, que no sean sensibles a la retroalimentación.

30 Esto también se aplica de forma análoga a la expresión incrementada combinada de la molécula de ácido nucleico de la presente invención o su producto genético con la de enzimas adicionales de las rutas biosintéticas de los aminoácidos, por ejemplo, que son útiles para la síntesis de los productos químicos finos.

35 Para el incremento, disminución o modulación de acuerdo con esta invención puede ser constitutivo, por ejemplo, debido a una expresión transgénica estable permanente o a una mutación estable en la correspondiente codificación genética endógena de la molécula de ácido nucleico de la invención o a una modulación de la expresión o del comportamiento de un gen que confiere la expresión del polipéptido de la invención, o transiente, por ejemplo debido a una transformación transiente o adición temporal de un modulador tal como un agonista o un antagonista o inducible, por ejemplo, después de la transformación con un constructo inducible que porta la molécula de ácido nucleico de la invención bajo control de un promotor inducible y mediante la adición de este inductor, por ejemplo, tetraciclina, o como aquí más abajo.

40 El incremento en la actividad de las cantidades de polipéptido en una célula, un tejido, un organelo, un órgano o un organismo o una parte de los mismos preferiblemente hasta al menos 5%, preferiblemente hasta al menos 20%, o hasta al menos 50%, especialmente de forma preferible hasta al menos 70%, 80%, 90% o más, muy especialmente preferible hasta al menos 200%, lo más preferiblemente al menos hasta el 500% o más en comparación con el control, referencia o tipo silvestre.

45 La actividad específica de un polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico de la presente invención o del polipéptido de la presente invención puede probarse como se describe en los ejemplos. En particular, la expresión de una proteína en cuestión en una célula, por ejemplo una célula vegetal o un microorganismo y la detección de un incremento en el nivel del producto químico fino en comparación con un control es una prueba fácil y puede llevarse a cabo tal como se describe en el estado de la técnica.

50 El término "incremento" incluye, que un compuesto o una actividad se introduce en una célula de novo o que el compuesto o la actividad no ha sido detectable antes, en otras palabras es "generada".

De acuerdo con lo anterior, en lo que sigue, el término "incremento" también comprende el término "generación" o "estimulación". La actividad incrementada se manifiesta por sí misma en un incremento del producto químico fino.

Las células vegetales transformadas se comparan con el tipo silvestre correspondiente no transformado del mismo género y especie bajo condiciones idénticas (tales como, por ejemplo, condiciones de cultivo, edad de las plantas y similares). En este contexto, un cambio en la actividad metabólica de al menos 10%, ventajosamente de al menos 20%, preferiblemente de al menos 30%, preferiblemente de manera especial de al menos 40%, 50% o 60%, preferiblemente de manera muy especial de al menos 70% , 80%, 90%, 95% o aún 100% o más, en comparación con el organismo no transformado resulta ventajoso.

Preferiblemente el cambio en la concentración de metabolito de las células vegetales transformadas es el cambio en comparación con el tipo silvestre correspondiente no transformado. Preferiblemente el cambio en la concentración de metabolitos se mide por HPLC y se calcula dividiendo la altura del pico o área del pico de cada analito (metabolito) a través del área de pico de los estándares internos respectivos. Los datos se normalizan utilizando el peso de la muestra fresca individual. Los valores resultantes se dividen por los valores medios encontrados para las plantas tipo silvestre cultivadas bajo condiciones de control y analizados en la misma secuencia, dando como resultado las llamadas relaciones, que representan valores independientes de la secuencia analítica. Estas relaciones indican el comportamiento de la concentración del metabolito de las plantas transformadas en comparación con la concentración en las plantas de control tipo silvestre.

De acuerdo con este método, el cambio en al menos una concentración del metabolito de las células vegetales transformadas en comparación con el tipo silvestre correspondiente no transformado es al menos 10%, ventajosamente de al menos 20%, preferiblemente de al menos 40%, 60% u 80%, preferiblemente de manera especial de al menos 90%, 100% o 200%, preferiblemente de manera muy especial de al menos 700%, 800%, 900% 1000% o más.

El significado de los datos puede determinarse por todos los métodos estadísticos conocidos por una persona experimentada en la técnica, preferiblemente por una prueba t, más preferiblemente por la prueba t student.

La actividad metabólica alterada también se refiere a metabolitos que, en comparación con una célula vegetal de tipo silvestre correspondiente no transformada, no se producen después de la transformación o se producen solamente después de la transformación.

Los metabolitos preferidos de la invención son 2,3-dimetil-5-fitolquinol o ácido 2-hidroxi-palmitico o 3,4-dihidroxifenilalanina (= dopa) o ácido 3-hidroxi-palmitico o 5-oxoprolina o alanina o ácido alfa linoléico (c18:3 (c9, c12, c15)) o alfatocoferol o ácido aminoadípico o anhidroglucosa o arginina o ácido aspártico o beta-apo-8'carotenal o beta-caroteno o beta-sitosterol o beta-tocoferol o ácido (delta-7-cis,10-cis)-hexadecadiénico o ácido hexadecanotriénico o ácido margárico o ácido delta-15-cis-tetracosénico o ácido ferúlico o campesterol o ácido cerótico (c26:0) o citrulina o criptoxantina o ácido eicosenóico (20:1) o fructosa o fumarato o galactosa o ácido gama-aminobutírico o gamatocoferol o ácido glucónico o glucosa o ácido glutámico o glutamina o glicerato o glicerinaldehído o glicerol o glicerol-3-fosfato o glicina u homoserina o inositol o isoleucina o isomaltosa o isopentil pirofosfato o leucina o ácido lignocérico (c24:0) o ácido linoleíco (c18:2 (c9, c12)) o luteína o licopeno o malato o manosa o metionina o metilgalactofuranósido o metilgalactopiranosido o metilgalactopiranosido o ácido palmítico (c16:0) o fenilalanina o fosfato o prolina o putrescina o piruvato o rafinosa o ácido ribónico o serina o shikimato o ácido sinapínico o ácido esteárico (c18:0) o succinato o sacarosa o treonina o ácido triacontanóico o triptófano o tirosina o ubiquinona o UDP-glucosa o valina o zeaxantina.

La actividad metabólica también puede ser alterada con relación a uno o más derivados de uno o más de los anteriores metabolitos.

La actividad metabólica preferiblemente se altera con relación a uno o más metabolitos seleccionados del grupo consistente de todos los metabolitos anteriores.

Alternativamente la actividad metabólica puede alterarse con relación a uno o más metabolitos seleccionados del grupo consistente de manosa, inositol, fosfato, ácido aspártico, isoleucina, leucina, ácido gama-aminobutírico, glicerinaldehído, sacarosa, campesterol, valina, beta-tocoferol, ubiquinona, ácido palmítico (c16:0), ácido 2-hidroxi-palmitico, 2,3-dimetil-5-fitolquinol, betacaroteno, ácido alfa linoléico (c18:3 (c9, c12, c15)), licopeno.

Alternativamente la actividad metabólica puede alterarse con relación a uno o más metabolitos seleccionados del grupo consistente de metilgalactofuranósido, beta-sitosterol, ácido delta-15-cis-tetracosénico (c24:1 me), ácido margárico (c17:0 me), ácido esteárico (c18:0), metilgalactopiranosido, gama-tocoferol, ácido linoléico (c18:2 (c9, c12)), ácido hexadecatriénico (c16:3 me), shikimato, rafinosa, ácido glutámico, glutamina, UDP-glucosa, prolina, treonina, pirofosfato de isopentenilo, 5-oxoprolina, ácido ferúlico, ácido sinapínico.

Alternativamente la actividad metabólica puede alterarse con relación a uno o más metabolitos seleccionados del grupo consistente de triptófano, citrulina, serina, alanina, glicerato, arginina, ácido 3-hidroxi-palmitico, putrescina, 3,4-dihidroxifenilalanina (=dopa), alfa-tocoferol, ácido aminoadípico, anhidroglucosa, beta-apo-8'carotenal, ácido

delta-7-cis,10-cis-hexadecadiénico (c16:2 me), ácido cerótico (c26:0), criptoxantina, ácido eicosenóico (20:1), fructosa, fumarato.

5 Alternativamente la actividad metabólica puede alterarse con relación a uno o más metabolitos seleccionados del grupo consistente de galactosa, ácido glucónico, glucosa, glicerol, glicerol-3-fosfato, glicina, homoserina, isomaltosa, ácido lignocérico (c24:0), luteína, malato, ácido triacontanóico, metionina, fenilalanina, piruvato, ácido ribónico, succinato, tirosina, zeaxantina.

10 La presente invención proporciona una célula vegetal transgénica, donde la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico en la célula vegetal da como resultado una tolerancia y/o resistencia incrementada a la sequía en comparación con células vegetales tipo silvestre no transformadas. Una célula vegetal tipo silvestre preferida es una célula vegetal de Arabidopsis no transformada. Un ejemplo aquí es la Arabidopsis c24 tipo silvestre (Nottingham Arabidopsis Stock, UK; NASC Stock N906).

15 Otras células vegetales tipo silvestre preferidas son no transformadas provenientes de plantas seleccionadas del grupo consistente de maíz, trigo, centeno, avena, triticual, arroz, cebada, soja, cacahuate, algodón, colza, canola, mandioca, pimienta, girasol, lino, borraja, cártamo, linaza, primula, colza, nabo, claveles, plantas solanáceas, patata, tabaco, berenjena, tomate, especies de Vicia, guisantes, alfalfa, café, cacao, té, especies de Salix, aceite de palma, coco, grama perenne y cultivos de forraje.

20 Células vegetales tipo silvestre más preferidas son una célula vegetal de Linum no transformada, preferiblemente Linum usitatissimum, más preferiblemente la variedad Brigitta, Golda, Golda, Gold Merchant, Helle, Juliel, Olpina, Livia, Marlin, Maedgold, Sporion, Serenade, Linus, Taunus, Lifax o Liviola, una célula vegetal no transformada de Heliantus, preferiblemente Heliantus annuus, más preferiblemente la variedad Aurasol, Capella, Flavia, Flores, Jazzy, Palulo, Pegasol, PIR64A54, Rigasol, Sariuca, Sideral, Sunny, Alenka, Candisol o Floyd., o una célula vegetal no transformada de Brassica, preferiblemente Brassica napus, más preferiblemente la variedad Dorothy, Evita, Heros, Hyola, Kimbar, Lambada, Licolly, Liconira, Licosmos, Lisonne, Mistral, Passat, Serator, Siapula, Sponsor, Star, Caviar, Hybridol, Baical, Olga, Lara, Doublol, Karola, Falcon, Spirit, Olymp, Zeus, Libero, Kyola, Licord, Lion, Lirajet, Lisbeth, Magnum, Maja, Mendel, Mica, Mohican, Olpop, Ontarion, Panthar, Prinoe, Pronio, Susanna, Talani, Titan, Transfer, Wiking, Woltan, Zeniah, Artus, Contact o Smart.

25 La expresión de dicha secuencia de ácidos nucleicos en la célula vegetal puede influir directa o indirectamente en la actividad metabólica de las células vegetales transformadas. Preferiblemente influyen en la actividad de los metabolitos anteriores. La actividad metabólica preferiblemente puede ser alterada por transformación con uno o más ácidos nucleicos codificadores de la Proteína Relacionada con Estrés (SRP) seleccionada del grupo consistente del ácido nucleico de la figura 1a, 1b o 1c homólogos de las secuencias antes mencionadas.

30 Está dentro del alcance de la invención identificar los genes codificados por una secuencia de ácidos nucleicos seleccionadas del grupo consistente de ácidos nucleicos de SEQ ID No: 1 y/o homólogos de los mismos en plantas objetivas, especialmente plantas de cultivo, y luego expresar el gen correspondiente para alcanzar la tolerancia y/o resistencia incrementada a la sequedad. Consecuentemente, la invención no está limitada a una planta específica.

35 Una proteína que tiene una actividad que confiere una actividad metabólica alterada tiene preferiblemente la estructura del polipéptido descrito aquí, en particular de los polipéptidos que comprenden la secuencia de consenso mostrada en la figura 2 o del polipéptido como se muestra en la figura 1a, 1b o 1c o los homólogos funcionales de los mismos tal como se describen aquí, o es modificada por la molécula de ácido nucleico caracterizada aquí o por la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico como se muestra en la figura 1a, 1b o 1c o sus homólogos funcionales aquí descritos y tiene la actividad mencionada aquí.

40 Adicionalmente es posible detectar estrés ambiental en células vegetales o plantas seleccionando las células vegetales en cuanto a su actividad metabólica alterada en comparación con condiciones sin estrés. Esto permite monitorizar los niveles de estrés en plantas aún cuando no sean visibles los síntomas. Por lo tanto pueden tomarse contraacciones más tempranamente y por lo tanto minimizar las pérdidas en cultivos regando a tiempo.

45 También está dentro del alcance de la invención seleccionar células vegetales o plantas para una tolerancia y/o resistencia incrementada al estrés ambiental seleccionando las células vegetales bajo condiciones de estrés en cuanto a actividad metabólica alterada en comparación con condiciones sin estrés. Esto permite la selección de plantas con tolerancia y/o resistencia incrementadas ante el estrés ambiental sin la identificación de genes o síntomas visuales.

50 Con la invención es posible adicionalmente cruzar células vegetales o plantas buscando una tolerancia y/o resistencia incrementada al estrés ambiental seleccionando células vegetales bajo condiciones de estrés en cuanto a actividad metabólica alterada en comparación con condiciones sin estrés y seleccionado aquellas con tolerancia y/o resistencia incrementada frente al estrés ambiental. La selección de la actividad metabólica es más rápida y más fácil que por ejemplo, la selección por genes.

La selección es bien conocida para los experimentados en la técnica en general se refiere a la búsqueda de un atributo o característica en particular. En la invención esta característica en una planta o célula vegetal es preferiblemente la concentración de un metabolito, especialmente prefiriéndose la concentración de los metabolitos anteriores. Los métodos y dispositivos para selección son familiares para los experimentados en la técnica e incluyen GC (cromatografía de gases), LC (cromatografía líquida), HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento (presión)), MS (espectrometría de masas), espectroscopía RMN (resonancia magnética nuclear), espectroscopía IR (infrarrojo), métodos fotométricos etc. y combinaciones de estos métodos.

El cruzamiento también es de conocimiento habitual para las personas experimentadas en la técnica. Se entiende como la incorporación dirigida y estable de un atributo o característica particular en una planta o célula vegetal.

Las diversas etapas de cruzamiento se caracterizan por la intervención humana bien definida tal como selección de las líneas que se van a cruzar, dirección de la polinización de las líneas madre, o selección de las plantas progenie apropiadas. Las diferentes medidas de cruzamiento pueden tomarse dependiendo de las propiedades deseadas. Todas las técnicas son bien conocidas para una persona experimentada en la técnica e incluyen como por ejemplo, pero no se limitan, a hibridación, intracruzamiento, cruzamiento retrocruzado, cruzamiento multilínea, mezcla de variedades, hibridación interespecífica, técnicas aneuploides, etc. Las técnicas de hibridación también pueden incluir la esterilización de plantas para producir plantas macho o hembra estériles por medios mecánicos, químicos o bioquímicos. La polinización cruzada de una planta macho estéril con polen de una línea diferente asegura que el genoma del macho estéril pero sí de una planta hembra fértil obtendrá uniformemente propiedades de ambas líneas de origen. Las semillas y plantas transgénicas de acuerdo con la invención pueden utilizarse por lo tanto para el cruzamiento de líneas vegetales mejoradas, lo que puede incrementar la efectividad de los métodos convencionales tales como el tratamiento con herbicidas o pesticidas o que permiten prescindir de dichos métodos debido a sus propiedades genéticas modificadas. Alternativamente pueden obtenerse nuevos cultivos con tolerancia mejorada al estrés, preferiblemente sequía y temperatura, los cuales, debido a su "equipamiento" genético optimizado, dan productos recolectados de mejor calidad que los productos que no fueron capaces de tolerar condiciones de desarrollo adversas comparables.

La invención permite que el estrés ambiental pueda ser salinidad, sequía, temperatura, metales, productos químicos, tensiones patogénicas y oxidativas, o combinaciones de los mismos, preferiblemente sequedad y/o temperatura.

El objeto de la invención es una célula vegetal transgénica, donde la SRP (=proteína relacionada con estrés) selecciona preferiblemente de levadura, preferiblemente *Saccharomyces cerevisiae*, o *E. Colli* o una planta, preferiblemente *Brassica napus*, *Glicina max*, u *Oryza sativa*.

El objeto de la invención también es una célula vegetal transgénica, donde el ácido nucleico codifica la SRP es al menos 50% homólogo a uno de los ácidos nucleicos de las figuras 1a, 1b o 1c.

En la célula vegetal transgénica de la invención, la expresión de dicho ácido nucleico da como resultado una tolerancia incrementada a la sequía, en comparación con una célula vegetal tipo silvestre correspondiente no transformada.

El término "expresión" se refiere a la transcripción y/o traducción de un segmento de o gen codogénico. Como regla, el producto resultante es un ARNm o una proteína. Sin embargo, los productos de expresión pueden incluir ARN funcional, por ejemplo, antisentido, ácidos nucleicos, ARNt, ARNsn, ARNr, ARNi, ARNsi, ribozimas, etc. La expresión puede ser sistémica, local o temporal, por ejemplo delimitada a ciertos tipos de células, tejidos, órganos o períodos de tiempo.

A menos que se especifique otra cosa, los términos "polinucleótidos", "ácidos nucleico" y "molécula de ácido nucleico" son intercambiables en el presente contexto. A menos que se especifique otra cosa, los términos "péptidos" "polipéptidos" y "proteínas" son intercambiables en el presente contexto. El término "secuencia" puede referirse a polinucleótidos, ácidos nucleicos, moléculas de ácidos nucleicos, péptidos. Polipéptidos y proteínas, dependiendo del contexto en el cual se utiliza el término "secuencia". Los términos "GEN(es)", "polinucleótidos", "secuencia de ácido nucleico", "secuencia de nucleótidos", o "molécula(s) de ácido nucleico", tal como se utilizan aquí se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, bien sea ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Los términos se refieren solamente a la estructura primaria de la molécula.

Así, los términos "gen(es)", "polinucleótido", "secuencia de ácido nucleico", "secuencia de nucleótidos", o "molécula(s) de ácido nucleico" tal como se utiliza aquí incluyen ADN y ARN de cadena doble y sencilla. También incluyen tipos conocidos de modificaciones, por ejemplo, metilación, "tapas", sustituciones de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo. Preferiblemente, la secuencia de ADN o ARN de la invención comprende una secuencia codificadora que codifica el polipéptido aquí definido.

Una "secuencia de codificación" es una secuencia de nucleótidos, que es transcrita en ARNm y/o traducida en un polipéptido cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Las fronteras de la secuencia de

codificación están determinadas por un codón de inicio de traducción en el término 5' y un codón de detención de traducción en el término 3'. Una secuencia de codificación puede incluir, pero no se limita a, ARNm, ADNc, secuencias de nucleótidos recombinantes o ADN genómico, mientras que los intrones pueden estar presentes también bajo ciertas circunstancias.

5 Para los propósitos de la invención, como regla se entiende que el plural abarca el singular y viceversa.

Adicionalmente, la célula de planta transgénica es derivada a partir de una planta monocotiledónea. Alternativamente, la célula de planta transgénica se deriva de una planta dicotiledónea. Preferiblemente, la célula vegetal transgénica se selecciona del grupo consistente de maíz, trigo, centeno, avena, tritical, arroz, cebada, soja, cacahuete, algodón, colza, canola, mandioca, pimienta, girasol, lino, borraja, girasol, linaza, primula, colza, nabo, claveles, plantas solanáceas, patata, tabaco, berenjena, tomate, especies vicia, guisante, alfalfa, café, cacao, té, especies salix, aceite de palma, coco, grama perenne, cultivos de forraje y Arabidopsis thaliana. Adicionalmente, la célula vegetal transgénica de la presente invención puede derivarse a partir de una planta gimnosperma. Preferiblemente, la planta se selecciona del grupo de abeto, pino y pinabete.

15 La invención adicionalmente proporciona una semilla producida por una planta transgénica transformada por un ácido nucleico que codifica SRP, donde la planta es un cruce verdadero para incrementar la intolerancia a la sequía. La planta transgénica puede ser una monocotiledónea, una dicotiledónea o una planta gimnosperma. La invención proporciona adicionalmente una semilla producida por una planta transgénica que expresa una SRP donde la planta es un cruce verdadero para una tolerancia incrementada a la sequía. La invención es pertinente a una semilla producida por una planta transgénica, donde la semilla es genéticamente homocigótica para un transgén que confiere una tolerancia incrementada a la sequía.

20 La invención proporciona adicionalmente un producto agrícola producido por una de las plantas transgénicas más abajo, partes de plantas tales como hojas, pétalos, anteros, raíces, tubérculos, tallos, yemas, flores o semillas. La invención proporciona adicionalmente un vector de expresión recombinante aislado que comprende un ácido nucleico que codifica una SRP.

25 La invención proporciona adicionalmente un método para producir una planta transgénica con un ácido nucleico que codifica SRP, donde la expresión del ácido nucleico en la planta da como resultado una tolerancia y/o resistencia incrementada a la sequía, en comparación con una célula vegetal tipo silvestre correspondiente no transformada, que comprende

30 a) Transformar una célula vegetal con un vector de expresión que incluye un ácido nucleico que codifica SRP seleccionado del grupo que comprende el ácido nucleico de SEQ ID No: 1 y/o homólogos o partes de los mismos

b) Generar a partir de la célula vegetal una planta transgénica con una tolerancia incrementada a la sequía en comparación con una planta tipo silvestre correspondiente no transformada.

Con respecto a la invención descrita aquí, "transformada o transgénica" significa todas aquellas plantas o partes de las mismas que han sido obtenidas por métodos de manipulación genética y en las cuales

35 c) uno o más genes, preferiblemente codificados por una o más secuencias de ácidos nucleicos como se describen en la figura 1a, 1b o 1c un homólogo de las mismas, o

d) un elemento genético regulador, por ejemplo un promotor, que esta enlazado funcionalmente, por ejemplo a la secuencia de ácidos nucleicos como se representa en la 1a, 1b o 1c y/o un homólogo de los mismos, o

e) (a) y (b)

40 no está/están presentes en su ambiente genético natural o ha/han sido modificados por medio de métodos de manipulación genética, siendo posible que la modificación sea, a manera de ejemplo, una sustitución, adición, eliminación, inversión o inserción de uno o más radicales nucleotídicos.

45 "Ambiente genético natural" significa el sitio cromosómico natural en el organismo de origen o en presencia de una biblioteca genómica. En el caso de una biblioteca genómica, el ambiente genético natural de la secuencia de ácidos nucleicos está preferiblemente preservado aún al menos parcialmente. El ambiente flanquea la secuencia de ácidos nucleicos al menos en un lado y tiene una longitud de secuencia de al menos 50 bp, preferiblemente al menos 500 bp, de forma particular preferiblemente al menos 1000 bp, de forma muy particular preferiblemente al menos 5000 bp.

50 En dicho método para producir una planta transgénica que comprenda un SRP, el ácido nucleico que codifica la SRP se selecciona del grupo que comprende el ácido nucleico de SEQ ID No: 1 y/o homólogos de las secuencias

antes mencionadas. Adicionalmente, el ácido nucleico que codifica la SRP usado en dicho método es al menos 80% homólogo con respecto al ácido nucleico de SEQ ID No: 1.

5 Una planta o extracto de planta se considera "cruce verdadero" para una característica particular si es genéticamente homocigótico para esa característica hasta el grado de que cuando se autopoliniza la planta de cruce verdadero, no se observa una cantidad significativa de segregación independiente de la característica entre la progenie. En la presente invención, la característica surge a partir de la expresión transgénica de una o más secuencias de ADN introducidas en una célula vegetal o planta.

10 La presente invención también proporciona métodos para modificar la tolerancia al estrés de una planta que comprende, modificar el nivel de expresión del ácido nucleico de SRP en la planta. La invención proporciona un método para producir una planta transgénica con un factor de transcripción sintético, novedoso o modificado que actúa por incremento de la transcripción de un gen de SRP. En teoría también es posible obtener un descenso en la expresión del gen.

15 Un método para detectar el estrés ambiental en las células vegetales o plantas comprende la selección de las células vegetales en cuanto a su actividad metabólica alterada en comparación con condiciones sin estrés que también está dentro del alcance de la invención.

Adicionalmente un método para seleccionar células vegetales o plantas para una tolerancia y/o resistencia incrementada al estrés ambiental que comprende la selección de células vegetales bajo condiciones de estrés en cuanto a actividad metabólica alterada en comparación con condiciones sin estrés se abarca dentro de la invención.

20 La presente invención también incluye un método para células de plantas cruzadas o plantas en busca de tolerancia y/o resistencia incrementada a la sequía que comprende seleccionar las células vegetales bajo condiciones de estrés en comparación con condiciones sin estrés y seleccionar aquellas con tolerancia y/o resistencia incrementada a la sequía.

En estos métodos la actividad metabólica se altera preferiblemente con relación a los metabolitos y grupos de metabolitos anteriores.

25 La presente invención también abarca el uso de un ácido nucleico que codifica la SRP seleccionado del grupo que comprende el ácido nucleico de SEQ ID No: 1 y/o homólogos de las secuencias antes mencionadas o partes de las mismas como marcadores para la selección de plantas o células vegetales con tolerancia incrementada a la sequía.

En estos métodos la actividad de los metabolitos se altera preferiblemente con relación a los metabolitos y grupos de metabolitos anteriores.

30 La presente invención también abarca el uso de un ácido nucleico que codifica SRP seleccionado del grupo que comprende el ácido nucleico de SEQ ID No: 1 y/o homólogos de las secuencias antes mencionadas o partes de las mismas como marcadores para la selección de plantas o células vegetales con tolerancia incrementada a la sequía.

35 La presente invención abarca adicionalmente el uso de un ácido nucleico que codifica SRP seleccionado del grupo que comprende el ácido nucleico de SEQ ID No: 1 y/o homólogos de las secuencias antes mencionadas o partes de las mismas como marcadores para la detección de sequía en plantas o células vegetales.

La presente invención también proporciona métodos para modificar la tolerancia al estrés de una planta de cultivo que comprende utilizar una secuencia de ácido nucleico que codifica SRP para identificar plantas individuales en poblaciones que se segregan en cuanto a la tolerancia al estrés ambiental incrementado o disminuido (marcador de ADN).

40 En el dicho método de modificar la tolerancia al estrés de una planta el ácido nucleico que codifica la SRP puede seleccionarse del grupo que comprende el ácido nucleico de SEQ ID No: 1 y/o homólogos de las secuencias antes mencionadas. Adicionalmente el ácido nucleico que codifica la SRP usado aquí puede ser al menos 80% homólogo al ácido nucleico de SEQ ID No: 1. También puede utilizarse en dicho método un vector de expresión tal como se describe en la presente invención.

45 En un método variante de dicho método para modificar la tolerancia al estrés, la planta se transforma con un promotor inducible que dirige la expresión de la SRP. Por ejemplo, el promotor es específico para tejidos. En una variante del método, el promotor usado es regulado mediante el desarrollo.

En una realización adicional, el método para modificar la tolerancia al estrés comprende una o más de las siguientes etapas:

- a) estabilizar una proteína que confiere la expresión incrementada de una proteína codificada por la molécula de ácido nucleico de la invención o del polipéptido de la invención que tiene la actividad aquí mencionada para alterar la actividad metabólica;
- 5 b) estabilizar un ARNm que confiere una expresión incrementada de una proteína codificada por la molécula de ácido nucleico de la invención o su homólogo o de un ARNm que codifica el polipéptido de la presente invención que tiene la actividad aquí mencionada de alterar la actividad metabólica;
- c) incrementar la actividad específica de una proteína que confiere la expresión incrementada de una proteína codificada por la molécula de ácido nucleico de la invención o del polipéptido de la presente invención o disminuir la regulación inhibitoria del polipéptido de la invención;
- 10 d) generar o incrementar la expresión de un factor de transcripción endógeno o artificial que media la expresión de una proteína que confiere a la expresión incrementada de una proteína codificada por la molécula de ácido nucleico de la invención o del polipéptido de la invención que tiene la actividad aquí mencionada de alterar la actividad metabólica;
- 15 e) estimular la actividad de una proteína que confiere la expresión incrementada de una proteína codificada por la molécula de ácido nucleico de la presente invención o un polipéptido de la presente invención que tiene la actividad aquí mencionada de alterar la actividad metabólica añadiendo uno o más factores inductores exógenos del organismo o partes del mismo;
- 20 f) expresar un gen transgénico que codifica una proteína que confiere la expresión incrementada de un polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico de la presente invención o un polipéptido de la presente invención, que tiene la actividad aquí mencionada de alterar la actividad metabólica; y/o
- g) incrementar el número de copias de un gen que confiere la expresión incrementada de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de la invención o el polipéptido de la invención que tiene la actividad aquí mencionada de alterar la actividad metabólica;
- 25 h) incrementar la expresión del gen endógeno que codifica al polipéptido de la invención o su homólogo añadiendo elementos de expresión positiva o removiéndolos de expresión negativa, por ejemplo, la recombinación homóloga puede ser utilizada para introducir bien sea elementos reguladores positivos para plantas del potenciador 35S en el promotor o para retirar elementos represores de las regiones reguladoras. Pueden utilizarse métodos adicionales de conversión de genes para perturbar los elementos del represor o para potenciar la actividad de los elementos positivos que pueden ser introducidos aleatoriamente en las plantas mediante ADN-T o mutagénesis del transposón y las líneas que pueden identificarse en las cuales los elementos positivos han sido integrados cerca a un gen de la invención, cuya expresión por lo tanto se potencia; y/o
- 30 i) modular las condiciones de crecimiento de la planta de manera tal que la expresión o actividad del gen que codifica la proteína de la invención o la proteína misma se potencia;
- 35 j) seleccionar organismos con actividad especialmente alta de las proteínas de la invención a partir de fuentes naturales o formas mutagenizadas y cruzarlos con los organismos objetivo, por ejemplo, los cultivos élite.
- Preferiblemente, dicho ARNm es la molécula de ácido nucleico de la presente invención y/o la proteína que confiere la expresión incrementada de una proteína codificada por la molécula de ácido nucleico de la presente invención o el polipéptido que tiene la actividad aquí mencionada es el polipéptido de la presente invención, por ejemplo, que confiere una tolerancia incrementada a la sequía.
- 40 En general, la cantidad de molécula de ARNm, polinucleótido o ácido nucleico en una célula con un compartimento de un organismo se correlaciona con la cantidad de proteína codificada y así con la actividad global de la proteína codificada en dicho volumen. Dicha correlación no siempre es lineal, la actividad en el volumen es dependiente de la estabilidad de las moléculas, la degradación de las moléculas o la presencia de cofactores activadores o inhibidores. Adicionalmente, las inhibiciones de producto y educto de las enzimas son bien conocidas, por ejemplo, Zinser et al.
- 45 "Enzyminhibitoren/ Enzyme inhibitors".

La actividad de las proteínas y/o polipéptidos antes mencionados codificados por la molécula de ácido nucleico de la presente invención puede incrementarse de diversas maneras. Por ejemplo, la actividad en un organismo o en una parte del mismo, como una célula, se incrementa a través del incremento del número de productos genéticos, por ejemplo, incrementando la tasa de expresión, introduciendo un promotor más fuerte o incrementando la estabilidad del ARNm expresado, incrementando así la tasa de traducción, y/o incrementando la estabilidad del producto genético, reduciendo así las proteínas en decadencia. Adicionalmente, la actividad o rendimiento de las enzimas puede influenciarse de tal manera que una reducción o incremento de la tasa de reacción o una modificación

50

- (reducción o incremento) de la afinidad al sustrato es alcanzada como resultado. Una mutación del centro catalítico de un polipéptido de la invención, por ejemplo como una enzima, puede modular la rata de rendimiento de la enzima, por ejemplo, una anulación de un aminoácido esencial puede llevar a una actividad reducida o completamente suspendida de la enzima, o la eliminación o mutación de un sitio de enlazamiento del regulador puede reducir una regulación negativa como una inhibición de retroalimentación (o una inhibición de sustrato, si el nivel de sustrato también está incrementado). La actividad específica de una enzima de la presente invención puede incrementarse de tal manera que la rata de rendimiento se incrementa o se mejora el enlazamiento de un cofactor. Mejorando la estabilidad del ARNm de codificación o la proteína también puede incrementar la actividad de un producto genético. La estimulación de la actividad también está bajo el alcance del término “actividad incrementada”.
- 5
- 10 Además, la regulación de las secuencias de ácido nucleico antes mencionadas puede modificarse de tal manera que se incremente la expresión del gen. Esto puede alcanzarse de forma ventajosa por medio de secuencias reguladoras heterólogas o modificando, por ejemplo mutando, las secuencias reguladoras naturales que están presentes. Los métodos ventajosos también pueden ser combinados uno con otro.
- 15 En general, una actividad de un producto de gen en un organismo o parte del mismo, en particular en una célula vegetal, una planta o un tejido de una planta o una parte del mismo o en un microorganismo puede incrementarse incrementando la cantidad de ARNm codificante específico o la proteína correspondiente en dicho organismo o parte de la misma. “Cantidad de proteína de ARNm” se entiende como el número de moléculas de polipéptidos o moléculas de ARNm en un organismo, un tejido, una célula o un compartimiento de una célula. “Incrementos” en la cantidad de una proteína significa el incremento cuantitativo del número de moléculas de dicha proteína en un organismo, un tejido, una célula o un compartimiento de una célula o parte de la misma – por ejemplo por uno de los métodos descritos aquí más abajo – en comparación con un control o referencia tipo silvestre.
- 20
- 25 El incremento en el número de moléculas se eleva preferiblemente a al menos 1%, preferiblemente a más de 10%, más preferiblemente a 30% o más, especialmente de forma preferible a 50%, 70% o más, muy especialmente de forma preferible a 100%, lo más preferiblemente a 500% o más. Sin embargo, también se observa una expresión de novo como sujeto de la presente invención.
- Una modificación, esto es un incremento o decremento, puede ser causada por factores endógenos o exógenos. Por ejemplo, un incremento en la actividad en un organismo o en una parte del mismo puede ser causado por la adición de un producto genético o un precursor o un activador o un agonista a los medios de nutrición o pueden ser causados introduciendo dichos sujetos en un organismo, transiente o estable.
- 30
- 35 En una realización el incremento o decremento en la actividad metabólica en la planta o una parte de la misma, por ejemplo, en una célula, un tejido, un órgano, un organelo, etc., se alcanza incrementando el nivel endógeno del polipéptido de la invención. De acuerdo con lo anterior, en una realización de la presente invención, la presente invención se relaciona con un proceso donde el número de copias del gen de un gen que codifica el polinucleótido o una molécula de ácido nucleico de la invención se incrementa. Adicionalmente, el nivel endógeno del polipéptido de la invención puede ser incrementado por ejemplo al modificar la regulación transcripcional o translacional del polipéptido.
- 40
- 45 En una realización la actividad metabólica en la planta o parte de la misma puede alterarse por mutagénesis dirigida o aleatoria de los genes endógenos de la invención. Por ejemplo la recombinación homóloga puede utilizarse para introducir bien sea elementos reguladores positivos para plantas como el potenciador 35S en el promotor o para eliminar elementos represores de las regiones reguladoras. Además, los métodos similares a la conversión de genes descritos por Kochevenko y Willmitzer (*Plant Physiol.* 2003 May; 132(1): 174-84) y las citaciones en los mismos pueden ser utilizados para perturbar los elementos represores o para potenciar la actividad de elementos reguladores positivos. Adicionalmente los elementos positivos pueden ser introducidos aleatoriamente en genomas (de plantas) por ADN-T o mutagénesis de transposón, pueden seleccionarse líneas en las cuales los elementos positivos han sido integrados cerca a un gen de la invención, cuya expresión por lo tanto se potencia. La activación de los genes vegetales por integraciones aleatorias de elementos potenciadores ha sido descrita por Hayashi et al., 1992 (*Science* 258:1350-1353) o Weigel et al., 2000 (*Plant Physiol.* 122, 1003-1013) y otros citados aquí.
- 50
- 55 Las estrategias genéticas reversas para identificar inserciones (las cuales eventualmente portan los elementos de activación) cercanas a genes de interés han sido descritos para varios casos, por ejemplo Krysan et al., 1999 (*Plant Cell* 1999, 11, 2283-2290); Sessions et al., 2002 (*Plant Cell* 2002, 14, 2985-2994); Young et al., 2001, (*Plant Physiol.* 2001, 125, 513-518); Koprek et al., 2000 (*Plant J.* 2000, 24, 253-263); Jeon et al., 2000 (*Plant J.* 2000, 22, 561-570); Tissier et al., 1999 (*Plant Cell* 1999, 11, 1841-1852); Speulmann et al., 1999 (*Plant Cell* 1999, 11, 1853-1866). En resumen el material de todas las plantas de una población de plantas grande de ADN-T o trasposón mutagenizado se recolecta y se prepara el ADN genómico. Luego el ADN genómico se reúne siguiendo arquitecturas específicas como las descritas por ejemplo en Krysan et al., 1999 (*Plant Cell* 1999, 11, 2283-2290). Las reservas de ADN genómicos son luego seleccionadas por las reacciones de PCR de multiplex específico que detectan la combinación del mutágeno insercional (por ejemplo ADN-T o transposón) y el gen de interés. Por lo tanto las reacciones de PCR son corridas en las reservas de ADN con combinaciones específicas de ADN-T o iniciadores de fronteras de

transposón y cebadores específicos de genes. Las reglas generales para el diseño primario pueden de nuevo tomarse de Krysan et al., 1999 (Plant Cell 1999, 11, 2283-2290). La reselección de niveles más bajos de reservas de ADN llevan a la identificación de plantas individuales en las cuales el gen de interés se activa mediante el mutágeno insercional.

- 5 El fortalecimiento de elementos reguladores positivos o la perturbación o debilitación de elementos reguladores negativos también puede activarse a través de técnicas de mutagénesis comunes: la producción de poblaciones mutadas químicamente o por radiación es una técnica común y conocida para las personas experimentadas en la técnica. Los métodos para plantas son descritos por Koorneef et al. 1982 y las citaciones en la misma y por Lightner y Caspar en "Methods in Molecular Biology" Vol 82. Estas técnicas inducen usualmente mutaciones puntuales que
10 pueden ser identificadas en cualquier gen utilizando métodos tales como TILLING (Colbert et al. 2001).

De acuerdo con lo anterior, el nivel de expresión puede incrementarse si los genes endógenos que codifican un polipéptido que confiere una expresión incrementada del polipéptido de la presente invención, en particular genes que comprenden la molécula de ácido nucleico de la presente invención, se modifican a través de recombinación homóloga, metodología de Tilling o conversión de gen.

- 15 Las secuencias reguladoras pueden enlazarse operativamente a la región codificadora de una proteína endógena y controlar su transcripción y traducción o la estabilidad o decaimiento del ADNm codificante o de la proteína expresada. Con el fin de modificar y controlar la expresión, el promotor, los UTR, los sitios de seccionamiento, las señales de procesamiento, los sitios de poliadenilación, terminadores, potenciadores, represores, sitios de modificación postranscripcional o postranslacional pueden cambiarse, agregarse o enmendarse. Por ejemplo, la
20 activación de genes vegetales por integraciones aleatorias de elementos potenciadores ha sido descrita por Hayashi et al., 1992 (Science 258:1350-1353) o Weigel et al., 2000 (Plant Physiol. 122, 1003-1013) y otros citados aquí. Por ejemplo, el nivel de expresión de la proteína endógena puede modularse reemplazando el promotor endógeno con un promotor transgénico más fuerte o reemplazando el 3'UTR endógeno con un 3'UTR, el cual proporciona más estabilidad sin modificar la región de codificación. Adicionalmente, la regulación transcripcional puede modularse por
25 introducción de un factor de transcripción artificial tal como se describe en los ejemplos. Más abajo se describen promotores, terminadores y UTRs alternativos.

- La activación de un polipéptido endógeno que tiene la actividad antes mencionada, esto es, conferir una tolerancia incrementada a la sequía después de alterar la actividad metabólica también puede incrementarse introduciendo un factor de transcripción sintético, el cual se enlaza cerca a la región codificadora de la proteína del gen codificante de
30 la invención y activa su transcripción. Una proteína dedo de zinc quimérica puede construirse de tal forma que comprenda un dominio de enlazamiento específico de ADN y un dominio de activación como por ejemplo, el dominio VP16 del virus herpes simplex. El dominio de enlazamiento específico puede enlazarse a la región reguladora de la región de codificación de la proteína. La expresión de factor de transcripción quimérico en una planta lleva a una expresión específica de la proteína de la invención, véase por ejemplo en WO01/52620, Oriz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, Vol. 99, 13290 o Guan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, Vol. 99, 13296.
35

- En una realización adicional del método de acuerdo con la invención, se utilizan plantas en las cuales uno de los genes antes mencionados, o uno de los ácidos nucleicos antes mencionados, se muta en una forma tal que la actividad de los productos genéticos codificados tiene influencia menos por factores celulares, o no del todo, en comparación con las proteínas sin mutación. Por ejemplo, el mecanismo de regulación bien conocido de actividad
40 enzimática es un sustrato o una regulación de mecanismos de retroalimentación. Las formas y técnicas para la introducción de sustituciones, eliminaciones y adiciones de una o más bases, nucleótidos, aminoácidos de una secuencia correspondiente se describe más abajo en los párrafos correspondientes y en las referencias listadas aquí, por ejemplo, en Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbour, NY, 1989. La persona experimentada en la técnica estará en capacidad de identificar los sectores de regulación y los sitios de enlazamiento de los
45 reguladores comparando la secuencia de la molécula de ácido nucleico de la presente invención o el producto de expresión del mismo dentro del estado del arte por medios de software de ordenador que comprenden algoritmos para la identificación de sitios de enlazamiento y dominios de regulación o introduciendo en una molécula de ácido nucleico o en una proteína mutaciones sistemáticamente y estableciendo para aquellas mutaciones cuál de ellas lleva a una actividad específica incrementada o a una actividad incrementada por volumen, en particular por célula.

- 50 Es por lo tanto ventajoso expresar en una planta una molécula de ácido nucleico de la invención o un polipéptido de la invención derivado de un organismo lejanamente relacionado desde el punto de vista evolutivo, esto es por ejemplo utilizando un gen procarionte en un huésped eucariote, puesto que en estos casos el mecanismo de regulación de la célula huésped puede no debilitar la actividad (celular o específica) del gen o su producto de expresión.

- 55 La mutación se introduce de tal manera que la producción de los aminoácidos no se afecta adversamente.

Menor influencia sobre la regulación de un gen o su producto genético se entiende como una regulación reducida de la actividad enzimática que lleva a una actividad específica o celular incrementada del gen o su producto. Un

incremento de la actividad enzimática se entiende como una actividad enzimática, que se incrementa en al menos 10%, ventajosamente al menos 20, 30 o 40%, de forma especial ventajosamente en al menos 50, 60 o 70% en comparación con el organismo de partida.

5 La invención proporciona que los métodos anteriores puedan ejecutarse de tal manera que la tolerancia al estrés se incremente. También es posible obtener un descenso en la tolerancia al estrés.

10 La invención no está limitada a ácidos nucleicos específicos, polipéptidos específicos, tipos celulares específicos, células huésped específicas, condiciones específicas o métodos específicos etc., como tales, sí no que puede variar y numerosas modificaciones y variaciones en la misma serán evidentes para los experimentados en la técnica. También debe entenderse que la terminología utilizada aquí es para el propósito de describir realizaciones específicas solamente y no se debe entender como limitante.

La presente invención también se relaciona con Proteínas Relacionadas con el Estrés (SRP) que se seleccionan del grupo consistente de las proteínas de la figura 1a, 1b o 1c y/o homólogos de las mismas.

15 Preferiblemente, las Proteínas Relacionadas con el Estrés (SRP) de la presente invención se seleccionan a partir de levadura o *E. coli*. Adicionalmente, la presente invención se relaciona con ácidos nucleicos que codifican Proteínas Relacionadas con el Estrés (SRP) seleccionadas del grupo que comprende el ácido nucleico de la figura 1a, 1b, o 1c y/o homólogos de los mismos. Aquí, preferiblemente, un ácido nucleico que codifica una Proteína Relacionada con el Estrés (SRP) codifica un SRP que se selecciona de levadura o *E. coli*.

20 La presente invención proporciona secuencias de genes relacionadas con el estrés seleccionadas del grupo consistente del ácido nucleico de la figura 1a, 1b o 1c de levadura, preferiblemente de *Saccharomyces cerevisiae* o *E. coli*.

25 Homólogos de las secuencias antes mencionadas pueden aislarse de ventajosamente a partir de levaduras, hongos, virus, algas, bacterias tales como *Acetobacter* (subgen. *Acetobacter*) *aceti*; *Acidithiobacillus ferrooxidans*; *Acinetobacter* sp.; *Actinobacillus* sp.; *Aeromonas salmonicida*; *Agrobacterium tumefaciens*; *Aquifex aeolicus*; *Arcanobacterium pyogenes*; *Aster yellows phytoplasma*; *Bacillus* sp.; *Bifidobacterium* sp.; *Borrelia burgdorferi*; *Brevibacterium linens*; *Brucella melitensis*; *Buchnera* sp.; *Butyrivibrio fibrisolvens*; *Campylobacter jejuni*; *Caulobacter crescentus*; *Chlamydia* sp.; *Chlamydophila* sp.; *Clorobium limicola*; *Citrobacter rodentium*; *Clostridium* sp.; *Comamonas testosteroni*; *Corynebacterium* sp.; *Coxiella burnetii*; *Deinococcus radiodurans*; *Dichelobacter nodosus*; *Edwardsiella ictaluri*; *Enterobacter* sp.; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Escherichia coli*; *Flavobacterium* sp.; *Francisella tularensis*; *Frankia* sp. Cpl1; *Fusobacterium nucleatum*; *Geobacillus stearothermophilus*; *Gluconobacter oxydans*; *Haemophilus* sp.; *Helicobacter pylori*; *Klebsiella pneumoniae*; *Lactobacillus* sp.; *Lactococcus lactis*; *Listeria* sp.; *Mannheimia haemolytica*; *Mesorhizobium loti*; *Metilophaga thalassica*; *Microcystis aeruginosa*; *Microscilla* sp. PRE1; *Moraxella* sp. TA144; *Mycobacterium* sp.; *Mycoplasma* sp.; *Neisseria* sp.; *Nitrosomonas* sp.; *Nostoc* sp. PCC 7120; *Novosphingobium aromaticivorans*; *Oenococcus oeni*; *Pantoea citrea*; *Pasteurella multocida*; *Pediococcus pentosaceus*; *Phormidium foveolarum*; *Phytoplasma* sp.; *Plectonema boryanum*; *Prevotella ruminicola*; *Propionibacterium* sp.; *Proteus vulgaris*; *Pseudomonas* sp.; *Ralstonia* sp.; *Rhizobium* sp.; *Rhodococcus equi*; *Rhodothermus marinus*; *Rickettsia* sp.; *Riemerella anatipestifer*; *Ruminococcus flavefaciens*; *Salmonella* sp.; *Selenomonas ruminantium*; *Serratia entomophila*; *Shigella* sp.; *Sinorhizobium meliloti*; *Staphylococcus* sp.; *Streptococcus* sp.; *Streptomyces* sp.; *Synechococcus* sp.; *Synechocystis* sp. PCC 6803; *Thermotoga maritima*; *Treponema* sp.; *Ureaplasma urealyticum*; *Vibrio cholerae*; *Vibrio parahaemolyticus*; *Xylella fastidiosa*; *Yersinia* sp.; *Zymomonas mobilis*, preferably *Salmonella* sp. o *Escherichia coli* o plantas preferiblemente de levaduras tales como las del género de los *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula*, *Torulopsis* o *Schizosaccharomyces* o plantas tales como *Arabidopsis thaliana*, maíz, trigo, centeno, avena, tritical, arroz, cebada, soja, cacahuate, algodón, borraja, girasol, linaza, primúla, colza, canola y nabo, mandioca, pimienta girasol, claveles, plantas solanáceas tales como patata, tabaco o berenjena y tomate, especies de *Vicia*, guisantes, alfalfa, arbustos tales como café, cacao, té, especies de *Salix*, árboles tales como palma de aceite, coco, césped perenne, tales como lolio y festuca y cultivos de forraje, tales como alfalfa y trébol y de abeto, pino o pinabete, por ejemplo. Más preferiblemente pueden aislarse homólogos de las secuencias antes mencionadas a partir de *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli* o plantas, preferiblemente *Brassica napus*, *Glicina max* u *Oryza sativa*.

50 Las proteínas relacionadas con el estrés de la presente invención se producen preferiblemente por técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína se clona en un vector de expresión, por ejemplo, en un vector binario, el vector de expresión es introducido en una célula huésped, por ejemplo la NASC N906 tipo silvestre de *Arabidopsis thaliana* o cualquier otra célula vegetal tal como se describe en los ejemplos que se encuentran más abajo, y la proteína relacionada con el estrés se expresa en dicha célula huésped. Ejemplos para vectores binarios son pBIN19, pBI101, pBinAR, pGPTV, pCAMBIA, pBIB-HYG, pBecks, pGreen o pZP (Hajukiewicz, P. et al., 1994, *Plant Mol. Biol.*, 25: 989-994 and Hellens et al, *Trends in Plant Science* (2000) 5, 446-451.).

Ventajosamente, las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la invención o el constructo genético junto con al menos un gen informador se clonan en un casete de expresión, el cual se introduce en el organismo a través de un vector o directamente en el genoma. Este gen informador permitiría una detección fácil a través de un ensayo de crecimiento, fluorescencia, químico, bioluminescencia o resistencia o a través de una medición fotométrica. Ejemplos de genes informadores que pueden mencionarse son genes antibióticos o de resistencia a herbicidas, genes de hidrolasa, genes de proteína con fluorescencia, genes de bioluminescencia, genes metabólicos de azúcar o nucleótidos, o genes de biosíntesis tales como el gen Ura3, el gen *Ilv2*, el gen luciferasa, el gen beta-galactosidasa, el gen *gfp*, el gen de 2-desoxiglucosa-6-fosfato fosfatasa, el gen β -glucoronidasa, el gen β -lactamasa, el gen neomicin fosfotransferasa, el gen higromicin fosfotransferasa o el gen BASTA (= de resistencia a glufosinato). Estos genes permiten una fácil medición y cuantificación de la actividad de transcripción y por lo tanto de la expresión de los genes. De esta forma pueden identificarse posiciones en el genoma que exhiben una productividad diferenciadora.

En una realización preferida un constructo de ácido nucleico, por ejemplo un casete de expresión, comprende corriente arriba, esto es en el extremo 5' de la secuencia de codificación, un promotor y corriente abajo, esto es en el extremo 3', una señal de poliadenilación y opcionalmente otros elementos reguladores que están enlazados de forma operativa con las secuencias codificadoras que intervienen con el ácido nucleico de SEQ ID No: 1. Mediante un enlace operable se entiende la disposición secuencial del promotor, la secuencia de codificación, el terminador y otros elementos reguladores opcionalmente de tal forma que cada uno de los elementos reguladores pueda cumplir con su función en la expresión de la secuencia de codificación de manera debida. Las secuencias preferidas para el enlazamiento operables son secuencias objetivo para asegurar una localización subcelular en los plástidos. Sin embargo, las secuencias objetivo para asegurar la localización subcelular en el mitocondrio, en el retículo endoplasmático (=ER), en el núcleo, o en corpúsculos oleosos u otros compartimientos también pueden emplearse como promotores de traducción tal como la secuencia guía 5' en el virus mosaico del tabaco (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693-8711).

Un constructo de ácido nucleico, por ejemplo un casete de expresión, puede contener por ejemplo, un promotor constitutivo o un promotor específico de tejidos (preferiblemente el promotor USP o *napina*) del gen que se va expresar y la señal de retención de ER. Para la señal de retención de ER la secuencia de aminoácidos KDEL (lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, leucina) o la secuencia de aminoácidos KKK (lisina-lisina-X-detención, donde X significa cualquier otro aminoácido conocido) se emplea de preferencia.

Para expresión en un organismo huésped procarionte o eucariote, por ejemplo un organismo tal como un hongo o una planta el casete de expresión se inserta ventajosamente en un vector tal como a manera de ejemplo, un plásmido, un fago u otro ADN que permita una expresión óptima de los genes en el organismo huésped. Ejemplos de plásmidos adecuados in *E. coli* pLG338, pACYC184, pBR series such as e.g. pBR322, pUC series such as pUC18 o pUC19, M113mp series, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III113-B1, λ gt11 o pBdCl; in *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 o pIJ361; in *Bacillus* pUB110, pC194 o pBD214; in *Corynebacterium* pSA77 o pAJ667; in fungi pALS1, pIL2 o pBB116; otros vectores fúngicos ventajosos están descritos por Romanos, M.A. et al., [(1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", *Yeast* 8: 423-488] and by van den Hondel, C.A.M.J.J. et al. [(1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi" as well as in *More Gene Manipulations in Fungi* [J.W. Bennet & L.L. Lasure, eds., pp. 396-428: Academic Press: San Diego] and in "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi" [van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, Peberdy, J.F. et al., eds., pp. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge]. Ejemplos de promotores de levadura ventajosos son 2 μ M, pAG-1, YEp6, YEp13 o pEMBLyE23. Ejemplos de promotores de algas o plantas son pLGV23, pGHlac+, pBIN19, pAK2004, pVKH o pDH51 (see Schmidt, R. and Willmitzer, L., 1988). Los vectores identificados más arriba o derivados de los vectores identificados más arriba son una selección pequeña de los plásmidos posibles. Plásmidos adicionales son bien conocidos para los experimentados en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en el libro *Cloning Vectors* (Eds. Pouwels P.H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018). Vectores de plantas adecuados están descritos inter alia en "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Ch.6/7, pp. 71-119. Los vectores ventajosos son conocidos como vectores lanzadera o vectores binarios que replican en *E. coli* y *Agrobacterium*.

Por vectores se entiende con la excepción de los plásmidos todos los otros vectores conocidos para los experimentados en la técnica tales como a manera de ejemplo fagos, virus tales como SV40, CMV, baculovirus, adenovirus, transposones, elementos IS, fásmidos, fagémidos, cósmidos, ADN lineal o circular. Estos vectores pueden replicarse de forma autónoma en el organismo huésped o replicarse de forma cromosómica, siendo preferida la replicación cromosómica.

En una realización adicional del vector el casete de expresión de acuerdo con la invención también puede ser introducido de forma ventajosa en los organismos en la forma de un ADN lineal e integrarse en el genoma del organismo huésped mediante recombinación heteróloga u homóloga. Este ADN lineal puede componerse de un plásmido linealizado o solamente del casete de expresión como vector o de la secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

En una realización adicional ventajosa la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención también puede introducirse en un organismo por sí misma.

Si además de la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención se van a introducir genes adicionales en el organismo, todos juntos con un gen informador en un vector sencillo o cada gen individual con un gen informador en un vector, en cada caso puede introducirse en el organismo, mediante lo cual los diferentes vectores pueden introducirse de forma simultánea o sucesiva.

El vector contiene ventajosamente al menos una copia de las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la invención y/o el casete de expresión (=constructor de gen) de acuerdo con la invención.

La invención proporciona adicionalmente un vector de expresión recombinante aislado que comprende un ácido nucleico SRP tal como se describe más arriba, donde la expresión del vector en una célula huésped da como resultado una tolerancia incrementada a la sequía en comparación con una variedad de tipo silvestre de la célula huésped. Tal como se utiliza aquí, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha enlazado. Un tipo de vector es un "plásmido", el cual se refiere a un bucle de ADN de doble cadena circular en el cual se pueden ligar segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector viral, 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, los vectores bacteriales que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamíferos episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episomales) se integran en el genoma de una célula huésped por introducción en la célula huésped, y por lo tanto se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los cuales están enlazados operativamente. Tales vectores se denominan aquí como "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en la forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" pueden utilizarse de forma intercambiable puesto que el plásmido es la forma de vector más usada comúnmente. Sin embargo, la invención pretende incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos de replicación, adenovirus y virus adenoasociados), los cuales sirven para funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinante de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para expresión del ácido nucleico en una célula huésped, lo que significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas sobre la base de las células huésped que se van a usar para la expresión, las cuales están enlazadas operativamente a la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar. Tal como se utiliza aquí con respecto a un vector de expresión recombinante, "enlazado de forma operativa" pretende indicar que la secuencia de nucleótidos de interés está enlazada a la secuencia (s) reguladora (s) de una forma tal que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción in vitro o en una célula huésped cuando el vector se introduce en la célula huésped). El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) and Gruber and Crosby, in: *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, eds. Glick and Thompson, Chapter 7, 89-108, CRC Press: Boca Raton, Florida, incluyendo las referencias contenidas en el mismo. Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótido en muchos tipos de células huésped y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solamente en ciertas células huésped bajo ciertas condiciones. Será evidente para los experimentados en la técnica que el diseño del vector de expresión puede depender de tales factores como la selección de la célula huésped que se va a transformar, el nivel de expresión del polipéptido deseado, etc. Los vectores de expresión de la invención pueden introducirse en las células huésped para producir por lo tanto polipéptidos o péptidos, incluyendo polipéptidos o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos tal como se describe aquí (por ejemplo, SRP, formas mutantes de SRP, polipéptidos de fusión, etc.).

Los vectores de expresión recombinante de la invención pueden diseñarse para la expresión de SRP en células procariones o eucariones. Por ejemplo, los genes SRP pueden expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insectos (utilizando vectores de expresión de baculovirus), levaduras y otras células fúngicas (véase 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*, in: *More Gene Manipulations in Fungi*, J.W. Bennet & L.L. Lasure, eds., p. 396-428: Academic Press: San Diego; and van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J., 1991, *Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi*, in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, Peberdy, J.F. et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge), algas (Falciatore et al., 1999, *Marine Biotechnology* 1 (3):239-251), ciliados de los tipos: Holotrichia, Peritrichia, Spirotrichia, Suctorina, Tetrahymena, Paramecium, Colpidium, Glaucocystis, Platyophrya, Potomacrus, Pseudocohnilembus, Euplotes, Engelmanniella, y Stylonychia, especialmente del género Stylonychia lemnae con vectores que siguen un método de transformación como el descrito en la solicitud PCT No. WO 98/01572, y células de plantas multicelulares (véase Schmidt, R. y Willmitzer, L., 1988, *High efficiency Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Arabidopsis*

5 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. Jenés et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. Kung und R. Wu, 128-43, Academic Press: 1993; Potrykus, 1991, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42:205-225 y referencias citadas en la misma) o células de mamíferos. Células huésped adecuadas se discuten adicionalmente en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press: San Diego, CA (1990). Alternativamente, el vector de expresión recombinante puede transcribirse y traducirse in vitro, por ejemplo utilizando secuencias reguladoras de promotor T7 polimerasa.

10 La expresión de los polipéptidos en los procariones se lleva a cabo más frecuentemente con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de polipéptidos bien sea de fusión o no fusión. Los vectores de fusión agregan un número de aminoácidos a un polipéptido codificado en ellos, usualmente al término amino de polipéptido recombinante pero también en el término C o fusionado con regiones adecuadas en los polipéptidos. Tales vectores de fusión sirven típicamente para tres propósitos: 1) para incrementar la expresión de un polipéptido recombinante; 2) para incrementar la solubilidad de un polipéptido recombinante; y 3) para ayudar en la purificación de un polipéptido recombinante actuando como ligando en purificación por afinidad. A menudo, en los vectores de expresión por fusión, se introduce un sitio de ruptura proteolítica en la unión de la unidad estructural de fusión y el polipéptido recombinante para permitir la separación del polipéptido recombinante de la unidad estructural de fusión subsecuentemente a la purificación del polipéptido de fusión. Tales enzimas, y sus secuencias de región análoga, incluyen el factor Xa, trombina y enteroquinasa.

20 A manera de ejemplo el casete de expresión de la planta puede instalarse en el vector de transformación pRT ((a) Toepfer et al., 1993, *Methods Enzymol.*, 217: 66-78; (b) Toepfer et al. 1987, *Nucl. Acids. Res.* 15: 5890 ff.).

Alternativamente, también puede transcribirse un vector recombinante (=vector de expresión) y traducirse in vitro, por ejemplo, utilizando el promotor T7 y la T7 ARN polimerasa.

25 Los vectores de expresión empleados en los procariones frecuentemente hacen uso de sistemas inducibles con y sin proteínas de fusión u oligopéptidos de fusión, donde estas fusiones pueden tener lugar tanto en la forma N-terminal y C-terminal o en otros dominios útiles de una proteína. Tales vectores de fusión tienen usualmente los siguientes propósitos: i) incrementar la tasa de expresión de ARN; ii) incrementar la tasa de síntesis de proteína alcanzable; iii) incrementar la solubilidad de la proteína; iv) o simplificar la purificación por medio de secuencias enlazables utilizables para la cromatografía por afinidad. Los puntos de ruptura proteolítica también se introducen frecuentemente a través de proteínas de fusión, lo que permite la ruptura de una porción de la proteína de fusión y purificación. Tales secuencias de reconocimiento para proteasas son reconocidas, por ejemplo, el factor Xa, trombina y enteroquinasa.

35 Vectores de fusión y expresión típicos ventajosos son 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), los cuales contienen glutatona S-transferasa (GST), proteína enlazante de la maltosa o proteína A.

40 En una realización, la secuencia de codificación de la SRP se clona en un vector de expresión pGEX para crear un vector que codifica un polipéptido de fusión que comprende, desde el término N hasta el término C, el polipéptido de ruptura en el sitio X de GST trombina. El polipéptido de fusión puede purificarse por cromatografía de afinidad utilizando resina de glutatona-agarosa. El PKSRP recombinante no fusionado con GST puede recuperarse por ruptura del polipéptido de fusión con trombina.

Otros ejemplos de vectores de expresión de *E. coli* son pTrc (pTrc [Amann et al., (1988) *Gene* 69:301-315] y vectores pET [Studier et al., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89; Stratagene, Amsterdam, países bajos.

45 La expresión del gen objetivo a partir del vector pTrc descansa en la transcripción de la ARN polimerasa huésped a partir de un promotor de fusión híbrido trp-lac. La expresión del gen objetivo del vector pET11d se basa en la transcripción desde un promotor de fusión T7gnd 10-lac mediado por polimerasa de ARN viral coexpresada (T7 gn1). Esta polimerasa viral se suministra mediante cepas huésped BL21 (DE3) o HMS174 (DE3) a partir de un profago residente λ que aloja un gen T7 gn1 bajo el control transcripcional del promotor lacUV5.

50 Una estrategia para maximizar la expresión del polipéptido recombinante es expresar el polipéptido en una bacteria huésped con una capacidad disminuida para escindir proteolíticamente el 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 se va insertar en un vector de expresión de tal manera que los codones individuales para cada aminoácido son aquellos que se utilizan preferencialmente en la bacteria escogida para la expresión, tal como C.glutámicoum (Wada et al., 1992, *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118). Tal alteración de la secuencias de ácido nucleico de la invención pueden llevarse a cabo mediante técnicas de síntesis estándar de ADN.

Otros vectores ventajosos para su uso en levaduras son pYepSec1 (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 pYES derivatives (Invitrogen Corporation, San Diego, California). Los vectores para uso en hongos filamentosos están descritos en van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems y vector development for filamentous fungi", in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, J.F. Peberdy, et al., eds., pp. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

Alternativamente, los vectores de expresión en células de insectos también pueden utilizarse ventajosamente, por ejemplo, para la expresión en células Sf9. Estos son por ejemplo los vectores de la serie pAc series (Smith et al. (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) y the pVL series (Lucklow y Summers (1989) *Virology* 170:31-39).

Adicionalmente, las células vegetales o células de algas pueden utilizarse ventajosamente para la expresión genética. Ejemplos de vectores de expresión en plantas pueden encontrarse 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 o in Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", *Nucl. Acid. Res.* 12: 8711-8721.

Adicionalmente, las secuencias de ácidos nucleicos pueden expresarse también en células de mamíferos, ventajosamente en células de mamíferos no humanos. Ejemplos de vectores de expresión correspondientes son pCDM8 y pMT2PC cuya referencia se encuentra en: Seed, B. (1987) *Nature* 329:840 o Kaufman et al. (1987) *EMBO J.* 6: 187-195). Al mismo tiempo los promotores preferidos para uso son de origen viral, tales como a manera de ejemplo los promotores de poliovirus, adenovirus 2, sitomegalovirus o virus 40 de simios. Otros sistemas de expresión procarionte y eucarionte están citados en los capítulos 16 y 17 de Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

En una realización preferida de la presente invención, las SRP se expresan en plantas y células vegetales tales como células vegetales unicelulares (por ejemplo algas) (véase Falciatore et al., 1999, *Marine Biotechnology* 1 (3):239-251 y referencias contenidas en la misma) y células vegetales de plantas superiores (por ejemplo, los espermatofitos, tales como plantas de cultivos). Una SRP puede ser "introducida" en una célula vegetal por cualquier medio, incluyendo transfección, transformación o transducción, electroporación, bombardeo con partículas, agroinfección y similares. Un método de transformación conocido para los experimentados en la técnica es la inmersión de una planta en florescencia en una solución de agrobacteria, donde la agrobacteria contiene el ácido nucleico de SRP, seguida por cruce de los gametos transformados.

Otros métodos adecuados para transformar o transfectar células huésped incluyendo células vegetales pueden encontrarse 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 en otros manuales de laboratorio tales como *Methods in Molecular Biology*, 1995, Vol. 44, *Agrobacterium protocols*, ed: Gartland and Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey. Puesto que la tolerancia al estrés biótico y abiótico es una característica general deseable de ser heredada en una amplia variedad de plantas tales como maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, soja, cacahuate, algodón, colza y canola, mandioca, pimienta, girasol y claveles, plantas solanáceas tales como patata, tabaco, berenjena y tomate, especies de Vicia, guisantes, alfalfa, arbustos (café, cacao, té), especies de salix, árboles (palma de aceite, coco), gramíneas perennes, y cultivos para forraje, estas plantas de cultivo son también plantas objetivo preferidas para una ingeniería genética como una realización adicional de la presente invención. Los cultivos para forraje incluyen, pero no se limitan a, Wheatgrass, Canarygrass, Bromegrass, Wildrye Grass, Bluegrass, Orchardgrass, Alfalfa, Salfoin, Birdsfoot Trefoil, Alsike Clover, Red Clover, and Sweet Clover.

En una realización de la presente invención, la transfección de una SRP en una planta es lograda mediante la transferencia genética mediada por agrobacterium. La transformación de una planta mediada por agrobacterium puede llevarse a cabo utilizando por ejemplo una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90) (Koncz y Schell, 1986, *Mol. Gen. Genet.* 204:383-396) o LBA4404 (Clontech). La transformación puede llevarse a cabo mediante técnicas de transformación y regeneración estándar (Deblaere et al., 1994, *Nucl. Acids Res.* 13:4777-4788; Gelvin, Stanton B. y Schilperoort, Robert A, *Plant Molecular Biology Manual*, 2nd Ed. - Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995. - in Sect., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R.; Thompson, John E., *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Boca Raton: CRC Press, 1993 360 S., ISBN 0-8493-5164-2). Por ejemplo, la colza puede ser transformada a través de transformación de cotiledones o hipocotiledones (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 selección de plantas depende del vector binario y de la cepa de *Agrobacterium* utilizada para la transformación. La selección de la colza se lleva a cabo normalmente utilizando kanamicina como marcador vegetal seleccionable. La transferencia genética mediada por *Agrobacterium* a la linaza puede llevarse 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 llevarse a cabo utilizando por ejemplo una técnica descrita en la patente Europea No 0424047, la patente de los Estados Unidos No 5,322,783, la patente Europea No 0397687, 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 lograrse mediante bombardeo con partículas, consumo de ADN mediado por polietilenglicol o a través de la técnica de fibra de carburo de silicio. (véase, 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 encontrarse en la solicitud PCT No WO 93/07256.

5 De acuerdo con la presente invención, la SRP introducida puede mantenerse en la célula vegetal de forma estable si se incorpora en un replicón autónomo no cromosómico en los cromosomas de la planta. Alternativamente, la SRP introducida puede estar presente sobre un vector extra cromosómico no replicante y expresarse de forma transiente o ser activo de forma transiente.

10 En una realización puede crearse un microorganismo recombinante homólogo donde la SRP se integra en un cromosoma, se prepara un vector que contiene al menos una porción de un gen de SRP en el cual se ha introducido una eliminación, adición o sustitución para alterar de esta manera, por ejemplo, perturbar funcionalmente, el gen SRP. Preferiblemente el gen de SRP es un gen de levadura, *E. coli*, *Brassica napus*, *Glicina max*, u *Oryza sativa*, pero puede ser un homólogo de una planta relacionada o incluso una fuente de un mamífero o insecto. En una realización, el vector está diseñado de tal manera que por recombinación homóloga, el gen de SRP endógeno se perturba funcionalmente (esto es, no codifica más un polipéptido funcional; también se conoce como un vector de 15 sustitución). Alternativamente, el vector puede estar diseñado de tal manera que, por recombinación homóloga, se muta el gen endógeno de SRP o se altera de alguna otra manera pero aún codifica un polipéptido funcional (por ejemplo, la región reguladora corriente arriba puede alterarse para mediante ello alterar la expresión de la SRP endógena). Para crear una mutación puntual a través de una recombinación homóloga, pueden utilizarse híbridos de ADN-ARN en una técnica conocida como quimeraplástia (Cole-Strauss et al., 1999, *Nucleic Acids Research* 27(5):1323-1330 and Kmiec, 1999 *Gene therapy American Scientist*. 87(3):240-247). Los procedimientos de 20 recombinación homóloga en la *Physcomitrella patens* también son bien conocidos en la técnica y se contemplan para su uso aquí.

25 Mientras tanto en el vector de recombinación homólogo, la porción alterada del gen SRP está flanqueada en sus extremos 5' y 3' por una molécula de ácido nucleico adicional del gen de SRP para permitir que ocurra la recombinación homóloga entre el gen de SRP exógeno portado por el vector y el gen SRP endógeno, en un microorganismo o planta. La molécula de ácido nucleico de SRP flanqueante adicional es de longitud suficiente para una recombinación homóloga exitosa con el gen endógeno. Típicamente, se incluyen varios cientos de pares de bases hasta kilobases de ADN flanqueante (tanto en el extremo 5' como en el extremo 3') en el vector. Véase, por ejemplo, Thomas, K.R., y Capecchi, M.R., 1987, *Cell* 51:503 para una descripción de los vectores de recombinación 30 homóloga o Strepp et al., 1998, *PNAS*, 95 (8):4368-4373 para recombinación basada en ADNc en *Physcomitrella patens*). El vector se introduce en un microorganismo o célula vegetal (por ejemplo, a través de ADN mediado por polietilén glicol), y las células en las cuales el gen PKSRP introducido se ha recombinado de forma homóloga con el gen PKSRP endógeno se seleccionan utilizando técnicas conocidas en el arte.

35 En otra realización, los microorganismos recombinantes pueden producirse de tal manera que contengan sistemas seleccionados que permitan la expresión regulada del gen introducido. Por ejemplo, la inclusión de un gen de SRP en un vector que lo coloca bajo control del operón lac permite la expresión del gen de SRP solamente en la presencia de IPTG. Tales sistemas reguladores son bien conocidos en la técnica.

40 Bien sea que esté presente en un vector no replicante extra cromosómico o en un vector integrado en un cromosoma, el polinucleótido de SRP reside preferiblemente en un casete de expresión vegetal. Un casete de expresión vegetal contiene preferiblemente secuencias reguladoras capaces de conducir la expresión genética en células vegetales que están enlazadas operativamente de tal manera que cada secuencia puede cumplir su función, por ejemplo, la terminación de la transcripción por señales de poliadenilación. Las señales de poliadenilación 45 preferidas son las que se originan en ADN-t de *Agrobacterium tumefaciens* tales como el gen 3 conocido como octopina sintasa de Ti del plásmido pTiACH5 (Gielen et al., 1984, *EMBO J.* 3:835) o equivalentes funcionales del mismo pero también son adecuados otros terminadores funcionalmente activos en las plantas. Como expresión genética en una planta frecuentemente no está limitado a niveles transcripcionales, un casete de expresión en plantas contiene preferiblemente otras secuencias enlazadas de forma operativas tales como potenciadores 50 translacionales tales como la secuencia de sobreconducción que contiene la secuencia guía 5' no traducida del virus mosaico del tabaco que potencia el polipéptido por proporción de ARN (Gallie et al., 1987, *Nucl. Acids Research* 15:8693-8711). Ejemplos de vectores de expresión incluyen los 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; y Bevan, M.W., 1984, *Binary Agrobacterium vectors for plant transformation*, *Nucl. Acid. Res.* 12:8711-8721; y Vectores para transferencia de genes en plantas superiores en: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds.: Kung and R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.

55 "Transformación" se define aquí como un proceso para introducir ADN heterólogo en una célula vegetal, tejido vegetal o planta. Puede ocurrir bajo condiciones naturales o artificiales utilizando métodos diversos bien conocidos en la técnica. La transformación puede basarse sobre cualquier método conocido para la inserción de secuencias de ácidos nucleicos foráneos en células huésped procariotes o eucariotes. El método se selecciona con base en la célula huésped que está siendo transformada y puede incluir, pero no se limita a, infección viral, electroporación,

- lipofección y bombardeo con partículas. Tales células “transformadas” incluyen células transformadas de forma estable en las cuales el ADN insertado es capaz de replicar bien sea como un plásmido replicante de forma autónoma o como parte de un cromosoma huésped. También incluyen células que expresan de forma transiente el ADN o ARN insertados por períodos limitados de tiempo. Las células vegetales transformadas, tejidos vegetales o plantas se entiende que abarcan no solamente el producto final de un proceso de transformación, sino también la progenie transgénica de los mismos.
- Los términos “transformado”, “transgénico” y “recombinante” se refieren a un organismo huésped tal como una bacteria o una planta en la cual se ha introducido una molécula de ácido nucleico heteróloga. La molécula de ácido nucleico puede ser integrada de forma estable en el genoma del huésped o la molécula de ácido nucleico también puede estar presente como una molécula extracromosómica. Tal molécula extracromosómica puede ser autorreplicante. Las células, tejidos o plantas transformados se entiende que abarcan no solamente el producto final de un proceso de transformación, sino también la progenie transgénica de los mismos. Un huésped “no transformado”, “no transgénico” o “no recombinante” se refiere a un organismo tipo silvestre, por ejemplo, una bacteria o planta, que no contiene la molécula de ácido nucleico heteróloga.
- Una “planta transgénica”, tal como se utiliza aquí, se refiere a una planta que contiene secuencias de nucleótidos foráneas insertadas bien sea en su genoma nuclear o en su genoma organelar. Abarca adicionalmente las generaciones resultantes, esto es, las generaciones T1-, T2- y consecutivas o BC1-, BC2- y generaciones consecutivas así como cruces de las mismas con plantas no transgénicas u otras transgénicas.
- El organismo huésped (= organismo transgénico) contiene ventajosamente al menos una copia del ácido nucleico de acuerdo con la invención y/o del constructo del ácido nucleico de acuerdo con la invención.
- En principio, todas las plantas pueden ser utilizadas como organismos huésped. Plantas transgénicas preferidas son seleccionadas, por ejemplo, de las familias Aceraceae, Anacardiaceae, Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Cactaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, Nymphaeaceae, Papaveraceae, Rosaceae, Salicaceae, Solanaceae, Arecaceae, Bromeliaceae, Cyperaceae, Iridaceae, Liliaceae, Orchidaceae, Gentianaceae, Labiaceae, Magnoliaceae, Ranunculaceae, Carifolaceae, Rubiaceae, Scrophulariaceae, Caryophyllaceae, Ericaceae, Polygonaceae, Violaceae, Juncaceae o Poaceae y preferiblemente de una planta seleccionada del grupo de las familias Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Papaveraceae, Rosaceae, Solanaceae, Liliaceae o Poaceae. SE prefieren plantas de cultivo tales como plantas seleccionadas ventajosamente del grupo consistente de los géneros decacahuete, colza, canola, girasol, cártamo, oliva, sésamo, avellana, almendra, aguacate, calabaza/zapallo, linaza, soja, pistacho, borraja, maíz, trigo, centeno, avena, sorgo y millo, tritical, arroz, cebada, casabe, patata, remolacha, berenjena, alfalfa y pastos perennes y plantas de forraje, palma de aceite, vegetales (brassicas, vegetales de raíz, vegetales de tubérculo, vegetales de vaina, vegetales frutales, vegetales de cebolla, vegetales de hojas y vegetales de tallo), alforfón, alcachofa de Jerusalén, judía ancha, algarrobo, lentejas, judía enana, lupino, trébol y Lucerna, para mencionar sólo algunas de ellas. En una realización preferida, la planta huésped se selecciona de las familias Aceraceae, Anacardiaceae, Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Cactaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, Nymphaeaceae, Papaveraceae, Rosaceae, Salicaceae, Solanaceae, Arecaceae, Bromeliaceae, Cyperaceae, Iridaceae, Liliaceae, Orchidaceae, Gentianaceae, Labiaceae, Magnoliaceae, Ranunculaceae, Carifolaceae, Rubiaceae, Scrophulariaceae, Caryophyllaceae, Ericaceae, Polygonaceae, Violaceae, Juncaceae o Poaceae y preferiblemente de una planta seleccionada del grupo de las familias Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Papaveraceae, Rosaceae, Solanaceae, Liliaceae o Poaceae. Se prefieren plantas de cultivo y en particular y en particular las plantas mencionadas arriba como plantas huésped tales como las familias y géneros mencionados arriba, prefiriéndose por ejemplo las especies *Anacardium occidentale*, *Calendula officinalis*, *Carthamus tinctorius*, *Cichorium intybus*, *Cynara scolymus*, *Helianthus annuus*, *Tagetes lucida*, *Tagetes erecta*, *Tagetes tenuifolia*; *Daucus carota*; *Corylus avellana*, *Corylus colurna*, *Borago officinalis*; *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp., *Sinapis arvensis* *Brassica juncea*, *Brassica juncea* var. *juncea*, *Brassica juncea* var. *crispifolia*, *Brassica juncea* var. *foliosa*, *Brassica nigra*, *Brassica sinapioides*, *Melanosinapis communis*, *Brassica oleracea*, *Arabidopsis thaliana*, *Anana comosus*, *Ananas ananas*, *Bromelia comosa*, *Carica papaya*, *Cannabis sativa*, *Ipomoea batatas*, *Ipomoea pandurata*, *Convolvulus batatas*, *Convolvulus tiliaceus*, *Ipomoea fastigiata*, *Ipomoea tiliacea*, *Ipomoea triloba*, *Convolvulus panduratus*, *Beta vulgaris*, *Beta vulgaris* var. *altissima*, *Beta vulgaris* var. *vulgaris*, *Beta maritima*, *Beta vulgaris* var. *perennis*, *Beta vulgaris* var. *conditiva*, *Beta vulgaris* var. *esculenta*, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita mixta*, *Cucurbita pepo*, *Cucurbita moschata*, *Olea europaea*, *Manihot utilissima*, *Janipha manihot* "Jatropha manihot.", *Manihot aipil*, *Manihot dulcis*, *Manihot manihot*, *Manihot melanobasis*, *Manihot esculenta*, *Ricinus communis*, *Pisum sativum*, *Pisum arvense*, *Pisum humile*, *Medicago sativa*, *Medicago falcata*, *Medicago varia*, *Glicina max* *Dolichos soja*, *Glicina gracilis*, *Glicina hispida*, *Phaseolus max*, *Soja hispida*, *Soja max*, *Cocos nucifera*, *Pelargonium grossularioides*, *Oleum cocoas*, *Laurus nobilis*, *Persea americana*, *Arachis hipogaea*, *Linum usitatissimum*, *Linum humile*, *Linum austriacum*, *Linum bienne*, *Linum angustifolium*, *Linum catharticum*, *Linum flavum*, *Linum grandiflorum*, *Adenolinum grandiflorum*, *Linum lewisii*, *Linum narbonense*, *Linum perenne* var. *lewisii*, *Linum pratense*, *Linum trigynum*, *Punica granatum*, *Gossypium hirsutum*, *Gossypium arboreum*, *Gossypium barbadense*, *Gossypium herbaceum*, *Gossypium thurberi*, *Musa nana*, *Musa acuminata*, *Musa paradisiaca*, *Musa* spp., *Elaeis guineensis*, *Papaver orientale*, *Papaver rhoeas*, *Papaver dubium*, *Sesamum indicum*, *Piper aduncum*, *Piper amalago*, *Piper angustifolium*, *Piper auritum*, *Piper betel*, *Piper cubeba*, *Piper longum*, *Piper nigrum*, *Piper*

- retrofractum, Artanthe adunca, Artanthe elongata, Peperomia elongata, Piper elongatum, Steffensia elongata, ,
 Hordeum vulgare, Hordeum jubatum, Hordeum murinum, Hordeum secalinum, Hordeum distichon o Hordeum
 aegiceras, Hordeum hexastichon., Hordeum hexastichum, Hordeum irregulare, Hordeum sativum, Hordeum
 secalinum, Avena sativa, Avena fatua, Avena byzantina, Avena fatua var. sativa, Avena hybrida, Sorghum bicolor,
 5 Sorghum halepense, Sorghum saccharatum, Sorghum vulgare, Andropogon drummondii, Holcus bicolor, Holcus
 sorghum, Sorghum aetiopicum, Sorghum arundinaceum, Sorghum caffrorum, Sorghum cernuum, Sorghum dochna,
 Sorghum drummondii, Sorghum durra, Sorghum guineense, Sorghum lanceolatum, Sorghum nervosum, Sorghum
 saccharatum, Sorghum subglabrescens, Sorghum verticilliflorum, Sorghum vulgare, Holcus halepensis, Sorghum
 10 miliaceum millet, Panicum militaceum, Zea mays, Triticum aestivum, Triticum durum, Triticum turgidum, Triticum
 hybernum, Triticum macha, Triticum sativum o Triticum vulgare, Coffea spp., Coffea arabica, Coffea canephora,
 Coffea liberica, Capsicum annuum, Capsicum annuum var. glabriusculum, Capsicum frutescens, Capsicum annuum,
 Nicotiana tabacum, Solanum tuberosum, Solanum melongena, Lycopersicon esculentum, Lycopersicon
 lycopersicum., Lycopersicon piriforme, Solanum integrifolium, Solanum lycopersicum Theobroma cacao o Camellia
 sinensis.
- 15 Anacardiaceae tales como los géneros Pistacia, Mangifera, Anacardium e.g. las especies Pistacia vera [pistachos,
 Pistazie], Mangifer indica [Mango] o Anacardium occidentale [Anacardo]; Asteraceae tales como los géneros
 Calendula, Carthamus, Centaurea, Cichorium, Cynara, Helianthus, Lactuca, Locusta, Tagetes, Valeriana e.g. las
 especies Calendula officinalis [Maravilla], Carthamus tinctorius [Cártamo], Centaurea cyanus [azulejo], Cichorium
 20 intybus [margarita azul], Cynara scolymus [Alcachofa], Helianthus annuus [Girasol], Lactuca sativa, Lactuca crisper,
 Lactuca esculenta, Lactuca scariola L. ssp. sativa, Lactuca scariola L. var. integrata, Lactuca scariola L. var.
 integrifolia, Lactuca sativa subsp. romana, Locusta communis, Valeriana locusta [lechuga], Tagetes lucida, Tagetes
 erecta o Tagetes tenuifolia [Maravilla]; Apiaceae tales como los géneros Daucus e.g. las especies Daucus carota
 [zanahoria]; Betulaceae tales como los géneros Corylus e.g. las especies Corylus avellana o Corylus colurna
 [avellana]; Boraginaceae tales como los géneros Borago e.g. las especies Borago officinalis [borraja]; Brassicaceae
 25 tales como los géneros Brassica, Melanosinapis, Sinapis, Arabidopsis e.g. las especies Brassica napus, Brassica
 rapa ssp. [canola, colza, nabo], Sinapis arvensis Brassica juncea, Brassica juncea var. juncea, Brassica juncea var.
 crispifolia, Brassica juncea var. foliosa, Brassica nigra, Brassica sinapioides, Melanosinapis communis [mustard],
 Brassica oleracea [fodder beet] o Arabidopsis thaliana; Bromeliaceae tales como los géneros Anana, Bromelia e.g.
 las especies Anana comosus, Ananas ananas o Bromelia comosa [piña]; Caricaceae tales como los géneros Carica
 30 e.g. las especies Carica papaya [papaya]; Cannabaceae tales como los géneros Cannabis e.g. las especies
 Cannabis sativa [cáñamo], Convolvulaceae tales como los géneros Ipomea, Convolvulus e.g. las especies Ipomea
 batatas, Ipomea pandurata, Convolvulus batatas, Convolvulus tiliaceus, Ipomea fastigiata, Ipomea tiliacea,
 Ipomea triloba o Convolvulus panduratus [patata dulce, Hombre de Tierra, patata silvestre], Chenopodiaceae tales
 como los géneros Beta, i.e. las especies Beta vulgaris, Beta vulgaris var. altissima, Beta vulgaris var. Vulgaris,
 35 Beta maritima, Beta vulgaris var. perennis, Beta vulgaris var. conditiva o Beta vulgaris var. esculenta [remolacha de
 azúcar]; Cucurbitaceae tales como los géneros Cucurbita e.g. las especies Cucurbita maxima, Cucurbita mixta,
 Cucurbita pepo o Cucurbita moschata [calabza, zapallo]; Elaeagnaceae tales como los géneros Elaeagnus e.g. las
 especies Olea europaea [oliva]; Ericaceae tales como los géneros Kalmia e.g. las especies Kalmia latifolia, Kalmia
 angustifolia, Kalmia microphylla, Kalmia polifolia, Kalmia occidentalis, Cistus chamaerhodendros o Kalmia lucida
 40 [Laurel americano, laurel de hoja ancha, cálico, cuchara de madera, laurel de la ovejas, laurel alpino, laurel de los
 pantanos, laurel de las marismas]; Euphorbiaceae tales como los géneros Manihot, Janipha, Jatropha, Ricinus e.g.
 las especies Manihot utilisissima, Janipha manihot" Jatropha manihot., Manihot aipil, Manihot dulcis, Manihot manihot,
 Manihot melanobasis, Manihot esculenta [mandioca, arrurruz, tapioca, casava] o Ricinus communis [judía de castor,
 arbusto de aceite de castor, planta de aceite de castor, palma de Cristo, árbol maravilla]; Fabaceae tales como los
 45 géneros Pisum, Albizia, Cathormion, Feuillea, Inga, Pithecolobium, Acacia, Mimosa, Medicago, Glicina, Dolichos,
 Phaseolus, Soja e.g. las especies Pisum sativum, Pisum arvense, Pisum humile [guisante], Albizia berteriana, Albizia
 julibrissin, Albizia lebeck, Acacia berteriana, Acacia littoralis, Albizia berteriana, Albizzia berteriana, Cathormion
 berteriana, Feuillea berteriana, Inga fragrans, Pithecolobium berterianum, Pithecolobium fragrans, Pithecolobium
 berterianum, Pseudalbizzia berteriana, Acacia julibrissin, Acacia nemu, Albizia nemu, Feuillea julibrissin, Mimosa
 50 julibrissin, Mimosa speciosa, Sericanrda julibrissin, Acacia lebeck, Acacia macrophylla, Albizia lebbek, Feuillea
 lebeck, Mimosa lebeck, Mimosa speciosa [Campeche bastardo, árbol de seda, nuez de las Indias Orientales],
 Medicago sativa, Medicago falcata, Medicago varia [alfalfa] Glicina max Dolichos soja, Glicina gracilis, Glicina
 hispida, Phaseolus max, Soja hispida o Soja max [soja]; Geraniaceae tales como los géneros Pelargonium, Cocos,
 Oleum e.g. las especies Cocos nucifera, Pelargonium grossularioides o Oleum cocois [coco]; Gramineae tales como
 55 los géneros Saccharum e.g. las especies Saccharum officinarum; Juglandaceae tales como los géneros Juglans,
 Wallia e.g. las especies Juglans regia, Juglans ailanthifolia, Juglans sieboldiana, Juglans cinerea, Wallia cinerea,
 Juglans bixbyi, Juglans californica, Juglans hindsii, Juglans intermedia, Juglans jamaicensis, Juglans major, Juglans
 microcarpa, Juglans nigra o Wallia nigra [nuez, nuez negra, nuez común, nuez persa, nuez blanca, nuez de
 manteca, nuez negra]; Lauraceae tales como los géneros Persea, Laurus e.g. las especies laurel Laurus nobilis [bay,
 60 laurel, bay laurel, sweet bay], Persea Americana Persea americana, Persea gratissima o Persea persea [aguacate];
 Leguminosae tales como los géneros Arachis e.g. las especies Arachis hipogaea [cacahuete]; Linaceae tales como
 los géneros Linum, Adenolinum e.g. las especies Linum usitatissimum, Linum humile, Linum austriacum, Linum
 bienne, Linum angustifolium, Linum catharticum, Linum flavum, Linum grandiflorum, Adenolinum grandiflorum, Linum
 lewisii, Linum narbonense, Linum perenne, Linum perenne var. lewisii, Linum pratense o Linum trigynum [lino,
 65 linaza.]; Lytharieae tales como los géneros Punica e.g. las especies Punica granatum [granada]; Malvaceae tales

como los géneros *Gossypium* e.g. las especies *Gossypium hirsutum*, *Gossypium arboreum*, *Gossypium barbadense*, *Gossypium herbaceum* o *Gossypium thurberi* [algodón]; Musaceae tales como los géneros *Musa* e.g. las especies *Musa nana*, *Musa acuminata*, *Musa paradisiaca*, *Musa* spp. [banano]; Onagraceae tales como los géneros *Camissonia*, *Oenothera* e.g. las especies *Oenothera biennis* o *Camissonia brevipes* [primula, onagra .]; Palmae tales como los géneros *Elacis* e.g. las especies *Elaeis guineensis* [palma de aceite]; Papaveraceae tales como los géneros *Papaver* e.g. las especies *Papaver orientale*, *Papaver rhoeas*, *Papaver dubium* [amapola, amapola oriental, hierba de amapola, amapola de campo, amapola Shirley, amapola de cabeza alargada, amapola de vaina alargada]; Pedaliaceae tales como los géneros *Sesamum* e.g. las especies *Sesamum indicum* [sésamo]; Piperaceae tales como los géneros *Piper*, *Artanthe*, *Peperomia*, *Steffensia* e.g. las especies *Piper aduncum*, *Piper amalago*, *Piper angustifolium*, *Piper auritum*, *Piper betel*, *Piper cubeba*, *Piper longum*, *Piper nigrum*, *Piper retrofractum*, *Artanthe adunca*, *Artanthe elongata*, *Peperomia elongata*, *Piper elongatum*, *Steffensia elongata*. [Pimienta de cayena, pimienta silvestre]; Poaceae tales como los géneros *Hordeum*, *Secale*, *Avena*, *Sorghum*, *Andropogon*, *Holcus*, *Panicum*, *Oryza*, *Zea*, *Triticum* e.g. las especies *Hordeum vulgare*, *Hordeum jubatum*, *Hordeum murinum*, *Hordeum secalinum*, *Hordeum distichon*, *Hordeum aegiceras*, *Hordeum hexastichon.*, *Hordeum hexastichum*, *Hordeum irregulare*, *Hordeum sativum*, *Hordeum secalinum* [cebada, cebada perlada, cebada cola de zorro, cebada de muro, cebada de los prados], *Secale cereale* [rye], *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hybrida* [avena], *Sorghum bicolor*, *Sorghum halepense*, *Sorghum saccharatum*, *Sorghum vulgare*, *Andropogon drummondii*, *Holcus bicolor*, *Holcus sorghum*, *Sorghum aetiopicum*, *Sorghum arundinaceum*, *Sorghum caffrorum*, *Sorghum cernuum*, *Sorghum dochna*, *Sorghum drummondii*, *Sorghum durra*, *Sorghum guineense*, *Sorghum lanceolatum*, *Sorghum nervosum*, *Sorghum saccharatum*, *Sorghum subglabrescens*, *Sorghum verticilliflorum*, *Sorghum vulgare*, *Holcus halepensis*, *Sorghum miliaceum* millet, *Panicum militaceum* [Sorgo, millo], *Oryza sativa*, *Oryza latifolia* [arroz], *Zea mays* [maíz] *Tritium aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum hybernum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum* o *Triticum vulgare* [trigo, trigo de panificación, trigo común], Proteaceae tales como los géneros *Macadamia* e.g. las especies *Macadamia intergrifolia* [macadamia]; Rubiaceae tales como los géneros *Coffea* e.g. las especies *Coffea* spp., *Coffea arabica*, *Coffea canephora* o *Coffea liberica* [café]; Scrophulariaceae tales como los géneros *Verbascum* e.g. las especies *Verbascum blattaria*, *Verbascum chaixii*, *Verbascum densiflorum*, *Verbascum lagurus*, *Verbascum longifolium*, *Verbascum lychnitis*, *Verbascum nigrum*, *Verbascum olympicum*, *Verbascum phlomoides*, *Verbascum phoenicum*, *Verbascum pulverulentum* o *Verbascum thapsus* [candelaria, candelaria de polilla blanca, candelaria de hoja espinosa, candelaria de floración densa, candelaria plateada, candelaria de hoja larga, candelaria blanca, candelaria oscura, candelaria griega, candelaria naranja, candelaria púrpura, candelaria gris, candelaria mayor]; Solanaceae tales como los géneros *Capsicum*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Lycopersicon* e.g. las especies *Capsicum annuum*, *Capsicum annuum* var. *glabrusculum*, *Capsicum frutescens* [pimiento], *Capsicum annuum* [páprika], *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana alata*, *Nicotiana attenuata*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana langsdorffii*, *Nicotiana obtusifolia*, *Nicotiana quadrivalvis*, *Nicotiana repanda*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana sylvestris* [tabaco], *Solanum tuberosum* [patata], *Solanum melongena* [berenjena] (*Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum.*, *Lycopersicon piriforme*, *Solanum integrifolium* o *Solanum lycopersicum* [tomate]; Sterculiaceae tales como los géneros *Theobroma* e.g. las especies *Theobroma cacao* [cacao]; Theaceae tales como los géneros *Camellia* e.g. las especies *Camellia sinensis* [té].

La introducción de los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención, el casete de expresión o el vector en organismos, por ejemplo plantas, puede en principio realizarse por todos los métodos conocidos por los experimentados en la técnica. La introducción de las secuencias de ácidos nucleicos da lugar a organismos recombinantes o transgénicos.

En el caso de los microorganismos, los experimentados en la técnica pueden encontrar métodos apropiados en los libros de texto de Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, by F.M. Ausubel et al. (1994) *Current protocols in molecular biology*, John Wiley and Sons, by D.M. Glover et al., *DNA Cloning Vol.1*, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9), by Kaiser et al. (1994) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press o Guthrie et al. *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, *Methods in Enzymology*, 1994, Academic Press.

La transferencia de genes foráneos en el genoma de una planta se denomina transformación. Para hacer esto se utilizan los métodos descritos para la transformación de regeneración de plantas a partir de tejidos vegetales o células vegetales para transformación transiente o estable. Métodos adecuados son transformación de protoplasto por consumo de ADN inducido por poli(etilén glicol), el método "biolístico" utilizado en el cañón de genes-denominado como método de bombardeo con partículas, electroporación, e incubación de embriones secos en solución de ADN, microinyección y transferencia de genes mediada por *Agrobacterium*. Dichos métodos se describen a manera de ejemplo en B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. S.D. Kung and R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 and in Potrykus *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991) 205-225). Los ácidos nucleicos o el constructo que se van a expresar se clonan preferiblemente en un vector que es adecuado para la transformación de *Agrobacterium tumefaciens*, por ejemplo pBin19 (Bevan et al., *Nucl. Acids Res.* 12 (1984) 8711). Las agrobacterias transformadas por tal vector pueden utilizarse entonces de manera conocida para la transformación de plantas, en particular de plantas de cultivo tales como a manera de ejemplo, plantas de tabaco, por ejemplo, bañando las hojas erosionadas u hojas cortadas en una solución de agrobacterias y luego cultivándolas en un medio adecuado. La transformación de las plantas por medio de *Agrobacterium tumefaciens* se describe, por ejemplo, por Höfgen y Willmitzer in *Nucl. Acid Res.* (1988) 16,

9877 o es conocida inter alia a partir de F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. S.D. Kung and R. Wu, Academic Press, 1993, pp. 15-38.

5 Las agrobacterias transformadas por un vector de expresión de acuerdo con la invención pueden de la misma forma utilizarse de manera conocida para la transformación de plantas tales como plantas de prueba similares a Arabidopsis o plantas de cultivo tales como cultivos de cereales, maíz, avena, centeno, cebada, trigo, soja, arroz, algodón, remolacha de azúcar, canola, girasol, linaza, gen, patatas, tabaco, tomates, zanahorias, paprika, colza, tapioca, casaba, arrurruz, claveles, alfalfa, lechuga y diversas especies de árboles, nueces y viñas, en particular plantas de cultivo que contienen aceites tales como soja, cacahuete, planta de aceite de castor, girasol, maíz, algodón, linaza, colza, coco, palma de aceite, cártamo o semilla de cocoa, por ejemplo, bañando hojas deterioradas o cortadas en una solución de agrobacterias y luego cultivándolas en un medio adecuado.

Las células vegetales genéticamente modificadas pueden regenerarse por todos los métodos conocidos por los experimentados en la técnica. Pueden encontrarse métodos apropiados en las publicaciones referidas anteriormente por S.D. Kung y R. Wu, Potrykus o Höfgen y Willmitzer.

15 De acuerdo con lo anterior, un aspecto adicional de la invención se relaciona con organismos transgénicos transformados por al menos una secuencia de ácidos nucleicos, casete de expresión o vector de acuerdo con la invención así como células, cultivos celulares, tejidos, partes -tales como, por ejemplo hojas, raíces etc., en el caso de organismos vegetales- o material reproductivo derivado de tales organismos. Los términos "organismo huésped", "célula huésped", "organismo recombinante (huésped)" y "célula transgénica (huésped)" se usan aquí de forma intercambiable. Desde luego estos términos se relacionan no solamente con el organismo huésped en particular o la célula objetivo en particular sino también a los descendientes o descendientes potenciales de estos organismos o células. Puesto que, debido a la mutación o efectos ambientales pueden surgir ciertas modificaciones en generaciones sucesivas, estos descendientes no necesariamente deben ser idénticos a las células de origen pero no obstante aún están abarcados por los términos tales como se utilizan aquí.

25 Para los propósitos de la invención "transgénico" o "recombinante" significa con respecto por ejemplo a una secuencia de ácidos nucleicos, un casete de expresión (= constructo de gen, constructo de ácido nucleico) o un vector que contiene la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención o un organismo transformado por las secuencias de ácidos nucleicos, casete de expresión o vector de acuerdo con la invención todas aquellas construcciones producidas por métodos de ingeniería genética en las cuales bien

- a) la secuencia de ácido nucleico representada en la Figura 1a, 1b o 1c o sus derivados o partes de las mismas o
- 30 b) una secuencia de control genético enlazada funcionalmente con la secuencia de ácido nucleico descrita abajo (a), por ejemplo una secuencia de control genético 3'- y/o 5'-tal como un promotor o terminador o
- c) (a) y (b)

35 No se encuentran en su ambiente genético natural o han sido modificadas por métodos de ingeniería genética, donde la modificación puede a manera de ejemplo ser una sustitución, adición, eliminación, inversión o inserción de uno o más residuos de nucleótidos. Un ambiente genético natural significa el sitio genómico o cromosómico natural en el organismo de origen o dentro del organismo huésped o presencia en una biblioteca genómica. En el caso de una biblioteca genómica el ambiente genético natural de la secuencia de ácido nucleico se retiene preferiblemente al menos en parte. El ambiente rodea la secuencia de ácido nucleico al menos en un lado y tiene una longitud de secuencia de al menos 50 bp, preferiblemente al menos 500 bp, particularmente de forma preferible al menos 1000 bp, lo más particularmente de forma preferible al menos 5000 bp. Un casete de expresión de origen natural (-por ejemplo la combinación de origen natural del promotor natural de la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención con el correspondiente gen de Δ -8-desaturasa, Δ -9-elongasa y/o Δ -5-desaturasa- se convierte en un casete de expresión genética cuando este último es modificado por métodos no naturales, sintéticos ("artificiales") tal como a manera de ejemplo una mutagenación. A manera de ejemplo se describen métodos apropiados en US 5,565,350 o WO 00/15815.

45 Organismos adecuados u organismos huésped para el ácido nucleico, casete de expresión o vector de acuerdo con la invención son ventajosamente en principio todos los organismos, los cuales son adecuados para la expresión de genes recombinantes como se describió más arriba. Ejemplos adicionales que pueden mencionarse son plantas tales como Arabidopsis, Asteracea tales como caléndula o plantas de cultivo tales como soja, cacahuete, planta de aceite de castor, girasol, linaza, maíz, algodón, linaza, colza, coco, palma de aceite, cártamo o semilla de cocoa.

50 Un objeto adicional de la invención se relaciona con el uso de un constructo de un ácido nucleico, por ejemplo, un casete de expresión, que contiene secuencias de ADN que codifica polipéptidos de SEQ ID No: 2 o secuencias de ADN que hibridizan con los mismos para la transformación de células vegetales, tejidos o partes de plantas.

ES 2 368 915 T3

Para hacerlo así, dependiendo de la selección del promotor, las secuencias SEQ ID No: 1 pueden expresarse específicamente en las hojas, las semillas, los nódulos, las raíces, en el tallo u otras partes de la planta. Aquellas plantas transgénicas que sobreproducen secuencias SEQ ID No: 2, el material reproductivo de las mismas, junto con las células vegetales, tejidos o partes de las mismas son un objeto adicional de la presente invención.

- 5 El casete de expresión o las secuencias de ácido nucleico o constructo de acuerdo con la invención que contienen secuencias de SEQ ID No:1 pueden, además, emplearse también para la transformación de los organismos identificados a manera de ejemplo más arriba tales como bacterias, levaduras, hongos filamentosos y plantas.

- 10 Dentro del marco de la presente invención, alteración de la actividad metabólica significa, por ejemplo, la característica adquirida artificialmente de un rendimiento biosintético incrementado debido a la sobreexpresión funcional de secuencias de SEQ ID No: 1 en los organismos de acuerdo con la invención, ventajosamente en las plantas transgénicas de acuerdo con la invención, en comparación con las plantas iniciales modificadas por vía diferente a la genética al menos durante la duración de al menos una generación de plantas.

Una expresión constitutiva de las secuencias exógenas de SEQ ID No: 1 es, además, ventajosa. Por otro lado, sin embargo, una expresión inducible también puede parecer deseable.

- 15 La eficiencia de la expresión de las secuencias de la figura 1a, 1b o 1c puede determinarse, por ejemplo, in vitro por propagación del meristema de brotes. Además, una expresión de las secuencias de la figura 1a, 1b o 1c modificada en su naturaleza y nivel y su efecto sobre el rendimiento de las rutas metabólicas puede probarse en plantas de ensayo en pruebas de invernadero.

- 20 Un objetivo adicional de esta invención comprende organismos transgénicos tales como plantas transgénicas transformadas mediante un casete de expresión que contiene secuencias de SEQ ID No: 1 de acuerdo con la invención o secuencias de ADN que hibridizan con las mismas, así como con células transgénicas, tejidos, partes y material de reproducción de tales plantas. Se da preferencia particular en este caso a plantas de cultivos transgénicos tales como a manera de ejemplo cebada, trigo, centeno, avena, maíz, soja, arroz, algodón, remolacha de azúcar, colza y canola, girasol, linaza, cáñamo y cardo, patatas, tabaco, tomates, tapioca, casaba, arrurruz, alfalfa, lechuga y diversas especies de árboles, nueces y viñedos.

Para propósitos de la invención las plantas son plantas mono y dicotiledóneas, musgos o algas.

Un refinamiento adicional de acuerdo con la invención son plantas transgénicas tal como se describieron más arriba que contienen una secuencia de ácidos nucleicos o un constructo de acuerdo con la invención o un casete de expresión de acuerdo con la invención.

- 30 Adicionalmente, por derivados se entienden homólogos de las secuencias de la figura 1a, 1b, o 1c, por ejemplo, homólogos eucariotes, secuencias truncadas, ADN de cadena sencilla de la secuencia codificadora y no codificadora de ADN o ARN de la secuencia codificadora y no codificadora de ADN.

- 35 Además, por homólogos de las secuencias de las figuras 1a, 1b o 1c se entienden derivados tales como a manera de ejemplo, variantes de promotores. Estas variantes pueden modificarse por uno o más intercambios de nucleótidos, por inserciones y/o eliminaciones sin afectar, sin embargo, de forma adversa la funcionalidad o eficiencia de los promotores. Adicionalmente, los promotores pueden tener su eficiencia incrementada alterando su secuencia o ser reemplazados completamente por promotores más efectivos aún de organismos foráneos.

- 40 Por derivados se entiende también ventajosamente variantes cuya secuencia de nucleótidos ha sido alterada en la región de -1 a -2000 adelante del codón de inicio de tal manera que la expresión del gen y/o la expresión de la proteína se modifique, preferiblemente se incremente. Además, por derivados se entiende también variantes que han sido modificadas en el extremo 3'.

- 45 Promotores adecuados en el casete de expresión son en principio todos los promotores que pueden controlar la expresión de genes foráneos en organismos tales como microorganismo similares a microorganismos como protozoos tales como ciliados, algas tales como algas verdes, marrón, rojas, o azules, tales como Euglenia, bacterias tales como bacterias gram-positivas o gram-negativas, levaduras tales como Saccharomyces, Pichia o Shizosaccharomyces u hongos tales como Mortierella, Thraustochytrium o Schizochytrium o plantas, ventajosamente en plantas u hongos. También se hace un uso preferiblemente en particular en promotores de plantas o promotores derivados de un virus de una planta. Se encuentran las secuencias de regulación ventajosas para el método de acuerdo con la invención por ejemplo en promotores tales como cos, tac, trp, tet, trp-tet, lpp, lac, lpp-lac, lacIq-, T7, T5, T3, gal, trc, ara, SP6, λ-PR o en λ-PL como promotores que se emplean ventajosamente en bacterias gram-negativas. Otras secuencias de regulación ventajosas se encuentran, por ejemplo, en los promotores gram-positivos amy y SPO2, en los promotores de levadura o fúngicos ADC1, Mfx, AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH o en los promotores de plantas CaMV/35S, [Franck et al., Cell 21 (1980) 285-294], SSU, OCS, lib4, STLS1, B33, nos (= promotor de la nopalín sintasa) o en el promotor de la ubiquitina o faseolina. El casete de

expresión también puede contener un promotor inducible químicamente por medio del cual la expresión de las secuencias exógenas de los números impares de SEQ ID No: 1-269 en el organismo puede controlarse de forma ventajosa en las plantas en un momento en particular. Promotores ventajosos en plantas de este tipo son a manera de ejemplo el promotor PRP1 [Ward et al., *Plant.Mol. Biol.*22(1993), 361-366], un promotor inducible por bencenesulfonamida (EP 388 186), un promotor inducible por tetraciclina [Gatz et al., (1992) *Plant J.* 2,397-404], un promotor inducible por ácido salicílico (WO95/19443), un promotor inducible por ácido absérico (EP 335 528) y un promotor inducible por etanol o ciclohexanona (WO 93/21334). Otros ejemplos de promotores de plantas que pueden utilizarse ventajosamente son el promotor de la FBPeasa citosólica de la patata, el promotor ST-LS1 (Stockhaus et al., *EMBO J.*8 (1989) 4245245), el promotor de la fosforibozil pirofosfato amidotransferasa de Glicina max (véase también el número de acceso al banco genético U87999) o un promotor específico de nodieno tal como se describe en EP 249676. Particularmente ventajoso son aquellos promotores de plantas que aseguran la expresión en tejidos o partes/órganos de plantas en los cuales la biosíntesis de los ácidos grasos o las etapas precursoras de las mismas se presentan, como en los endospermos o en los embriones en desarrollo por ejemplo. Particularmente notables son los promotores ventajosos que aseguran la expresión específica de las semillas tales como a manera de ejemplo el promotor USP o derivados del mismo, el promotor LEB4, el promotor de faseolina o el promotor de napina. El promotor USP particularmente ventajoso citado de acuerdo con la invención o sus derivados median cualquier expresión genética muy temprana en el desarrollo de las semillas [Baeumlein et al., *Mol Gen Genet*, 1991, 225 (3): 459-67]. Otros promotores específicos para las semillas ventajosos que pueden utilizarse para plantas monocotiledónea o dicotiledóneas son los promotores adecuados para los dicotilodones tales como los promotores del gen de napina, probablemente citados a manera de ejemplo, de colza (US 5,608,152) el promotor de oleocina de arabis (WO 98/4546), el promotor de faseolina de *Phaseolus vulgaris* (US 5,504,200), el promotor Bce4 de Brassica (WO 91/13980), o el promotor B4 de leguminosas (LeB4, Baeumlein et al., *Plant J.*, 2,2 1992: 233-239), o promotores adecuados para monocotiledónea tales como los promotores del gen *lpt2* o *lpt1* en cebada (WO 95/15389 y WO 95/23230) o los promotores del gen ordeina de la cebada, el gen de glutelina de arroz, el gen de orizina de arroz, el gen de prolamina de arroz, el gen de gliadina de trigo, el gen de glutelina blanca, el gen de zeina de maíz, el gen de glutelina de avena, el gen de kasirina de sorgo o el gen de secalina de centeno que se describen en WO99/16890.

Además, se prefieren particularmente aquellos promotores que aseguran la expresión en tejidos, o partes de la planta en las cuales, por ejemplo, tiene lugar la biosíntesis de los ácidos grasos, aceites y lípidos o las etapas precursoras de los mismos. Particularmente notables son promotores que aseguran una expresión específica en semillas. Notables son el promotor del gen napina de la colza (US 5,608,152), el promotor US de Vicia faba (USP = proteína desconocida de semilla, Baeumlein et al., *Mol Gen Genet*, 1991,225 (3): 459-67), el promotor del gen oleocina de *Arabidopsis* (WO 98/45461), el promotor de faseolina (US 5,504,200) o el promotor del gen B4 de legumina (LeB4; Baeumlein et al., *Plant J.*, 2,2, 1992: 233-239). Otros promotores que se pueden mencionar son los del gen IPT2 o IPT1 de cebada (WO 95/15389 y WO 95/23230) que median la expresión específica en semillas en plantas monocotiledóneas. Otros promotores específicos ventajosos en semillas son promotores tales como los promotores de arroz, maíz o trigo divulgados en WO 99/16890 o Amy32b o aleurain (US 5,677,474), Bce4 (colza, US 5,530,149), glicinina (soja, EP 571 741), fosfoenol piruvato carboxilasa (soja, JP 06/62870), ADR12-2 (soja, WO 98/08962), isocitratliasa (colza, US 5,689,040) o β -amilasa (cebada, EP 781 849).

Tal como se describió más arriba, el constructo de expresión (= constructo de gen, constructo de ácido nucleico) puede contener incluso otros genes, que se van a introducir en los organismos. Estos genes pueden someterse a una regulación separada o ser sometidos a la misma región de regulación como las secuencias figuras 1a, 1b o 1c. Estos genes son a manera de ejemplo otros genes de biosíntesis, ventajosamente para la biosíntesis de ácidos grasos, biosíntesis de vitaminas, etc., que permiten una síntesis incrementada.

En principio todos los promotores naturales con sus secuencias de regulación pueden utilizarse como los mencionados más arriba para el casete de expresión de acuerdo con la invención y el método de acuerdo con la invención. Además de todo esto, los promotores sintéticos también pueden ser utilizados ventajosamente.

En la preparación de un casete de expresión pueden manipularse diversos fragmentos de ADN con el fin de obtener una secuencia de nucleótidos, la cual usualmente se lee en la dirección correcta y está equipada con un rastreador de lectura correcto. Para conectar los fragmentos de ADN (= ácidos nucleicos de acuerdo con la invención) uno a otro pueden unirse adaptadores o enlazantes a los fragmentos.

Las regiones promotora y terminadora pueden proveerse de manera útil en la dirección de transcripción con un enlazante o un polienlazante que contiene uno o más puntos de restricción para la inserción de esta secuencia. En general, el enlazante tiene de 1 a 10, mayormente de 1 a 8, preferiblemente de 2 a 6, puntos de restricción. En general el tamaño del enlazante dentro de la región reguladora es menor de 100 bp, frecuentemente menor de 60 bp, pero al menos 5 bp. El promotor puede ser tanto nativo como homólogo así como foráneo o heterólogo al organismo huésped, por ejemplo, a la planta huésped. En la dirección de transcripción 5'-3' el casete de expresión contiene el promotor, una secuencia de ADN que codifica de la figura 1a, 1b o 1c el gen y una región para terminación de la transcripción. Las regiones de terminación diferentes pueden intercambiarse una por otra de cualquier manera deseada.

- Además, pueden emplearse manipulaciones que proporcionan interfaces de restricción adecuada o que eliminan el ADN en exceso o interfaces de restricción. Cuando entran en consideración inserciones, eliminaciones o sustituciones, tales como transiciones y transversiones, pueden utilizarse mutagénesis in vitro, reparación de cebador, restricción o unión. En manipulaciones adecuadas tales como restricción, retromasticación o llenado de salientes para extremos romos pueden proveerse para la unión extremos complementarios de los fragmentos.
- Para una alta expresión ventajosa de la unión de la señal de retención ER específica entre otros puede ser de importancia el SEKDEL (Shouten, A. et al., *Plant Mol. Biol.* 30 (1996), 781-792). De esta forma el nivel de expresión promedio se triplica o incluso se cuadruplica. Pueden presentarse otras señales de retención de forma natural en proteínas vegetales y animales localizadas en el ER que también pueden emplearse para la construcción del casete. En otra realización preferida se utiliza una secuencia plastídica de apuntamiento como se describe en Napier J.A. [Targeting of foreign proteins to the chloroplast, *Methods Mol. Biol.*, 49, 1995: 369 - 376].
- Un vector preferido y utilizado que comprende dicha secuencia de apuntamiento plastídica está descrito por Colin Lazarus [Guerineau F., Woolston S., Brooks L., Mullineaux P. "An expression cassette for targeting foreign proteins into chloroplast; *Nucleic. Acids Res.*, Dec 9, 16 (23), 1988: 11380].
- Las señales de poliadenilación preferidas son señales de poliadenilación en plantas, preferiblemente aquellas que corresponden sustancialmente a señales de poliadenilación de ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens*, en particular el gen 3 del ADN-T (octopin Sintasa) del plásmido de Ti pTiACH5 (Gielen et al., *EMBO J.* 3 (1984), 835 et seq) o equivalentes funcionales correspondientes.
- Un casete de expresión se produce por fusión de un promotor adecuado con secuencias adecuadas de figura 1a, 1b o 1c. Junto con una señal de poliadenilación por recombinación común y técnicas de clonación tal como se describe, por ejemplo, en T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) así como en T.J. Silhavy, M.L. Berman and L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) y en Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987).
- En la preparación de un casete de expresión pueden manipularse diversos fragmentos de ADN para producir una secuencia de nucleótidos que lea de forma útil en la dirección correcta y esté equipada con un rastreador de lectura correcto. Los adaptadores o enlazantes pueden unirse a los fragmentos para complementar los fragmentos de ADN.
- Las regiones de promotor y terminador pueden proveerse de forma útil en la dirección de transcripción con un enlazante o polienlazante que contiene uno o más puntos de restricción para la inserción de esta secuencia. En general, el enlazante tiene de 1 a 10, mayormente de 1 a 8, preferiblemente de 2 a 6, puntos de restricción. En general el tamaño del enlazante dentro de la región reguladora es menor de 100 bp, frecuentemente menor de 60 bp, pero al menos 5 bp. El promotor puede ser tanto nativo como homólogo así como foráneo o heterólogo para el organismo huésped, por ejemplo para la planta huésped. En la dirección de transcripción 5'-3' el casete de expresión contiene el promotor, una secuencia de ADN que bien sea codifica los números impares de la SEQ ID No: 1-269 o una región para terminación de la transcripción. Las regiones de terminación diferentes pueden intercambiarse una por otra de cualquier manera deseada.
- En la preparación de un casete de expresión pueden manipularse diversos fragmentos de ADN para producir una secuencia de nucleótidos que lea de forma útil en la dirección correcta y esté equipada con rastreador de lectura correcto. Los adaptadores o enlazantes pueden unirse a los fragmentos para conectarse con los fragmentos de ADN.
- Las secuencias de ADN que codifican las secuencias de ácidos nucleicos usados en el proceso de la invención tal como las secuencias de SEC ID No: 1 contienen todas las secuencias características necesarias para alcanzar una localización correcta de la respectiva biosíntesis. De acuerdo con lo anterior, no se requieren secuencias objetivo adicionales per se. Sin embargo, tal localización puede ser deseable y ventajosa y por lo tanto modificarse o reforzarse de forma artificial de tal manera que tales constructos de fusión también sean una realización ventajosa preferida de la invención.
- Se prefieren particularmente secuencias que aseguren el objetivo en los plástidos. Bajo ciertas circunstancias que apuntan en otros compartimentos (reportados en: Kermodé, *Rev. Crit Plant Sci.* 15, 4 (1996), 285 a 423) también puede ser deseable, por ejemplo, en vacuolas, el mitocondrio, el retículo endoplásmico (ER), peroxisomas, estructuras lipídicas o debido a la falta de retención de secuencias operativas correspondientes en el compartimento de origen, el citosol.
- Tal como se utiliza aquí, el término "estrés ambiental" se refiere a cualquier condición de crecimiento subóptima e incluye, pero no se limita a condiciones subóptimas asociadas con salinidad, sequía, temperatura, metales, productos químicos, estrés patogénicos u oxidativos, o combinaciones de los mismos. En realizaciones preferidas, el estrés ambiental puede ser salinidad, sequía, calor o baja temperatura, o combinaciones de los mismos, y en

particular, puede ser un bajo contenido de agua o baja temperatura. Aunque el estrés por sequía significa cualquier estrés ambiental que lleve a la carencia de agua en las plantas o a la reducción del suministro de agua a las plantas, donde estrés por temperatura baja significa congelamiento de las plantas por debajo de 4°C así como enfriamiento de las plantas por debajo de 15°C y donde estrés por alta temperatura significa por ejemplo una temperatura por encima de 35°C. El rango de estrés y la respuesta al estrés depende de las diferentes plantas que se utilicen para la invención, esto es, difiere por ejemplo entre una planta tal como trigo y una planta tal como Arabidopsis. Una respuesta común de las plantas al estrés ambiental es la pérdida de rendimiento o la pérdida de calidad. También debe entenderse que tal como se usa en la especificación y en las reivindicaciones, "un" o "una" puede significar uno o más, dependiendo del contexto en el cual se utiliza. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" puede significar que puede utilizarse al menos una célula.

Tal como se utilizan aquí, los términos "ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico" pretenden incluir las moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo ARNm) y análogos de ADN o ARN generados utilizando nucleótidos análogos. Este término también abarca secuencias no traducidas localizadas tanto en los extremos 3' y 5' de la región de codificación del gen: al menos aproximadamente 1000 nucleótidos de secuencia corriente arriba del extremo 5' de la región codificadora y al menos 200 nucleótidos de secuencia corriente abajo del extremo 3' de la región codificadora del gen. La molécula de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o cadena doble, pero preferiblemente es ADN de cadena doble.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una que está separada sustancialmente de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico. Esto significa que otras moléculas de ácido nucleico están presentes en una cantidad menor al 5% con base en el peso de la cantidad del ácido nucleico deseado, preferiblemente menos de 2% en peso, más preferiblemente menos de 1% en peso, lo más preferiblemente menos de 0.5% en peso. Preferiblemente, un ácido nucleico "aislado" está libre de algunas de las secuencias que de forma natural flanquean el ácido nucleico (por ejemplo, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo desde el cual se deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, en diversas realizaciones, la molécula de ácido nucleico aislado que codifica la proteína relacionada con el estrés puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb o 0.1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean de forma natural la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la cual se deriva el ácido nucleico. Además, una molécula de ácido nucleico "aislada", tal como una molécula de ADNc, puede estar libre de parte del material celular con el cual se asocia de forma natural, o del medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente.

Una molécula de ácido nucleico de la presente invención, por ejemplo una molécula de ácido nucleico que codifica una SRP o una porción de la misma que confiere tolerancia y/o resistencia a la sequía en plantas, puede aislarse utilizando técnicas estándar de biología molecular y la información de secuencia provista aquí. Por ejemplo, un ADNc que codifica una proteína relacionada con el estrés en Arabidopsis taliana puede ser aislada a partir de una biblioteca de ADNc de A.taliana utilizando toda o una porción de las secuencias de SEC ID No: 1. Además, una molécula de ácido nucleico que abarca toda o una porción de las secuencias de SEC ID No: 1 puede aislarse mediante la reacción en cadena de polimerasa utilizándose cebadores de oligonucleótidos diseñados con base en esta secuencia. Por ejemplo, el ARNm puede aislarse a partir de células vegetales (por ejemplo, mediante el procedimiento de extracción con guanidinio-tiocianato de Chirgwin et al., 1979 1979 Biochemistry 18:5294-5299) y el ADNc puede prepararse utilizando transcriptasa reversa (por ejemplo, Moloney MLV reverse transcriptase, available from Gibco/BRL, Bethesda, MD; o transcriptasa reversa AMV, disponible de Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL). Los cebadores de oligonucleótidos sintéticos para la amplificación mediante la reacción en cadena de polimerasa pueden basarse en una de las secuencias de nucleótidos mostradas en las figuras 1a, 1b, o 1c. Una molécula de ácido nucleico de la invención puede amplificarse utilizando ADNc o, alternativamente, ADN genómico, como plantilla y cebadores de oligonucleótidos apropiados de acuerdo con técnicas estándar de amplificación por PCR. La molécula de ácido nucleico amplificada de esta manera puede clonarse en un vector apropiado y ser caracterizada mediante análisis de secuencia de ADN. Adicionalmente, los oligonucleótidos correspondientes a una secuencia de nucleótidos que codifica SRP pueden prepararse por técnicas sintéticas estándar, por ejemplo, utilizando un sintetizador automatizado de ADN.

En una realización preferida, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención comprende una de las secuencias nucleótidos mostradas en SEQ ID: 1 que codifican la SRP (esto es, la "región codificadora"), así como secuencias 5' no traducidas y secuencias 3' no traducidas.

Adicionalmente, la molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender solamente una porción de la región codificadora de una de las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID No: 1, por ejemplo, un fragmento que pueda utilizarse como sonda o cebador o un fragmento que codifica una porción biológicamente activa de una SRP.

Porciones de proteínas codificadas por las moléculas de ácido nucleico que codifican la SRP de la invención son porciones preferiblemente activas biológicamente descritas aquí. Tal como se utiliza aquí, el término "porción biológicamente activa de una SRP" pretende incluir una porción, por ejemplo, un dominio/estructura, de una proteína

- relacionada con el estrés que participa en una respuesta de tolerancia al estrés y/o de resistencia en una planta. Para determinar si una SRP, o una porción biológicamente activa de la misma, da como resultado una tolerancia incrementada al estrés en una planta, puede llevarse a cabo un análisis de estrés de una planta que comprende la SRP. Tales métodos de análisis son bien conocidos para los expertos en la técnica, tal como se detalla en los ejemplos. Más específicamente, los fragmentos de ácidos nucleicos que codifican porciones activas biológicamente de una SRP pueden prepararse aislando una porción de una de las secuencias del ácido nucleico de SEQ ID No: 1 que expresa la porción codificada de la SRP o del péptido (por ejemplo, por expresión recombinante in vitro) y estableciendo la actividad de la porción codificada de la SRP o el péptido.
- Porciones biológicamente activas de una SRP son abarcadas por la presente invención e incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos derivadas de la secuencia de aminoácidos de un gen que codifica una SRP, o la secuencia de aminoácidos de una proteína homóloga a una SRP, que incluye menos aminoácidos que un SRP de longitud completa o la proteína de longitud completa que es homóloga a una SRP, y exhibe al menos parte de la actividad enzimática de una SRP. 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) comprenden un dominio o estructura con al menos una actividad de una SRP. Adicionalmente, otras porciones biológicamente activas en las cuales se elimina otras regiones de la proteína, pueden prepararse mediante técnicas recombinantes y evaluarse en cuanto a una o más de las actividades descritas aquí. Preferiblemente, las porciones activas biológicamente de una SRP incluyen uno o más dominios/estructuras o porciones seleccionados de la misma que tienen actividad biológica.
- El término "porción biológica activa" o "actividad biológica" significa una SRP o una porción de una SRP que tiene al menos aún 10% o 20%, preferiblemente 20%, 30%, 40% o 50%, especialmente preferible con 60%, 70% u 80% de la actividad enzimática de la enzima natural o de partida.
- Una molécula de ácido nucleico que abarca una secuencia completa de las moléculas de ácido nucleico utilizadas en el proceso, por ejemplo el polinucleótido de la invención, o una parte del mismo puede aislarse adicionalmente mediante reacción en cadena de polimerasa, cebadores de oligonucleótidos basados en esta secuencia o en partes de los mismos que están siendo usados. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia completa o parte de la misma puede aislarse mediante la reacción en cadena de polimerasa utilizando cebadores de oligonucleótidos que han sido generados sobre la base de esta secuencia. Por ejemplo, un ARNm puede aislarse a partir de células (por ejemplo por medio del método de extracción de guanidinio tiocianato de Chirgwin et al. (1979) *Biochemistry* 18:5294-5299) y el ADNc puede generarse por medio de transcriptasa reversa (por ejemplo, transcriptasa reversa de Moloney MLV, disponible de Gibco/BRL, Bethesda, MD, o transcriptasa reversa AMV, obtenible de Seikagaku America, Inc., St.Petersburg, FL).
- Los cebadores de oligonucleótidos sintéticos para la amplificación, por ejemplo, como los mostrados en la tabla 2, por medio de la reacción en cadena de polimerasa puede generarse sobre la base de una secuencia mostrada aquí, por ejemplo la secuencia mostrada en la figura. 1a, 1b o 1c o la secuencia derivada de los polipéptidos como se muestra en la figura. 1a, 1b o 1c.
- Además, es posible identificar regiones conservadas de diversos organismos llevando a cabo alineaciones de secuencia de proteínas con los polipéptidos utilizados en el proceso de la invención, en particular con secuencias del polipéptido de la invención, a partir del cual pueden derivarse regiones conservadas y a su vez, cebadores degenerados. La región conservada para el polipéptido de la invención se indica en el alineamiento mostrado en la figura 1a, 1b, o 1c. Las regiones conservadas son aquellas, que muestran una variación muy pequeña en los aminoácidos en una posición particular de varios homólogos de origen diferente. Las secuencias de consenso mostradas en la figura 2 son derivadas de dichos alineamientos.
- Los cebadores degenerados pueden ser utilizados por PCR para la amplificación de fragmentos de proteínas novedosas que tienen actividad antes mencionada, por ejemplo, que tienen una actividad de SRP u homólogos funcionales adicionales del polipéptido de la invención a partir de otros organismos.
- Estos fragmentos pueden utilizarse entonces como sondas de hibridación para aislar la secuencia genética completa. Como alternativa, las secuencias 5' y 3' faltantes pueden aislarse por medio de RACE-PCR (amplificación rápida de extremos ADNc). Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención puede amplificarse utilizando ADNc o, como alternativa, ADN genómico como plantilla y cualquier cebador de oligonucleótidos, según técnicas de amplificación de PCR estándar. La molécula de ácido nucleico amplificada puede así clonarse en un vector adecuado y caracterizarse por medio de un análisis de secuencia de ADN. Los oligonucleótidos, que corresponden a una de las moléculas de ácidos nucleicos utilizadas en el proceso pueden generarse mediante métodos de síntesis estándar, por ejemplo, utilizando un sintetizador automático de ADN.
- Las moléculas de ácido nucleico que son ventajosas para el proceso de acuerdo con la invención pueden aislarse con base en su homología con las moléculas de ácido nucleico divulgadas aquí utilizando las secuencias o parte de las mismas como sondas de hibridación y siguiendo técnicas de hibridación estándar bajo condiciones de

hibridación restrictivas. En este contexto, es posible utilizar, por ejemplo, moléculas de ácido nucleico aisladas de al menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 o más nucleótidos, preferiblemente de al menos 15, 20 o 25 nucleótidos en longitud que hibridizan bajo condiciones restrictivas con las moléculas de ácidos nucleicos descritas anteriormente, en particular con aquellas que abarcan una secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico usada en el proceso de la invención o codifican una proteína utilizada en la invención o de la molécula de ácido nucleico de la invención. Pueden usarse también moléculas de ácido nucleico con 30, 50, 100, 250 o más nucleótidos.

Además de los fragmentos de la SRP descritos aquí, la presente invención incluye homólogos y análogos de SRP y ácidos nucleicos que codifican SRP origen natural en una planta.

"Homólogos" se definen aquí como dos ácidos nucleicos o proteínas que tienen secuencias de nucleótidos o aminoácidos similares, u "homóloga", respectivamente. Los homólogos incluyen variantes alélicas, ortólogos, parálogos, agonistas y antagonistas de SRP como se definen más adelante. El término "homólogo" abarca adicionalmente moléculas de ácidos nucleicos que difieren de una de las secuencias de ácido nucleico mostradas en las secuencias con SEQ ID No. XXX (y porciones de la misma) debido a la degeneración del código genético y codifican así la misma SRP que es codificada por las secuencias de aminoácidos mostradas en las secuencias con SEC ID No. XXX. Tal como se utiliza aquí, una SRP "de origen natural" se refiere a una secuencia de aminoácidos de SRP que se presenta en la naturaleza.

El término "homología" significa que las respectivas moléculas de ácidos nucleicos o proteínas codificadas son equivalentes funcional y/o estructuralmente. Las moléculas de ácido nucleico que son homólogas a las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente y que son derivados de dichas moléculas de ácido nucleico son, por ejemplo, variaciones de dichas moléculas de ácido nucleico que representan modificaciones que tiene la misma función biológica, en particular codificar proteínas con la misma o sustancialmente la misma función biológica. Pueden ser variaciones de origen natural, tales como secuencias de otras variedades de plantas o especies, o mutaciones. Estas mutaciones pueden presentarse de forma natural o pueden obtenerse por técnicas de mutagénesis. Las variaciones alélicas pueden ser variantes alélicas de origen natural así como variantes producidas sintéticamente o manipuladas genéticamente. Los equivalentes estructurales pueden ser identificados, por ejemplo, probando el enlazamiento de dicho polipéptido a anticuerpos o predicciones basadas en ordenador. Los equivalentes estructurales tienen las mismas características inmunológicas, por ejemplo, comprenden epítomos similares.

Equivalentes funcionales derivados de uno de los polipéptidos se muestran en SEC ID No.: YYY de acuerdo con la invención por sustitución, inserción o eliminación y tienen al menos 30%, 35%, 40%, 45% o 50%, preferiblemente al menos 55%, 60%, 65% o 70% de preferencia al menos 80%, especialmente de preferencia al menos 85% o 90%, 91%, 92%, 93% o 94%, de forma muy especialmente preferible al menos 95%, 97%, 98% o 99% de homología con uno de los polipéptidos como se muestran en la figura. 1a 1b, o 1c de acuerdo con la invención y se distinguen por tener esencialmente las mismas propiedades que el polipéptido como se muestra en las figuras 1a, 1b o 1c.

Los equivalentes funcionales derivados de la secuencia de ácidos nucleicos como se muestra en SEC ID No: YYY de acuerdo con la invención por sustitución, inserción o eliminación tienen al menos 30%, 35%, 40%, 45% o 50%, preferiblemente al menos 55%, 60%, 65% o 70% por preferencia al menos 80%, especialmente de forma preferible al menos 85% o 90%, 91%, 92%, 93% o 94%, muy especialmente de forma preferible al menos 95%, 97%, 98% o 99% de homología con uno de los polipéptidos como los mostrados en las Figuras 1a, 1b o 1c de acuerdo con la invención y codifican polipéptidos que tienen esencialmente las mismas propiedades que el polipéptido que se muestra en las figuras 1a, 1b o 1c.

"Esencialmente las mismas propiedades" de un equivalente funcional debe entenderse como que el equivalente funcional tiene la actividad mencionada anteriormente, por ejemplo, conferir un incremento en la cantidad de productos químicos finos a la vez que incrementa la cantidad de proteína, actividad o función de dicho equivalente funcional en un organismo, por ejemplo, un microorganismo, una planta o un tejido vegetal o animal, células vegetales o animales o partes de los mismos.

Por "hibridización" se entiende que tales moléculas de ácido nucleico hibridizan bajo condiciones de hibridización convencionales, preferiblemente bajo condiciones restrictivas tales como las descritas por ejemplo, por Sambrook (Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)) o in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.

De acuerdo con la invención, las moléculas de ADN así como las de ARN del ácido nucleico de la invención pueden ser utilizadas como sondas. Adicionalmente, como plantilla para la identificación de homólogos funcionales pueden llevarse a cabo ensayos de inmunoprecipitación Northern así como ensayos de inmunoprecipitación Southern. Los ensayos de inmunoprecipitación Northern proporcionan ventajosamente información adicional acerca del producto genético expresado: por ejemplo, patrones de expresión, ocurrencia de las etapas de procesamiento, como división y taponamiento, etc. La prueba de inmunoprecipitación Southern proporciona información adicional acerca de la localización cromosómica y organización del gen que codifica la molécula de ácido nucleico de la invención.

Un ejemplo preferido no limitante de condiciones de hibridización restrictiva son las hibridaciones en 6 x cloruro de sodio/citrato de sodio (= SSC) a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más etapas de lavado en 0.2 x SSC, 0.1% de SDS a 50°C hasta 65°C, por ejemplo a 50°C, 55°C o 60°C. La persona experimentada sabe que estas condiciones de hibridización difieren como función del tipo de ácido nucleico y, por ejemplo, cuando están presentes solventes orgánicos, con respecto a la temperatura y concentración del regulador. La temperatura bajo "condiciones de hibridización estándar" difiere por ejemplo como una función del tipo de ácido nucleico entre 42°C y 58°C, preferiblemente entre 45°C y 50°C en un regulador acuoso con una concentración de 0.1x, 0.5x, 1x, 2x, 3x, 4x o 5x SSC (pH 7.2). Si hay presentes un solvente o solventes orgánicos en el regulador antes mencionado, por ejemplo 50% de formamida, la temperatura bajo condiciones estándar es aproximadamente 40°C, 42°C o 45°C. Las condiciones de hibridización para híbridos ADN:ADN son preferiblemente por ejemplo 0.1x SSC y 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C o 45°C, preferiblemente entre 30°C y 45°C. Las condiciones de hibridización para híbridos de ADN:ARN son preferiblemente por ejemplo 0.1 x SSC y 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C o 55°C, preferiblemente entre 45°C y 55°C. Las temperaturas de hibridización antes mencionadas se determinan por ejemplo para un ácido nucleico de aproximadamente 100 bp (= pares de bases) en longitud y un contenido G + C de 50% en la ausencia de formamida. Las personas experimentadas saben cómo determinar las condiciones de hibridización requeridas con la ayuda de libros de texto, por ejemplo los mencionados anteriormente, o a partir de los siguientes textos: Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; Hames and Higgins (Ed.) 1985, "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (Ed.) 1991, "Essential Molecular Biology: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

Un ejemplo adicional de tales condiciones restrictivas de hibridización es la hibridización a 4XSSC a 65°C seguida por un lavado en 0.1X SSC a 75°C durante una hora. Alternativamente, una condición de hibridización restrictiva de ejemplo es en formamida al 50%, 4X SSC a 42°C. Adicionalmente, las condiciones durante la etapa de lavado pueden seleccionarse en el rango de condiciones delimitadas por condiciones de baja restricción (aproximadamente 2X SSC a 50°C) y condiciones de alta restricción (aproximadamente 0.2X SSC a 50°C, preferiblemente a 65°C) (20X SSC: citrato de sodio 0.3M, NaCl 3M, pH 7.0). Además, la temperatura durante la etapa de lavado puede elevarse desde condiciones de baja restricción a temperatura ambiente, aproximadamente 22°C, hasta condiciones de más alta restricción a aproximadamente 65°C. Tanto los parámetros de concentración de sal como de temperatura pueden variarse simultáneamente, o uno de los dos parámetros puede mantenerse constante mientras que el otro se varía. También pueden emplearse desnaturalizantes, por ejemplo formamida o SDS durante la hibridización. En la presencia de formamida al 50%, la hibridización se efectúa preferiblemente a 42°C. Pueden combinarse factores relevantes como i) longitud del tratamiento, ii) condiciones de salinidad, iii) condiciones de detergencia, iv) ADNs competidores, v) temperatura y vi) selección de sondas caso por caso de manera que no todas las posibilidades pueden mencionarse aquí.

Así, en una realización preferida, se prehibridizan las inmunosupresiones Northern con el regulador Rothi-Hybr-Quick (Roth, Karlsruhe) a 68°C durante 2 horas. La hibridización con una sonda con marcación radioactiva se hace durante la noche a 68°C. Las etapas de lavado subsiguientes se llevan a cabo a 68°C con 1xSSC.

Para las pruebas de inmunoprecipitación Southern las membranas se prehibridiza con regulador Rothi-Hybr-Quick (Roth, Karlsruhe) a 68°C durante 2 horas. La hibridización con una sonda con marcación radioactiva se lleva a cabo durante la noche a 68°C. Subsecuentemente el regulador de hibridización es descartado y el filtro se lava rápidamente utilizando 2xSSC; SDS al 0.1%. Después de descartar el regulador de lavado se agrega nuevo regulador 2xSSC; se agrega regulador SDS al 0.1% y se incuba a 68°C durante 15 minutos. Esta etapa de lavado se lleva a cabo dos veces seguida por una etapa de lavado adicional utilizando 1xSSC; SDS al 0.1% a 68°C durante 10 minutos.

Algunos ejemplos de condiciones de hibridización para ADN (ensayos de inmunoprecipitación Southern) y etapas de lavado se muestran a continuación:

(1) Las condiciones de hibridización pueden seleccionarse, por ejemplo, a partir de las siguientes condiciones:

- a) 4X SSC a 65°C,
- b) 6X SSC a 45°C,
- c) 6X SSC, 100 mg/ml de ADN de esperma de pescado fragmentado desnaturalizado a 68°C,
- d) 6X SSC, SDS al 0.5%, 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 68°C,
- e) 6X SSC, SDS al 0.5%, 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado fragmentado, formamida al 50% a 42°C,
- f) formamida al 50%, 4X SSC a 42°C,

ES 2 368 915 T3

g) formamida al 50% (vol/vol), albúmina de suero bovino 0.1%, Ficoll al 0.1%, polivinilpirrolidona al 0.1%, regulador de fosfato de sodio 50 mM pH 6.5, NaCl 750 mM, citrato de sodio al 75 mM a 42°C,

h) 2X o 4X SSC a 50°C (condición de baja restricción), o

i) formamida al 30 a 40%, 2X o 4X SSC a 42°C (condición de baja restricción).

5 2) Las etapas de lavado se pueden seleccionar, por ejemplo a partir de las siguientes condiciones:

a) NaCl 0.015 M/citrato de sodio 0.0015 M/SDS al 0.1% a 50°C.

b) 0.1X SSC a 65°C.

c) 0.1 X SSC, SDS al 0.5 % a 68°C.

d) 0.1X SSC, SDS al 0.5%, formamida al 50% a 42°C.

10 e) 0.2X SSC, SDS al 0.1% a 42°C.

f) 2X SSC a 65°C (condición de baja restricción).

15 En otra realización se entiende por condiciones estándar, por ejemplo, dependiendo del ácido nucleico en cuestión temperaturas entre 42°C y 58°C en una solución acuosa de regulador que tiene una concentración de entre 0.1 y 5x SSC (1 X SSC = NaCl 0.15 M, citrato de sodio 15 mM, pH 7.2) o adicionalmente en la presencia de formamida al 50%, tal como a manera de ejemplo a 42°C en 5 x SSC, formamida al 50%. Las condiciones de hibridación para los híbridos ADN:ADN son ventajosamente 0.1 x SSC y temperaturas entre aproximadamente 20°C y 45°C, preferiblemente entre aproximadamente 30°C y 45°C. Para híbridos ADN:ARN las condiciones de hibridación son ventajosamente 0.1 x SSC y temperaturas entre aproximadamente 30°C y 55°C, preferiblemente entre aproximadamente 45°C y 55°C. Estas temperaturas especificadas para la hibridación son valores de temperatura de fusión calculados a manera de ejemplo para un ácido nucleico que tiene una longitud de aproximadamente 100 nucleótidos y un contenido de G + C del 50% en ausencia de formamida. Las condiciones experimentales para la hibridación de ADN se describen en textos relevantes de genética tales como a manera de ejemplo Sambrook et al. "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, de 1989, y pueden calcularse mediante fórmulas conocidas por los expertos en la técnica, por ejemplo como una función de la longitud de los ácidos nucleicos, la naturaleza de los híbridos o el contenido de G + C. Los expertos en la técnica pueden extraer de los siguientes textos información adicional sobre la hibridación: Ausubel et al. (eds), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

20 30 Los polipéptidos que tienen la actividad antes mencionada, esto es, que confieren la actividad metabólica alterada, derivados de otros organismos, pueden codificarse por otras secuencias de ADN que hibridizan a las secuencias mostradas en las figuras 1a, 1b o 1c bajo condiciones de hibridización relajadas y cuyo código sobre la expresión para los péptidos confiere una actividad metabólica alterada.

35 Adicionalmente, algunas aplicaciones deben llevarse a cabo en condiciones de hibridización de baja restricción, sin consecuencias para la especificidad de la hibridización. Por ejemplo, un análisis por inmunoprecipitación Southern del ADN total podría ser probado con una molécula de ácido nucleico de la presente invención y lavado en baja restricción (55°C en 2xSSP 0.1% de SDS). El análisis de hibridación podría revelar un patrón simple de polipéptidos que codifican solamente genes de la presente invención o utilizados en el proceso de la invención, por ejemplo, que tienen la actividad aquí mencionada de incrementar los productos químicos finos. Un ejemplo adicional de tales condiciones de hibridización de baja restricción es 4XSSC a 50°C o hibridización con formamida al 30 a 40% a 42°C. Tales moléculas comprenden las que son fragmentos, análogos o derivados del polipéptido de la invención o se utilizan en el proceso de la invención y difieren, por ejemplo, mediante eliminación(s) inserción(es), sustitución (es), adición (es) y/o recombinación (es) de aminoácidos y/o nucleótidos o cualquier otra modificación (es) conocida en la técnica bien sea sola o en combinación con las secuencias de aminoácidos antes descritas o sus secuencias de nucleótidos subyacentes. Sin embargo, se prefiere utilizar condiciones de hibridización de alta restricción.

40 50 La hibridización debería llevarse a cabo ventajosamente con fragmentos de al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 bp, ventajosamente al menos 50, 60, 70 u 80 bp, preferiblemente al menos 90, 100 o 110 bp. Lo más preferiblemente son fragmentos de al menos 15, 20, 25 o 30 bp. Preferiblemente también son hibridaciones con al menos 100 bp o 200, muy especialmente preferibles al menos 400 bp de longitud. En una realización especialmente preferida, la hibridización debería llevarse a cabo con la secuencia completa del ácido nucleico con las condiciones descritas más arriba.

- Los términos “fragmentos”, “fragmento de una secuencia” o “parte de una secuencia” significan una secuencia truncada de la secuencia original a la que se hace referencia. La secuencia truncada (secuencia de ácido nucleico o proteína) puede variar ampliamente en longitud; el tamaño mínimo para una secuencia de tamaño suficiente para proveer una secuencia con al menos una función y/o actividad comparable de la secuencia original a la que se refiere, que hibridice con la molécula de ácido nucleico de la invención o se utilice en el proceso de la invención bajo condiciones restrictivas, mientras que el tamaño máximo no es crítico. En algunas aplicaciones, el tamaño máximo usualmente no es sustancialmente superior que el requerido para proveer la actividad y/o funciones deseadas de la secuencia original.
- Además de los fragmentos y polipéptidos de fusión de la SRP descrita aquí, la presente invención incluye homólogos y análogos de SRPs de origen natural y ácidos nucleicos que codifican SRPs en una planta. Los “homólogos” se definen aquí como dos ácidos nucleicos o polipéptidos que tienen secuencias de nucleótidos o aminoácidos similares, o sustancialmente idénticos, respectivamente. Los homólogos incluyen variantes alélicas, ortólogos, parálogos, agonistas y antagonistas de SRPs como se define más adelante. El término “homólogo” abarca adicionalmente moléculas de ácidos nucleicos que difieren de la de las secuencias de nucleótido mostradas en SEQ ID No:1 (y porciones de las mismas) debido a la degeneración del código genético y así codificar la misma SRP que fue codificada por las secuencias de nucleótidos mostradas en SEQ ID No:1. Tal como se utiliza aquí una SRP “de origen natural” se refiere a una secuencia de aminoácidos de una SRP que se presenta en la naturaleza. Preferiblemente, una SRP de origen natural comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente de los polipéptidos de SEQ ID No: 2.
- Un agonista de la SRP puede retener sustancialmente, o un subconjunto, de las actividades biológicas de la SRP. Un antagonista de la SRP puede inhibir una o más de las actividades de la forma originaria natural de la SRP. Por ejemplo, el antagonista de SRP puede enlazarse competitivamente a un miembro corriente abajo o corriente arriba de la cascada de componentes metabólicos de la membrana celular que incluye la SRP, o enlazarse a una SRP que medie en el transporte de compuestos a través de tales membranas, evitando así que tenga lugar la translocación.
- Las moléculas de ácido nucleico correspondientes a las variantes alélicas y análogos, ortólogos y parálogos del ADNc de SRP puede aislarse con base en su identidad con los ácidos nucleicos de *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli*, *Brassica napus*, *Glicina max* u *Oryza sativa* descritos aquí utilizando ADNc de SRP o una porción del mismo, como una sonda de hibridización de acuerdo con técnicas de hibridización estándar bajo condiciones de hibridización restrictivas. En una realización alternativa, los homólogos de la SRP pueden identificarse seleccionando bibliotecas combinacionales de mutantes, por ejemplo, mutantes por truncamiento, de la actividad agonista o antagonista de la SRP para SRP. En una realización, se genera una biblioteca variegada de variantes de SRP por mutagénesis combinacional al nivel del ácido nucleico y se codifica por una biblioteca de genes variegada. Una biblioteca variegada de variantes de SRP puede producirse, mediante por ejemplo, la ligación enzimática de una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias genéticas tales que se puede expresar un conjunto degenerado de secuencias potenciales SRP como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de polipéptidos de fusión más grande (por ejemplo, para despliegue de fagos) que contienen el conjunto de secuencias de SRP en el mismo. Hay una variedad de métodos que pueden utilizarse para producir bibliotecas de homólogos potenciales de SRP a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. La síntesis química de una secuencia de genes degenerada puede llevarse a cabo en un sintetizador automático de ADN, y el gen sintético se liga entonces en un vector de expresión apropiado. El uso de un conjunto degenerado de genes permite proveer, en una mezcla, todas las secuencias que codifican el conjunto deseado de secuencias de SRP potenciales. Los métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados son conocidos en la técnica. Véase, 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, las bibliotecas de fragmentos de las regiones codificadoras de SRP pueden utilizarse para generar una población variegada de fragmentos de SRP para selección y subsecuente selección de homólogos de una SRP. En una realización, puede generarse una biblioteca de fragmentos de secuencia codificadora tratando un fragmento de PCR de doble cadena de una secuencia de codificación de SRP con una nucleasa bajo condiciones en las que ocurre un muescado solamente aproximadamente una vez por molécula, desnaturalizando el ADN de doble cadena, renaturalizando el ADN para formar ADN de doble cadena, el cual puede incluir pares sentido/antisentido a partir de diferentes productos de muescado, retirando porciones de cadena sencilla de dúplex reformado por tratamiento con S1 nucleasa, ligando la biblioteca de fragmentos resultante en un vector de expresión. Mediante este método, puede derivarse una biblioteca de expresión la cual codifica fragmentos N-terminales, C-terminales e internos de diversos tamaños de la SRP.
- Se conocen varias técnicas en el arte para la selección de productos genéticos de bibliotecas combinacionales hechas por mutaciones puntuales o truncación, y para la selección de bibliotecas de ADNc para productos genéticos que tienen una propiedad seleccionada. Tales técnicas son adaptables para la selección rápida de bibliotecas genéticas generadas por mutagénesis combinacional de homólogos de la SRP. Las técnicas más ampliamente utilizadas, que son adecuadas para análisis de alto rendimiento, para bibliotecas genéticas de larga selección incluyen típicamente la clonación de la biblioteca genética en vectores de expresión replicables, células apropiadas

para la transformación con la biblioteca resultante de vectores, y la expresión de los genes combinacionales bajo condiciones en las cuales la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto fue detectado. La mutagénesis de conjunto recursivo (REM), una nueva técnica que potencia la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, puede utilizarse en combinación con las pruebas de selección para identificar homólogos de la SRP (Arkin and Yourvan, 1992, PNAS 89:7811-7815; Delgrave et al., 1993, Polypeptide Engineering 6(3):327-331). En otra realización, las pruebas basadas en células pueden explotarse para analizar una biblioteca de SRP variada, utilizando métodos bien conocidos en la técnica. La presente invención proporciona además un método para identificar una novedosa SRP, que comprende (a) elevar una respuesta específica de un anticuerpo a SRP, o un fragmento de la misma, tal como se describe aquí; (b) seleccionar material de SRP putativo con el anticuerpo, donde el enlazamiento específico del anticuerpo al material indica la presencia de una SRP potencialmente novedosa; y (c) analizar el material enlazado en comparación con la SRP conocida, para determinar su novedad.

Tal como se estableció anteriormente, la presente invención incluye SRPs y homólogos de las mismas. Para identificar el porcentaje de identidades de dos secuencias de aminoácidos (por ejemplo, una de las secuencias de figura 1a, 1b o 1c, y una forma mutante de las mismas), las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse brechas en la secuencia de un polipéptido para una alineación óptima con el otro polipéptido o ácido nucleico). Se comparan los residuos de aminoácidos en posiciones correspondientes a los aminoácidos. Cuando una posición en una secuencia (por ejemplo una de las secuencias de figura 1a, 1b o 1c) está ocupada por el mismo residuo de aminoácido que la posición correspondiente en la otra secuencia (por ejemplo, una forma mutante de la secuencia seleccionada del polipéptido de figura 1a, 1b o 1c), las moléculas son entonces idénticas en esa posición. Puede hacerse el mismo tipo de comparación entre dos secuencias de ácidos nucleicos.

El porcentaje de identidad de secuencia entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (esto es, porcentaje de identidad de secuencia = número de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100). Preferiblemente, los homólogos de aminoácidos aislados incluidos en la presente invención son al menos 50-60%, preferiblemente al menos 60-70%, y más preferiblemente al menos 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90% o 90-95%, y lo más preferiblemente al menos 96%, 97%, 98% o 99% o más idénticos a una secuencia completa de aminoácidos mostrada en SEQ ID No:2. En aún otra realización, los homólogos de aminoácidos aislados incluidos en la presente invención son al menos aproximadamente 50-60%, preferiblemente al menos aproximadamente 60-70%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90% o 90-95%, y los más preferiblemente al menos aproximadamente 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntico a una secuencia de aminoácidos completa codificada por una secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID No:1. En otras realizaciones, los homólogos de aminoácidos de la SRP tienen identidad de secuencia por encima de al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos, más preferiblemente al menos 25 residuos de aminoácidos contiguos y lo más preferiblemente al menos 35 residuos de aminoácidos contiguos de SEQ ID No: 2.

En otra realización preferida, un homólogo de ácido nucleico aislado de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 80-85%, 85-90% o 90-95% y aún más preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica a una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID No: 1, o a una porción que comprende al menos 20, 30, 40, 50, 60 nucleótidos consecutivos de la misma. La longitud preferible de la comparación de secuencia para ácidos nucleicos es al menos 75 nucleótidos, más preferiblemente al menos 100 nucleótidos y lo más preferiblemente la longitud completa de la región de codificación.

Se prefiere adicionalmente que el homólogo de ácido nucleico aislado de la invención codifique una SRP, o una porción de la misma, que sea al menos 85% idéntica a una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2 y que funcione como moduladora de la respuesta a la sequía en una planta. En una realización más preferida, la sobreexpresión del homólogo del ácido nucleico en una planta incrementa la tolerancia de la planta a una sequía.

Para los propósitos de la invención, el porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos se determina utilizando el paquete de software el Vector NTI 6.0 (PC) y (InforMax, 7600 Wisconsin Ave., Bethesda, MD 20814). Se utiliza una penalidad de apertura de brecha de 15 y una penalidad de extensión de brecha de 6.66 para determinar el porcentaje de identidad de dos ácidos nucleicos. Una penalidad de apertura de brecha de 10 y una penalidad de extensión de brecha de 0.1 se utilizan para determinar el porcentaje de identidad de dos polipéptidos. Todos los otros parámetros se definen como valores por sistema. Para propósitos de una alineación múltiple (Algoritmo Clustal W), la penalidad de apertura de brecha es 10, y la penalidad de extensión de brecha es 0.05 con la matriz blosum62. Debe entenderse que para propósitos de determinar identidad de secuencia cuando se compara una secuencia de ADN con una secuencia de ARN, un nucleótido timidina es equivalente a un nucleótido uracilo.

En otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende un polinucleótido que hibridiza al polinucleótido de SEQ ID No: 1 bajo condiciones restrictivas. Más particularmente, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención tiene al menos 15 nucleótidos de longitud e hibridiza bajo condiciones restrictivas a la molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID No: 1. En otras realizaciones, el ácido nucleico tiene al menos 30, 50, 100, 250 o más nucleótidos de longitud. Preferiblemente, un homólogo de

ácido nucleico aislado de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que hibridiza bajo condiciones altamente restrictivas a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID No: 1, y funciona como un modulador de tolerancia al estrés en una planta. En una realización preferida adicional, la sobreexpresión del ácido nucleico aislado homólogo en una planta incrementa la tolerancia de la planta a la sequía.

5 Tal como se utiliza aquí con respecto a la hibridización para inmunoprecipitación de ADN a ADN, el término "condiciones restrictivas" se refiere en una realización a la hibridización durante la noche a 60°C en solución 10X Denharts, SDS al 0.5% y 100 µg/ml de ADN esperma de salmón desnaturalizado. Las inmunoprecipitaciones se lavan secuencialmente a 62°C durante 30 minutos cada vez en 3X SSC/0.1% de SDS, seguido por 1X SSC/0.1% de SDS y finalmente 0.1X SSC/0.1% de SDS. También como se utiliza aquí, "condiciones altamente restrictivas" se refiere a una hibridización durante la noche a 65°C en solución de Denharts al 10X, 6X SSC, 0.5% de SDS y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Las inmunoprecipitaciones se lavan secuencialmente a 65°C durante 30 minutos cada vez en 3X SSC/0.1% de SDS, seguido por 1X SSC/0.1% de SDS y finalmente 0.1X SSC/0.1% de SDS. Los métodos para hibridizaciones de ácidos nucleicos están descritos en Meinkoth and Wahl, 1984, Anal. Biochem. 138:267-284; Ausubel et al.eds, 1995, Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 2, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York; and Tijssen, 1993, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2, Elsevier, New York. Preferiblemente, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención que hibridiza bajo condiciones restrictivas o altamente restrictivas a una secuencia de SEQ ID No: 1 corresponde a una molécula de ácido nucleico de origen natural. Tal como se 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, codifica un polipéptido natural". En una realización, el ácido nucleico codifica una SRP de origen natural de *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli*, *Brassica napus*, *Glicina Max* u *Oryza sativa*.

Utilizando los métodos antes descritos, y otros conocidos para los expertos en la técnica, una persona de experiencia normal en la técnica puede aislar homólogos de las SRP que comprenden secuencias de aminoácidos mostradas en la figura 1a, 1b o 1c. Un subconjunto de estos homólogos son las variantes alélicas. Tal como se utiliza aquí, el término "variante alélica" se refiere a una secuencia de nucleótidos que contiene polimorfismos que llevan a cambios en secuencias de aminoácidos de una SRP y que existen dentro de una población natural (por ejemplo, una especie o variedad de plantas). Tales variaciones alélicas naturales pueden dar como resultado típicamente una varianza de 1-5% en un ácido nucleico de SRP. Las variantes alélicas pueden identificarse secuenciando la secuencia de ácidos nucleicos de interés en un cierto número de plantas diferentes, lo cual puede llevarse a cabo fácilmente utilizando sondas de hibridización para identificar los mismos locus genéticos de SRP en esas plantas. Cualquiera y todas las variaciones de ácidos nucleicos y polimorfismos o variaciones resultantes en aminoácidos en una SRP son el resultado de una variación alélica natural y que no alteran la actividad funcional del SRP, se entienden como dentro del alcance de la invención.

Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una SRP que tiene identidad de secuencia con una secuencia de polipéptido de la figura 1a, 1b o 1c pueden crearse introduciendo una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos en una secuencia de nucleótidos de figura 1a 1b, ó 1c, respectivamente, de tal manera que se introducen una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos en el polipéptido codificado. Las mutaciones pueden ser introducidas en una de las secuencias de las figuras 1a, 1b o 1c por técnicas estándar, tales como la mutagénesis dirigida a un sitio y mutagénesis mediada por PCR. Preferiblemente, las sustituciones conservativas de aminoácidos se hacen en uno o más residuos de aminoácidos predichos no esenciales. Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en la cual el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familia de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. 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 (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 con ramificación beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Así un residuo de aminoácido predicho no esencial en una SRP se reemplaza preferiblemente con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Alternativamente, en otra realización, las mutaciones pueden introducirse aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia de codificación de SRP, tal como por mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes pueden ser seleccionados en cuanto a una actividad SRP descrita aquí para identificar mutantes que retienen actividad de SRP. Después de la mutagénesis de una de las secuencias de SEQ ID NO: XXX, el polipéptido codificado puede expresarse de forma recombinante y la actividad del polipéptido puede determinarse analizando la tolerancia al estrés de una planta que expresa el polipéptido tal como se describe aquí.

Adicionalmente, pueden crearse ácidos nucleicos de SRP optimizados. Tal como se utiliza aquí, "optimizado" se refiere a un ácido nucleico que está manipulado genéticamente con el fin de incrementar su expresión en una planta o animal dado. Para proporcionar ácidos nucleicos de SRP optimizados, la secuencia de ADN del gen puede modificarse para 1) comprender codones preferidos por genes vegetales altamente expresados; 2) comprender un contenido de A + T en una composición básica de nucleótidos de manera que se encuentre sustancialmente en las plantas; 3) formar una secuencia de iniciación de plantas; o 4) eliminar secuencias que produzcan desestabilización,

poliadenilación inapropiada, degradación y terminación de ARN, o que formen estructuras secundarias de pasadores o sitios de división de ARN. La expresión incrementada de los ácidos nucleicos de SRP en las plantas puede alcanzarse utilizando la frecuencia de distribución del uso de codón en plantas en general o en una planta en particular. Los métodos para optimizar la expresión de ácidos nucleicos en plantas pueden encontrar en EPA 0359472; EPA 0385962, la solicitud PCT No. WO 91/16432; La Patente de los Estados Unidos No. 5,380,831; la 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.

Tal como se utiliza aquí, "frecuencia de utilización de codón preferido" se refiere a la preferencia exhibida por una célula huésped en particular 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 de 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. De la misma forma, la frecuencia de utilización de un codón preferido exhibida por una célula huésped puede calcularse promediando la frecuencia del uso del codón preferido en un gran número de genes expresados por la célula huésped. Es preferible que este análisis sea limitado a genes que sean altamente expresados por la célula huésped. La desviación porcentual de la frecuencia del uso de codón preferido para un gen sintético con respecto al empleado en una célula huésped se calcula primero determinando la desviación porcentual de la frecuencia del uso de un codón simple con respecto a la de la célula huésped seguido por la obtención de la desviación promedio con respecto a todos los codones. Tal como se define aquí, este cálculo incluye codones únicos (esto es, ATG y TGG). En términos generales, la desviación promedio global del uso de codón de un gen optimizado con respecto al de la célula huésped se calcula utilizando la ecuación $1A = n = 1Z X_n - Y_n X_n$ por 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 global de la frecuencia del uso de codón, A, para todos los aminoácidos debería ser preferiblemente menor de aproximadamente 25%, y más preferiblemente menor de aproximadamente 10%.

Por lo tanto, un ácido nucleico de SRP puede optimizarse de tal forma que su frecuencia de distribución de utilización de codón se desvíe, preferiblemente, no más de 25% de la de genes vegetales altamente expresados y, más preferiblemente, no más de aproximadamente 10%. Además, se da consideración al porcentaje de contenido de G + C de la tercera base degenerada (las monocotiledóneas parecen favorecer G + C en esta 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 el codón XTA se evita tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas. Los ácidos nucleicos de SRP de esta invención también tienen preferiblemente índices que indican que evitan los dobletes CG y TA aproximándose cercanamente a los de la planta huésped escogida (por ejemplo, Brassica napus, Glicina max, u Oryza sativa). Más preferiblemente estos índices se desvían del huésped por no más de aproximadamente 10-15%.

Además de las moléculas de ácido nucleico que codifica la SRP descritas aquí, otro aspecto de la invención es pertinente a moléculas de ácidos nucleicos aislados que son antisentido a las mismas. Se cree que los polinucleótidos antisentido inhiben la expresión genética de un polinucleótido objetivo enlazando específicamente el polinucleótido objetivo e interfiriendo con la transcripción, división, transporte, traducción y/o estabilidad de polinucleótido objetivo. Se describen métodos en la técnica anterior para dirigir el polinucleótido antisentido al ADN cromosómico, a un transcripto de ARN primario, o a un ARNm procesado. Preferiblemente, las regiones objetivo incluyen sitios de división, codones de iniciación de la traducción, codones de terminación de la traducción, y otras secuencias dentro del marco de lectura abierto.

El término "antisentido" para el propósito de la invención, se refiere a un ácido nucleico que comprende un polinucleótido que es suficientemente complementario a todo o una porción de un gen, transcripto primario o ARNm procesado, de tal manera que interfiere con la expresión del gen endógeno. Polinucleótidos "Complementario" son aquellos que son capaces de aparear bases de acuerdo con las reglas de complementariedad estándar de Watson-Crick, específicamente las purinas aparearán bases con pirimidinas para formar una combinación de guanina apareada con citosina (G:C) y la adenina se apareará también con timina (A:T) en el caso del ADN, o la adenina se apareará con uracilo (A:U) en el caso del ARN. Se entiende que dos polinucleótidos pueden hibridizar uno a otro, incluso si no son completamente complementarios entre sí, dado que cada uno tiene al menos una región que es sustancialmente complementaria con el otro. El término "ácido nucleico antisentido" incluye ARN de cadena sencilla así como casetes de expresión de ADN de cadena doble que pueden ser transcritos para producir ARN antisentido. Ácidos nucleicos antisentido "activo" son moléculas de ARN antisentido que son capaces de hibridizarse selectivamente con un transcripto primario o un ARNm que codifica un polipéptido que tiene al menos una identidad de secuencia del 80% con el polipéptido de figura 1a, 1b, o 1c.

El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a una cadena de codificación completa de SRP, o solamente a una porción de la misma. En una realización, una molécula de ácido nucleico antisentido es antisentido a una "región de codificación" de la cadena de codificación de una secuencia de nucleótidos que codifica una SRP. El término "región de codificación" se refiere a la región de la secuencia de nucleótidos que comprende codones que son traducidos en residuos de aminoácidos. En otra realización, la molécula de ácido nucleico antisentido es

antisentido a una "región no codificadora" de la cadena codificadora de una secuencia de nucleótidos que codifica una SRP. El término "región no codificadora" se refiere a secuencias 5' y 3' que flanquean la región codificadora que no son traducidas en aminoácidos (esto es, también denominadas como regiones no traducidas 5' y 3'). La molécula de ácido nucleico antisentido puede ser complementaria a la región codificadora completa de SRP ARNm, pero más preferiblemente es un oligonucleótido que es antisentido solamente a una porción de la región codificadora o no codificadora de SRP ARNm. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede ser complementario a la región que rodea el sitio de inicio de la traducción de PKSRP ARNm. Un oligonucleótido antisentido puede tener, por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos de longitud. Típicamente, las moléculas antisentido de la presente invención comprenden un ARN que tiene una identidad de secuencia de 60-100% con al menos 14 nucleótidos consecutivos de uno de los ácidos nucleicos de la figura. 1a, 1b, o 1c. Preferiblemente, la identidad de secuencia será al menos 70%, más preferiblemente al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% y lo más preferiblemente de 99%.

Un ácido nucleico antisentido de la invención puede construirse utilizando síntesis química y reacciones de ligación enzimática utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un ácido nucleico antisentido (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido) pueden sintetizarse químicamente utilizando nucleótidos de origen natural o nucleótidos modificados de forma diversa diseñados para incrementar la estabilidad biológica de las moléculas o para incrementar la estabilidad física del dúplex formado entre los ácidos nucleicos antisentido y sentido, por ejemplo, pueden usarse derivados de fosfortiorato y nucleótidos sustituidos con acridina. Ejemplos de nucleótidos modificados que puedan utilizarse para generar el ácido nucleico antisentido incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxilmetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihydrouracilo, beta-Dgalactosylqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-methylcitosina, 5-methylcitosina, 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, ácido uracil-5-oxiacético metiléster, 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 producirse biológicamente utilizando un vector de expresión en el cual un ácido nucleico ha sido subclonado en una orientación antisentido (esto es, 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).

En aún otra realización, la molécula de ácido nucleico antisentido de la invención es una molécula de ácido nucleico α -anomérico. Una molécula de ácido nucleico α -anomérica forma híbridos de doble cadena específicos con ARN complementario en el cual, contrario a las unidades β usuales, las cadenas corren paralela una a otra (Gaultier et al., 1987, Nucleic Acids. Res. 15:6625-6641). La molécula de ácido nucleico antisentido también puede comprender un 2'-o-metilribonucleótido (Inoue et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15:6131-6148) o un análogo de ARN- ADN quimérico (Inoue et al., 1987, FEBS Lett. 215:327-330).

Las moléculas de ácido nucleico antisentido de la invención se administran típicamente a una célula o son generadas in situ de tal forma que hibridizan con o se enlazan con ARNm celular y/o ADN genómico que codifican una SRP para inhibir mediante esa forma la expresión del polipéptido, por ejemplo, inhibiendo la transcripción y/o traducción. La hibridización puede ser por complementariedad convencional del nucleótido para formar un dúplex estable, o, por ejemplo, en el caso de una molécula de ácido nucleico antisentido que se enlaza a dúplex de ADN, a través de interacciones específicas en el surco principal de la hélice doble. La molécula antisentido puede modificarse de tal forma que se enlace específicamente a un receptor o un antígeno expresados sobre una superficie celular seleccionada, por ejemplo, enlazando la molécula de ácido nucleico antisentido con un péptido o un anticuerpo que se enlaza a un receptor o antígeno de la superficie celular. La molécula de ácido nucleico antisentido también puede administrarse a células utilizando los vectores descritos aquí. Para alcanzar suficiente concentración intracelular de las moléculas antisentido, se prefieren constructos de vectores en los cuales la molécula de ácido nucleico antisentido se coloca bajo el control de un promotor fuerte procariótico, viral, o eucariótico (incluyendo plantas).

Como una alternativa a los polinucleótidos antisentido, pueden utilizarse ribozimas, polinucleótidos sentido o ARN de doble cadena (ARNds) para reducir la expresión de un polipéptido de SRP. Por "ribozima" se entiende una enzima catalítica basada en ARN con actividad de ribonucleasa que es capaz de escindir un ácido nucleico de cadena sencilla, tal como un ARNm, con el cual tiene una región de complementariedad. Las ribozimas (por ejemplo, las ribozimas de cabeza de martillo descritas en Haselhoff and Gerlach, 1988, Nature 334:585-591) pueden utilizarse para escindir catalíticamente los transcritos de SRP ARNm para mediante esa forma inhibir la traducción de la SRP ARNm. Una ribozima que tenga especificidad por el ácido nucleico que codifica la SRP puede ser diseñada con base en la secuencia de nucleótidos de una SRP ADNc, tal como se describe aquí (esto es, figura 1a, 1b o 1c) o sobre la base de una secuencia heteróloga para ser aislada de acuerdo con métodos enseñados en esta invención. Por ejemplo, un derivado de un ARN Tetrahimena L-19 IVS puede ser construido de tal forma que la secuencia de nucleótidos del sitio activo sea complementaria a la secuencia de nucleótidos para ser escindida en un ARNm que codifica SRP. Véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 4,987,071 y 5,116,742 de Cech et al. Alternativamente, el ARNm de SRP puede utilizarse para seleccionar un ARN catalítico que tenga actividad

ribonucleasa específica para una reserva de moléculas de ARN. Véase, por ejemplo, Bartel, D. y Szostak, JW, 1993, Science 261:1411-1418. En realizaciones preferidas, la ribozima contendrá una porción que tenga al menos 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 nucleótidos, y más preferiblemente de 7 u 8 nucleótidos, que tenga 100% de complementariedad con una porción del ARN objetivo. Los métodos para hacer ribozima son conocidos para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,025,167; 5,773,260 y 5,496,698.

El término "ARNds," tal como se utiliza aquí, se refiere a híbridos de ARN que comprenden dos cadenas de ARN. El ARNds puede ser lineal o circular en su estructura. En una realización preferida, el ARNds es específico para un polinucleótido que codifica bien sea el polipéptido de figura 1a, 1b, o 1c, o un polipéptido que tiene al menos 70% de identidad en secuencia con un polipéptido de la figura 1a, 1b, o 1c. Los ARN hibridizantes pueden ser sustancial o completamente complementarios. Por "sustancialmente complementarios" se entiende que cuando los dos ARN hibridizantes se alinean de forma óptima utilizando el programa BLAST tal como se describió más arriba, las porciones hibridizantes son al menos 95% complementarias. Preferiblemente, el ARNds tendrá al menos 100 pares de bases de longitud. Típicamente, los ARN hibridizantes serán de longitud idéntica sin sobrecarga de extremo 5' o 3' y sin brechas. Sin embargo, los ARNds que tienen sobrecargas 5' o 3' de hasta 100 nucleótidos pueden utilizarse en los métodos de la invención.

El ARNds puede comprender ribonucleótidos o análogos de ribonucleótidos, tales como residuos 2'-O-metil ribosilo o combinaciones de los mismos. Véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 4,130,641 y 4,024,222. Un ácido ARNds polirribonósico: ácido polirribocitidílico está descrito en la patente de los Estados Unidos 4,283,393. Los métodos para hacer y utilizar ARNds son conocidos en la técnica. Un método comprende la transcripción simultánea de dos cadenas complementarias de ADN, bien sea in vivo o en una mezcla de reacción sencilla in vitro. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,795,715. En una realización el ARNds puede ser introducido en una planta o en una célula vegetal directamente por procedimientos de transformación estándar. Alternativamente, el ARNds puede expresarse en una célula vegetal transcribiendo dos ARN complementarios.

Otros métodos para la inhibición de la expresión genética endógena, tal como la formación de hélice triple (Moser et al., 1987, Science 238:645-650 y Cooney et al., 1988, Science 241:456-459) y cosupresión (Napoli et al., 1990, The Plant Cell 2:279-289) son conocidas en la técnica. ADNc de longitud parcial y completa han sido utilizados para la cosupresión de genes vegetales endógenos. Véase, 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 and Napoli et al., 1990, The Plant Cell 2:279-289.

Para la supresión en sentido, se cree que la introducción de un polinucleótido en sentido bloquea la transcripción del gen objetivo correspondiente. El polinucleótido en sentido tendrá al menos 65% de identidad en secuencia con el gen vegetal o el ARN objetivo. Preferiblemente, la identidad porcentual es al menos 80%, 90%, 95% o más. El polinucleótido en sentido introducido necesita no tener longitud completa con respecto al gen o transcripto objetivo. Preferiblemente, el polinucleótido en sentido tendrá al menos 65% de identidad de secuencia con al menos 100 nucleótidos consecutivos de uno de los ácidos nucleicos de la figura 1a, 1b, o 1c. Las regiones de identidad pueden comprender intrones y/o exones de regiones no traducidas. El polinucleótido en sentido introducido puede estar presente en la célula vegetal de forma transiente, o puede estar integrado de forma estable en un cromosoma de una planta o en un replicón extracromosómico.

Además, las moléculas de ácido nucleico que codifican SRP a partir de la misma u otras especies tales como análogos, ortólogos o parálogos de SRP, se entiende que están dentro del alcance de la presente invención. Tal como se utiliza aquí, el término "análogos" se refiere a dos ácidos nucleicos que tienen la misma o similar función, pero que han evolucionado separadamente en organismos no relacionados. Tal como se utiliza aquí, el término "ortólogos" se refiere a dos ácidos nucleicos de diferentes especies que han evolucionado a partir de un gen ancestral común por especiación. Normalmente, los ortólogos codifican proteínas que tienen la misma o similares funciones. También tal como se utiliza aquí, el término "parálogos" se refiere a dos ácidos nucleicos que están relacionadas por duplicación dentro de un genoma. Los parálogos usualmente tienen funciones diferentes, pero estas funciones pueden estar relacionadas (Tatusov, RL et al. 1997 Science 278(5338):631-637). Los análogos, ortólogos y parálogos de una proteína de origen natural relacionada con el estrés pueden diferir de las proteínas relacionadas con el estrés de origen natural por modificaciones post-transcripcionales, mediante diferencias en secuencias de aminoácidos o por ambas. Las modificaciones post-transcripcionales incluyen derivación química in vivo e in vitro de polipéptidos, por ejemplo, acetilación, carboxilación, fosforilación o glicosilación, y tales modificaciones pueden ocurrir durante la síntesis del polipéptido o el procesamiento o tratamiento siguiente con enzimas modificadoras aisladas. En particular, los ortólogos de la invención generalmente exhibirán al menos 80-85%, más preferiblemente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, y lo más preferiblemente 95%, 96%, 97%, 98% o aún 99% de identidad u homología con todo o parte de una secuencia de aminoácidos de proteínas relacionadas con el estrés de origen natural y exhibirán una función similar a una proteína relacionada con el estrés. Los ortólogos de la presente invención también son preferiblemente capaces de participar en la respuesta al estrés en las plantas.

Además de las variantes de origen natural de secuencia de proteína relacionadas con el estrés que pueden existir en la población, el técnico experimentado apreciará adicionalmente que pueden introducirse cambios por mutación en una secuencia de nucleótidos de la figura. 1a, 1b, o 1c, llevando por tanto a cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada relacionada con el estrés, sin alterar la capacidad funcional de la proteína relacionada con el estrés o potenciar la capacidad funcional de la proteína relacionada con el estrés. Por ejemplo, las sustituciones de nucleótidos que llevan a sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos "no esenciales" pueden hacerse en una secuencia de la figura 1. Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que puede ser alterado a partir de la secuencia silvestre de una de las proteínas relacionadas con el estrés sin alterar la actividad de las mismas, mientras que un residuo de aminoácido "esencial" es requerido para la actividad de las proteínas relacionadas con el estrés. Otros residuos de aminoácidos, sin embargo, (por ejemplo, aquellos que no son conservados o solamente son semiconservados en el dominio que tiene actividad SRP) pueden no ser esenciales para la actividad y así probablemente pueden ser susceptibles de alteración sin alterar la actividad de SRP.

De acuerdo con lo anterior, otro aspecto de la invención es pertinente a moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas relacionados con el estrés que contienen cambios en residuos de aminoácidos que no son esenciales para la actividad de la proteína relacionada con el estrés. Tales SRP difieren en secuencia de aminoácidos con respecto a una secuencia de figura 1a, 1b o 1c, a la vez que retienen al menos una de las actividades de la proteína relacionadas con el estrés descritas aquí. En una realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína, donde la proteína comprende una secuencia de aminoácidos al menos 50% homóloga a una secuencia de aminoácidos de figura 1a, 1b, o 1c. Preferiblemente, la proteína codificada por la molécula de ácido nucleico es al menos aproximadamente 50-60% homóloga frente a una de las secuencias de la figura 1a, 1b o 1c, más preferiblemente al menos 60 - 70% homóloga a una de las secuencias de la figura 1a, 1b o 1c, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 70 - 80%, 80 - 90%, más preferiblemente 90%, 91%, 92%, 93%, 94% homóloga a una de las secuencias de figura 1a, 1b o 1c y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 96%, 97%, 98% o 99% homóloga a una de las secuencias de la figura 1a, 1b, o 1c. Las proteínas preferidas relacionadas con el estrés homólogas de la presente invención son preferiblemente capaces de participar en la respuesta a la tolerancia al estrés en una planta. La homología (= identidad) fue calculada a lo largo de todo el rango completo de aminoácidos. El programa utilizado fue PileUP (J. Mol Evolution, 25 (1987), 351-360, Higgins et al, CABIOS, 5 1989: 151-153). Los homólogos de las secuencias dadas en figura 1a, 1b o 1c deben entenderse adicionalmente con el significado de, por ejemplo, homólogos, análogos, ortólogos y parálogos que tienen al menos 30% de homología (= identidad) al nivel del aminoácido derivado, preferiblemente al menos 50%, 60%, 70% u 80% de homología, de forma especial preferiblemente al menos 85% de homología, de forma muy especial preferiblemente 90%, 91%, 92%, 93%, 94% de homología, lo más preferiblemente 95%, 96%, 97%, 98% o 99 % de homología. La homología (= identidad) se calculó a lo largo del rango entero de aminoácidos. El programa utilizado fue PileUp (J. Mol. Evolution., 25 (1987), 351 - 360, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151 - 153) o el programa Gap and BestFit [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443 - 453 (1970) y Smith y Waterman respectivamente (Adv. Appl. Math. 2; 482 - 489 (1981))] que son parte del paquete de software GCG [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)]. Los porcentajes antes mencionados de homología de secuencia se calculan con el programa BestFit o Gap, preferiblemente Gap, a lo largo de la longitud total de la secuencia utilizando los siguientes parámetros: Peso de Brecha: 8, Peso de Longitud: 2.

También deben abarcarse las variantes, en particular variantes funcionales que pueden obtenerse a partir de la secuencia mostrada en figura 1a, 1b o 1c por medio de eliminación, inserción o sustitución de nucleótidos, reteniéndose o potenciándose la actividad enzimática de las proteínas sintéticas derivadas.

Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína relacionada con el estrés homóloga a una secuencia de proteínas de la figura 1a, 1b o 1c puede crearse introduciendo una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos en una secuencia de nucleótidos de figura 1a, 1b o 1c de tal forma que se introduzcan una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos en la proteína codificada. Pueden introducirse mutaciones en una de las secuencias de figura 1a, 1b, o 1c mediante técnicas estándar, tales como la mutagénesis dirigida a un sitio y mutagénesis mediada por PCR. Otra ruta de la mutagénesis de las enzimas, divulgada en la publicación Europea EP-A-0 909 821, es un método que utiliza la cepa específica de *Escherichia coli* XL1-Red para generar mutantes y alterar la actividad enzimática.

Preferiblemente, las sustituciones que conservan aminoácidos se hacen en uno o más residuos de aminoácidos predichos no esenciales. Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es aquella en la cual el residuo de aminoácidos se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar.

En la técnica se han definido las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. 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 (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 con ramificación beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Así, un residuo de aminoácido no esencial en la proteína relacionada con el estrés se reemplaza preferiblemente con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Alternativamente, en otra realización, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de todo o parte de la secuencia de codificación de la proteína relacionada con el estrés, tal como por mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes pueden seleccionarse en cuanto a una actividad de la proteína relacionada con el estrés tal como se describe aquí para identificar mutantes que retienen la actividad de la proteína relacionada con el estrés o muestran una actividad potenciada de la proteína relacionada con el estrés. Después de la mutagénesis de una de las secuencias del ácido nucleico de la figura 1a, 1b o 1c, la proteína codificada puede expresarse de forma recombinante y la actividad de la proteína puede determinarse analizando la tolerancia al estrés de una planta que exprese la proteína tal como se describe en los ejemplos más adelante.

Un método útil para establecer el nivel de transcripción del gen (un indicador de la cantidad de ARNm disponible para la traducción al producto genético) es llevar a cabo una inmunoprecipitación Northern (para referencia véase, por ejemplo, Ausubel et al., 1988 *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley: Nueva York). Esta información al menos parcialmente demuestra el grado de transcripción del gen. El ARN celular total puede prepararse a partir de células, tejidos u órganos por varios métodos, todos bien conocidos en la técnica, tales como los descritos en Bormann, ER et al., 1992 *Mol. Microbiol.* 6:317-326. Para establecer la presencia o cantidad relativa de proteína traducida a partir de este ARNm, pueden emplearse técnicas estándar, tales como una inmunoprecipitación de Western. Estas técnicas son bien conocidas para las personas de experiencia ordinaria en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel et al., 1988 *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley: Nueva York).

La presente invención también se relaciona con un casete de expresión en plantas que comprende un ácido nucleico que codifica SRP seleccionado del grupo consistente de las secuencias de SEQ ID No. XXX y/o homólogos o partes de las mismas enlazadas de forma operativa a secuencias reguladoras y/o secuencias de objetivación.

Adicionalmente, el objetivo de la invención es un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica SRP seleccionado del grupo consistente de secuencias del ácido nucleico de SEC ID No: 1 y/o homólogos o partes del mismo o un casete de expresión en plantas tal como se describió más arriba, por lo cual la expresión del ácido nucleico que codifica SRP en una célula huésped da como resultado una tolerancia incrementada a la sequía, la cual se alcanza preferiblemente alterando la actividad metabólica, en comparación con una célula huésped tipo silvestre no transformada correspondiente.

La invención proporciona adicionalmente un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína relacionada con el estrés tal como se describe más arriba, donde la expresión del vector o del ácido nucleico que codifica la proteína relacionada con el estrés, respectivamente en una célula huésped da como resultado una tolerancia y/o resistencia incrementadas a la sequía, en comparación con la correspondiente célula huésped tipo silvestre no transformada. Tal como se utiliza aquí, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico a la cual se ha enlazado. Un tipo de vector es un "plásmido", el cual se refiere a un bucle de ADN de doble cadena circular dentro del cual pueden ligarse segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector viral, donde pueden ligarse segmentos adicionales de ADN en el genoma viral. Tipos adicionales de vectores pueden ser secuencias de ácidos nucleicos linealizadas, tales como los transposones, que son trozos de ADN que pueden copiarse e insertarse a sí mismos. Se han encontrado dos tipos de transposones: los transposones simples, conocidos como secuencias de inserción y transposones compuestos, que pueden tener varios genes así como los genes que son requeridos para la transposición.

Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la cual se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamíferos) están integrados en el genoma de una célula huésped por introducción en la célula huésped, y por lo tanto se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los cuales están enlazados operativamente. Tales vectores se denominan aquí como "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en la forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" pueden usarse de forma intercambiable puesto que el plásmido es la forma más comúnmente usada de vector. La invención pretende incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos de replicación, adenovirus y virus adeno-asociado), que sirven para funciones equivalentes.

Un casete de expresión en plantas contiene preferiblemente secuencias reguladoras capaces de conducir la expresión genética en células vegetales y enlazarse operativamente de tal forma que cada secuencia puede satisfacer su función, por ejemplo, la terminación de la transcripción por señales de poliadenilación. Las señales de poliadenilación preferida son aquellas que se originan a partir de *Agrobacterium tumefaciens* ADN-T, como el gen 3 conocido como octopina sintasa del Ti-plásmido pTiACH5 (Gielen et al., 1984 *EMBO J.* 3:835) o equivalentes funcionales del mismo, pero también son adecuados otros terminadores funcionalmente activos en plantas.

Como la expresión genética en plantas no está limitada frecuentemente a los niveles transcripcionales, un casete de expresión en plantas contiene preferiblemente otras secuencias enlazadas operativamente tales como los potenciadores translacionales tales como los que contienen la secuencia sobreguía de las secuencias 5' no traducidas del virus mosaico del tabaco que potencia la proteína por relación de ARN (Gallie et al., 1987 Nucl. Acids Research 15:8693-8711).

La expresión genética en plantas tiene que ser enlazada operativamente a un promotor apropiado que confiera expresión genética en forma oportuna, específica para células o tejidos. Se prefieren promotores que impulsen la expresión constitutiva (Benfey et al., 1989 EMBO J. 8:2195-2202) como los derivados de virus de plantas tales como el 35S CaMV (Franck et al., 1980 Cell 21:285-294), el 19S CaMV (véase también la patente de los Estados Unidos No. 5352605 y la solicitud PCT No. WO 8402913) o promotores vegetales tales como los de la subunidad pequeña de Rubisco descritos en la patente de los Estados Unidos No. 4,962,028.

Secuencias reguladoras ventajosas adicionales están, por ejemplo incluidas en los promotores vegetales tales como CaMV/35S [Franck et al, Cell 21 (1980) 285 - 294], PRP1 [Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993)], SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, LEB4, nos o en el promotor de ubiquitina, napina o faseolina. También son ventajosos en esta relación los promotores inducibles tales como los promotores descritos en EP-A-0 388 186 (inducibles por bencil sulfonamida), Plant J. 2, 1992: 397 a 404 (Gatz et al., inducibles por Tetraciclina), EP-A -0 335 528 (inducibles por el ácido abscísico) o WO 93/21334 (inducibles por etanol o ciclohexenol). Promotores vegetales adicionales útiles son el promotor de la FBPasa citosólico o el promotor ST-LSI de la patata (Stockhaus et al., EMBO J. 8, 1989, 2445), el promotor de la fosforibosil pirofosfato amido transferasa de la Glicina max (No. de acceso al banco U87999) o el promotor específico de Noden descrito en EP-A-0 249 676. Promotores particularmente ventajosos adicionales son los promotores específicos de semillas que pueden utilizarse para monocotiledóneas o dicotiledóneas y que están descritos en US 5,608,152 (promotor de la napina a partir de la colza), WO 98/45461 (promotor de faseolina de Arabidopsis), US 5,504,200 (promotor de faseolina de Phaseolus vulgaris), WO 91/13980 (promotor Bce4 de la Brassica) y Baeumlein et al., Plant J., 2, 2, 1992: 233-239 (promotor de LEB4 de leguminosas). Dichos promotores son útiles en dicotiledóneas. Los siguientes promotores son útiles por ejemplo en monocotiledóneas lpt-2- o lpt-1- como promotor de la cebada (WO 95/15389 y WO 95/23230) o promotor de la hordeína de cebada. Otros promotores útiles se describen en WO 99/16890.

Es posible, en principio utilizar todos los promotores naturales con sus secuencias reguladoras como las mencionadas anteriormente para el proceso novedoso. También es posible y ventajoso además utilizar promotores sintéticos.

El constructo del gen puede comprender también adicionalmente genes que se insertan en los organismos y que por ejemplo están involucrados en la resistencia al estrés. Es posible y ventajoso insertar y expresar en organismos huéspedes genes reguladores tales como genes para inductores, represores o enzimas que intervienen por su actividad enzimática en la regulación, o uno o más o todos los genes de una ruta biosintética. Estos genes pueden ser heterólogos u homólogos en su origen. Los genes insertados pueden tener su propio promotor o incluso estar bajo el control del mismo promotor como las secuencias del ácido nucleico de la figura. 1a, 1b o 1C o sus homólogos.

El constructo de gen comprende ventajosamente, para expresión de los otros genes presentes, adicionalmente secuencias reguladoras 3' y/o 5' terminales para potenciar la expresión, las cuales se seleccionan para expresión óptima dependiendo del organismo huésped seleccionado y del gen o genes.

Estas secuencias reguladoras están previstas para hacer una expresión específica de los genes y expresión de proteínas posible tal como se mencionó más arriba. Esto puede significar, dependiendo del organismo huésped, que por ejemplo el gen está expresado o sobreexpresado solamente después de la inducción, o que se expresa y/o sobreexpresa inmediatamente.

Las secuencias o factores reguladores pueden tener preferiblemente además un efecto beneficioso sobre la expresión de los genes introducidos, y así incrementarla. Es posible de esta manera que los elementos reguladores se protejan ventajosamente al nivel de transcripción utilizando señales de transcripción fuertes como promotores y/o potenciadores. Sin embargo, además, también es posible potenciar la traducción mediante, por ejemplo, la mejora de la estabilidad del ARNm.

Otras secuencias preferidas para uso en los casetes de expresión genética en plantas son las secuencias de objetivación necesarias para dirigir el producto genético en su compartimiento celular apropiado (para una revisión véase Kermodé, 1996 Crit. Rev. Plant Sci. 15(4):285-423 y las referencias citadas en la misma) tales como la vacuola, el núcleo, todos los tipos de plástidos tales como amiloplastos, cloroplastos, cromoplastos, el espacio extracelular, mitocondrias, el retículo endoplásmico, cuerpos oleosos, peroxisomas y otros compartimentos de las células vegetales.

La expresión de genes vegetales también puede facilitarse a través de un promotor inducible (para una revisión véase Gatz, 1997 Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:89-108). Los promotores inducibles químicamente son especialmente adecuados si se desea que la expresión genética se presente de una forma específica en el tiempo.

- 5 La tabla 1 lista varios ejemplos de promotores que pueden utilizarse para regular la transcripción de las secuencias codificadoras de ácidos nucleicos de proteínas relacionados con el estrés.

Tabla 1: Ejemplos de promotores específicos para tejidos e inducibles por el estrés en plantas

Expresión	Referencia
Cor78- inducible por frío, sequía, sal, ABA, lesiones	Ishitani, et al., Plant Cell 9:1935-1949 (1997). Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, Plant Cell 6:251-264 (1994)
Rci2A – Inducible por frío y deshidratación	Capel et al., Plant Physiol 115:569-576 (1997)
Rd22 – Sequía, sal	Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, Mol Gen Genet 238: 17-25 (1993).
Cor15A - frío, deshidratación, ABA	Baker et al., Plant Mol. Biol. 24:701-713 (1994).
GH3- Inducible por Auxin	Liu et al., Plant Cell 6:645-657 (1994)
ARSK1- De raíces, inducible por sal	Hwang and Goodman, Plant J 8:37-43 (1995).
PtxA – de raíces, inducible por sal	GenBank accession X67427
SbHRGP3 – Específico de raíces	Ahn et al., Plant Cell 8:1477-1490 (1998).
KST1 – Específico de células guardianes	Plesch et al., Plant Journal. 28(4):455-64, (2001)
KAT1 - Específico de células guardianes	Plesch et al., Gene 249:83-89 (2000) Nakamura et al., Plant Physiol. 109:371-374 (1995)
Inducible por ácido salicílico	Solicitud PCT No. WO 95/19443
Inducible por tetraciclina	Gatz et al. Plant J. 2:397-404 (1992)
Inducible por etanol	Solicitud PCT No. WO 93/21334
Inducible por el patógeno PRP1	Ward et al., 1993 Plant. Mol. Biol. 22:361-366
Inducible por calor hsp80	Patente de los Estados Unidos No. 5187267
Alfa amilasa inducible por frío	Solicitud PCT No. WO 96/12814
PinII inducible por lesiones	Patente Europea No. 375091
RD29A -inducible por sal	Yamaguchi-Shinozaki et al. (1993) Mol. Gen. Genet. 236: 331-340
ARN- polimerasa viral específica de plástidos	Solicitud PCT Nos. WO 95/16783 y WO 97/06250

Otros promotores, por ejemplo, un superpromotor (Ni et al., *Plant Journal* 7, 1995: 661-676), promotor de Ubiquitina (Callis et al., *J. Biol. Chem.*, 1990, 265: 12486-12493; US 5,510,474; US 6,020,190; Kawalleck et al., *Plant. Molecular Biology*, 1993, 21: 673-684) o promotor 34S (Números de acceso a GenBank M59930 y X16673) fueron similarmente útiles para la presente invención y son conocidos para una persona experimentada en la técnica.

5 Los promotores preferidos en la etapa de desarrollo se expresan preferiblemente en ciertas etapas del desarrollo. Los promotores de tejidos u órganos preferidos incluyen aquellos que se expresan preferencialmente en ciertos tejidos u órganos, tales como hojas, raíces, semillas, o xilema. Ejemplos de promotores preferidos de órganos y tejidos incluyen, pero no se limitan a preferidos para frutas, preferidos para óvulos, preferidos para tejidos machos, preferidos para semillas, preferidos para el integumento, preferidos para tubérculos, preferidos para peciolo,
10 preferidos para pericarpio y preferidos para hojas, preferidos para estigmas, preferidos para polen, preferidos para anteras, preferidos para pétalos, preferidos para sépalos, preferidos para pedicelo, preferidos para silicua, preferidos para tallos, preferidos para raíces y similares. Los promotores preferidos para semillas se expresan preferiblemente durante el desarrollo y/o germinación de las semillas. Por ejemplo, los promotores preferidos para semillas pueden ser preferidos para embriones, preferidos para endospermas, y preferidos para recubrimientos de semillas. Véase
15 Thompson et al., 1989, *BioEssays* 10:108. Ejemplos de promotores preferidos para semillas incluyen, pero no se limitan a, celulosa sintasa (celA), Cim1, gama-zeína, globulina-1, 19 kD zeína del maíz (cZ19B1), y similares.

Otros promotores útiles en los casetes de expresión de la invención incluyen, pero no se limitan a, el principal promotor de la proteína de enlazamiento de la clorofila a/b, promotores de histona, el promotor Ap3, el promotor β -
20 conglicina, el promotor de napina, el promotor de lectina de soja, el promotor de zeína 15kD del maíz, el promotor de zeína 22kD, el promotor de zeína 27kD, el promotor de zeína g, el ceroso, los promotores de encogimiento 1, encogimiento 2 y bronce, el promotor Zm13 (Patente de los Estados Unidos No. 5,086,169), los promotores de poligalacturonasa del maíz (PG) (patentes de los Estados Unidos Nos. 5,412,085 y 5,545,546), y el promotor SGB6 (Patente de los Estados Unidos Nos. 5,470,359), así como otros promotores sintéticos naturales.

Puede obtenerse flexibilidad adicional en el control de la expresión genética heteróloga en plantas utilizando dominios de enlazamiento de ADN y elementos de respuesta a partir de fuentes heterólogas (esto es, dominios de enlazamiento de ADN a partir de fuentes no vegetales). Un ejemplo de tales dominios de enlazamiento de ADN heterólogos es el dominio de enlazamiento LexA ADN (Brent and Ptashne, 1985, *Cell* 43:729-736).

La invención proporciona adicionalmente un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ADN de SRP de la invención clonada en el vector de expresión en una orientación antisentido. Esto es, la molécula
30 de ADN se enlaza operativamente a una secuencia reguladora de una forma tal que permite la expresión (por transcripción de la molécula de ADN) de una molécula de ARN que es antisentido al ARNm de SRP. Las secuencias reguladoras enlazadas de forma operativa a una molécula de ácido nucleico clonada en la orientación antisentido pueden escogerse de tal forma que dirijan la expresión continua de la molécula de ARN antisentido en una variedad de tipos de células. Por ejemplo, los promotores y/o potenciadores virales, o secuencias reguladoras pueden escogerse de forma que sean de forma directa constitutiva, específicos para tejidos o específicos para la expresión
35 en tipos de células de ARN antisentido. El vector de expresión antisentido puede estar en la forma de un plásmido recombinante, fagémido, o virus atenuado donde los ácidos nucleicos antisentido se producen bajo el control de una región de alta eficiencia. La actividad de la región reguladora puede determinarse mediante el tipo celular en el cual se introduce el vector. Para una discusión acerca de la regulación de la expresión genética utilizando genes antisentido, véase Weintraub, H. et al, 1986, *Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis*, *Reviews - Trends in Genetics*, Vol. 1(1), and Mol et al., 1990, *FEBS Letters* 268:427-430.

Otro aspecto de la invención es pertinente a células huésped en las cuales se ha introducido un vector de expresión recombinante de la invención. Los términos "célula huésped" y "célula huésped recombinante" se utilizan aquí de forma intercambiable. Se entiende de que tales términos se refieren no solamente a la célula sujeto particular, sino
45 que también aplican a la progenie o progenie potencial de tal célula. Puesto que puede presentarse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido bien sea a mutación o influencias ambientales, tal progenie podría no ser, en efecto, idéntica a la célula original, pero estar incluida aún dentro del alcance del término tal como se utiliza aquí. Una célula huésped puede ser cualquier célula procarionte o eucariote. Por ejemplo, una SRP puede ser expresada en células bacterianas tales como *C. glutamicum*, levadura, *E. coli*, células de insectos, células fúngicas, o células de mamíferos (tales como células de ovario de hámster chino (CHO) o células COS), algas, ciliados, células vegetales, hongos u otros microorganismos tales como *C. glutamicum*. Otras células huésped adecuadas son conocidas para los experimentados en la técnica.

Una célula huésped de la invención, tal como una célula huésped procariótica o eucariótica en cultivo, puede ser utilizada para producir (esto es, expresar) una SRP. De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona
55 adicionalmente métodos para producir SRP utilizando las células huésped de la invención. En una realización, el método comprende cultivar la célula huésped de la invención (en la cual se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica una SRP, o en cuyo genoma se ha introducido un gen que codifica un tipo silvestre o

alterado de SRP) en un medio adecuado hasta que se produzca la SRP. En otra realización, el método comprende adicionalmente aislar SRP del medio o de la célula huésped.

Otro aspecto de la invención es pertinente a SRP aislados, y porciones biológicamente activas del mismo. Un polipéptido "aislado" o "purificado" o una porción biológicamente activa del mismo está libre de parte del material celular cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u otros agentes químicos cuando se sintetizan químicamente. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de SRP en las cuales el polipéptido se separa a partir de algunos de los componentes celulares de las células en las cuales se produce de forma natural o recombinante. En una realización, la expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de una SRP que tiene menos de aproximadamente 30% (en peso seco) de un material diferente de SRP (también denominado aquí como "polipéptido contaminante"), más preferiblemente menos de aproximadamente 20% de material diferente a SRP, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 10% de material diferente de SRP, y los más preferiblemente menos de aproximadamente 5% de material diferente de PKSRP.

Cuando la SRP o la porción activa de la misma se produce de forma recombinante, también está preferiblemente libre en forma sustancia de medio de cultivo, esto es, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, más preferiblemente menos de aproximadamente 10%, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 5% del volumen de la preparación de polipéptido. La expresión "sustancialmente libre de precursores químicos u otros agentes químicos" incluye preparaciones de SRP en las cuales el polipéptido se separa de los precursores químicos u otros productos químicos que están involucrados en la síntesis del polipéptido. En una realización, la expresión "sustancialmente libre de precursores químicos u otros agentes químicos" incluye preparaciones de una SRP que tiene menos de aproximadamente 30% (en peso seco) de precursores químicos o agentes químicos diferentes de SRP, más preferiblemente menos de aproximadamente 20% de precursores químicos o agentes químicos diferentes de SRP, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 10% de precursores químicos o de agentes químicos diferentes de SRP, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 5% de precursores químicos o agentes químicos diferentes de SRP. En realizaciones preferidas, los polipéptidos aislados, o porciones biológicamente activas de los mismos, carecen de polipéptidos contaminantes provenientes del mismo organismo del cual se deriva la SRP. Típicamente, tales polipéptidos se producen por expresión recombinante de, por ejemplo, una SRP de *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli*, *Brassica napus*, *Glicina max*, u *Oryza sativa* en plantas diferentes de *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli*, *Brassica napus*, *Glicina max*, 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, cebadores, vectores y células huésped descritas aquí pueden utilizarse en uno o más de los siguientes métodos: identificación de *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli*, *Brassica napus*, *Glicina max*, u *Oryza sativa* y organismos relacionados; mapeo de genomas de organismos relacionados con *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli*, *Brassica napus*, *Glicina max*, u *Oryza sativa*, identificación y localización de secuencias de *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli*, *Brassica napus*, *Glicina max*, u *Oryza sativa* de interés; estudios evolutivos; determinación de regiones de la SRP requeridas para la función, modulación de una actividad de SRP, 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 los ácidos nucleicos de SRP.

Las moléculas de ácido nucleico de SRP de la invención también son útiles para estudios evolutivos y estructurales de polipéptidos. Los procesos metabólicos y de transporte en los cuales participan las moléculas de la invención son utilizados por una amplia variedad de células procarióticas y eucarióticas; al comparar las secuencias de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención con aquellas que codifican enzimas similares de otros organismos, puede establecerse la relación evolutiva de los organismos. De la misma forma, tal comparación permite un establecimiento de cuales regiones de la secuencia se conservan y cuáles no, lo cual puede ayudar en la determinación de aquellas regiones de polipéptido que son esenciales para el funcionamiento de la enzima. Este tipo de determinación es de valor para los estudios de manipulación de polipéptidos y pueden dar una indicación de lo que el polipéptido puede tolerar en términos de mutagénesis sin perder su función.

La manipulación de las moléculas de ácido nucleico de la SRP de la invención puede dar como resultado la producción de SRP que tiene diferencias funcionales con respecto al tipo silvestre de SRP. Estos polipéptidos pueden mejorarse en eficiencia o actividad, pueden estar presentes en números mayores en la célula de lo usual, o puede disminuir en eficiencia o actividad.

Hay un cierto número de mecanismos mediante los cuales la alteración de una SRP de la invención puede afectar de manera directa la respuesta al estrés y/o la tolerancia al estrés. En el caso de plantas que expresan SRPs, el transporte incrementado puede llevar a una partición mejorada de sal y/o soluto dentro de tejidos y órganos de las plantas. Bien sea incrementando el número o la actividad de las moléculas transportadoras que exportan moléculas iónicas de la célula, puede ser posible afectar la tolerancia a la sal de la célula.

El efecto de la modificación genética en plantas, *C. glutamicum*, hongos, algas, o ciliados sobre la tolerancia al estrés puede determinarse cultivando los microorganismos modificados o la planta bajo condiciones menos adecuadas y luego analizar las características de crecimiento y/o metabolismo de la planta. Tales técnicas de análisis son bien conocidas para la persona experimentada en la técnica e incluyen peso seco, peso húmedo, síntesis de polipéptidos, síntesis de carbohidratos, síntesis de lípidos, tasas de de evapotranspiración, rendimiento general de la planta y/o cultivo, floración, reproducción, generación de semillas, crecimiento de raíces, tasas de respiración, tasas de fotosíntesis, etc. (Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol. 17; Rehm et al., 1993 Biotechnology, vol. 3, Chapter III: Product recovery and purification, page 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A. et al., 1988, Bioseparations: downstream processing for biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F. and Cabral, J.M.S., 1992, Recovery processes for biological materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A. and Henry, J.D., 1988, Biochemical separations, in: Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, vol. B3, Chapter 11, page 1-27, VCH: Weinheim; and Dechow, F.J., 1989, Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications). Por ejemplo, los vectores de expresión de levaduras que comprenden los ácidos nucleicos divulgados aquí, o fragmentos de los mismos, pueden ser contruidos y transformados en *Saccharomyces cerevisiae* utilizando protocolos estándar. Las células transgénicas resultantes pueden luego probarse en cuanto a su falla o alteración de su tolerancia a estrés por sequía, sal y temperatura. De la misma forma, los vectores de expresión en plantas que comprenden los ácidos nucleicos divulgados aquí, o fragmentos de los mismos, pueden construirse y transformarse en una célula vegetal apropiada tal como *Arabidopsis*, soja, colza, maíz, trigo, *Medicago truncatula*, etc., utilizando protocolos estándar. Las células y/o transgénicas resultantes derivadas de los mismos pueden luego probarse en cuanto a su tolerancia al estrés por sequía, sal, temperatura y alojamiento.

La manipulación de uno o más genes de SRP de la invención también puede dar como resultado SRP que tiene actividades alteradas que impactan de manera indirecta la respuesta al estrés y/o la tolerancia al estrés de algas, plantas, ciliados u hongos, u otros microorganismos tales como *C. glutamicum*. Por ejemplo, los procesos bioquímicos normales del metabolismo dan como resultado la producción de una variedad de productos (por ejemplo, peróxido de hidrógeno y otras especies de oxígeno reactivas) que pueden interferir activamente con estos mismos procesos metabólicos. Por ejemplo, se sabe que el peroxinitrilo nitra las cadenas laterales de tirosina, inactivando por lo tanto algunas enzimas que tienen la tirosina en el sitio activo (Groves, J.T., 1999, Curr. Opin. Chem. Biol. 3(2):226-235). Mientras que estos productos se excretan normalmente, las células pueden alterarse genéticamente para transportar más productos de lo normal para una célula tipo silvestre. Optimizando la actividad de una o más PKSRP de la invención que están involucradas en la exportación de moléculas específicas, tales como moléculas de sal, puede ser posible mejorar la tolerancia al estrés de la célula.

Adicionalmente, las secuencias divulgadas aquí, o fragmentos de las mismas, pueden utilizarse para generar mutaciones de anulación en los genomas de diversos organismos, tales como bacterias, células de mamíferos, células de levadura y células vegetales (Girke, T., 1998, The Plant Journal 15:39-48). Las células de anulación resultantes pueden ser evaluadas en cuanto a su habilidad o capacidad para tolerar diversas condiciones de estrés, su respuesta a diversas condiciones de estrés, y el efecto sobre el fenotipo y/o genotipo de la mutación. Para otros métodos de inactivación de genes, véase la patente de los Estados Unidos No 6,004,804 "Non-Chimeric Mutational Vectors" and Puttaraju et al., 1999, Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy, Nature Biotechnology 17:246-252.

Las estrategias de mutagénesis antes mencionadas para SRP que dan como resultado una resistencia incrementada al estrés no se deben entender como limitantes; las variaciones sobre estas estrategias serán evidentes fácilmente para una persona experimentada en la técnica. Utilizando tales estrategias, e incorporando los mecanismos divulgados aquí, las moléculas de ácido nucleico y polipéptidos de la invención pueden utilizarse para generar algas, ciliados, plantas, hongos u otros microorganismos tales como *C. glutamicum* que expresen moléculas de ácidos nucleicos y polipéptidos mutadas de PKSRP de tal forma que se mejore la tolerancia al estrés.

La presente invención también proporciona anticuerpos que se enlazan específicamente a una SRP, o a una porción de la misma, tal como son codificadas por un ácido nucleico descrito aquí. Los anticuerpos pueden hacerse mediante muchos métodos bien conocidos (véase, por ejemplo, Harlow and Lane, "Antibodies; A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, (1988)). En resumen, el antígeno purificado puede inyectarse en un mamífero en una cantidad en intervalos suficientes para disparar una respuesta inmune. Los anticuerpos pueden ser purificados bien sea directamente, o pueden obtenerse células de bazo a partir del animal. Las células pueden fusionarse entonces con una línea celular inmortal y seleccionarse en cuanto a la secreción de anticuerpos. Los anticuerpos pueden utilizarse para seleccionar bibliotecas clonadas de ácidos nucleicos en cuanto a células que secreten el antígeno. Estos clones positivos pueden secuenciarse entonces. Véase, por ejemplo, Kelly et al., 1992, Bio/Technology 10:163-167; Bebbington et al., 1992, Bio/Technology 10:169-175.

Las expresiones "se enlaza selectivamente" y "se enlaza específicamente" con el polipéptido se refieren a una reacción de enlazamiento que es determinante de la presencia del polipéptido en una población heterogénea de polipéptidos y otros agentes biológicos. Así, bajo condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos especificados enlazados a un polipéptido particular no se enlazan en una cantidad significativa a otros polipéptidos

presentes en la muestra. El enlazamiento selectivo de un anticuerpo bajo tales condiciones puede requerir un anticuerpo que sea seleccionado en cuanto su especificidad por un polipéptido particular. Puede utilizarse una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos que se enlazan selectivamente con un polipéptido en particular. Por ejemplo, los inmunoensayos de ELISA en fase sólida se utilizan de manera rutinaria para seleccionar anticuerpos que son selectivamente inmunorreactivos con un polipéptido. (Véase Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Publications, New York, (1988).), para una descripción de formatos de inmunoensayo y condiciones que pueden utilizarse para determinar un enlazamiento selectivo.

En algunos casos, es deseable preparar anticuerpos monoclonales de varios huéspedes. Puede encontrarse una descripción de técnicas para preparar tales anticuerpos monoclonales en Stites et al., eds., "Basic and Clinical Immunology," (Lange Medical Publications, Los Altos, Calif., Fourth Edition) y referencias citadas allí y en Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Publications, New York, (1988).

La expresión genética en plantas está regulada por la interacción de factores de transcripción de proteínas con secuencias y nucleótidos específicas dentro de la región reguladora de un gen. Un tipo común de factor de transcripción contiene estructuras de dedos de zinc (ZF). Cada módulo ZF tiene aproximadamente 30 aminoácidos de longitud plegados alrededor de un ion zinc. El dominio de reconocimiento de ADN de una proteína ZF es una estructura α -helicoidal que se inserta en el surco principal de la hélice doble de ADN. El módulo contiene tres aminoácidos que se enlazan al ADN conteniendo cada aminoácido un par de bases sencillas en la secuencia de ADN objetivo. Las estructuras ZF están dispuestas de una forma repetitiva modular para formar un conjunto de dedos que reconocen una secuencia de ADN contigua. Por ejemplo, una estructura con tres dedos ZF reconocerá 9 bp de ADN. Cientos de proteínas han mostrado contener estructura ZF con entre 2 y 37 módulos ZF en cada proteína ((Isalan M, et al., 1998 Biochemistry 37(35):12026-33; Moore M, et al., 2001 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98(4):1432-1436 and 1437-1441; Patentes de los Estados Unidos US 6007988 y US 6013453).

La región reguladora de un gen vegetal contiene muchas secuencias de ADN cortas (elementos de acción cis) que sirven como dominios de reconocimiento para factores de transcripción, incluyendo proteínas ZF. Dominios de reconocimiento similares en diferentes genes permiten la expresión coordinada de varios genes que codifican enzimas en una ruta metabólica mediante factores de transcripción comunes. La variación en los dominios de reconocimiento entre miembros de una familia genética facilita las diferencias en la expresión genética dentro de la misma familia genética, por ejemplo, entre tejidos y etapas de desarrollo y en respuesta a condiciones ambientales.

Las proteínas ZF típicas contienen no solamente un dominio de reconocimiento de ADN sino también un dominio funcional que potencia la proteína ZF para activar o reprimir la transcripción de un gen específico. Experimentalmente, se ha utilizado un dominio de activación para activar la transcripción del gen objetivo (patente de los Estados Unidos No 5789538 y solicitud de patente WO 9519431), pero también es posible enlazar un dominio represor de la transcripción al ZF y por lo tanto inhibir la transcripción (solicitudes de patente WO 00/47754 y WO 2001002019). Se ha informado que a una función enzimática tal como una escisión de ácido nucleico puede enlazarse a la ZF (solicitud de patente WO 00/20622).

La invención proporciona un método que permite a una persona experimentada en la técnica aislar la región reguladora de uno o más genes codificadores de proteínas relacionadas con el estrés a partir del genoma de una célula vegetal y para diseñar los factores de transcripción de dedos de zinc enlazados a un dominio funcional que interactuará con la región reguladora del gen. La interacción de la proteína de dedo de zinc con el gen vegetal puede diseñarse de manera tal que altere la expresión del gen y preferiblemente altere por lo tanto la actividad metabólica para conferir una tolerancia incrementada (o disminuida) de estrés abiótico tal como la sequía. La invención proporciona un método para producir una planta transgénica con un transgén que codifica este factor de transcripción diseñado, o alternativamente un factor de transcripción natural, que modifique la transcripción de la Proteína Relacionada con el Estrés, particularmente el gen de la proteína relacionada con el estrés para proporcionar una tolerancia incrementada al estrés ambiental, lo cual se alcanza preferiblemente alterando la actividad metabólica. Tal regulación de los genes vegetales mediante dedos de zinc polidáctiles artificiales ha sido demostrada por Ordiz et al., PNAS, 99 (20) 13290-13295, 2002) o Guan et al. (Heritable endogenous gene regulation in plants with designed polydactyl zinc finger transcription factors, PNAS, Vol. 99 (20), 13296-13301 (2002).

En particular, la invención proporciona un método para producir una planta transgénica con un ácido nucleico que codifica una proteína relacionada con el estrés, donde la expresión de los ácidos nucleicos en la planta da como resultado una tolerancia incrementada a la sequía, en comparación con una planta tipo silvestre que comprende: (a) transformar una célula vegetal con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína relacionada con el estrés y (b) generar desde la célula vegetal una planta transgénica con una tolerancia incrementada a la sequía en comparación con una planta tipo silvestre. Para tal transformación de la planta, pueden utilizarse vectores binarios tales como pBinAR Höfgen and Willmitzer, 1990 Plant Science 66:221-230). Además vectores binarios adecuados son por ejemplo pBIN 19, pB1101, pGPV o pZP (Hajukiewicz, P. et al., 1994, Plant Mol. Biol., 25: 989-994).

La construcción de los vectores binarios puede llevarse a cabo por ligación del ADNc en el T-ADN. El 5' en el ADNc de un promotor vegetal activa la transcripción del ADNc. Se localiza una secuencia de poliadenilación 3' en el ADNc. La expresión específica para el tejido puede alcanzarse utilizando un promotor específico para tejidos como se listaron más arriba. También, puede utilizarse cualquier otro elemento promotor. Para la expresión constitutiva dentro de la planta completa, puede utilizarse el promotor CaMV35S. La proteína expresada puede apuntarse hacia un compartimiento celular utilizando un péptido de señal, por ejemplo para plástidos, mitocondrias o retículoendoplásmico (Kermode, 1996 Crit. Rev. Plant Sci. 4(15):285-423). El péptido de señal se clona 5' en el marco al ADNc para archivar la localización subcelular de la proteína de fusión. Adicionalmente, los promotores que son responsables del estrés abiótico pueden utilizarse con promotores tales como el promotor de Arabidopsis RD29A. Una persona experimentada en la técnica reconocerá que el promotor utilizado debería estar enlazado operativamente al ácido nucleico de tal forma que el promotor produzca la transcripción del ácido nucleico lo que da como resultado la síntesis del ARNm que codifica un polipéptido.

Métodos alternativos de transfección incluyen la transferencia directa de ADN a flores en desarrollo a través de electroporación o transferencia de genes mediada por Agrobacterium. La transformación de plantas mediada por Agrobacterium puede llevarse a cabo utilizando por ejemplo, la cepa GV3101 (pMP90) de Agrobacterium tumefaciens (Koncz and Schell, 1986 Mol. Gen. Genet. 204:383-396) o LBA4404 (Ooms et al., Plasmid, 1982, 7: 15-29; Hoekema et al., Nature, 1983, 303: 179-180). La transformación puede llevarse a cabo mediante técnicas de transformación y regeneración estándar (Deblaere et al., 1994 Nucl. Acids. Res. 13:4777-4788; Gelvin and Schilperoort, Plant Molecular Biology Manual, 2nd Ed. - Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995. - in Sect., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, B R and Thompson, J E, Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton: CRC Press, 1993. - 360 S., ISBN 0-8493-5164-2). Por ejemplo, la colza puede transformarse a través de transformación de cotiledóneas o hipocotiledóneas (Moloney et al., 1989 Plant Cell Reports 8:238-242; De Block et al., 1989 Plant Physiol. 91:694-701). El uso de antibióticos para Agrobacterium y selección de plantas depende del vector binario y de la cepa de Agrobacterium utilizada para la transformación. La selección de colza se lleva a cabo normalmente utilizando Kanamicina como marcador seleccionable de plantas. La transferencia de genes mediada por Agrobacterium a la linaza puede llevarse 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 llevarse a cabo utilizando por ejemplo una técnica descrita en la patente Europea No 0424047, la patente de los Estados Unidos No 5,322,783, la patente Europea No 0397687, 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 lograrse mediante bombardeo con partículas, con zumo de ADN mediado por polietilén glicol o a través de la técnica de fibra de carburo de silicio (véase, por ejemplo Freeling y Walbot "The maize handbook" Springer Verlag: New York (1993) ISBN 3-540-97826-7). Se encuentra un ejemplo específico de transformación de maíz en la patente de los Estados Unidos No 5,990,387 y un ejemplo específico de transformación de trigo puede encontrarse en la solicitud PCT No WO 93/07256.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican proteína relacionada con el estrés de la invención tienen una variedad de usos. Lo más importante, las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de la presente invención pueden utilizarse para transformar células vegetales o plantas, incluyendo por lo tanto tolerancia a estrés tales como sequía, alta salinidad y frío. La presente invención proporciona por lo tanto una planta transgénica transformada mediante un ácido nucleico que codifica una proteína relacionada con el estrés (codificación o antisentido), donde la expresión de la secuencia de ácido nucleico en la planta da como resultado una tolerancia incrementada a la sequía en comparación con una planta tipo silvestre. La tolerancia al estrés incrementada es evidente como un incremento en el rendimiento o calidad de la planta. La planta transgénica puede ser una monocotiledónea o una dicotiledónea o una planta gymnosperm. La invención proporciona adicionalmente el hecho de que la planta transgénica puede ser seleccionada de maíz, trigo, centeno, avena, triticual, arroz, cebada, soja, cacahuete, algodón, borraja, cártamo, lino, primula, colza, canola y linabo, mandioca, pimienta, girasol, claveles, plantas solanáceas tales como patata, tabaco, berenjena y tomate, especies de Vicia, guisantes, alfalfa, plantas de arbustos tales como café, cacao, té, especies de salix, árboles tales como palma de aceite, coco, césped perene, tales como S lolio y fesuca y cultivos de forraje tales como alfalfa y clavo y Arabidopsis thaliana. Adicionalmente la planta transgénica puede seleccionarse a partir de pinabeto, pino o abeto.

En particular, la presente invención describe el uso de la expresión de proteínas relacionadas con el estrés para manipular plantas tolerantes a la sequía, tolerantes a la sal y/o tolerantes al frío. Esta estrategia ha sido demostrada para Arabidopsis thaliana, bálico, alfalfa, colza/canola, soja, maíz y trigo pero su aplicación no está restringida a estas plantas. De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona una planta transgénica que contiene un gen que codifica una proteína relacionada con el estrés seleccionado del ácido nucleico de SEQ ID No: 1 y/o homólogos de las secuencias antes mencionadas, donde el estrés ambiental es sequía. Puede obtenerse protección contra otras condiciones adversas tales como calor, polución en el aire, metales pesados y tóxicos químicos, por ejemplo. En realizaciones preferidas, el estrés ambiental es sequía.

La presente invención también proporciona métodos para modificar tolerancia al estrés de una planta que comprende, modificar la expresión de un gen que codifica una proteína relacionada con el estrés en la planta. La invención proporciona que este método pueda ser llevado a cabo de tal forma que se incremente la tolerancia al estrés. Esto puede hacerse por ejemplo mediante el uso de factores de transcripción. En particular, la presente

invención proporciona métodos para producir una planta transgénica que tiene una tolerancia incrementada al estrés ambiental en comparación con una planta tipo silvestre debido a la expresión incrementada de una proteína relacionada con el estrés en la planta.

5 El crecimiento de las plantas modificadas bajo condiciones de estrés y luego la selección y análisis de las características de crecimiento y/o actividad metabólica establece el efecto de la modificación genética en plantas sobre la tolerancia y/o resistencia al estrés. Tales técnicas de análisis son bien conocidas para una persona experimentada en la técnica. A continuación seleccionar (Römpp Lexikon Biotechnologie, Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag 1992, "screening" p. 701) peso seco, peso húmedo, síntesis de proteína, síntesis de carbohidrato, síntesis de lípidos, ratas de evapotranspiración, rendimiento y floración en general de la planta y/o cultivo, reproducción, germinación de semillas, crecimiento de raíces, ratas de respiración, ratas de fotosíntesis etc. (Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol. 17; Rehm et al., 1993 Biotechnology, vol. 3, Chapter III: Product recovery and purification, página 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A. et al., 1988 Bioseparations: downstream processing for biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F. and Cabral, J.M.S., 1992 Recovery processes for biological materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A. and Henry, J.D., 1988 Biochemical separations, in: Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, vol. B3, Chapter 11, página 1-27, VCH: Weinheim; and Dechow, F.J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).

20 La manipulación de uno o más genes que codifican proteínas relacionadas con el estrés de la invención también puede dar como resultado proteínas relacionadas con el estrés que tienen actividades alteradas que impactan indirectamente la respuesta al estrés y/o la tolerancia al estrés de las plantas. Por ejemplo, los procesos bioquímicos normales del metabolismo dan como resultado la producción de una variedad de productos (por ejemplo peróxido de hidrógeno y otras especies de oxígeno reactivas) que pueden interferir activamente con estos mismos procesos metabólicos (por ejemplo, el peroxinitrilo es conocido por reaccionar con cadenas laterales de tirosina, inactivando por lo tanto algunas enzimas que tienen tirosina en el sitio activo (Groves, J.T., 1999 Curr. Opin. Chem. Biol. 3(2):226-235). Optimizando la actividad de una o más proteínas (enzimas) relacionadas con el estrés de la invención, puede ser posible mejorar la tolerancia al estrés de las células.

30 A través de esta solicitud, se han citado diversas publicaciones. Las divulgaciones de todas estas publicaciones y otras referencias citadas dentro de esas publicaciones en su totalidad se incorporan aquí como referencia en esta solicitud con el fin de describir de manera más completa el estado de la técnica a la cual es pertinente esta invención.

35 También debe entenderse que lo anterior se relaciona con realizaciones preferidas de la presente invención y que pueden hacerse numerosos cambios y variaciones dentro de la misma sin apartarse del alcance de la invención. La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no deben considerarse de ninguna manera como limitantes. Por el contrario, se entiende claramente que diversas otras realizaciones, modificaciones y equivalentes de los mismos, los cuales, después de leer la descripción presente, pueden sugerirse a sí mismos a aquellos experimentados en la técnica sin apartarse del espíritu de la presente invención y/o del alcance de las reivindicaciones.

40 La invención también es pertinente al uso de ácidos nucleicos que codifican SRP seleccionados del grupo que comprende el ácido nucleico de SEQ ID No: 1 y/o homólogos de las secuencias antes mencionadas para preparar una célula vegetal con tolerancia incrementada a la sequía. Las dichas secuencias también pueden utilizarse para preparar una planta con tolerancia incrementada al estrés ambiental.

45 Un objetivo adicional de la presente invención es usar el ácido nucleico que codifica SRP seleccionado del grupo de secuencias del ácido nucleico de SEQ ID No: 1 y/o homólogos de las secuencias antes mencionadas o partes de las mismas como marcadores para la selección de plantas con tolerancia incrementada a la sequía o como marcadores para la detección de estrés en plantas o células vegetales.

Ejemplo 1

Manipulación de plantas de Arabidopsis tolerantes al estrés por sobreexpresión de genes de proteínas relacionadas con el estrés.

Clonación de genes y transformación de Arabidopsis thaliana

50 Amplificación

El protocolo estándar de la Pfu ADN polimerasa en una mezcla de Pfu/Taq ADN polimerasa (Herculasa) se utilizó para el procedimiento de amplificación. Los fragmentos amplificados de ORF fueron analizados por electroforesis en gel. Cada cebador consiste de un extremo universal 5' y un extremo específico 3' ORF mediante el cual las secuencias universales difieren para los cebadores de avance y reversos (la secuencia del cebador de avance

ES 2 368 915 T3

contiene un EcoRI para levadura o SmaI para E. coli y la secuencia del cebador reverso un SmaI para levadura o un SacI para el sitio de restricción en E. coli) permitiendo en general un éxito de clonación unidireccional.

5 La amplificación utilizando el protocolo de Pfu o Herculasa ADN polimerasa (Stratagene). Condiciones: 1x regulador PCR, dNTP 0.2 mM, 100 ng de ADN genómico de *Saccharomy cerevisiae* (S288C) o 60 ng de ADN genómico de *Escherichia coli*-12 K-12 (MG 1655), 25 pmol de cebador de avance, 25 pmol de cebador en reverso, 2.5 u Pfu o Herculasa ADN polimerasa. Un ciclo st para 3' para levadura de 2' para E. coli a 94°C, seguido por 25 ciclos durante 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C para levadura o 60°C para E. coli y 5-6 minutos a 72°C, seguidos por un ciclo durante 610 minutos a 72°C, final por 4°C hasta ∞.

Tabla 2: Secuencias de cebador de avance y reversas utilizadas para amplificación ORF

Gen	Secuencia de Avance
YGL263W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGATGGAGCCAAATTTGAAAATAC
YGR004W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGAGCGAAATAAATAATGAAAATCTAG
YGR014W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGCAGTTTCCATTTCGCTTGTCTC
YGL239C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGAAATTTTTGAAGAACAAAGCACC
YBL060W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTGCGCCAGTTTAAACGAGGTA
YGL166W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGTCGTAATTAACGGGGTCAAAT
YDL202W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTTGCAGCTAAGGTTTATGCCT
YAL046C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGAAGCTCCCACAGACCATGCT
YDR101C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGCTCTAGCTATCTCCCACGA
YDR108W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGTTTTTTCTTATGAGCACTATATG
YAL064W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGCGATATACTGCAACTTTTCGG
YDR134C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGCAATTCTCTACCGTCGCTTCT
YFL031w	GGAATTCCAGCTGACCACCATGAATAGCGAGTACGATTACCTGT
YFL052W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGCCCGCAATAGACAAGCGT
YFL042C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTCCGATGTAGATAACTGGGAA
YBR025C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGCCTCCAAAGAAGCAAGTCGAA
YER174C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGACTGTGGTTGAAATAAAAAGCC
YBR051W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGCACATTCTTTTCTTGTTTATTTTC
YER175C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTCTACCTTTTCTGCTTCTGATT
YDR521W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGAAAGGTTCAAAATCGCACCTTG
YER167W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGCCGAAGAATAGTCACCACCAT
YER123W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTCCCAACGATCTTCACAACAC
YDR415C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGCCGATGAGGAACGTTTAAAG

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Gen	Secuencia de Avance
YEL052W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGATCGCTTTGAAGCCCAATGCT
YDR536W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGAAGGATTTAAAATTATCGAATTTCA
YDR513W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGAGACCAATTTTTCTTCGACT
YEL045C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGAAATGTCACGCGAAACGGAC
YEL041W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGAAAAGTATAGATTACTGATTAAC
YDL238C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGACAAAAAGTGATTTATTATTTGATAA
YBR282W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGAAAGGCTCACCCATTTCTCAAT
YBR258C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGCGTATAATCAAGAAGATAGTAA
YCL001W-A	GGAATTCCAGCTGACCACCATGACCTTTTTACAATTTATCAATAATAATA
YBR274W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGAGTCTCTCGCAGGTGTCAC
YHR090C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGATCCAAGTTTAGTTTTAGAGC
YGR121C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGAGAGTCGAACTACAGGGC
YGR127W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTGCATTTAATGGCCACAAGG
YGR150C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTACATGGCCAGATGTGGCC
YKL037W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGCAGACAATGGGCGGGGAG
YKL051W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGATTCAATTTAAAAGTCCAGGTAAC
YKL120W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTCATCTGACAACTCTAAACAAG
YKL011C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTGACAGCACAGAAAGCTAAG
YKL017C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGAACAAAGAATTGGCTTCTAAGTT
YKL049C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGAAACTGAAGTACCTGCACCA
YKL132C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGATGATATAAGCGGAAGGCAAA
YGR126W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGCCTGTCCCATCTGTTACTGT
YKL070W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTACATTCCTAAACATTTTGAGTC
YKL058W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGCAGTACCCGGGTATTACGA
YHR130C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGACTAAAAGTATATATATTATCATCG
YIL070C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTTCTTAAGAAGCGTTAACCGTG

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Gen	Secuencia de Avance
YHR195W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGACTCGTCCCCATTGGTTC
YIR022W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGAATCTAAGATTTGAATTGCAGAAA
YJL089W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGCCAAGAGGAAATATGGCAG
YJL172W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGATCGCCTTACCAGTAGAGAAG
YHR113W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTTTCAGGATACAACCTGAGAACTA
YHR175W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGATGATAAGAAAACATGGAGTAC
YGR212W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGAATCTTAACTTTCTGCTATTGAA
YJL024C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGATTCATGCAGTTCTAATATGTATG
YGR180c	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGAAGCACATAACCAATTTTTGAA
YJL179W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTCACAGATAGCACAAGAAATGA
YJL001W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGAATGGAATTCAAGTGGACATCA
YJL208C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTGCAGTAGGATACTCTTGTCC
YJL152W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGCCGCATTTAGCCGCCGAAG
YJL131C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTTAAAAGTTCCTTTGAGTGATGT
YJL151C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGACAGAGACCATATTAATGACC
YLR441C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGCTGTCGGAAAGAATAAGAGA
YLR415C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTATCTCAGTGCCAGCTTATG
YLR212C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGGTGGAGAAATTACTTTGTC
YLR029C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGGTGCCTACAAATATTTGGAAG
YLL041C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTTGAACGTGCTATTGAGAAGGA
YLR105C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTCTAAAGGGAGGGTCAATCAG
YIL136W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTCATCAAGAATAATTGTCGGCA
YLR215C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTCTCACAAGAATATACAACCTT
YLR321C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTGCGACCAAACCAGCTTATT
YMR260C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGGTAAGAAAAACACTAAAGGTG
YNL120C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGATAAAAGTCGATACTTCCGATG

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Gen	Secuencia de Avance
YLR407W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGACTGTTTCTACTTCCAAGACC
YMR197C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGAGTTCCTATTAATATCATACGA
YMR100W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGAGAGACTCTAATCATCGATCAT
YMR210W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGCGTCTAAAAGAATTGTTACCTAA
YMR318C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTCTTATCCTGAGAAATTTGAAGG
YMR069W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGCGTTCCTTCGGTATATAGTGAGA
YNL076W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTCGCGGGAGGCATTTGATGT
YNL024C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGAGAGTATATTTGGTGGGTTTG
YNL125C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTCAACGCACTCAAACGACTAC
YNL029C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTTGCTAATAAGAAGGACGATAAA
YMR115W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGCTTTTACAAGGAATGCGTTTATC
YNL244C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTCCATTGAGAATCTGAAATCATT
YNL334C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGACCGTCGTTATCGGAGTCTT
YNR018W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGAAGATTTTAACCCAAGACGAAAT
YNL277W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTCGCATACTTTAAAATCGAAAAC
YOL118C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTCTTTTAGAAAAGAAAAAACTCAAAC
YOL123W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGAGCTCTGACGAAGAAGATTTCA
YOR020C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTCCACCCTTTTGAAGTCTGCT
YOL116W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGCAAGTAACCAGCACATAGGA
YOR305w	GGAATTCCAGCTGACCACCATGATAAAAAACTATTTGGGACGAAG
YPL267W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGATATCACCATCAAAAAAGAGAAC
YPL229w	GGAATTCCAGCTGACCACCATGATGCCCTACAACACCCCTC
YPL038W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGAAACTGGCGCAAGACATGAAT
YPR047W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGAGGTAACCTCAATGTTTCTCA
YPL011C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGACTACAAATAATGACTTCTATTTTG
YPR148C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTCTGGTTATTTTTTCAGGGTTTTTC

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Gen	Secuencia de Avance
YOL103W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGCTGAAATGAAGAATTCGACAG
YOR016C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGCGCGTTTTTACTTTGATTGCGA
YPL079W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGGTAAATCGTATGTCCATATAAC
YOR260W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTCAATTCAGGCTTTTGTCTTTTG
YOR360C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTCCACCCTTTTTCTGATTGGAA
YDL060W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGCAGGTCATTCACACAGGTC
YDL005C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGTAGTACAAAATAGCCCAGTTT
YPL210C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGAAAGAAAGCAAAAAAATGGCTAAA
YMR118C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGAAAGCAACCATTCAAAGAGTAAC
YPR052C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGTCACCCCAAGAGAACCTAA
YLR224W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGAATCAGAGCGATAGCAGCTTG
YLR275W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTCGTATGTTTGATCTTAACCATT
YMR154C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGAATGATTGGCATGAGTTCAATG
YDR205w	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGATAGAGGCAGGTGGTGTTT
YPR037C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGAAACAGATAGTCAAAGAAGCC
YNR008W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGGCACACTGTTTCGAAGAAAT
YOR084W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGAACAGAACAGGTTCAAGAAAG
YGR054W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTCATCTCAGTTTTTCTGAAAAC
YGL106W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTCAGCCACCAGAGCCAATAAA
YAL067C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTATTCAATTGTTAAAGAGATTATTG
YIL023c	GGAATTCCAGCTGACCACCATGAAGGCGTCGCACATTTGCTC
YBR064W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGATATGGTATCACCAGTCTTGA
b0019	TTGCTCTTCCATGAAACATCTGCATCGATTCTTTAG
b2148	TTGCTCTTCCATGAGTGCGTTAAATAAGAAAAG
b2796	TTGCTCTTCCATGGAAACGACTCAAACCAGCAC
b2082	TTGCTCTTCCATGTTTCATTGTCTTTATGCCAGC

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Gen	Secuencia de Avance
b0124	TTGCTCTTCCATGGCAATTAACAATACAGGCTCG
b3116	TTGCTCTTCCATGAGTACTTCAGATAGCATTGTATC
b1830	TTGCTCTTCCATGAACATGTTTTTTAGGCTTACC
b1453	TTGCTCTTCCATGTTTCATGGCAACTTATATGACTTTT
b2664	TTGCTCTTCCATGATCAGGAGTCACACCATGA
b2799	TTGCTCTTCCATGATGGCTAACAGAATGATTCTGA
b3327	TTGCTCTTCCATGAATTATCGCTATCGCGCCA
b0970	TTGCTCTTCCATGGATCGTATTGTTAGTTCTTAC
YER003C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTCCAACAAGCTGTTTCAGGTTA
YCL027W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGTAGCAACAATAATGCAGACGA
YBR112C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGAATCCGGGCGGTGAACAAAC
YNL079C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGACAAAATCAGAGAAAAGCTAAG
YFR042W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGCAGGTATCAAGTTGACGCAT
YER137C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTGTGAATCATCAAATAAGACTGA
YKL103C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGAGGAACAACGTGAAATACTG
YNL090W	GGAATTCCAGCTGACCACCATGTCTGAAAAGGCCGTTAGAAGG
YGR161C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGATCGCTACCTCCAGAGCCG
YDR071C	GGAATTCCAGCTGACCACCATGGCCTCCTCAAGTAGCACGC

Gen	Secuencia de Reverso
YGL263W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTACACATCATTGCAAGCTGATTGT
YGR004W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTATAGAGAAGGAGACATTGAAACAT
YGR014W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCAAACCTTCGTTCCAACCCAGGG
YGL239C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCAATTGCAGGGATTATGGAATAAAA
YBL060W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTAGAACTGAACAGAACCCATGGC
YGL166W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTATTGTGAATGTGAGTTATGCGAAG

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Gen	Secuencia de Reverso
YDL202W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTACTTTGATCCCTTCGATTCTGCA
YAL046C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTGCATGATGATGCCGGACCCTTC
YDR101C	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTACATTTTCATGGTTTCTTCAACTC
YDR108W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCCATAAAGCTAACACTTGTTTC
YAL064W	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTATGGTTTCGCTATTCAATATTAGAA
YDR134C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTACAACAATAAAGCGGCAGCACC
YFL031w	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCAACAGCAGCCCCCACCAGT
YFL052W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTAAGGAAGCGCATCTACATCTTCT
YFL042C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCAACCATACTTTGATCCAACCTG
YBR025C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCAATTCTTACCAGCACCAGCTCT
YER174C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTACTGTAGAGCATGTTGGAAATATT
YBR051W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTATATATGGCATGTCTTCGCATGT
YER175C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCAGACCCTTTTGCCAAGTTTGTA
YDR521W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTACTCACCATTAACATCTTTCCC
YER167W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTAGTTGCTATTATCAAATAAAAAGAC
YER123W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCAAAAAAAAAAAGGAAAAAGAAAAAG
YDR415C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCACATTTTCTAAATTCCTTAGCAC
YEL052W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTAGTATGTAGGCTTAGTAACCCAA
YDR536W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCAACCCTCAAATTTGCTTTATCG
YDR513W	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTATTGAAATACCGGCTTCAATATTT
YEL045C	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTAGGAAAGGAGGTGGTTACGAA
YEL041W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTAGATTGCAAATGAGCCTGACGA
YDL238C	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTAAATCTGGTAGACTTGCTGGC
YBR282W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTATCCACGCTCCTTATAACATGAA
YBR258C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTACGTACTTCCATTTGCTTCCTCT
YCL001 W-A	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCAGTTCATCAAATTTGAAATTTCTAACCA

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Gen	Secuencia de Reverso
YBR274W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCAGTTGGGAATTAGGATAATATCC
YHR090C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCAGTTACGTTTTCTTTTCAGTTTGT
YGR121C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTACCTATTGGCAGGATCTTCTTGA
YGR127W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTACAATTTGAATTTAAACCTTTTTTCC
YGR150C	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTACATGTTAAGTTCTTGTTCTCC
YKL037W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTATATACTCAATCCAAAACAGGGAA
YKL051W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCATACGACTACTTGAATAGATTCCG
YKL120W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTAATTATGGCCTAAAACCTCTCGAC
YKL011C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTAGTCATTGTTGTAAGTGTCTGC
YKL017C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTACAAATAATCGTCAATGTTGGGG
YKL049C	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTAAATAAACTGTCCCCTGATTCTT
YKL132C	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTATACTGGCAAGTGACAGTTGTG
YGR126W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTAATCGAAAATTCTATGAAAAACCC
YKL070W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCAGAAACGCTCCACTTTACTTCG
YKL058W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTACTCGCTCTTTTTTGAGTTACATG
YHR130C	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTAATTCCTGATGCCAAGTAACGA
YIL070C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTAGTGGAAAACTTCTTCATCTTTTC
YHR195W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTAGTATCTAAATGGTTGAGAGTATG
YIR022W	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTACTCGCCCCCAGCAGAG
YJL089W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTAGAAGGTCGAGTTCAAAATATTCT
YJL172W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTAAGCGTATTCGTTAACATTAACGA
YHR113W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTAGACAACAATTTAGATTCTATGG
YHR175W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTAATGGCAGGCGAGGGAGCTG
YGR212W	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTAGTATAAATTTAAGTAATCTTTCATAT
YJL024C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTATTGCCCGTTGCCATTGTG
YGR180c	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTAGAAGTCATCATCAAAGTTAATTTCC

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Gen	Secuencia de Reverso
YJL179W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTAATTCTTCATCAATGCCTTTAGATT
YJL001W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTATAGTTGTTTCATATTCATCAGGGT
YJL208C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCAATTCCTTTTTTTGGAGGAGGT
YJL152W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCACGCAGACATGCGACTGCG
YJL131C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTACATTTTCATTCATTTTTTTCTCTGA
YJL151C	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTAAGTACGGCCGGAAGAGAGC
YLR441C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTACACAGTTTCCAAGACTTCGTC
YLR415C	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTACTTCCAAACAACGGTCCAGA
YLR212C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTATACTAATTTATGATCACCGTCGG
YLR029C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTATTTTCTGTATCTCCACAAGGAC
YLL041C	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTAGGCAAATGCCAAAGATTTCTTA
YLR105C	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTAGTCTCTATTTCTTCCGGGAAC
YIL136W	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTAGTCCTTTTTTCGAGCTCCAGAA
YLR215C	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTAAGTTTCATTCTCACTATCACTG
YLR321C	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTACATTCTCATTGTGGTTTCTAAG
YMR260C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTAATCATAAATAGTTTCATAAGTGTGT
YNL120C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCACCTTCTATGCAAAATGCTTAATA
YLR407W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCAGTCATGGCATGCCTTGGA
YMR197C	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTAAAATGAAGACAGCCACAATCTG
YMR100W	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTATTGATTGTTTGTCCACGGACT
YMR210W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTATGAAGTCCATGGTAAATTCGTG
YMR318C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTACATGAGGTTTCATGTTTCATGTTAG
YMR069W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTATTTTTACTTAATTTTCATCCATTTAG
YNL076W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTATGTATCACAACATTAATTCAGTT
YNL024C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTAATCTCTTTCAAACAGACAGCAA
YNL125C	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTATTTTTCACTTTGGCTGTTGCC

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Gen	Secuencia de Reverso
YNL029C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTAACTCTCTTGTCGCCGATTCTC
YMR115W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTAGTTTCTCAAGTGACTATTGTGAA
YNL244C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTACGAATCAGTCCGATTGGACTT
YNL334C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTAAGCTGGAAGAGCCAATCTCTT
YNR018W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTATTTCAAAGTCTTCAACAATTTTTCT
YNL277W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTAGTCTTCATGCTTATCACAGAAC
YOL118C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCACTTCAAAGTCTCTGGAATATGA
YOL123W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTATTCGTCTTCTTCCAAAGTTTGAG
YOR020C	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTATGAGCGATCCCGTTTTGTGAA
YOL116W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTAATAATTGAATTAATTTACTTCTGTT
YOR305w	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCACCGACTCATTTTTGTTAAGCTTG
YPL267W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTACTCATCTTCATAGACGTGGAAG
YPL229w	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTAACATTTCTTATTATCTCTATATATC
YPL038W	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTAACTGCTTTTTTTCGTGTTGAGTA
YPR047W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCATTTTTGTCCCTTTATATCAATTTTT
YPLO11C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTAGCGTTTTTTTTTGCCTTCTTC
YPR148C	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTAAATTTCAAACCATTTAGAACTTT
YOL103W	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTAAGACTTGAAATTAATTAATTCGGG
YOR016C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCACTGTATCTCGCTGTCACAATC
YPL079W	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTATTGTAATTCCTTATAGTGTTCA
YOR260W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTATTTAAGCTCGAAATGGCTATTGA
YOR360C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCAATTGTGGAAGAGGTCTTCTAGG
YDL060W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTACATACCATTCCAAGGTAACGAA
YDL005C	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTATATATTGAAGCCGCTGAGGTC
YPL210C	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTACTTACGTACTAAAATAGTCTCTT
YMR118C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTACTGAGCCAGTAAATACGTTCTT

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Gen	Secuencia de Reverso
YPR052C	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTAAGCCAAAGTGGCGTTATATAAC
YLR224W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTCATCTTCGAAGATAAGGGGTATTC
YLR275W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTACTCAACAGGGGTTTTTAACACA
YMR154C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTATTTTGGTATCACATCATCGGAG
YDR205w	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCAATTTGCTATAGGCTGTAGCGG
YPR037C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTAGAACTGAATTATTTTACATTGTCT
YNR008W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTACATTGGGAAGGGCATCTGAGA
YOR084W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTACAGTTTTTGTAGTCGTTTTAAC
YGR054W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTATTCATCCTTCCAACCCAACCTTT
YGL106W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCATTGTCTCAAACATCTTCGATG
YAL067C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTATTTTTTCATCAGATACTGATAAGGT
YIL023c	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCAATGCTCATCCATGAGCGCCA
YBR064W	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTAAAATATGGAGGAACTAGGTTTTAA
b0019	TTGCTCTTCGTTAAACTGATGGACGCAAACGAACG
b2148	TTGCTCTTCGTTATTTCTTACGCGCGTATTTTCAGTG
b2796	TTGCTCTTCGTTAGCTGAACAGAGAGTAGAAGATT
b2082	TTGCTCTTCGTTACATCCACATAATTTGCTGCCC
b0124	TTGCTCTTCGTTACTTCACATCATCCGGCAGCG
b3116	TTGCTCTTCGTTAAAACAGTTTGTATACGATGTTTCAG
b1830	TTGCTCTTCGTTACTTGACGGGAGCGGGTTGT
b1453	TTGCTCTTCGTTAACTCGCCGTTTCAGGCTTAAA
b2664	TTGCTCTTCGTTAATTGCCAGCCATCGCCTG
b2799	TTGCTCTTCGTTACCAGGCGGTATGGTAAAGCT
b3327	TTGCTCTTCGTTAATTAATCATTGAGTTAAGTTGAAGA
b0970	TTGCTCTTCGTTAATCGCGGCTAGCGAAGCCC
YER003C	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTAATTTGGTTCCACAAAGGCTCTA

(continuación)

Gen	Secuencia de Reverso
YCL027W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCAGTCGTATTCTTGGAGACAGTC
YBR112C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTAGTCGTCGTAGTTTTTCATCTTCT
YNL079C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCACAAGTTTTCCAGAGATGCAGC
YFR042W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCATTTTGTAAATAGTTTTTTGTATGCT
YER137C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTATTTCTTGGGTATAACTGTCAGTC
YKL103C	GATCCCCGGGAATTGCCATGTCACAACCTCGCCGAATTCATCGTA
YNL090W	GATCCCCGGGAATTGCCATGTTATAAAATTATGCAACAGTTAGCCC
YGR161C	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTATTTCAATGAACCAGTTTGGAAATC
YDR071C	GATCCCCGGGAATTGCCATGCTAGTTGTCGTATTCTTCCTTAATTA

Preparación de vector

5 El vector binario preferido 1bxbig Resgen para levadura y 1bxSuper CoLic para E. coli, que se basan en el esqueleto de vector binario pPZP modificado (comprendiendo el gen de kanamicina para selección bacteriana; Hajukiewicz, P. et al., 1994, Plant Mol. Biol., 25: 989-994) portaba el gen de barra marcador de selección (De Block et al., 1987, EMBO J. 6, 2513-2518) impulsado por el promotor mas1' (Velten et al., 1984, EMBO J. 3, 2723-2730; Mengiste, Amedeo and Paszkowski, 1997, Plant J., 12, 945-948) sobre su T-ADN. Además, el T-ADN contenía el doblete fuerte 35S (Kay et al., 1987, Science 236, 1299-1302) para levadura o el super promotor (Ni et al., 1995, Plant Journal 7, 661-676) para E. coli frente de un casete de clonación seguido por el terminador nos (Depicker A. Stachel S. Dhaese P. Zambryski P. Goodman HM. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. Journal of Molecular & Applied Genetics. 1(6):561-73, 1982.). El casete de clonación consistía de la siguiente secuencia:

Levadura: 5'-GGAATTCAGCTGACCACCATGGCAATTCCTCGGGGATC-3 o

E.coli: 5'-TTG CTC TTC CAT GGC AAT GAT TAA TTA ACG AAG AGC AA-3', respectivamente.

15 Otros sistemas de marcadores de selección, como el marcador AHAS u otros promotores, por ejemplo, el superpromotor (véase más arriba), el promotor 35S (véase más arriba), el promotor de Ubiquitina (Callis et al., J. Biol. Chem., 1990, 265: 12486-12493; US 5,510,474; US 6,020,190; Kawalleck et al., Plant. Molecular Biology, 1993, 21: 673-684) o el promotor 34S (número de acceso GenBank M59930 y X16673) fueron de la misma forma útiles para la presente invención y son conocidos para una persona experimentada en la técnica. El vector fue linealizado con EcoR y SmaI para levadura o SmaI y SacI para E. coli utilizando el protocolo estándar provisto por el proveedor (MBI Fermentas, Alemania) y purificado utilizando columnas Qiagen (Qiagen, Hilden, Alemania).

Ligación y transformación

25 Los fragmentos actuales de ORF (aproximadamente 100 ng) fueron digeridos por EcoRI y SmaI para levadura y SmaI y SacI para E. coli utilizando el protocolo estándar suministrado por el proveedor (MBI Fermentas, Alemania), purificado utilizando columnas Qiagen (Qiagen, Hilden, Alemania) y fueron ligados en el casete de clonación de los sistemas del vector binario (aproximadamente 30 ng) utilizando procedimientos estándar (Maniatis et al.).

30 En el caso de los sitios de restricción internos de EcoRI, SmaI y SacI se aplicó un procedimiento de clonación con extremo romo. Los fragmentos de ORF no digeridos fueron purificados directamente y ligados en el casete de clonación del vector binario. En este caso el sitio de EcoRI fue rellenado mediante la reacción de Klenow y el sitio SacI hizo roma la Pfu ADN polimerasa.

Los productos de ligación fueron transformados en E. coli (DH5alfa) utilizando un protocolo estándar de choque con calor (Maniatis et al.). Las colonias transformadas fueron cultivadas sobre un medio LB y se seleccionaron mediante

antibióticos respectivos (Km) durante 16 horas a 37°C. Los clones positivos fueron identificados por reacciones de control de PCR utilizando una combinación de un vector específico y los respectivos cebadores específicos de ORF.

Preparación de plásmidos

5 El AND plásmido fue preparado a partir de clones positivos utilizando protocolos estándar (Qiagen Hilden, Alemania).

Transformación de agrobacterias

10 Los plásmidos fueron transformados en *Agrobacterium tumefaciens* (GV31 01 pMP90; Koncz and Schell, 1986, Mol Gen. Genet 204: 383-396) utilizando protocolos de choque por calor o electroporación. Las colonias transformadas fueron cultivadas sobre medio YEP y seleccionadas mediante antibióticos respectivos (Rif/Gent/Km) durante 2 días a 28°C. Estos cultivos de *Agrobacterium* fueron utilizados para transformación de las plantas.

15 Se cultivó la *Arabidopsis thaliana* y se transformó de acuerdo con condiciones estándar Bechtold 1993 (Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G. 1993. In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of *Arabidopsis thaliana* plants C.R. Acad.Sci.Paris. 316:1194-1199); Bent et al. 1994 (Bent, A., Kunkel, B.N., Dahlbeck, D., Brown, K.L., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, J., and Staskawicz, B.J. 1994; PPCS2 of *Arabidopsis thaliana*: A leucine-rich repeat class of plant disease resistant genes; Science 265: 1856-1860).

20 Plantas transgénicas de *A. thaliana* fueron cultivadas individualmente en macetas que contenían una mezcla 4:1 (v/v) de suelo y arena de cuarzo en una cámara de crecimiento York. Las condiciones estándar de crecimiento fueron: fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, 20°C, 60% de humedad relativa, y una densidad de flujo de fotones de 150 µE. Para inducir la germinación, las semillas sembradas fueron mantenidas a 4°C, en la oscuridad, durante 3 días. Las plantas fueron regadas diariamente hasta que tuvieron aproximadamente 3 semanas de edad momento en el cual se impuso la sequía suspendiendo el agua. En paralelo, se redujo la humedad relativa en incrementos de 10% cada segundo día hasta el 20%. Después de aproximadamente 12 días de suspensión de agua, la mayor parte de las plantas mostraban síntomas visuales de lesiones, tales como marchitamiento y oscurecimiento de las hojas, mientras que las plantas tolerantes fueron identificadas por estar visualmente túrgidas y saludablemente verdes en color. Las plantas fueron clasificadas en cuanto a síntomas de lesiones por sequía en comparación con las plantas vecinas durante 3 días en sucesión.

30 Se llevaron a cabo tres experimentos sucesivos. En el primer experimento, se utilizaron 10 líneas independientes T2 para cada gen que estaba siendo probado. Se determinó el porcentaje de plantas que no mostró síntomas individuales de lesiones. En el segundo experimento, las líneas que habían sido calificadas como tolerantes en el primer experimento fueron puestas a través de un filtro de confirmación de acuerdo con los mismos procedimientos experimentales. En este experimento, las plantas de cada línea tolerante fueron cultivadas y tratadas como antes. En el tercer experimento, al menos siete replicados de la línea más tolerante fueron cultivados y tratados como antes. Se determinó el promedio y número máximo de días de supervivencia a la sequía después de que los controles tipo silvestre habían muerto visualmente. Se hicieron mediciones adicionales de fluorescencia de la clorofila en plantas estresadas y no estresadas utilizando un Mini-PAM (Heinz Walz GmbH, Efeltrich, Alemania).

35 En el primer experimento, después de 12 días de sequía, la *Arabidopsis thaliana* no transgénica de control, y la mayoría de las líneas de expresión que expresaban otros transgenes en la prueba mostraron síntomas visuales extremos de estrés incluyendo necrosis y muerte celular. Varias plantas que expresaban los genes mantenían la viabilidad como era evidente por su apariencia túrgida y el mantenimiento del color verde.

40 El segundo experimento comparó un número más pequeño de líneas transgénicas independientes para cada gen pero un número mayor de progenies dentro de eventos de transformación independientes cada una. Este experimento confirmó los resultados previos. Aquellas líneas que contenían los genes de levadura que codificaban SRP específico sobrevivieron durante más tiempo que los controles. En algunos casos la línea transgénica sobrevivió más de 3 días después de que los controles habían muerto.

45 De acuerdo con los resultados del primero y segundo experimentos se identificaron algunas líneas principales que contenían los genes de levadura que codificaban SRP, los que mostraron los mejores resultados con respecto al promedio de días de supervivencia después del tipo silvestre y/o el porcentaje máximo.

50 En un tercer experimento estas líneas principales fueron probadas con replicados múltiples (4-80 plantas por línea). El número promedio de días en las plantas de la línea principal sobrevivieron más que el tipo silvestre que fue medido. Esto es, el número 1' significa que, en promedio las plantas que sobreexpresaban este ORF, sobrevivieron en promedio un día más que el tipo silvestre. El valor para WT en esta columna es "0". Los resultados se resumen en la tabla 3.

ES 2 368 915 T3

5 Tabla 3: tolerancia a la sequía de *Arabidopsis thaliana* transgénica que expresa los diversos genes que codifican SRP de *Saccharomyces cerevisiae* o *E. coli* después de la imposición de estrés por sequía sobre plantas de tres semanas de edad en un tercer experimento utilizando varias plantas de una línea transgénica (experimento 3). La tolerancia a la sequía se mide para el número indicado de plantas transgénicas (plantas probadas) como el número promedio de días (días promedio de supervivencia después de WT) que las plantas transgénicas sobrevivieron después del control (tipo silvestre no transformado). El porcentaje máximo indica la fracción de las plantas probadas de la línea principal que fue realmente resistente, esto es, el número "50" indica que la mitad de las plantas probadas fueron resistentes (sobrevivieron más tiempo que WT). Para WT, esta columna tiene el valor "0".

Secuencia ID No.	Gen	Plantas probadas	Días promedio de supervivencia después de WT
1	YGL263W	12	1,17
3	YGR004W	11	1,36
5	YGR014W	11	0,82
7	YGL239C	13	2,4
9	YBL060W	14	1,6
11	YGL166W	14	1,07
13	YDL202W	15	0,47
15	YAL046C	14	1,9
17	YDR101C	14	3,57
19	YDR108W	14	0,5
21	YAL064W	33	2,29
23	YDR134C	13	0,8
25	YFL031 w	13	1,3
27	YFL052W	14	1,1
29	YFL042C	11	1,3
31	YBR025C	11	1,4
33	YER174C	22	1,05
35	YBR051W	10	1,2
37	YER175C	11	1,7
39	YDR521W	14	0,5
41	YER167W	35	0,66

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Secuencia ID No.	Gen	Plantas probadas	Días promedio de supervivencia después de WT
43	YER123W	11	2,2
45	YDR415C	7	2,71
47	YEL052W	4	1,5
49	YDR536W	14	1,5
51	YDR513W	7	3,14
53	YEL045C	14	1,64
55	YEL041W	13	1,77
57	YDL238C	35	1,2
59	YBR282W	14	1,79
61	YBR258C	9	3,4
63	YCL001W-A	36	1,78
65	YBR274W	14	2
67	YHR090C	8	4,5
69	YGR121C	40	1,6
71	YGR127W	8	1,4
73	YGR150C	12	2,6
75	YKL037W	14	0,79
77	YKL051 W	16	2,4
79	YKL120W	14	0,64
81	YKL011C	12	1,9
83	YKL017C	10	1,8
85	YKL049C	80	1,92
87	YKL132C	33	1,82
89	YGR126W	8	2,3
91	YKL070W	14	2,1
93	YKL058W	9	1,44

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Secuencia ID No.	Gen	Plantas probadas	Días promedio de supervivencia después de WT
95	YHR130C	9	1,8
97	YIL070C	13	0,69
99	YHR195W	14	1,9
101	YIR022W	14	1,07
103	YJ L089W	14	0,86
105	YJL172W	11	0,82
107	YHR113W	15	2
109	YHR175W	9	0,78
111	YGR212W	13	1,46
113	YJL024C	13	0,69
115	YGR180c	14	2,9
117	YJL179W	18	1,3
119	YJL001W	14	1,6
121	YJL208C	12	1,4
123	YJL152W	13	1,3
125	YJL131C	14	0,6
127	YJL151C	14	1,9
129	YLR441C	10	2
131	YLR415C	14	1,6
133	YLR212C	13	0,64
135	YLR029C	14	1,56
137	YLL041C	13	0,92
139	YLR105C	14	0,86
141	YIL136W	8	2,25
143	YLR215C	13	1,77
145	YLR321C	14	1,29

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Secuencia ID No.	Gen	Plantas probadas	Días promedio de supervivencia después de WT
147	YMR260C	11	2,09
149	YNL120C	7	2
151	YLR407W	12	1,17
153	YMR197C	14	0,57
155	YMR100W	12	1,25
157	YMR210W	10	1,1
159	YMR318C	13	0,85
161	YMR069W	8	1,25
163	YNL076W	13	1,31
165	YNL024C	13	1,08
167	YNL125C	4	1,75
169	YNL029C	13	1,92
171	YMR115W	12	0,75
173	YNL244C	11	1,55
175	YNL334C	14	1,5
177	YNR018W	14	1,29
179	YN L277W	14	1,14
181	YOL118C	14	1,71
183	YOL123W	14	0,71
185	YOR020C	12	1,83
187	YOL116W	13	1,08
189	YOR305w	15	1,2
191	YPL267W	6	2,5
193	YPL229w	5	2
195	YPL038W	10	1,3
197	YPR047W	11	1

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Secuencia ID No.	Gen	Plantas probadas	Días promedio de supervivencia después de WT
199	YPL011C	12	0,75
201	YPR148C	10	1,1
203	YOL103W	12	0,75
205	YOR016C	14	0,79
207	YPL079W	15	1,33
209	YOR260W	7	1,29
211	YOR360C	15	1,53
213	YDL060W	15	0,67
215	YDL005C	15	1
217	YPL210C	15	1,13
219	YMR118C	14	1,14
221	YPR052C	14	1,07
223	YLR224W	10	2,1
225	YLR275W	9	2,44
227	YMR154C	15	1,27
229	YDR205w	12	1,08
231	YPR037C	12	2,17
233	YNR008W	14	2,29
235	YOR084W	10	2,2
237	YGR054W	14	1,5
239	YGL106W	13	3,46
241	YAL067C	13	1,62
243	YIL023c	15	1,73
245	YBR064W	15	1,13
247	b0020	13	0,78
249	b2148	15	3,13

(continuación)

Secuencia ID No.	Gen	Plantas probadas	Días promedio de supervivencia después de WT
251	b2796	15	2,33
253	b2082	14	2,43
255	b0124	15	2,87
257	b3116	15	1,07
259	b1830	15	2,07
261	b1453	14	2,29
263	b2664	13	1,85
265	b2799	15	1,87
267	b3327	15	1,47
269	b0970	15	1,33
271	YER003C	5	1
273	YCL027W	9	0.56
275	YBR112C	10	0.5
277	YNL079C	9	0.67
279	YFR042W	9	0.78
281	YER137C	3	0
283	YKL103C	9	1
285	YNL090W	6	0.83
287	YGR161C	7	0.86
289	YDR071C	9	0.78

5 En un experimento adicional, para líneas principales individuales, se probaron otras líneas que contenían el mismo constructo de gen, pero resultantes de un diferente evento de transformación, En estas líneas, los genes de levadura que codificaban SRP específicos se incorporan en un sitio diferente del genoma de la planta. Los resultados se resumen en la tabla 4 en concordancia con la tabla 3. Los resultados demuestran la dependencia de la tolerancia al y/o resistencia al estrés en plantas sobre la expresión de la SRP, más que el evento de inserción.

10 Tabla 4: Tolerancia a la sequedad de *Arabidopsis thaliana* transgénica que expresa genes que codifican SRP seleccionados de *Saccharomyces cerevisiae* o *E. coli* después de la imposición de estrés por sequía sobre plantas de 3 semanas de edad en un tercer experimento usando una planta de varias líneas transgénicas independientes cada una (experimento 3). La tolerancia a la sequía se mide por el número indicado de plantas transgénicas (plantas probadas) como el número promedio de días (promedio de días de supervivencia después de WT) que las plantas transgénicas sobrevivieron después del control (tipo silvestre no transformado). El porcentaje máximo indica la fracción de las plantas probadas de la línea principal que fueron realmente resistentes, esto es, el número "50" indica

ES 2 368 915 T3

que la mitad de las plantas probadas fueron resistentes (sobrevivieron más que WT). Para WT, esta columna tiene el valor "0".

Secuencia ID No.	Gen	Número de otras líneas probadas	Días promedio de supervivencia después de WT
1	YGL263W	7	1,43
3	YGR004W	8	1
5	YGR014W	8	0,75
7	YGL239C	5	1
9	YBL060W	8	2
11	YGL166W	8	0,63
13	YDL202W	8	0,25
15	YAL046C	7	1,3
17	YDR101C	9	1,1
19	YDR108W	9	0,22
21	YAL064W	8	3
23	YDR134C	6	2,2
25	YFL031w	9	2,3
27	YFL052W	5	1,4
31	YBR025C	5	1,2
33	YER174C	9	0,5
35	YBR051W	6	1,3
37	YER175C	4	1,4
39	YDR521W	3	0,7
43	YER123W	6	0,3
45	YDR415C	7	1,4
47	YEL052W	3	1,33
49	YDR536W	8	1,25
51	YDR513W	4	1,5
53	YEL045C	5	1,2

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Secuencia ID No.	Gen	Número de otras líneas probadas	Días promedio de supervivencia después de WT
55	YEL041W	8	0,88
57	YDL238C	6	0,17
59	YBR282W	9	2,2
61	YBR258C	7	1,7
63	YCL001W-A	7	0,57
65	YBR274W	9	0,78
67	YHR090C	6	2,7
69	YGR121C	9	0,8
71	YGR127W	6	2,5
73	YGR150C	5	3
75	YKL037W	9	0,78
77	YKL051W	5	1,8
79	YKL120W	8	0,63
81	YKL011C	5	1,4
83	YKL017C	5	0,6
85	YKL049C	9	1,4
87	YKL132C	7	0,7
89	YGR126W	6	1,3
91	YKL070W	6	2
93	YKL058W	8	0,88
95	YHR130C	9	2,1
97	YIL070C	7	0,71
99	YHR195W	9	2,1
101	YIR022W	9	1,22
103	YJL089W	7	0,6
105	YJL172W	4	1

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Secuencia ID No.	Gen	Número de otras líneas probadas	Días promedio de supervivencia después de WT
107	YHR113W	7	1,6
109	YHR175W	3	1
111	YGR212W	8	0,88
113	YJL024C	6	1,33
115	YGR180c	8	2,7
117	YJL179W	8	1,8
119	YJL001W	9	0,7
121	YJL208C	6	1,7
123	YJL152W	8	0,3
125	YJL131C	6	1
127	YJL151C	8	1,6
129	YLR441C	7	2,6
131	YLR415C	9	0,3
133	YLR212C	7	2,14
135	YLR029C	8	0,25
137	YLL041C	7	0,86
139	YLR105C	7	0,29
141	YIL136W	9	1,75
143	YLR215C	8	1,25
145	YLR321C	7	0,86
147	YMR260C	8	0,88
149	YNL120C	9	1,56
151	YLR407W	5	0,4
153	YMR197C	9	1,22
155	YMR100W	8	0,88
157	YMR210W	8	0,88

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Secuencia ID No.	Gen	Número de otras líneas probadas	Días promedio de supervivencia después de WT
159	YMR318C	8	0,63
161	YMR069W	9	0,44
163	YNL076W	4	1,75
165	YNL024C	9	1,78
167	YNL125C	7	2,14
169	YNL029C	9	1,88
171	YMR115W	9	1,44
173	YNL244C	8	0,25
175	YNL334C	9	1,33
177	YNR018W	9	1,22
179	YNL277W	8	1
181	YOL118C	9	0,89
183	YOL123W	8	0,88
185	YOR020C	9	0,44
187	YOL116W	9	1,67
189	YOR305w	7	0,28
191	YPL267W	4	0,75
193	YPL229w	5	1,6
195	YPL038W	5	0,4
197	YPR047W	2	1
199	YPL011C	6	0,5
201	YPR148C	9	0,33
203	YOL103W	9	0,33
205	YOR016C	9	0,56
211	YOR360C	8	0,38
213	YDL060W	8	0,5

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Secuencia ID No.	Gen	Número de otras líneas probadas	Días promedio de supervivencia después de WT
215	YDL005C	9	0,44
217	YPL210C	8	1,5
219	YMR118C	10	1,1
221	YPR052C	7	0,86
223	YLR224W	9	1,22
225	YLR275W	8	1,75
227	YMR154C	9	1,11
229	YDR205w	4	1
231	YPR037C	5	3,4
233	YNR008W	8	0,75
235	YOR084W	6	0,5
239	YGL106W	7	2,14
241	YAL067C	6	1,83
243	YIL023c	1	3
245	YBR064W	7	0,71
247	b0020	4	1,5
249	b2148	10	0,1
251	b2796	11	0,72
253	b2082	9	1,22
255	b0124	9	3,3
257	b3116	8	1
259	b1830	7	1,71
261	b1453	8	1,13
263	b2664	9	1
267	b3327	10	0,8
269	b0970	8	1,5

(continuación)

Secuencia ID No.	Gen	Número de otras líneas probadas	Días promedio de supervivencia después de WT
271	YER003C	12	2,08
273	YCL027W	14	2,14
275	YBR112C	11	3,3
277	YNL079C	13	2,69
279	YFR042W	7	2,3
281	YER137C	13	2,2
283	YKL103C	10	2,8
285	YNL090W	12	4,33
287	YGR161C	12	2,7
289	YDR071C	11	3

5 Las mediciones de fluorescencia de la clorofila de la producción fotosintética confirmaron que un estrés severo por sequía inhibía completamente la fotosíntesis en las plantas de control, pero las líneas principales transgénicas mantuvieron la función fotosintética más tiempo (Tabla 5).

10 Tabla 5: Tolerancia a la sequía de *Arabidopsis thaliana* transgénica que expresa los diversos genes que codifican SRP a partir de *Saccharomyces cerevisiae* o *E. coli* después de la imposición de estrés por sequía en plantas de tres semanas de edad en un tercer experimento utilizando varias plantas de una línea transgénica (experimento 3). La tolerancia a la sequía se reporta como el rendimiento fotosintético medido por fluorescencia de la clorofila medida en tres puntos de tiempo diferentes durante el experimento de estrés por sequía, y en comparación con el control tipo silvestre no transformado. Para cada línea transgénica, se indica el promedio de 5 plantas en replicado, el valor de tipo silvestre es el promedio de 20-25 plantas medidas en el mismo experimento.

Sec. ID No.	Gen	Rendimiento fotosintético 6 días después del riego final	Tipo silvestre	Rendimiento fotosintético 10 días después del riego final	Tipo silvestre	Rendimiento fotosintético 14 días después del riego final	Tipo silvestre
1	YGL263W	751	766	765	654	264	106
3	YGR004W	759	766	755	654	246	106
5	YGR014W	759	766	752	654		
7	YGL239C	782	757	786	610		
9	YBL060W	743	757	782	610	108	16
11	YGL166W	752	736	747	709		

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Sec. ID No.	Gen	Rendimiento fotosintético 6 días después del riego final	Tipo silvestre	Rendimiento fotosintético 10 días después del riego final	Tipo silvestre	Rendimiento fotosintético 14 días después del riego final	Tipo silvestre
13	YDL202W	790	766	508	548		
15	YAL046C	788	760	756	549	216	20
19	YDR108W	756	736	739	709	0	20
23	YDR134C	757	760	765	549	273	20
25	YFL031w	763	760	766	549	784	20
27	YFL052W	757	757	753	610		
29	YFL042C	743	757	780	610		
31	YBR025C	763	760	762	549	631	20
35	YBR051W	741	760	696	549	456	20
37	YER175C	749	757	627	610	140	16
43	YER123W	767	757	780	610	147	16
47	YEL052W	750	736	773	710	177	20
49	YDR536W	753	736	772	709	293	20
51	YDR513W	782	794	660	413	411	54
53	YEL045C	755	736	553	709	147	20
55	YEL041W	758	736	769	709	129	20
59	YBR282W	759	760	724	549	221	20
61	YBR258C	759	757	772	610	144	16
65	YBR274W	749	736	769	709	146	20
67	YHR090C	749	760	765	549	620	20
71	YGR127W	740	549	576	20		
73	YGR150C	771	760	742	549	618	20
75	YKL037W	761	736	760	709	134	20
77	YKL051 W	733	760	740	549	153	20

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Sec. ID No.	Gen	Rendimiento fotosintético 6 días después del riego final	Tipo silvestre	Rendimiento fotosintético 10 días después del riego final	Tipo silvestre	Rendimiento fotosintético 14 días después del riego final	Tipo silvestre
79	YKL120W	759	736	518	709		
81	YKL011C	750	760	694	549	434	20
83	YKL017C	744	549	734	549	754	20
89	YGR126W	784	760	750	549	159	20
91	YKL070W	774	760	734	549	244	20
93	YKL058W	752	766	765	654	495	20
95	YHR130C	772	760	756	549	147	20
97	YIL070C	768	766	755	654		
99	YHR195W	753	757	693	610	141	16
101	YIR022W	761	736	771	709		
105	YJL172W	756	766	758	654	293	20
107	YHR113W	749	760	754	549	142	20
109	YHR175W	768	766	758	654	465	106
111	YGR212W	777	766	748	654		
113	YJL024C	762	766	758	654	736	106
115	YGR180c	763	757	779	610		
117	YJL179W	744	760	606	549	310	20
119	YJL001W	748	757	519	610	135	16
121	YJL208C	685	549	49	20		
123	YJL152W	754	757	726	610		
125	YJL131C	750	757	758	610		
127	YJL151C	755	760	764	549	152	20
129	YLR441C	745	760	762	549	277	20
131	YLR415C	739	757	503	610	144	16

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Sec. ID No.	Gen	Rendimiento fotosintético 6 días después del riego final	Tipo silvestre	Rendimiento fotosintético 10 días después del riego final	Tipo silvestre	Rendimiento fotosintético 14 días después del riego final	Tipo silvestre
133	YLR212C	740	736	759	709	103	20
135	YLR029C	746	736	780	709	292	20
139	YLR105C	751	736	764	709		
141	YIL136W	749	736	779	710	422	20
143	YLR215C	752	736	774	709	151	20
145	YLR321C	749	736	767	709	145	20
147	YMR260C	774	766	763	654	691	106
149	YNL120C	764	766	740	654	298	20
151	YLR407W	774	766	640	654	138	106
153	YMR197C	751	736	723	709	63	20
155	YMR100W	770	766	596	654	171	20
157	YMR210W	753	766	755	654	733	20
159	YMR318C	761	736	780	709	135	20
161	YMR069W	756	766	750	654	519	20
163	YNL076W	765	766	757	654	244	20
165	YNL024C	767	766	761	654	279	20
167	YNL125C	761	766	750	654	283	20
169	YNL029C	764	766	758	654		
171	YMR115W	755	736	739	709		
173	YNL244C	774	766	696	654	94	20
175	YNL334C	751	736	756	709		
177	YNR018W	756	736	749	709		
181	YOL118C	727	736	756	709	280	20
183	YOL123W	747	736			140	20

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Sec. ID No.	Gen	Rendimiento fotosintético 6 días después del riego final	Tipo silvestre	Rendimiento fotosintético 10 días después del riego final	Tipo silvestre	Rendimiento fotosintético 14 días después del riego final	Tipo silvestre
185	YOR020C	764	766	748	654	207	20
187	YOL116W	774	766	735	654	135	20
189	YOR305w	773	769	565	245		
191	YPL267W	757	767	756	548		
193	YPL229w	781	769	752	245		
197	YPR047W	761	769	597	245		
199	YPL011C	766	769	582	245		
201	YPR148C	771	769	401	245		
203	YOL103W	789	769	237	245		
205	YOR016C	770	769	523	245		
211	YOR360C	771	769	651	245		
215	YDL005C	782	769	702	245		
217	YPL210C	794	769	735	245		
219	YMR118C	777	768	499	272		
221	YPR052C	772	768	298	272		
223	YLR224W	767	768	434	272		
225	YLR275W	741	768	780	272		
227	YMR154C	760	768	734	272		
229	YDR205w	787	768	241	272		
231	YPR037C	759	768	740	272		
233	YNR008W	746	768	782	272		
235	YOR084W	758	768	765	272		
237	YGR054W	766	768	140	272		
239	YGL106W	760	768	477	272		

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Sec. ID No.	Gen	Rendimiento fotosintético 6 días después del riego final	Tipo silvestre	Rendimiento fotosintético 10 días después del riego final	Tipo silvestre	Rendimiento fotosintético 14 días después del riego final	Tipo silvestre
241	YAL067C	759	768	681	272		
243	YIL023c	769		814			
245	YBR064W	745	750	770	576	117	31
249	b2148	736	768	740	272		
251	b2796	761	768	319	272		
253	b2082	756	768	706	272		
255	b0124	756	768	571	272		
257	b3116	765	768	600	272		
259	b1830	757	768	772	272		
261	b1453	750	768	648	272		
263	b2664	764	768	521	272		
265	b2799	763	768	615	272		
267	b3327	766	768	499	272		
269	b0970	764	768	560	272		
271	YER003C	758	760	769	549	729	20
273	YCL027W	749	760	770	549	145	20
275	YBR112C	760	760	760	549	731	20
277	YNL079C	763	766	762	654	216	20
279	YFR042W	789	760	739	549	232	20
281	YER137C	760	760	728	549	458	20
283	YKL103C	747	760	763	549	791	20
285	YNL090W	757	760	783	549	403	20
287	YGR161C	742	760	753	549	225	20
289	YDR071C	737	757	793	610	707	16

Análisis metabólico de plantas transgénicas

Los cambios metabólicos descritos en las plantas transgénicas fueron identificados utilizando los siguientes procedimientos experimentales:

a) Crecimiento y tratamiento de plantas.

5 Las plantas fueron cultivadas en cámaras climáticas bajo condiciones estándar sobre macetas de suelo durante tres semanas (véase más arriba). Ocho días antes de la recolección, se suspendió el agua para parte de las plantas (tratamiento a ocho días). Cuatro días antes de la recolección, se suspendió el agua para otro grupo de plantas (tratamiento de cuatro días). Las plantas de "tratamiento de control" fueron regadas normalmente a través del periodo de crecimiento. Las plantas previstas para ser analizadas en la misma secuencia analítica fueron cultivadas lado a lado para evitar influencias ambientales.

10 b) Muestreo y almacenamiento de muestras

El muestreo tuvo lugar en la cámara climática. Se cortaron partes verdes con un par de tijeras, se repesaron rápidamente y se pusieron inmediatamente en un manguito de extracción preenfriada con nitrógeno líquido. Las gradillas con manguitos de extracción fueron almacenadas a -80°C hasta su extracción.

c) Secado por congelación

15 Las plantas no se dejaron descongelar ni alcanzar temperaturas > -40°C hasta ponerlas en contacto con solventes o hasta la eliminación de agua por liofilización.

20 La gradilla de muestras con manguitos de extracción fue colocada en el liofilizador preenfriado (-40°C). La temperatura de partida para la fase principal de secado fue -35°C, la presión fue 0.120 mbar. Para el proceso de secado, se cambiaron los parámetros de acuerdo con el programa de presión y temperatura. La temperatura final (después de 12 horas) fue +30°C, la presión fue 0.001- 0.004 mbar. Después de desconectar la bomba de vacío y la máquina de enfriamiento, el sistema fue aireado con aire seco o argón.

d) Extracción

25 Los manguitos de extracción con el material vegetal fueron transferidos a celdas de extracción de 5 mL sobre el ASE (extractor acelerado de solvente ASE 200 con controlador de solvente y software autoASE-(DIONEX)) inmediatamente después de la liofilización. Se extrajeron las sustancias polares con aproximadamente 10 mL de metanol/agua (80/20, v/v) a T = 70°C y p = 140 bar, con fase de calentamiento de 5 minutos, extracción estática de 1 minuto. Se extrajeron las sustancias lipídicas con aproximadamente 10 mL de metanol/diclorometano (40/60, v/v) a T = 70°C y p = 140 bar, fase de calentamiento de 5 minutos, extracción estática de 1 minuto. Ambos extractos fueron recolectados en un vial de extracción (tubos de centrifuga, 50 mL con tapa de rosca y Septum para ASE (DIONEX)).

30 Los siguientes estándares internos fueron añadidos a los extractos: Estándares de LC L-Metionina-d3, Boc-Ala-Gly-Gly-Gly-OH, L-Triptofano-d5, Argenina ¹³C₆¹⁵N₄, CoEnzima Q1,2,4 y ribitol, L-glicina-2,2-d2, L-alanina-2,3,3,3-d4, alfa-metil-glucopiranosido, éster metílico del ácido nonadecanoico, éster metílico del ácido undecanoico, ácido tridecanoico, ácido pentadecanoico, ácido nonacosanoico. A la mezcla resultante, se agregaron 8 mL de agua. Se descartaron los residuos sólidos de la planta y del manguito de extracción.

35 El extracto fue centrifugado a 1400 g durante 5-10 minutos para acelerar la separación de fases. Para el análisis por GC y LC, se tomó 1 mL de cada una de las fases superiores incoloras metanol/agua (polares). La fase superior restante fue descartada. De la fase inferior orgánica color verde oscuro se tomaron 0.5 mL para análisis por GC y LC, respectivamente. Todas las alícuotas de muestras fueron evaporadas utilizando un evaporador al vacío de infrarrojo IR-Dancer (Hettich), utilizando un máximo de temperatura de 40°C y una presión máxima de 10 mbar.

40 e) Análisis LC/MS y LC/MS/MS

La fase móvil de HPLC fue agregada a los residuos lipídicos y polares, respectivamente (volumen ajustado a la muestra pesada) y se llevó a cabo un análisis por HPLC utilizando elución en gradiente.

f) Formación de derivados de la fase lipídica para análisis por GC/MS

45 Para la transmetanólisis, se agregó al residuo una mezcla de 140 µL de cloroformo, 30 µL de HCl (37% de HCl en agua), 320 µL de metanol y 20 µL de toluol. El contenedor de la muestra fue cerrado cuidadosamente y la reacción se llevó a cabo a 100°C durante 2 horas. Subsecuentemente, se evaporó la solución y la pella fue secada completamente.

5 La metoximación de los grupos carbonilo fue lograda mediante reacción con 100 µL de metoxiamina-clorhidrato (5 mg/mL en piridina) durante 1.5 horas a 60°C, en un vial cerrado. Se agregaron 20 µL de una mezcla de ácidos grasos lineales de números impares para proveer un estándar de tiempo. Finalmente, la formación de derivados con 100 µL de N-metil-N-(trimetilsilil)-2,2,2-trifluoroacetamida (MSTFA) tuvo lugar en un vial cerrado durante 30 minutos a 60°C. El volumen final para inyección en GC fue de 220 µL.

g) Formación de derivados de la fase polar para análisis por GC/MS

10 La metoximación de los grupos carbonilos se alcanzó mediante reacción con 50 µL de metoxiamina-clorhidrato (5 mg/mL en piridina) durante 1.5 horas a 60°C en un vial cerrado. Se agregó 10 µL de una mezcla de ácidos grasos lineales de número impar para proporcionar un estándar de tiempo. Finalmente, la derivación con 50 µL de N-metil-N-(trimetilsilil)-2,2,2-trifluoroacetamida (MSTFA) tuvo lugar en un vial cerrado durante 30 minutos a 60°C. El volumen final para la inyección en GC fue 110 µL.

h) Análisis de diferentes muestras de plantas

15 Las muestras fueron medidas en secuencias de 20. Cada secuencia contenía 5 plantas tipo silvestre y 5 transgénicas bajo condiciones de control, así como 5 plantas tipo silvestre y 5 transgénicas tanto del día 4 como del día 8 del tratamiento con sequía.

20 La altura del pico o el área de pico para cada analito (metabolito) fue dividida por el área de pico de los estándares internos respectivos. Los datos fueron normalizados utilizando el peso de la muestra fresca individual. Los valores resultantes fueron divididos por los valores medios encontrados para plantas tipo silvestre bajo condiciones de control y se analizaron en la misma secuencia, dando como resultado los así llamados pliegues X o relaciones (véase tabla 7-14), que representan valores independientes de la secuencia analítica. Estas proporciones indican el comportamiento de la concentración de metabolito de las plantas objetivo en comparación con la concentración en las plantas de control tipo silvestre.

En la tabla 6 se muestran los resultados de la selección de metabolitos para las plantas transformadas en los genes YCL027W, YBR112C, YNL079C, YER137C, YKL103C, YNL090W, YGR161C, YDR071C.

25 Tabla 6: Detalles sobre la selección de la actividad metabólica.

metabolito	Tipo silvestre			YDR071C		
	control	4 días	8 días	control	4 días	8 días
2,3-dimetil-5-ftilquinol	1,00	0,50	0,54			
ácido 2-hidroxi-palmítico	1,00	1,11	1,25	1,18		
3,4-dihidroxifenilalanina (=dopa)	1,00	1,83	3,37			
ácido 3-hidroxi-palmítico	1,00					
5-oxoprolina	1,00	1,56	1,81			
alanina	1,00	0,64	0,64			
ácido alfa linolénico (c18:3 (c9, c12, c15))	1,00	1,24	1,40			
alfa-tocoferol	1,00	1,05	1,14			
ácido aminoadípico	1,00	1,73	1,65			
ácido aminoadípico	1,00	1,02	1,16			
arginina	1,00	0,39	0,33			

ES 2 368 915 T3

(continuación)

metabolito	Tipo silvestre			YDR071C		
	control	4 días	8 días	control	4 días	8 días
ácido aspártico	1,00	2,72	2,96			
beta-apo-8' carotenal	1,00	1,21	1,22			
beta-caroteno	1,00	1,25	1,26			
beta-sitosterol	1,00	1,39	1,51			
beta-tocoferol	1,00	0,54	0,60			
ácido palmítico	1,00	1,07	1,25			
ácido delta-7-cis, 10-cis-hexadecadiénico (c16:2 me)	1,00	1,01	1,04			
ácido hexadecatriénico (c16:3 me)	1,00	1,19	1,29			
ácido margárico (c17:0 me)	1,00	1,19	1,28			
ácido delta-15-cis-tetracosénico (c24:1 me)	1,00	1,16	1,34			
campesterol	1,00	1,32	1,65			
ácido cerótico (c26:0)	1,00	0,74	1,00			
citulina	1,00	0,51	0,33			
criptoxantina	1,00	1,00	0,90			
ácido eicosenoico (20:1)	1,00	0,81	0,81			
ácido ferúlico	1,00	1,37	1,47			
fructosa	1,00	14,10	19,78			
fumarato	1,00	5,19	9,33			
galactosa	1,00	1,29	1,42	0,98		
ácido g-aminobutírico	1,00	1,16	1,32			
gama-tocoferol	1,00	0,54	0,60			
ácido glucónico	1,00	2,24	3,08			
glucosa	1,00	14,97	20,73			
glutamina	1,00	0,98	1,17			
ácido glutámico	1,00	2,01	2,69			

ES 2 368 915 T3

(continuación)

metabolito	Tipo silvestre			YDR071C		
	control	4 días	8 días	control	4 días	8 días
glicerato	1,00	1,87	2,04			
gliceraldehído	1,00	1,11	1,12			
glicerol	1,00	1,22	1,29			
glicerol-3-fosfato	1,00	1,86	2,41			
glicina	1,00	0,25	0,26			
homoserina	1,00	0,61	0,69			
inositol	1,00	4,19	6,32			
isoleucina	1,00	1,28	1,66			
iso-maltosa	1,00	2,63	3,02			
isopentenil pirofosfato	1,00	1,80	2,62			
leucina	1,00	1,34	1,74			
Ácido lignocérico (c24:0)	1,00	0,91	1,02			
Ácido linoleic (c18:2 (c9, c12))	1,00	1,19	1,38			
luteína	1,00	1,26	1,33			
malato	1,00	2,91	3,46			
manosa	1,00	16,40	17,80			
Ácido triacontanoico	1,00	1,26	1,23			
metionina	1,00	1,13	1,12			
metilgalactofuranósido	1,00	1,24	1,49			
metilgalactopiranosido	1,00	1,25	1,36			
ornitina						
Ácido palmítico (c16:0)	1,00	1,16	1,38			
fenilalanina	1,00	0,92	1,10			
fosfato	1,00	2,15	2,73			
prolina	1,00	1,23	4,77			

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Tipo silvestre				YDR071C		
metabolito	control	4 días	8 días	control	4 días	8 días
putrescina	1,00		0,39			
piruvato	1,00	1,30	1,21			
rafinosa	1,00	17,04	74,78			
ácido ribónico	1,00	2,32	3,43			
serina	1,00	0,98	1,13			
shikimato	1,00	1,11	1,07			
ácido sinapínico	1,00	2,74	3,44			
Ácido esteárico (c18:0)	1,00	1,18	1,35			
succinato	1,00	2,98	3,49			
sacarosa	1,00	1,42	1,70			
treonina	1,00	1,26	1,68			
triptófano	1,00	1,13	1,89			
tirosina	1,00	1,56	2,01			
ubiquinona	1,00	1,02	1,20			
udp-glucosa	1,00	1,53	1,94			
valina	1,00	0,98	1,18			
zeaxantina	1,00	1,27	1,34			

Tipo silvestre				YER137C		
metabolito	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
2,3-dimetil-5-ftilquinol	1,00	0,50	0,54	2,15		5,57
ácido 2-hidroxi-palmítico	1,00	1,11	1,25			
3,4-dihidroxifenilalanina (=dopa)	1,00	1,83	3,37			
ácido 3-hidroxi-palmítico	1,00					
5-oxoprolina	1,00	1,56	1,81	1,55		1,73

ES 2 368 915 T3

(continuación)

metabolito	Tipo silvestre			YER137C		
	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
alanina	1,00	0,64	0,64	1,32		0,94
ácido alfa linolénico (c18:3 (c9, c12, c15))	1,00	1,24	1,40			
alfa-tocoferol	1,00	1,05	1,14			
ácido aminoadípico	1,00	1,73	1,65			
ácido aminoadípico	1,00	1,02	1,16		1,26	0,63
arginina	1,00	0,39	0,33			
Ácido aspártico	1,00	2,72	2,96			
beta-apo-8' carotenal	1,00	1,21	1,22			
beta-caroteno	1,00	1,25	1,26			
beta-sitosterol	1,00	1,39	1,51	0,88	1,17	1,35
beta-tocoferol	1,00	0,54	0,60	2,78		5,83
ácido palmítico	1,00	1,07	1,25			
ácido delta-7-cis, 10-cis-hexadecadiénico (c16:2 me)	1,00	1,01	1,04			
ácido hexadecatriénico (c16:3 me)	1,00	1,19	1,29			
ácido margárico (c17:0 me)	1,00	1,19	1,28			
ácido delta-15-cis-tetracosénico (c24:1 me)	1,00	1,16	1,34			
campesterol	1,00	1,32	1,65		1,10	1,28
Ácido cerótico (c26:0)	1,00	0,74	1,00	3,24	1,78	
citrulina	1,00	0,51	0,33			
criptoxantina	1,00	1,00	0,90			
Ácido eicosenoico (20:1)	1,00	0,81	0,81			
Ácido ferúlico	1,00	1,37	1,47			
fructosa	1,00	14,10	19,78			
fumarato	1,00	5,19	9,33			
galactosa	1,00	1,29	1,42			

ES 2 368 915 T3

(continuación)

metabolito	Tipo silvestre			YER137C		
	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
Ácido g-aminobutírico	1,00	1,16	1,32	4,44		10,51
gama-tocoferol	1,00	0,54	0,60	2,78		5,83
Ácido glucónico	1,00	2,24	3,08			
glucosa	1,00	14,97	20,73			
glutamina	1,00	0,98	1,17			
Ácido glutámico	1,00	2,01	2,69			
glicerato	1,00	1,87	2,04	1,17	2,32	
gliceraldehído	1,00	1,11	1,12			
glicerol	1,00	1,22	1,29			
glicerol-3-fosfato	1,00	1,86	2,41	1,12	1,57	2,05
glicina	1,00	0,25	0,26			
homoserina	1,00	0,61	0,69			
inositol	1,00	4,19	6,32			
isoleucina	1,00	1,28	1,66			
iso-maltosa	1,00	2,63	3,02			
isopentenil pirofosfato	1,00	1,80	2,62			
leucina	1,00	1,34	1,74			
ácido lignocérico (c24:0)	1,00	0,91	1,02	2,01	1,74	2,03
ácido linoleico (c18:2 (c9, c12))	1,00	1,19	1,38			
luteína	1,00	1,26	1,33			
malato	1,00	2,91	3,46	1,67	5,70	6,01
manosa	1,00	16,40	17,80			
ácido triacontanoico	1,00	1,26	1,23			
metionina	1,00	1,13	1,12			
metilgalactofuranósido	1,00	1,24	1,49			

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Tipo silvestre				YER137C		
metabolito	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
metilgalactopiranosido	1,00	1,25	1,36			
ornitina						
metabolito	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
Ácido palmítico (c16:0)	1,00	1,16	1,38			
fenilalanina	1,00	0,92	1,10			
fosfato	1,00	2,15	2,73			
prolina	1,00	1,23	4,77			
putrescina	1,00		0,39			
piruvato	1,00	1,30	1,21			
rafinosa	1,00	17,04	74,78			
ácido ribónico	1,00	2,32	3,43			
serina	1,00	0,98	1,13			
shikimato	1,00	1,11	1,07		1,40	1,50
Ácido sinapínico	1,00	2,74	3,44			
Ácido esteárico (c18:0)	1,00	1,18	1,35			
succinato	1,00	2,98	3,49			
sacarosa	1,00	1,42	1,70			
treonina	1,00	1,26	1,68			
triptófano	1,00	1,13	1,89			
tirosina	1,00	1,56	2,01			
ubiquinona	1,00	1,02	1,20			
udp-glucosa	1,00	1,53	1,94			
valina	1,00	0,98	1,18			

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Tipo silvestre				YER137C		
metabolito	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
zeaxantina	1,00	1,27	1,34			

Tipo silvestre				YBR112C		
metabolito	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
2,3-dimetil-5-ftilquinol	1,00	0,50	0,54	0,63		
ácido 2-hidroxi-palmítico	1,00	1,11	1,25			
3,4-dihidroxifenilalanina (=dopa)	1,00	1,83	3,37			
ácido 3-hidroxi-palmítico	1,00					
5-oxoprolina	1,00	1,56	1,81			
alanina	1,00	0,64	0,64			
ácido alfa linolénico (c18:3 (c9, c12, c15))	1,00	1,24	1,40	1,12		1,42
alfa-tocoferol	1,00	1,05	1,14			
Ácido aminoadípico	1,00	1,73	1,65	3,90	12,95	
ácido aminoadípico	1,00	1,02	1,16			
arginina	1,00	0,39	0,33			
Ácido aspártico	1,00	2,72	2,96			
beta-apo-8' carotenal	1,00	1,21	1,22			
beta-caroteno	1,00	1,25	1,26	1,35		
beta-sitosterol	1,00	1,39	1,51	1,19		
beta-tocoferol	1,00	0,54	0,60	0,70		
Ácido palmítico	1,00	1,07	1,25			
Ácido delta-7-cis,10-cis-hexadecadiénico (c16:2 me)	1,00	1,01	1,04			
Ácido hexadecatrienic (c16:3 me)	1,00	1,19	1,29			
Ácido margaric (c17:0 me)	1,00	1,19	1,28			
Ácido delta-15-cis-tetracosénico (c24:1 me)	1,00	1,16	1,34			

ES 2 368 915 T3

(continuación)

metabolito	Tipo silvestre			YBR112C		
	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
campesterol	1,00	1,32	1,65	1,42		
ácido cerótico (c26:0)	1,00	0,74	1,00			
citulina	1,00	0,51	0,33			
criptoxantina	1,00	1,00	0,90			
ácido eicosenoico (20:1)	1,00	0,81	0,81			
ácido ferúlico	1,00	1,37	1,47	1,20		
fructosa	1,00	14,10	19,78			
fumarato	1,00	5,19	9,33			
galactosa	1,00	1,29	1,42			
ácido g-aminobutírico	1,00	1,16	1,32			
gama-tocoferol	1,00	0,54	0,60	0,70		
ácido glucónico	1,00	2,24	3,08			
glucosa	1,00	14,97	20,73			
glutamina	1,00	0,98	1,17			
ácido glutámico	1,00	2,01	2,69			
glicerato	1,00	1,87	2,04			
glicerinaldehído	1,00	1,11	1,12			
glicerol	1,00	1,22	1,29			
glicerol-3-fosfato	1,00	1,86	2,41			
glicina	1,00	0,25	0,26			
homoserina	1,00	0,61	0,69			
inositol	1,00	4,19	6,32			
isoleucina	1,00	1,28	1,66			
iso-maltosa	1,00	2,63	3,02			

ES 2 368 915 T3

(continuación)

metabolito	Tipo silvestre			YBR112C		
	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
isopentenil pirofosfato	1,00	1,80	2,62			
leucina	1,00	1,34	1,74			
ácido lignocérico (c24:0)	1,00	0,91	1,02			
ácido linoleico (c18:2 (c9, c12))	1,00	1,19	1,38			
luteína	1,00	1,26	1,33	1,17		
malato	1,00	2,91	3,46			
manosa	1,00	16,40	17,80			
ácido triacontanoico	1,00	1,26	1,23			
metionina	1,00	1,13	1,12			
metilgalactofuranósido	1,00	1,24	1,49			
metilgalactopiranosido	1,00	1,25	1,36			
ornitina						
ácido palmítico (c16:0)	1,00	1,16	1,38	1,11		
fenilalanina	1,00	0,92	1,10			
fosfato	1,00	2,15	2,73			
prolina	1,00	1,23	4,77			
putrescina	1,00		0,39			
piruvato	1,00	1,30	1,21			
rafinosa	1,00	17,04	74,78			
ácido ribónico	1,00	2,32	3,43			
serina	1,00	0,98	1,13			
shikimato	1,00	1,11	1,07			
ácido sinápico	1,00	2,74	3,44			
ácido esteárico (c18:0)	1,00	1,18	1,35			
succinato	1,00	2,98	3,49			

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Tipo silvestre				YBR112C		
metabolito	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
sacarosa	1,00	1,42	1,70			
treonina	1,00	1,26	1,68			
triptófano	1,00	1,13	1,89			
tirosina	1,00	1,56	2,01			
ubiquinona	1,00	1,02	1,20			
udp-glucosa	1,00	1,53	1,94			
valina	1,00	0,98	1,18			
zeaxantina	1,00	1,27	1,34			

Tipo silvestre				YGR161C		
metabolito	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
2,3-dimetil-5-ftilquinol	1,00	0,50	0,54			
ácido 2-hidroxi-palmítico	1,00	1,11	1,25			
3,4-dihidroxifenilalanina (=dopa)	1,00	1,83	3,37			
ácido 3-hidroxi-palmítico	1,00					
5-oxoprolina	1,00	1,56	1,81			
alanina	1,00	0,64	0,64			
Ácido Alfa linolénico (c18:3 (c9, c12, c15))	1,00	1,24	1,40			
alfa-tocoferol	1,00	1,05	1,14			
ácido aminoadípico	1,00	1,73	1,65			
ácido aminoadípico	1,00	1,02	1,16			
arginina	1,00	0,39	0,33			
ácido aspártico	1,00	2,72	2,96			
beta-apo-8' carotenal	1,00	1,21	1,22			
beta-caroteno	1,00	1,25	1,26			

ES 2 368 915 T3

(continuación)

metabolito	Tipo silvestre			YGR161C		
	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
beta-sitosterol	1,00	1,39	1,51			
beta-tocoferol	1,00	0,54	0,60			
ácido palmítico	1,00	1,07	1,25			
ácido delta-7-cis, 10-cis-hexadecadiénico (c16:2me)	1,00	1,01	1,04	1,14		
ácido hexadecatriénico (c16:3 me)	1,00	1,19	1,29			
ácido margárico (c17:0 me)	1,00	1,19	1,28	1,22		
ácido delta-15-cis-tetracosénico (c24:1 me)	1,00	1,16	1,34			
campesterol	1,00	1,32	1,65			
ácido cerótico (c26:0)	1,00	0,74	1,00			
citrulina	1,00	0,51	0,33			
criptoxantina	1,00	1,00	0,90			
ácido eicosenoico (20:1)	1,00	0,81	0,81			
ácido ferúlico	1,00	1,37	1,47			
fructosa	1,00	14,10	19,78			
fumarato	1,00	5,19	9,33			
galactosa	1,00	1,29	1,42	1,15		
ácido g-aminobutírico	1,00	1,16	1,32			
gama-tocoferol	1,00	0,54	0,60			
ácido glucónico	1,00	2,24	3,08			
glucosa	1,00	14,97	20,73			
glutamina	1,00	0,98	1,17			
ácido glutámico	1,00	2,01	2,69			
glicerato	1,00	1,87	2,04			
glicerinaldehído	1,00	1,11	1,12			
glicerol	1,00	1,22	1,29			

ES 2 368 915 T3

(continuación)

metabolito	Tipo silvestre			YGR161C		
	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
glicerol-3-fosfato	1,00	1,86	2,41			
glicina	1,00	0,25	0,26			
homoserina	1,00	0,61	0,69			
inositol	1,00	4,19	6,32			
isoleucina	1,00	1,28	1,66			
iso-maltosa	1,00	2,63	3,02			
isopentenil pirofosfato	1,00	1,80	2,62			
leucina	1,00	1,34	1,74			
ácido lignocérico (c24:0)	1,00	0,91	1,02			
ácido linoleico (c18:2 (c9, c12))	1,00	1,19	1,38			
luteína	1,00	1,26	1,33			
malato	1,00	2,91	3,46			
manosa	1,00	16,40	17,80			
ácido triacontanoico	1,00	1,26	1,23			
metionina	1,00	1,13	1,12			
metilgalactofuranósido	1,00	1,24	1,49			
metilgalactopiranósido	1,00	1,25	1,36	1,18		
ornitina						
ácido palmítico (c16:0)	1,00	1,16	1,38			
fenilalanina	1,00	0,92	1,10			
fosfato	1,00	2,15	2,73			
prolina	1,00	1,23	4,77			
putrescina	1,00		0,39			
piruvato	1,00	1,30	1,21			
rafinosa	1,00	17,04	74,78			

ES 2 368 915 T3

(continuación)

Tipo silvestre				YGR161C		
metabolito	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
ácido ribónico	1,00	2,32	3,43			
serina	1,00	0,98	1,13			
shikimato	1,00	1,11	1,07			
ácido sinapínico	1,00	2,74	3,44			
ácido esteárico (c18:0)	1,00	1,18	1,35			
succinato	1,00	2,98	3,49			
sacarosa	1,00	1,42	1,70			
treonina	1,00	1,26	1,68			
triptófano	1,00	1,13	1,89			
tirosina	1,00	1,56	2,01			
ubiquinona	1,00	1,02	1,20			
udp-glucosa	1,00	1,53	1,94			
valina	1,00	0,98	1,18			
zeaxantina	1,00	1,27	1,34			

YKL103C						
metabolito	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
2,3-dimetil-5-ftilquinol	1,00	0,50	0,54			
ácido 2-hidroxi-palmítico	1,00	1,11	1,25			
3,4-dihidroxifenilalanina (=dopa)	1,00	1,83	3,37			
ácido 3-hidroxi-palmítico	1,00					
5-oxoprolina	1,00	1,56	1,81			
alanina	1,00	0,64	0,64			
Ácido Alfa-linolénico (c18:3 (c9, c12, c15))	1,00	1,24	1,40			
alfa-tocoferol	1,00	1,05	1,14			

ES 2 368 915 T3

(continuación)

YKL103C						
metabolito	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
ácido aminoadípico	1,00	1,73	1,65			
ácido aminoadípico	1,00	1,02	1,16			
arginina	1,00	0,39	0,33			
ácido aspártico	1,00	2,72	2,96			
beta-apo-8' carotenal	1,00	1,21	1,22			
beta-caroteno	1,00	1,25	1,26			
beta-sitosterol	1,00	1,39	1,51			
beta-tocoferol	1,00	0,54	0,60			
ácido palmítico	1,00	1,07	1,25			
ácido delta-7-cis, 10-cis-hexadecadiénico (c16:2 me)	1,00	1,01	1,04	1,18	1,16	1,30
ácido hexadecatriénico (c16:3 me)	1,00	1,19	1,29			
ácido margárico (c17:0 me)	1,00	1,19	1,28			
ácido delta-15-cis-tetracosénico (c24:1 me)	1,00	1,16	1,34			
campesterol	1,00	1,32	1,65			
ácido cerótico (c26:0)	1,00	0,74	1,00			
citrulina	1,00	0,51	0,33			
criptoxantina	1,00	1,00	0,90			
ácido eicosenoico (20:1)	1,00	0,81	0,81			
ácido ferúlico	1,00	1,37	1,47			
fructosa	1,00	14,10	19,78			
fumarato	1,00	5,19	9,33			
galactosa	1,00	1,29	1,42			
ácido g-aminobutírico	1,00	1,16	1,32			
gama-tocoferol	1,00	0,54	0,60			
ácido glucónico	1,00	2,24	3,08			

ES 2 368 915 T3

(continuación)

YKL103C						
metabolito	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
glucosa	1,00	14,97	20,73			
glutamina	1,00	0,98	1,17			
ácido glutámico	1,00	2,01	2,69			
glicerato	1,00	1,87	2,04			
gliceraldehído	1,00	1,11	1,12			
glicerol	1,00	1,22	1,29			
glicerol-3-fosfato	1,00	1,86	2,41			
glicina	1,00	0,25	0,26			
homoserina	1,00	0,61	0,69			
inositol	1,00	4,19	6,32			
isoleucina	1,00	1,28	1,66			
iso-maltosa	1,00	2,63	3,02			
isopentenil pirofosfato	1,00	1,80	2,62			
leucina	1,00	1,34	1,74			
ácido lignocérico (c24:0)	1,00	0,91	1,02			
ácido linoleico (c18:2 (c9, c12))	1,00	1,19	1,38			
luteína	1,00	1,26	1,33			
malato	1,00	2,91	3,46			
manosa	1,00	16,40	17,80			
ácido triacontanoico	1,00	1,26	1,23			
metionina	1,00	1,13	1,12			
metilgalactofuranósido	1,00	1,24	1,49			
metilgalactopiranosido	1,00	1,25	1,36			
ornitina					1,70	1,52

ES 2 368 915 T3

(continuación)

YKL103C						
metabolito	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
ácido palmítico (c16:0)	1,00	1,16	1,38			
fenilalanina	1,00	0,92	1,10			
fosfato	1,00	2,15	2,73			
prolina	1,00	1,23	4,77			
putrescina	1,00		0,39			
piruvato	1,00	1,30	1,21			
rafinosa	1,00	17,04	74,78			
ácido ribónico	1,00	2,32	3,43			
serina	1,00	0,98	1,13			
shikimato	1,00	1,11	1,07			
ácido sinapínico	1,00	2,74	3,44			
ácido esteárico (c18:0)	1,00	1,18	1,35			
succinato	1,00	2,98	3,49			
sacarosa	1,00	1,42	1,70			
treonina	1,00	1,26	1,68			
triptófano	1,00	1,13	1,89			
tirosina	1,00	1,56	2,01			
ubiquinona	1,00	1,02	1,20			
udp-glucosa	1,00	1,53	1,94			
valina	1,00	0,98	1,18			
zeaxantina	1,00	1,27	1,34			

YCL027W						
metabolito	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
2,3-dimetil-5-ftilquinol	1,00	0,50	0,54			

ES 2 368 915 T3

(continuación)

YCL027W						
metabolito	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
ácido 2-hidroxi-palmitico	1,00	1,11	1,25			
3,4-dihidroxifenilalanina (=dopa)	1,00	1,83	3,37			
ácido 3-hidroxi-palmitico	1,00					
5-oxoprolina	1,00	1,56	1,81			
alanina	1,00	0,64	0,64			
Ácido Alfa-linolénico (c18:3 (c9, c12, c15))	1,00	1,24	1,40			
alfa-tocoferol	1,00	1,05	1,14			
ácido aminoadípico	1,00	1,73	1,65			
ácido aminoadípico	1,00	1,02	1,16			
arginina	1,00	0,39	0,33			
ácido aspártico	1,00	2,72	2,96			
beta-apo-8' carotenal	1,00	1,21	1,22			
beta-caroteno	1,00	1,25	1,26			
beta-sitosterol	1,00	1,39	1,51			
beta-tocoferol	1,00	0,54	0,60			
ácido palmitico	1,00	1,07	1,25			
Ácido delta-7-cis,10-cis-hexadecadiénico (c16:2 me)	1,00	1,01	1,04			
ácido hexadecatriénico (c16:3 me)	1,00	1,19	1,29			
ácido margárico (c17:0 me)	1,00	1,19	1,28			
ácido delta-15-cis-tetracosénico (c24:1 me)	1,00	1,16	1,34			
campesterol	1,00	1,32	1,65			
ácido cerótico (c26:0)	1,00	0,74	1,00			
citulina	1,00	0,51	0,33			
criptoxantina	1,00	1,00	0,90			
ácido eicosenoico (20:1)	1,00	0,81	0,81			

ES 2 368 915 T3

(continuación)

YCL027W						
metabolito	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
ácido ferúlico	1,00	1,37	1,47	0,79	0,74	0,80
fructosa	1,00	14,10	19,78			
fumarato	1,00	5,19	9,33			
galactosa	1,00	1,29	1,42			
ácido g-aminobutírico	1,00	1,16	1,32			
gama-tocoferol	1,00	0,54	0,60			
ácido glucónico	1,00	2,24	3,08			
glucosa	1,00	14,97	20,73			
glutamina	1,00	0,98	1,17			
ácido glutámico	1,00	2,01	2,69			
glicerato	1,00	1,87	2,04			
gliceraldehído	1,00	1,11	1,12			
glicerol	1,00	1,22	1,29			
glicerol-3-fosfato	1,00	1,86	2,41			
glicina	1,00	0,25	0,26			
homoserina	1,00	0,61	0,69			
inositol	1,00	4,19	6,32			
isoleucina	1,00	1,28	1,66			
iso-maltosa	1,00	2,63	3,02			
isopentenil pirofosfato	1,00	1,80	2,62			
leucina	1,00	1,34	1,74			
ácido lignocérico (c24:0)	1,00	0,91	1,02			
ácido linoleico (c18:2 (c9, c12))	1,00	1,19	1,38			
luteína	1,00	1,26	1,33			
malato	1,00	2,91	3,46			

ES 2 368 915 T3

(continuación)

YCL027W						
metabolito	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
manosa	1,00	16,40	17,80			
ácido triacontanoico	1,00	1,26	1,23			
metionina	1,00	1,13	1,12			
metilgalactofuranósido	1,00	1,24	1,49			
metilgalactopiranosido	1,00	1,25	1,36			
ornitina						
ácido palmítico (c16:0)	1,00	1,16	1,38			
fenilalanina	1,00	0,92	1,10			
fosfato	1,00	2,15	2,73			
prolina	1,00	1,23	4,77			
putrescina	1,00		0,39			
piruvato	1,00	1,30	1,21			
rafinosa	1,00	17,04	74,78			
ácido ribónico	1,00	2,32	3,43			
serina	1,00	0,98	1,13			
shikimato	1,00	1,11	1,07			
ácido sinapínico	1,00	2,74	3,44			
ácido esteárico (c18:0)	1,00	1,18	1,35			
succinato	1,00	2,98	3,49			
sacarosa	1,00	1,42	1,70			
treonina	1,00	1,26	1,68			
triptófano	1,00	1,13	1,89			
tirosina	1,00	1,56	2,01			
ubiquinona	1,00	1,02	1,20			
udp-glucosa	1,00	1,53	1,94			

ES 2 368 915 T3

(continuación)

YCL027W						
metabolito	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
valina	1,00	0,98	1,18			
zeaxantina	1,00	1,27	1,34			

YNL079C						
metabolito	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
2,3-dimetil-5-ftilquinol	1,00	0,50	0,54	0,59		
ácido 2-hidroxi-palmítico	1,00	1,11	1,25			
3,4-dihidroxifenilalanina (=dopa)	1,00	1,83	3,37			
ácido 3-hidroxi-palmítico	1,00		!			
5-oxoprolina	1,00	1,56	1,81			
alanina	1,00	0,64	0,64			
ácido Alfa-linolénico (c18:3 (c9, c12, c15))	1,00	1,24	1,40		1,53	1,56
alfa-tocoferol	1,00	1,05	1,14		2,64	3,66
ácido aminoadípico	1,00	1,73	1,65			
ácido aminoadípico	1,00	1,02	1,16			
arginina	1,00	0,39	0,33			
ácido aspártico	1,00	2,72	2,96			
beta-apo-8' carotenal	1,00	1,21	1,22			
beta-caroteno	1,00	1,25	1,26		1,26	1,20
beta-sitosterol	1,00	1,39	1,51			
beta-tocoferol	1,00	0,54	0,60	0,73		0,56
ácido palmítico	1,00	1,07	1,25			
ácido delta-7-cis, 10-cis-hexadecadiénico (c16:2 me)	1,00	1,01	1,04			
ácido hexadecatriénico (c16:3 me)	1,00	1,19	1,29			
ácido margárico (c17:0 me)	1,00	1,19	1,28	1,22	1,53	1,36

ES 2 368 915 T3

(continuación)

YNL079C						
metabolito	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
ácido delta-15-cis-tetracosénico (c24:1 me)	1,00	1,16	1,34			
campesterol	1,00	1,32	1,65		1,79	1,82
ácido cerótico (c26:0)	1,00	0,74	1,00			
citrulina	1,00	0,51	0,33			
criptoxantina	1,00	1,00	0,90			
ácido eicosenoico (20:1)	1,00	0,81	0,81			
ácido ferúlico	1,00	1,37	1,47			
fructosa	1,00	14,10	19,78			
fumarato	1,00	5,19	9,33			
galactosa	1,00	1,29	1,42			
ácido g-aminobutírico	1,00	1,16	1,32			
gama-tocoferol	1,00	0,54	0,60			
ácido glucónico	1,00	2,24	3,08			
glucosa	1,00	14,97	20,73			
glutamina	1,00	0,98	1,17			
ácido glutámico	1,00	2,01	2,69			
glicerato	1,00	1,87	2,04			
glicerinaldehído	1,00	1,11	1,12			
glicerol	1,00	1,22	1,29			
glicerol-3-fosfato	1,00	1,86	2,41			
glicina	1,00	0,25	0,26			
homoserina	1,00	0,61	0,69			
inositol	1,00	4,19	6,32		4,73	6,12
isoleucina	1,00	1,28	1,66			
iso-maltosa	1,00	2,63	3,02		4,42	4,93

ES 2 368 915 T3

(continuación)

YNL079C						
metabolito	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
isopentenil pirofosfato	1,00	1,80	2,62			
leucina	1,00	1,34	1,74		1,51	2,19
ácido lignocérico (c24:0)	1,00	0,91	1,02			
ácido linoleico (c18:2 (c9, c12))	1,00	1,19	1,38			
luteína	1,00	1,26	1,33			
malato	1,00	2,91	3,46	1,49		5,72
manosa	1,00	16,40	17,80			
ácido triacontanoico	1,00	1,26	1,23			
metionina	1,00	1,13	1,12			
metilgalactofuranósido	1,00	1,24	1,49			
metilgalactopiranosido	1,00	1,25	1,36			
ornitina						
ácido palmítico (c16:0)	1,00	1,16	1,38			
fenilalanina	1,00	0,92	1,10			
fosfato	1,00	2,15	2,73			
prolina	1,00	1,23	4,77			
putrescina	1,00		0,39			
piruvato	1,00	1,30	1,21			
rafinosa	1,00	17,04	74,78			
ácido ribónico	1,00	2,32	3,43			
serina	1,00	0,98	1,13			
shikimato	1,00	1,11	1,07			
ácido sinapínico	1,00	2,74	3,44		3,89	2,79
ácido esteárico (c18:0)	1,00	1,18	1,35			
succinato	1,00	2,98	3,49			

ES 2 368 915 T3

(continuación)

YNL079C						
metabolito	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
sacarosa	1,00	1,42	1,70			
treonina	1,00	1,26	1,68			
triptófano	1,00	1,13	1,89		2,68	2,98
tirosina	1,00	1,56	2,01			
ubiquinona	1,00	1,02	1,20		0,88	1,02
udp-glucosa	1,00	1,53	1,94			
valina	1,00	0,98	1,18			
zeaxantina	1,00	1,27	1,34			

Tipo silvestre			YNL090W			
metabolito	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
2,3-dimetil-5-ftilquinol	1,00	0,50	0,54			
ácido 2-hidroxi-palmitico	1,00	1,11	1,25	1,15	1,25	
3,4-dihidroxifenilalanina (=dopa)	1,00	1,83	3,37			
ácido 3-hidroxi-palmitico	1,00					
5-oxoprolina	1,00	1,56	1,81			
alanina	1,00	0,64	0,64			
ácido alfa linolénico (c18:3 (c9, c12, c15))	1,00	1,24	1,40			
alfa-tocoferol	1,00	1,05	1,14	1,30		5,28
ácido aminoadípico	1,00	1,73	1,65			
ácido aminoadípico	1,00	1,02	1,16			
arginina	1,00	0,39	0,33		0,85	
ácido aspártico	1,00	2,72	2,96			
beta-apo-8'carotenal	1,00	1,21	1,22			
beta-caroteno	1,00	1,25	1,26	1,15		1,91

ES 2 368 915 T3

(continuación)

metabolito	Tipo silvestre			YNL090W		
	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
beta-sitosterol	1,00	1,39	1,51			
beta-tocoferol	1,00	0,54	0,60			
ácido palmítico	1,00	1,07	1,25			
Ácido delta-7-cis,10-cis-hexadecadiénico (c16:2 me)	1,00	1,01	1,04			
ácido hexadecatriénico (c16:3 me)	1,00	1,19	1,29			
ácido margárico (c17:0 me)	1,00	1,19	1,28			
ácido delta-15-cis-tetracosénico (c24:1 me)	1,00	1,16	1,34			
campesterol	1,00	1,32	1,65			
ácido cerótico (c26:0)	1,00	0,74	1,00 2,98		3,93	
citulina	1,00	0,51	0,33			
criptoxantina	1,00	1,00	0,90			
ácido eicosenoico (20:1)	1,00	0,81	0,81			
ácido ferúlico	1,00	1,37	1,47			
fructosa	1,00	14,10	19,78			
fumarato	1,00	5,19	9,33	0,76		
galactosa	1,00	1,29	1,42			
ácido g-aminobutírico	1,00	1,16	1,32			
gama-tocoferol	1,00	0,54	0,60			1,69
glucónicoacid	1,00	2,24	3,08			
glucosa	1,00	14,97	20,73			
glutamina	1,00	0,98	1,17			
ácido glutámico	1,00	2,01	2,69			
glicerato	1,00	1,87	2,04			
glicerinaldehído	1,00	1,11	1,12			
glicerol	1,00	1,22	1,29			

ES 2 368 915 T3

(continuación)

metabolito	Tipo silvestre			YNL090W		
	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
glicerol-3-fosfato	1,00	1,86	2,41			
glicina	1,00	0,25	0,26			
homoserina	1,00	0,61	0,69			
inositol	1,00	4,19	6,32	1,46		9,70
isoleucina	1,00	1,28	1,66		3,54	4,86
iso-maltosa	1,00	2,63	3,02	3,59	20,72	14,65
isopentenil pirofosfato	1,00	1,80	2,62	1,79		
leucina	1,00	1,34	1,74			
ácido lignocérico (c24:0)	1,00	0,91	1,02			
ácido linoleico (c18:2 (c9, c12))	1,00	1,19	1,38			
luteína	1,00	1,26	1,33			
malato	1,00	2,91	3,46	2,12		14,49
manosa	1,00	16,40	17,80			
ácido triacontanoico	1,00	1,26	1,23			
metionina	1,00	1,13	1,12			
metilgalactofuranósido	1,00	1,24	1,49			
metilgalactopiranósido	1,00	1,25	1,36			
ornitina						
ácido palmítico (c16:0)	1,00	1,16	1,38			
fenilalanina	1,00	0,92	1,10			
fosfato	1,00	2,15	2,73			
prolina	1,00	1,23	4,77			
putrescina	1,00		0,39			
piruvato	1,00	1,30	1,21			
rafinosa	1,00	17,04	74,78			

(continuación)

metabolito	Tipo silvestre			YNL090W		
	Control	4 días	8 días	Control	4 días	8 días
ácido ribónico	1,00	2,32	3,43			
serina	1,00	0,98	1,13			
shikimato	1,00	1,11	1,07			
ácido sinapínico	1,00	2,74	3,44			
ácido esteárico (c18:0)	1,00	1,18	1,35			
succinato	1,00	2,98	3,49			
sacarosa	1,00	1,42	1,70			
treonina	1,00	1,26	1,68			
triptófano	1,00	1,13	1,89			
tirosina	1,00	1,56	2,01			
ubiquinona	1,00	1,02	1,20			
udp-glucosa	1,00	1,53	1,94			
valina	1,00	0,98	1,18	1,13	1,55	1,80
zeaxantina	1,00	1,27	1,34			

Ejemplo 2

5 Manipulación de plantas de Arabidopsis tolerantes a la sequía por sobreexpresión de los genes codificadores de la proteína relacionada con el estrés de Saccharomyces cerevisiae o E. coli o Brassica napus, Glicina Max y Oryza sativa utilizando promotores inducibles por estrés y específicos para tejidos.

10 Se crearon plantas transgénicas de Arabidopsis como en el ejemplo 1 para expresar los transgenes que codificaban la proteína relacionada con el estrés bajo el control de un promotor específico para tejidos o inducible por el estrés. La expresión constitutiva de un transgén puede causar efectos colaterales nocivos. La expresión inducible por el estrés se alcanzó utilizando promotores seleccionados de los que aparecen listados en la Tabla 1.

15 Se produjeron plantas de generación T2 y se trataron con estrés por sequía en dos experimentos. Para el primer experimento con sequía, las plantas fueron privadas de agua hasta que la planta y el suelo se secaron. En varios momentos después de suspender el agua, se reasumió una programación de riego y las plantas fueron cultivadas hasta la madurez. El rendimiento de semillas fue determinado como semillas por planta. En un grado equivalente de estrés por sequía, las plantas tolerantes fueron capaces de reasumir un crecimiento normal y produjeron más semillas que las plantas de control no transgénicas. El contenido de prolina de las hojas y de las aperturas estomatales también se midió en diversos momentos durante el estrés por sequía. Las plantas tolerantes mantuvieron un contenido de prolina inferior y una apertura estomatal superior que las plantas de control no transgénicas.

20 Un método alternativo para imponer estrés por agua sobre las plantas transgénicas fue por tratamiento con agua que contenía un osmolito tal como polietilén glicol (PEG) o un potenciador específico de agua. Puesto que el PEG puede ser tóxico, las plantas recibieron solamente una exposición a corto plazo y luego se reasumió el riego normal. Como sucedió más arriba, se midieron los rendimientos en semillas de las plantas maduras. La respuesta fue medida durante el periodo de estrés por mediciones físicas, tales como apertura estomatal o potencial osmótico, o

mediciones bioquímicas, tales como acumulación de prolina. Las plantas tolerantes tenían rendimientos de semillas superiores, mantuvieron su apertura estomatal y mostraron solamente cambios ligeros en el potencial osmótico y en los niveles de prolina, mientras que las plantas de control no transgénicas susceptibles cerraron sus estomas y exhibieron niveles incrementados de potencial osmótico y prolina.

- 5 Las plantas transgénicas con un promotor constitutivo que controlaba la transcripción del transgén fueron comparadas con aquellas plantas con un promotor inducible por sequía en ausencia de estrés. Los resultados indicaron que los cambios en metabolito y expresión genética no ocurrieron cuando las plantas con el promotor inducible por estrés fueron cultivadas en ausencia de estrés. Estas plantas también tenían rendimientos de semillas más altos que aquellas con el promotor constitutivo.

10 **Ejemplo 3**

Sobreexpresión de genes relacionados con el estrés de *Saccharomyces cerevisiae* o *E. coli* o *Brassica napus*, *Glycine Max* y *Oryza sativa* proporciona tolerancia de tensiones abióticas múltiples.

- 15 Las plantas que exhibían tolerancia de una de las clases de estrés abiótico exhiben tolerancia frente a otro tipo de estrés ambiental o a un herbicida que genera radicales de oxígeno libres. Este fenómeno de tolerancia cruzada no está entendido a un nivel mecanístico (McKersie and Leshem, 1994). No obstante, es razonable esperar que las plantas exhiban tolerancia a la sequía incrementada debido a la expresión de un transgén también pueden exhibir tolerancia a bajas temperaturas, congelación, sal, contaminantes en el aire tales como ozono, y otras tensiones abióticas. En soporte de esta hipótesis, la expresión de varios genes es supra o subregulada por múltiples factores de estrés abiótico incluyendo frío, sal, osmóticos, ABA, etc., (por ejemplo Hong et al. (1992) Developmental and organ-specific expression of an ABA-and stress-induced protein in barley. *Plant Mol Biol* 18: 663-674; Jagendorf and Takabe (2001) Inducers of glicinabetaïne synthesis in barley. *Plant Physiol* 127: 1827-1835; Mizoguchi et al. (1996). Un gen que codifica una proteína quinasa activada por mitógeno se induce simultáneamente con genes para una proteína quinasa activada por mitógeno y una proteína quinasa S6 ribosómica por estrés por contacto, frío y agua en *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 765-769; Zhu (2001) Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr Opin Plant Biol* 4: 401-406).

- 20 Para determinar la tolerancia a la sal, se esterilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* (blanqueado al 100%, 0.1% de Triton X durante 5 minutos dos veces y se enjuagó cinco veces con ddH₂O). Las semillas fueron colocadas en placas sobre medios no selectivos (1/2 MS, 0.6% de fitagar, 0.5g/L de MES, sacarosa al 1%, 2 µg/mL de benamil). Las semillas se dejaron germinar durante aproximadamente 10 días. En la etapa de la 4-5 hojas, las plantas transgénicas fueron sembradas en macetas de 5.5 cm de diámetro y se dejaron crecer (22°C, luz continua) durante aproximadamente siete días, regándose según fuera necesario. Para comenzar el ensayo, se agregó a la bandeja bajo las macetas NaCl 100 mM y MS 1/8. A la bandeja que contenía las plantas de control, se agregó 1/8 MS. Las concentraciones de suplementación con NaCl fueron incrementadas paso a paso en 50 mM cada 4 días hasta 200 mM. Después del tratamiento con sal con 200 mM, se determinaron los pesos fresco y seco de las plantas así como de las semillas producidas.

- 35 Para determinar la tolerancia al frío, se hicieron germinar y crecer semillas de las líneas transgénica y fría durante aproximadamente 10 días en la etapa de 4-5 hojas como se hizo anteriormente. Las plantas fueron transferidas entonces a temperaturas frías (5°C) y se cultivaron a través de las etapas de floración y brote de semillas del desarrollo. La fotosíntesis fue medida utilizando la fluorescencia de la clorofila como un indicador del rendimiento fotosintético en integridad de los fotosistemas. El rendimiento en semillas y el peso seco de la planta fueron medidos como indicador de la producción de biomasa de la planta.

Las plantas que tenían tolerancia por salinidad o frío tuvieron rendimientos en semillas, fotosíntesis y producción de materia seca más altas que las plantas susceptibles.

Ejemplo 4

- 45 Manipulación de plantas de alfalfa tolerantes al estrés por sobreexpresión de genes relacionados con el estrés de *Saccharomyces cerevisiae* o *E. coli* o *Brassica napus*, *Glycine Max* y *Oryza sativa*

- Un clon regenerante de alfalfa (*Medicago sativa*) fue transformado utilizando el método de (McKersie et al., 1999 *Plant Physiol* 119: 839-847). La regeneración y transformación de la alfalfa es dependiente del genotipo y por lo tanto se requiere una planta regenerante. Los métodos para obtener plantas regenerantes han sido descritos. Por ejemplo, pueden seleccionarse del cultivar Rangelander (Agriculture Canada) o cualquier otra variedad de alfalfa comercial tal como está descrita en Brown DC y A Atanassov (1985. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 4: 111-112). Alternativamente, la variedad RA3 (University of Wisconsin) ha sido seleccionada para su uso en cultivo de tejidos (Walker et al., 1978 *Am J Bot* 65: 654-659).

Los explantes de peciolo fueron cocultivados con un cultivo durante la noche de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1pMP 90 (McKersie et al., 1999 *Plant Physiol* 119: 839-847) o LBA4404 que contenían un vector binario. Se han descrito muchos diferentes sistemas de vectores binarios diferentes para la transformación de plantas (por ejemplo, An, G. in *Agrobacterium Protocols. Methods in Molecular Biology* vol 44, pp 47-62, Gartland KMA and MR Davey eds. Humana Press, Totowa, New Jersey). Muchos se basan en el vector pBIN19 descrito por Bevan (*Nucleic Acid Research*. 1984. 12:8711-8721) que incluye un casete de expresión en plantas franqueado por las secuencias de frontera izquierda y derecha del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. Un casete de expresión genética en plantas consiste de la menos dos genes - un gen marcador de selección y un promotor de planta que regula la transcripción del ADNc o ADN genómico del gen característico. Pueden utilizarse diversos genes marcadores de selección incluyendo el gen de *Arabidopsis* que codifica una enzima ácido acetohidroxi sintasa mutada (AHAS) (patentes de los Estados Unidos No 57673666, y 6225105). De la misma forma, pueden utilizarse diversos promotores para regular el gen característico que proporciona una regulación constitutiva, de desarrollo, de tejido o ambiental de la transcripción genética. En este ejemplo, el promotor 34S (números de acceso al GenBank M59930 y X 16673) fue utilizado para proveer la expresión constitutiva del gen característico.

Los explantes fueron cocultivados durante tres días en la oscuridad sobre medio de inducción SH que contenía 288 mg/L de pro, 53 mg/L de tioprolina, 4.35 g/L de K₂SO₄ y 100 µM de acetosiringinona. Los explantes fueron lavados en medio Murashige-Skoog de potencia media (Murashige and Skoog 1962) y se sembraron en placas sobre el mismo medio de inducción SH sin acetosiringinona pero con un agente de selección adecuado y un antibiótico adecuado para inhibir el crecimiento de *Agrobacterium*. Después de varias semanas los embriones somáticos fueron transferidos a un medio de desarrollo BOi2Y que no contenía reguladores del crecimiento, ni antibióticos, y contenía 50 g/L de sacarosa. Los embriones somáticos fueron germinados de forma subsecuente en un medio de Murashige-Skoog de potencia media. Las semillas con raíces fueron trasplantadas en macetas y cultivadas en un invernadero.

Las plantas transgénicas T0 fueron propagadas por cortes de nodos y se permitió que echaran raíces en un medio de crecimiento Turface. Las plantas fueron desfoliadas y cultivadas hasta una altura de aproximadamente 10 cm (aproximadamente 2 semanas después de la desfoliación). Las plantas fueron sometidas entonces a estrés por sequía en dos experimentos.

Para el primer experimento de sequía, los germinados no recibieron agua durante un periodo de hasta 3 semanas en el cual se desecaron la planta y el suelo. En varios tiempos después de la suspensión del agua, se reasumió una programación de riego. Una semana después de reasumir el riego, se determinaron los pesos fresco y seco de los brotes. En un grado equivalente de estrés por sequedad, las plantas tolerantes fueron capaces de reasumir un crecimiento normal mientras que las plantas susceptibles habían muerto o sufrieron lesiones significativas que dieron como resultado menor materia seca. El contenido de prolina de las hojas y la apertura estomatal también fueron medidas en diversos tiempos durante el estrés por sequía. Las plantas tolerantes mantuvieron un contenido de prolina más bajo y una apertura estomatal mayor que las plantas de control no transgénicas.

Un método alternativo para imponer estrés por agua sobre las plantas transgénicas fue un tratamiento con una solución a un potencial de agua específico, que contenía un osmólito tal como polietilén glicol (PEG). El tratamiento con PEG fue dado bien sea a hojas ya desprendidas (por ejemplo Djilianov et al., 1997 *Plant Sciencie* 129: 147-156) o a las raíces (Wakabayashi et al., 1997 *Plant Physiol* 113: 967-973). Puesto que el PEG puede ser tóxico, las plantas recibieron solamente una exposición a corto plazo. La respuesta fue medida como mediciones físicas tales como aperturas estomatal o potencial osmótico, o mediciones bioquímicas tales como acumulación de prolina. Las plantas tolerantes mantuvieron su apertura estomatal y mostraron solamente cambios ligeros en su potencial osmótico, mientras que las plantas de control no transgénicas susceptibles cerraron sus estomas y exhibieron potencial osmótico incrementado. Además los cambios en la prolina y otros metabolitos fueron menores en las plantas transgénicas tolerantes que en las plantas de control no transgénicas.

La tolerancia a la salinidad y el frío fueron medidas utilizando métodos como los descritos en el ejemplo 3. Las plantas que tenían tolerancia a la salinidad o el frío tuvieron rendimientos en semillas, fotosíntesis y producción de materia seca mayores que las plantas susceptibles.

Ejemplo 5

Manipulación de plantas de lolo tolerantes al estrés por sobreexpresión de genes relacionados con el estrés de *Saccharomyces cerevisiae* o *E. coli* o *Brassica napus*, *Glicina Max* y *Oryza sativa*

Las semillas de diferentes variedades de lolo fueron utilizadas como fuentes de explante para la transformación, incluyendo la variedad comercial Gunne disponible de la compañía de semillas Svalof Weibull o la variedad Affinity. Las semillas fueron esterilizadas en superficies secuencialmente con 1% de Tween-20 durante 1 minuto, se blanquearon al 100% durante 60 minutos, 3 enjuagues con 5 minutos cada uno con agua desionizada y destilada, y luego se germinaron durante 3-4 días sobre papel de filtro húmedo estéril en la oscuridad. Los germinados fueron esterilizados adicionalmente durante 1 minuto con Tween-20 al 1%, 5 minutos con blanqueador a 75% y se enjuagaron 3 veces con ddH₂O, 5 minutos cada uno. Las semillas esterilizadas en superficie fueron colocadas en el

medio de inducción de callus que contenía sales basales de Murashige y Skoog y vitaminas, 20 g/l de sacarosa, 150 mg/l de asparagina, 500 mg/l de hidrolizado de caseína, 3 g/l de Phytigel 10 mg/IBAP y 5 mg/l dicamba. Las placas fueron incubadas en la oscuridad a 25°C durante 4 semanas para germinación de las semillas e inducción del callus embriogénico.

5 Después de 4 semanas en el medio de inducción de callus, los brotes y raíces de los germinados fueron retirados por corte, el callus fue transferido a medio fresco, se mantuvo en cultivo durante otras 4 semanas y luego se transfirió a un medio MSO a la luz durante 2 semanas. Se drenaron varias piezas de callus (de 11-17 semanas de edad) a través de un tamiz de malla 10 y se colocaron sobre medio de inducción de callus, o se cultivaron en 100 ml de medio de inducción de callus líquido para lolio (el mismo medio usado para la inducción de callus con agar) en un
10 matraz de 250 ml. El matraz fue envuelto en una hoja y agitado 175 rpm en la oscuridad a 23°C durante una semana. El tamizado del cultivo líquido con un tamiz de malla 40 recolectó las células. La fracción recolectada sobre el tamiz fue colocada sobre placa y cultivada sobre medio de inducción de callus para lolio sólido durante una semana en la oscuridad a 25°C. Se transfirió entonces el callus y se cultivó en un medio MS que contenía 1% de sacarosa durante dos semanas.

15 La transformación puede lograrse bien sea con los métodos de Agrobacterium o de bombardeo de partículas. Se crea un vector de expresión que contiene un promotor constitutivo de plantas y el ADNc del gen en un vector pUC. El plásmido de ADN fue preparado a partir de células de E. coli utilizando el kit Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Aproximadamente se esparcieron 2 g del callus embriogénico en el centro de un papel de filtro estéril en una caja de Petri. Se agregó una alícuota de MSO líquido con 10 g/l de sacarosa al papel de filtro.
20 Se recubrieron partículas de oro (1.0 µM de tamaño) con el plásmido ADN de acuerdo con el método de Sanford et al., 1993 y se administraron al callus embriogénico con los siguientes parámetros: 500 µg de partículas y 2 µg de ADN por disparo, 1300 psi y a una distancia de objetivo de 8.5 cm desde la placa de detención hasta la placa de callus y un disparo por placa de callus.

25 Después del bombardeo, los callus fueron transferidos de regreso al medio de desarrollo de callus fresco y se mantuvieron en la oscuridad a temperatura ambiente durante un período de una semana. El callus fue transferido entonces a condiciones de crecimiento a la luz a 25°C para iniciar la diferenciación del embrión con el agente de selección apropiado, por ejemplo, 250 nM de Arsenal, 5 mg/l de PPT o 50 mg/L de kanamicina. Aparecieron los brotes resistentes a la selección y una vez brotaron raíces fueron transferidos al suelo.

30 Las muestras de las plantas transgénicas primarias (T0) se analizan por PCR para confirmar la presencia de ADN-T. Estos resultados se confirman por hibridación Southern en el cual el ADN se somete a electroforesis sobre un gel de agarosa al 1% y se transfiere a una membrana de nailon cargada positivamente (Roche Diagnostics). El kit de síntesis de sonda PCR DIG (Roche Diagnostics) se utiliza para preparar una sonda marcada con digoxigenina por PCR, y utilizada tal como lo recomienda el fabricante.

35 Las plantas de lolio transgénicas T0 fueron propagadas por vía vegetativa mediante la escisión de retoños. Los retoños trasplantados se mantuvieron en el invernadero durante 2 meses hasta que se establecieron adecuadamente. Los brotes fueron desfoliados y se dejaron crecer durante 2 semanas.

40 El primer experimento de sequía fue llevado a cabo de una manera similar al descrito en el ejemplo 3. Los germinados no recibieron agua durante un período de hasta 3 semanas tiempo en el cual la planta y el suelo estaban desecados. En varios tiempos después de la suspensión del agua, se reasumió una programación de riego normal. Una semana después de reasumir el riego, se determinaron las longitudes de las hojas, y los pesos fresco y seco de los brotes. En un grado equivalente de estrés por sequía, las plantas tolerantes fueron capaces de reasumir un crecimiento normal mientras que las plantas susceptibles habían muerto o sufrido lesiones significativas que dieron como resultado hojas más cortas y menos materia seca. El contenido de prolina de las hojas y la apertura estomatal se midieron también en diversos tiempos durante el estrés por sequía. Las plantas tolerantes mantuvieron
45 un contenido de prolina inferior y una apertura estomatal mayor que las plantas de control no transgénicas.

Un segundo experimento que imponía estrés por sequía sobre las plantas transgénicas fue por tratamiento con una solución de PEG como se describió en los ejemplos previos. La tolerancia a salinidad y el frío se midieron utilizando métodos como los descritos en el ejemplo 3. Las plantas que tenían tolerancia a la salinidad o el frío tuvieron mayor rendimiento de semillas fotosíntesis y producción de materia seca que las plantas susceptibles.

50 Ejemplo 6

Manipulación de plantas de soja tolerantes al estrés por sobreexpresión de genes relacionados con el estrés de Saccharomyces cerevisiae o E. coli o Brassica napus, Glicina Max y Oryza sativa

La soja fue transformada de acuerdo con la siguiente modificación del método descrito en la patente de Texas A&M US 5,164,310. Varias variedades comerciales de soja son adecuadas para la transformación por este método. El cultivar Jack (disponible de la Illinois Seed Foundation) se utiliza comúnmente para la transformación. Las semillas
55

5 fueron esterilizadas por inmersión en etanol al 70% (v/v) durante 6 minutos y en lejía comercial (NaOCl) al 25% complementada con 0.1% (v/v) de Tween durante 20 minutos, seguido por enjuague 4 veces con agua estéril doblemente destilada. Los germinados de 7 días fueron propagados removiendo el radículo, el hipocotilo y un cotiledón de cada germinado. Luego, el hipocotilo con un cotiledón fueron transferidos a un medio de germinación fresco en cajas de Petri y se incubaron a 25°C durante un fotoperíodo de 16 horas (aproximadamente 100 μ E-m-2s-1) durante 3 semanas. Se cortaron los nódulos axilares (aproximadamente 4 mM de longitud) de plantas de 3-4 semanas de edad. Los nódulos axilares fueron escindidos e incubados en cultivo de *Agrobacterium* LBA4404.

10 Muchos diferentes sistemas de vector binario han sido descritos para la transformación de plantas (por ejemplo, An, G in *Agrobacterium* Protocols. Methods in Molecular Biology vol 44, pp 47-62, Gartland KMA and MR Davey eds. Humana Press, Totowa, New Jersey). Muchos se basan en el vector pBIN19 descrito por Bevan (Nucleic Acid Research. 1984. 12:8711-8721) que incluye un casete de expresión genética en plantas flanqueado por las secuencias de frontera izquierda y derecha del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. Un casete de expresión genética en plantas consiste de al menos dos genes - un gen marcador de selección y un promotor de las plantas que regula la transcripción del ADNc o de la ADN genómico del gen característico. Pueden utilizarse diversos genes marcadores de selección incluyendo el gen de *Arabidopsis* que codifica una enzima ácido acetohidroxisintasa (AHAS) mutada (patentes de los Estados Unidos No 57673666 y 6225105). De la misma forma, pueden utilizarse diversos promotores para regular el gen característico para proveer una regulación constitutiva, de desarrollo, de tejido o ambiental de la transcripción del gen. En este ejemplo, el promotor 34S (números de acceso GenBank M59930 y X16673) fue utilizado para proveer la expresión constitutiva del gen característico.

20 Después del tratamiento de cocultivo, los explantes fueron lavados y transferidos a un medio de selección suplementado con 500 mg/l de timetina. Los brotes fueron escindidos y colocados en un medio de elongación de brotes. Los brotes superiores más largos de 1 cm fueron colocados sobre un medio para generación de raíces durante 2 a 4 semanas antes de trasplantarlos a suelo.

25 Las plantas transgénicas primarias (T0) fueron analizadas por PCR para confirmar la presencia de T-ADN. Estos resultados fueron confirmados por hibridación Southern en la cual se sometió el ADN a electroforesis sobre un gel de agarosa al 1% y se transfirieron a una membrana de nailon cargada positivamente (Roche Diagnostics). Se utilizó el kit de síntesis de sonda PCR DIG (Roche Diagnostics) para preparar una sonda marcada con digoxigenina por PCR, y se utilizó tal como lo recomendó el fabricante.

30 Las plantas tolerantes tenían rendimientos en semillas más altos, mantuvieron su apertura estomatal y mostraron solamente cambios ligeros en el potencial osmótico y en los niveles de prolina, mientras que las plantas de control no transgénicas susceptibles cerraron sus estomas y exhibieron un potencial osmótico y niveles de prolina incrementados.

35 La tolerancia a la sequedad, salinidad y frío fueron medidas utilizando métodos como los descritos en el ejemplo 3. Las plantas que tenían tolerancia a la salinidad o al frío tenían rendimientos de semillas, fotosíntesis y producción de materia seca más altos que las plantas susceptibles.

Ejemplo 7

Manipulación de plantas de colza/canola tolerantes al estrés por sobreexpresión de genes relacionados con el estrés de *Saccharomyces cerevisiae* o *E. coli* o *Brassica napus*, *Glicina Max* y *Oryza sativa*

40 Peciolos e hipocotiledones de cotiledones desgerminados jóvenes de 5-6 días de edad se utilizaron como explantes para cultivo de tejidos y se transformaron de acuerdo con Babic et al. (1998, Plant Cell Rep 17: 183-188). El cultivar comercial Westar (Agriculture Canada) es la variedad estándar utilizada para la transformación, pero pueden usarse otras variedades.

45 Se utilizó *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 que contenía un vector binario para la transformación de la canola. Se han descrito muchos sistemas de vectores binarios diferentes para la transformación de plantas (por ejemplo, An, G. in *Agrobacterium* Protocols. Methods in Molecular Biology vol 44, pp 47-62, Gartland KMA and MR Davey eds. Humana Press, Totowa, New Jersey) muchos están basados en el vector pBIN19 descrito por Bevan (Nucleic Acid Research. 1984. 12:8711-8721) que incluye un casete de expresión genética en plantas flanqueado por las secuencias de frontera izquierda y derecha del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. Un casete de expresión genética en plantas consiste de al menos dos genes - un gen marcador de selección y un promotor de las plantas que regula la transcripción del ADNc o de la ADN genómico del gen característico. Pueden utilizarse diversos genes marcadores de selección incluyendo el gen de *Arabidopsis* que codifica una enzima ácido acetohidroxisintasa (AHAS) mutada (patentes de los Estados Unidos No 57673666 y 6225105). De la misma forma, pueden utilizarse diversos promotores para regular el gen característico para proveer una regulación constitutiva, de desarrollo, de tejido o ambiental de la transcripción del gen. En este ejemplo, el promotor 34S (números de acceso GenBank M59930 y X16673) fue utilizado para proveer la expresión constitutiva del gen característico.

5 Las semillas de canola fueron esterilizadas en superficie en etanol al 70% durante 2 minutos, y luego en Clorox al 30% con una gota de Tween-20 durante 10 minutos, seguido por 3 enjuagues con agua destilada esterilizada. Las semillas fueron germinadas in vitro durante 5 días en un medio MS de fuerza media sin hormonas, sacarosa al 1%, 0.7% de Phytagar a 23°C, con 16 horas de luz. Los explantes de peciolo del cotiledón y el cotiledón anexo fueron escindidos de los germinados in vitro e inoculados con *Agrobacterium* sumergiendo el extremo cortado del explante de peciolo en la suspensión bacteriana. Los explantes fueron cultivados entonces durante dos días sobre medio MSBAP-3 que contenían 3 mg/l de BAP, 3% de sacarosa, 0.7% de Phytagar a 23°C, durante 16 horas de luz. Después de dos días de cultivo con *Agrobacterium*, los explantes de peciolo fueron transferidos a medio MSBAP-3 que contenía 3 mg/l de BAP, cefotaxima, carbenicilina o timentina (300 mg/l) durante 7 días, y luego se cultivaron sobre medio MSBAP-3 con cefotaxima, carbenicilina o timentina y agente de selección hasta la regeneración del brote. Cuando los brotes tenían 5-10 mm de longitud, fueron cortados y transferidos a un medio de elongación de brotes (MSBAP-0.5, que contenía 0.5 mg/l de BAP). Los brotes de aproximadamente 2 cm de longitud fueron transferidos al medio de generación de raíces (MS0) para la inducción de raíces.

15 Las muestras de las plantas transgénicas primarias (T0) fueron analizadas por PCR para confirmar la presencia de T-ADN. Estos resultados fueron confirmados por hibridación Southern en la cual el ADN se somete a electroforesis sobre gel de agarosa al 1% y se transfiere a una membrana de nylon cargada positivamente (Roche Diagnostics). Se utilizó el kit de síntesis de sonda PCR DIG (Roche Diagnostics) para preparar una sonda marcada con digoxigenina por PCR, y se utilizó tal como lo recomendó el fabricante.

20 Las plantas transgénicas fueron evaluadas entonces en cuanto a su tolerancia individual mejorada de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 3. Las plantas tolerantes tenían rendimientos de semillas superiores, mantenían su apertura estomatal y mostraron solamente cambios ligeros en el potencial osmótico y los niveles de prolina, mientras que las plantas de control no transgénicas susceptibles cerraron sus estomas y exhibieron potencial osmótico y niveles de prolina incrementados.

25 La tolerancia a la sequía, salinidad y frío se midió utilizando métodos como los descritos en el ejemplo 3 anterior. Las plantas que tenían tolerancia a la salinidad o el frío tuvieron rendimientos de semillas, fotosíntesis y producción de materia seca más altas que las plantas susceptibles.

Ejemplo 8

Manipulación de plantas de maíz tolerantes al estrés por sobreexpresión de genes relacionados con el estrés de *Saccharomyces cerevisiae* o *E. coli* o *Brassica napus*, *Glicina Max* y *Oriza sativa*

30 La transformación de maíz (*Zea Mays L.*) se lleva a cabo con una modificación del método descrito Ishida et al. (1996. *Nature Biotech* 14745-50). La transformación es dependiente del genotipo en el maíz y solamente algunos genotipos específicos son adecuados para la transformación y regeneración. La línea endógama A188 (University of Minnesota) o híbridos con A188 como padres son buenas fuentes de material donante para la transformación (Fromm et al. 1990 *Biotech* 8:833-839), pero pueden utilizarse otros genotipos exitosamente también. Se recolectan las espigas a partir de plantas de maíz en aproximadamente 11 días después de la polinización (DAP) cuando la longitud de los embriones inmaduros es aproximadamente 1 a 1.2mm. Los embriones inmaduros son cocultivados con *Agrobacterium tumefaciens* que portan vectores "superbinarios" y las plantas transgénicas se recuperan a través de organogénesis. El sistema de vector superbinario de Japan Tobacco está descrito en las patentes WO 94/00977 y WO 95/06722. Los vectores fueron construidos como se describe. Pueden utilizarse diversos genes marcadores de selección incluyendo el gen del maíz que codifica una enzima ácido acetohidroxi sintasa (AHAS) mutada (patente de los Estados Unidos 6025541). De la misma forma, pueden utilizarse diversos promotores para regular el gen característico para proveer una regulación constitutiva, de desarrollo, de tejido o ambiental de la transcripción del gen. En este ejemplo, el promotor 34S (números de acceso al GenBank M59930 y X16673) fue utilizado para proveer la expresión constitutiva del gen característico.

45 Los embriones escindidos se cultivan sobre medio de inducción de callus, luego sobre medio de regeneración para maíz, que contiene imidasolinona como agente de selección. Las placas de Petri se incuban a la luz a 25°C durante 2-3 semanas, o hasta que se desarrollen los brotes. Los brotes verdes son transferidos desde cada embrión a un medio de formación de raíces de maíz y se incuban a 25°C durante 2-3 semanas, hasta que se desarrollen las raíces. Los brotes con raíces son trasplantados a suelo en el invernadero. Se producen semillas T1 a partir de plantas que exhiban tolerancia a los herbicidas de imidasolinona y que sean positivos en PCR para los transgenes.

55 Las plantas T1 transgénicas fueron evaluadas entonces en cuanto a su tolerancia mejorada al estrés de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 3. La generación T1 de inserciones en sitio individual del T-ADN segregaran para el transgén en una proporción 3:1. Esta progenie que contiene una o dos copias del transgén son tolerantes al herbicida imidasolinona, y exhiben mayor tolerancia al estrés por sequía que la progenie que carece de los transgenes. Las plantas tolerantes tienen rendimientos en semillas superiores, mantuvieron su apertura estomatal mientras que las plantas de control no transgénicas susceptibles cerraron sus estomas y exhibieron potencial osmótico y niveles de prolina incrementados. Las plantas T2 homocigóticas exhibieron fenotipos similares. Las

plantas híbridas (progenie F1) de plantas transgénicas homocigóticas y plantas no transgénicas exhibieron también tolerancia al estrés ambiental incrementada.

5 La tolerancia a la salinidad y el frío se midieron utilizando métodos como los descritos en el ejemplo previo 3. Las plantas que tenían tolerancia a la sequía, salinidad o frío tenían rendimientos en semillas, fotosíntesis y producción de materia seca superiores a las plantas susceptibles.

Ejemplo 9

Manipulación de plantas de trigo tolerantes al estrés por sobreexpresión de genes relacionados con el estrés de *Saccharomyces cerevisiae* o *E. coli*, *Brassica napus*, *Glicina Max* y *Oryza sativa*

10 La transformación del trigo se lleva a cabo con el método descrito por Ishida et al., (1996 Nature Biotech 14745-50). El cultivar Bobwhite (disponible de CYMMIT, Mexico) se utiliza comúnmente en la transformación. Los embriones inmaduros son cocultivados con *Agrobacterium tumefaciens* que portan vectores "superbinarios" y las plantas transgénicas se recuperan a través de organogénesis. El sistema de vector superbinario de Japan Tobacco está descrito en las patentes WO 94/00977 y WO 95/06722. Los vectores fueron construidos como se describe. Pueden utilizarse diversos genes marcadores de selección incluyendo el gen del maíz que codifica una enzima ácido acetohidroxi sintasa (AHAS) mutada (patente de los Estados Unidos 6025541). De la misma forma, pueden utilizarse diversos promotores para regular el gen característico para proveer una regulación constitutiva, de desarrollo, de tejido o ambiental de la transcripción del gen. En este ejemplo, el promotor 34S (números de acceso al GenBank M59930 y X16673) fue utilizado para proveer la expresión constitutiva del gen característico.

20 Después de la incubación con *Agrobacterium*, los embriones se cultivan sobre medio de inducción de callus, luego en medio de regeneración, incluyendo imidasolinona como agente de selección. Las placas de Petri se incuban a la luz a 25°C durante 2-3 semanas, o hasta que se desarrollen los brotes. Los brotes verdes se transfieren de cada embrión a un medio para generación de raíces y se incuban a 25°C durante 2-3 semanas hasta que se desarrollen las raíces. Los brotes con raíces son trasplantados a suelo en el invernadero. Las semillas T1 se producen a partir de plantas que exhiben tolerancia a los herbicidas de imidasolinona y los cuales son positivos en PCR para los transgenes

30 Las plantas T1 transgénicas fueron evaluadas entonces en cuanto a su tolerancia mejorada al estrés de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 3. La generación T1 de inserciones en sitio individual del T-ADN segregaran para el transgén en una proporción 3:1. Esta progenie que contiene una o dos copias del transgén son tolerantes al herbicida imidasolinona, y exhiben mayor tolerancia al estrés por sequía que la progenie que carece de los transgenes. Las plantas tolerantes tienen rendimientos en semillas superiores, mantuvieron su apertura estomatal mientras que las plantas de control no transgénicas susceptibles cerraron sus estomas y exhibieron potencial osmótico y niveles de prolina incrementados. Las plantas T2 homocigóticas exhibieron fenotipos similares. Las plantas híbridas (progenie F1) de plantas transgénicas homocigóticas y plantas no transgénicas exhibieron también tolerancia al estrés ambiental incrementada. La tolerancia a la salinidad y el frío se midieron utilizando métodos como los descritos en el ejemplo previo 3. Las plantas que tenían tolerancia a la sequía, salinidad o frío tenían rendimientos en semillas, fotosíntesis y producción de materia seca superiores a las plantas susceptibles.

Ejemplo 14

Identificación de genes idénticos y heterólogos

40 Las secuencias genéticas pueden utilizarse para identificar genes idénticos o heterólogos a partir de ADNc o de bibliotecas genómicas. Los genes idénticos (clones de ADNc de longitud completa por ejemplo) pueden aislarse a través de hibridación de ácidos nucleicos utilizando por ejemplo bibliotecas de ADNc. Dependiendo de la abundancia del gen de interés, se colocan en placas desde 100000 hasta 1000000 de bacteriófagos recombinantes y se transfieren a membranas de nylon. Después de la desnutrición con álcali, el ADN se inmoviliza sobre la membrana por ejemplo mediante entrecruzamiento por UV. La hibridación se lleva a cabo en condiciones de alta restricción. En solución acuosa, la hibridación y el lavado se llevan a cabo a una fuerza iónica de 1 M de NaCl y a una temperatura de 68°C. Las sondas de hibridación se generan mediante por ejemplo, etiquetado con transcripción con muesca de (³²P) radiactivo (High Prime, Roche, Mañean, Alemania). Las señales se detectan por autorradiografía.

50 Los genes idénticos o heterólogos que están relacionados pero no son idénticos pueden identificarse de una forma análoga al procedimiento antes descrito utilizando hibridación de baja restricción y condiciones de lavado. Para hibridación acuosa, la fuerza iónica se mantiene normalmente a 1 M de NaCl mientras que la temperatura baja progresivamente desde 68 hasta 42°C.

El aislamiento de las secuencias genéticas con homología (o identidad/similaridad en secuencia) solamente en un dominio distinto de (por ejemplo 10-20 aminoácidos) puede llevarse a cabo utilizando sondas de oligonucleótidos

5 sintéticos radiomarcados. Los oligonucleótidos radiomarcados se preparan por fosforilación del extremo 5-prima de dos oligonucleótidos complementarios con la polinucleótido quinasa T4. Los oligonucleótidos complementarios se fusionan y ligan para formar concatémeros. Los concatémeros de doble cadena son radiomarcados, por ejemplo, mediante transcripción de muescas. La hibridización se lleva a cabo normalmente en condiciones de baja restricción utilizando altas concentraciones de oligonucleótidos.

Solución de hibridación de oligonucleótidos:

6 x SSC

Fosfato de sodio 0.01 M

EDTA 1 mM (pH 8)

10 SDS al 0.5 %

100 µg/ml de ADN de esperma desnaturalizado de salmón

Leche no grasa seca al 0.1%

15 Durante la hibridización, la temperatura se baja paso a paso hasta 5-10°C por debajo de T_m estimada de los oligonucleótidos o hasta temperatura ambiente seguida por etapas de lavado y autorradiografía. El lavado se lleva a cabo con baja restricción tal como 3 etapas de lavado utilizando 4 x SSC. Se describe en detalles adicionales 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 15

Identificación de genes idénticos por bibliotecas de expresión de selección con anticuerpos

20 Los clones de ADNc pueden utilizarse para producir un polipéptido recombinante por ejemplo en *E. coli* (por ejemplo, sistema Qiagen QIAexpress pQE). Los polipéptidos recombinantes son purificados normalmente luego por afinidad a través de cromatografía de afinidad Ni-NTA (Qiagen). Los polipéptidos recombinantes se utilizan entonces para producir anticuerpos específicos por ejemplo utilizando técnicas estándar para la inmunización de conejos. Los anticuerpos son purificados por afinidad utilizando una columna de Ni-NTA saturada con el antígeno recombinante tal como lo describe Gu et al., 1994, *BioTechniques* 17:257-262. El anticuerpo puede utilizarse entonces para seleccionar las bibliotecas de expresión de ADNc para identificar genes idénticos 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 16

30 Mutagénesis In vivo

35 La mutagénesis in vivo de microorganismos puede llevarse a cabo mediante el paso de plásmidos (u otro vector) de ADN a través de *E. coli* u otros microorganismos (por ejemplo, *Bacillus* spp. o levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*), que están impedidas en sus capacidades para mantener la integridad de su información genética. Las cepas mutadoras típicas tienen mutaciones en los genes para el sistema de reparación de ADN (por ejemplo, *mutHLS*, *mutD*, *mutT*, etc.; para referencia, véase Rupp W.D., 1996, DNA repair mechanisms, in: *Escherichia coli and Salmonella*, p. 2277-2294, ASM: Washington). Tales cepas son bien conocidas para los experimentados en la técnica. El uso de tales cepas se ilustra, por ejemplo, en Greener, A. and Callahan, M., 1994, *Strategies* 7: 32-34. La transferencia de moléculas de ADN mutadas en plantas se hace preferiblemente después de la selección y prueba en microorganismos. Las plantas transgénicas se generan de acuerdo con diversos ejemplos dentro de la ejemplificación de este documento.

Ejemplo 17

Identificación y análisis de Homólogos de YNL090W

45 Las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan YNL 090W (ORF 3165) vivieron 4.33 días más que los controles tipo silvestre bajo condiciones de sequía. La secuencia de proteínas de YNL090W se utilizó para identificar secuencias de genes relacionadas de bibliotecas originales de marcadores de secuencia expresados (EST) construidas a partir de *Oryza sativa* cv. Noppon-Brarre (a japonica rice), *Brassica napus* cv. "AC Excel" "Quantum"

and "Cresor" (canola), and *Glicina max* cv. Resuick (soybean) by Blast analysis (Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990 J Mol Biol 21593:403-10).

5 Las secuencias de ANDc de las plantas fueron traducidas en secuencias de aminoácidos predicadas, y se determinó la relación entre las secuencias de aminoácidos por alineación secuencial utilizando el algoritmo de agrupamiento W en Vector NTI Versión 7 (Figura 1-1).

10 Tenían una similaridad global del 75%. En general, las proteínas conservaron los dominios denominados como I (GXXXGKT), II (DXXG), III (VGTK), IV (EXSS), y E (FXXXYXX), clasificadas como GTPasas. Todos los cinco dominios en las proteínas de la Figura 1 están mejor conservados que en otras GTPasas pequeñas conocidas, particularmente Dominio I (KXVXXGDXXXGKT) (SEQ ID NO: 557), Dominio E (FXXXYXXTV) (SEQ ID NO: 558), Dominio II (WDTAGQE) (SEQ ID NO: 559) y el Dominio III (VGTKXDL) (SEQ ID NO: 560). Además, los aminoácidos polibásicos en terminales C se muestran en la Figura 1-1, así como el dominio CAAL en terminal C (donde A es un aminoácido alifático), el cual es la secuencia de identificación para la modificación postranslacional de la enzima geranilgeraniltransferasa I. Otra característica importante específica de Rho mostrada en la mayoría de las proteínas de la Figura 1-1 son los aminoácidos altamente conservados entre el Dominio II y el Dominio III.

15 SECUENCIAS

<110> BASF

<120> Secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas asociadas con la respuesta a estrés abiótico y células vegetales y plantas con tolerancia incrementada al estrés ambiental

<130> BASF/NAE 141

20 <210> 1

<211> 1143

<212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

25 <221> CDS

<222> (1)..(1143)

<400> 1

ES 2 368 915 T3

ctg tat ttc tta tgg aca tat tcg tac ata ttc cga gaa cgc acc tta	288
Leu Tyr Phe Leu Trp Thr Tyr Ser Tyr Ile Phe Arg Glu Arg Thr Leu	
85 90 95	
gga aag caa gtt tct caa ttt gct aaa gag atc att aca aat act ccg	336
Gly Lys Gln Val Ser Gln Phe Ala Lys Glu Ile Ile Thr Asn Thr Pro	
100 105 110	
ggt ata gac act gaa gac tgg gaa cgt gtt gca gta aat ttc aat tct	384
Gly Ile Asp Thr Glu Asp Trp Glu Arg Val Ala Val Asn Phe Asn Ser	
115 120 125	
tat tta tat gaa aat aaa ctt tgg aat act gag tac ttt ttt ttt gat	432
Tyr Leu Tyr Glu Asn Lys Leu Trp Asn Thr Glu Tyr Phe Phe Phe Asp	
130 135 140	
ggt tcc agc tgc caa gaa gcg ttc aga aag atg ctt ctt gag cca ttt	480
Gly Ser Ser Cys Gln Glu Ala Phe Arg Lys Met Leu Leu Glu Pro Phe	
145 150 155 160	
tcc ttg aaa aaa aat gac ttt gct aat gcc aag gta cct gac gga tct	528
Ser Leu Lys Lys Asn Asp Phe Ala Asn Ala Lys Val Pro Asp Gly Ser	
165 170 175	
ggt tgt tac act gaa aaa gct ttg cag gtt tat ttt aca cag ata gag	576
Val Cys Tyr Thr Glu Lys Ala Leu Gln Val Tyr Phe Thr Gln Ile Glu	
180 185 190	
aga aaa tgg cac tgg att aat tct gaa gga ttt tta cac aat aaa acc	624
Arg Lys Trp His Trp Ile Asn Ser Glu Gly Phe Leu His Asn Lys Thr	
195 200 205	
aca cag agt gtt caa ttt tcg aaa cat ggt tac ggt tcc aaa ctt ctc	672
Thr Gln Ser Val Gln Phe Ser Lys His Gly Tyr Gly Ser Lys Leu Leu	
210 215 220	
tgg gct ttc aag gaa gtg aca ata atg aat tca cgc ttt gcg ttc ttc	720
Trp Ala Phe Lys Glu Val Thr Ile Met Asn Ser Arg Phe Ala Phe Phe	
225 230 235 240	
agt att gct tac tta aac ggt ctc ctt act ata cca aga cta aga aat	768

ES 2 368 915 T3

Ser Ile Ala Tyr Leu Asn Gly Leu Leu Thr Ile Pro Arg Leu Arg Asn
 245 250 255

tca ctg cat atc ctc tat gta tgt gca gtt ctt tca tct atg ata att 816
 Ser Leu His Ile Leu Tyr Val Cys Ala Val Leu Ser Ser Met Ile Ile
 260 265 270

gaa tat tta ata ggg atc gac aaa ttc agg ttc aaa tca atg aat ctg 864
 Glu Tyr Leu Ile Gly Ile Asp Lys Phe Arg Phe Lys Ser Met Asn Leu
 275 280 285

ata cat aaa cta cag ttc ttg tca tat att aca tgt gga cac gag aag 912
 Ile His Lys Leu Gln Phe Leu Ser Tyr Ile Thr Cys Gly His Glu Lys
 290 295 300

tct gat gca act aat tgg tct caa att gcg aag agg acg aat act tac 960
 Ser Asp Ala Thr Asn Trp Ser Gln Ile Ala Lys Arg Thr Asn Thr Tyr
 305 310 315 320

atg ttt gag cag aaa att tgg aat tcg cca ata ctg ttc tca gat ggt 1008
 Met Phe Glu Gln Lys Ile Trp Asn Ser Pro Ile Leu Phe Ser Asp Gly
 325 330 335

att gat tgt gaa aag ttt ttt aaa tgg tat ttc agt acc cct gta tct 1056
 Ile Asp Cys Glu Lys Phe Phe Lys Trp Tyr Phe Ser Thr Pro Val Ser
 340 345 350

tcg caa gcg tct ttg tca gtt ggt tcc act gat ttt gaa ctc tgg cca 1104
 Ser Gln Ala Ser Leu Ser Val Gly Ser Thr Asp Phe Glu Leu Trp Pro
 355 360 365

tat ata aaa gaa gca caa tca gct tgc aat gat gtg taa 1143
 Tyr Ile Lys Glu Ala Gln Ser Ala Cys Asn Asp Val
 370 375 380

<210> 2

<211> 380

5 <212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 2

ES 2 368 915 T3

Met Asp Gly Ala Lys Phe Glu Asn Thr Val Ala Phe Leu Pro Ser Glu
1 5 10 15

Ile Phe Asp Cys Tyr Asn Ser Thr Leu Pro Lys Asn Val Phe Arg Ser
20 25 30

Phe Val Thr Trp Ser Cys Tyr Glu Lys Phe Asn Ser Leu Glu Phe Arg
35 40 45

Thr Trp Leu Leu Met Trp Leu Pro Leu Ile Ile Ala Trp Lys Ile Arg
50 55 60

Gly Lys Arg His Tyr Leu Val Ile Val Thr Ala Leu Met Phe Glu Val
65 70 75 80

Leu Tyr Phe Leu Trp Thr Tyr Ser Tyr Ile Phe Arg Glu Arg Thr Leu
85 90 95

Gly Lys Gln Val Ser Gln Phe Ala Lys Glu Ile Ile Thr Asn Thr Pro
100 105 110

Gly Ile Asp Thr Glu Asp Trp Glu Arg Val Ala Val Asn Phe Asn Ser
115 120 125

Tyr Leu Tyr Glu Asn Lys Leu Trp Asn Thr Glu Tyr Phe Phe Phe Asp
130 135 140

Gly Ser Ser Cys Gln Glu Ala Phe Arg Lys Met Leu Leu Glu Pro Phe
145 150 155 160

Ser Leu Lys Lys Asn Asp Phe Ala Asn Ala Lys Val Pro Asp Gly Ser
165 170 175

Val Cys Tyr Thr Glu Lys Ala Leu Gln Val Tyr Phe Thr Gln Ile Glu
180 185 190

Arg Lys Trp His Trp Ile Asn Ser Glu Gly Phe Leu His Asn Lys Thr
195 200 205

Thr Gln Ser Val Gln Phe Ser Lys His Gly Tyr Gly Ser Lys Leu Leu
210 215 220

ES 2 368 915 T3

Trp Ala Phe Lys Glu Val Thr Ile Met Asn Ser Arg Phe Ala Phe Phe
 225 230 235 240

Ser Ile Ala Tyr Leu Asn Gly Leu Leu Thr Ile Pro Arg Leu Arg Asn
 245 250 255

Ser Leu His Ile Leu Tyr Val Cys Ala Val Leu Ser Ser Met Ile Ile
 260 265 270

Glu Tyr Leu Ile Gly Ile Asp Lys Phe Arg Phe Lys Ser Met Asn Leu
 275 280 285

Ile His Lys Leu Gln Phe Leu Ser Tyr Ile Thr Cys Gly His Glu Lys
 290 295 300

Ser Asp Ala Thr Asn Trp Ser Gln Ile Ala Lys Arg Thr Asn Thr Tyr
 305 310 315 320

Met Phe Glu Gln Lys Ile Trp Asn Ser Pro Ile Leu Phe Ser Asp Gly
 325 330 335

Ile Asp Cys Glu Lys Phe Phe Lys Trp Tyr Phe Ser Thr Pro Val Ser
 340 345 350

Ser Gln Ala Ser Leu Ser Val Gly Ser Thr Asp Phe Glu Leu Trp Pro
 355 360 365

Tyr Ile Lys Glu Ala Gln Ser Ala Cys Asn Asp Val
 370 375 380

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula vegetal transformada con tolerancia y/o resistencia incrementada a la sequía en comparación con una célula vegetal tipo silvestre no transformada, y donde la célula vegetal transgénica es transformada por un ácido nucleico que codifica una Proteína Relacionada con el Estrés (SRP) y sobreexpresa dicho ácido nucleico que se selecciona del grupo consistente de:
- a) molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 2, el cual confiere una tolerancia incrementada a la sequía en comparación con una variedad tipo silvestre de la célula huésped;
- b) molécula de ácido nucleico que comprende la molécula de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 1;
- 10 c) molécula de ácido nucleico cuya secuencia puede deducirse a partir de una secuencia de polipéptidos codificada por una molécula de ácido nucleico de (a) o (b) como resultado de la degeneración del código genético y que confiere una tolerancia incrementada a la sequía en comparación con una variedad tipo silvestre de la célula huésped;
- 15 d) molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos 80% de identidad con la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de (a) a (c) y que confiere una tolerancia incrementada a la sequía en comparación con una variedad tipo silvestre de la célula huésped;
- e) molécula de ácido nucleico que hibridiza con una molécula de ácido nucleico de (a) a (c) bajo condiciones de hibridización restrictivas y que confiere una tolerancia incrementada a la sequía en comparación con una variedad tipo silvestre de la célula huésped;
- 20 o que comprende una secuencia que es complementaria a la misma.
2. La célula vegetal transgénica de la reivindicación 1 derivada de una planta monocotiledónea o de una planta dicotiledónea.
3. Una planta transgénica generada a partir de una célula vegetal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y que es una planta monocotiledónea o dicotiledónea.
- 25 4. Una semilla producida por una planta transgénica de cualquiera de la reivindicación 3, donde la semilla es genéticamente homocigótica para un transgén que confiere una tolerancia incrementada a la sequía en comparación con la planta tipo silvestre correspondiente no transformada.
5. Un constructo de ácido nucleico que confiere la expresión de la molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo consistente de:
- 30 a) molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 2, el cual confiere una tolerancia incrementada a la sequía en comparación con una variedad tipo silvestre de la célula huésped;
- b) molécula de ácido nucleico que comprende la molécula de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 1;
- c) molécula de ácido nucleico cuya secuencia puede deducirse a partir de una secuencia de polipéptidos codificada por una molécula de ácido nucleico de (a) o (b) como resultado de la degeneración del código genético y que confiere una tolerancia incrementada a la sequía en comparación con una variedad tipo silvestre de la célula huésped;
- 35 d) molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos 80% de identidad con la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de (a) a (c) y que confiere una tolerancia incrementada a la sequía en comparación con una variedad tipo silvestre de la célula huésped;
- 40 e) molécula de ácido nucleico que hibridiza con una molécula de ácido nucleico de (a) a (c) bajo condiciones de hibridización restrictivas y que confiere una tolerancia incrementada a la sequía en comparación con una variedad tipo silvestre de la célula huésped;
- que comprende uno o más elementos reguladores, mediante lo cual la sobreexpresión del ácido nucleico que codifica la SRP en una célula huésped da como resultado una tolerancia incrementada a la sequía en comparación con una célula huésped tipo silvestre correspondiente no transformada.
- 45

6. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 1 o el constructo de ácido nucleico de la reivindicación 5, mediante lo cual la expresión del ácido nucleico que codifica la SRP en una célula huésped da como resultado una tolerancia incrementada a la sequía en comparación con una célula huésped tipo silvestre correspondiente no transformada.
- 5 7. Una célula huésped, que ha sido transformada de forma estable o transiente con el vector tal como se reivindica en la reivindicación 6 o la molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 1 o el constructo de ácido nucleico de la reivindicación 5.
8. Un método para producir una planta transgénica con un ácido nucleico que codifica SRP, donde la sobreexpresión del ácido nucleico en la planta da como resultado una tolerancia y/o resistencia incrementadas a las sequías, que comprende
- 10 transformar una célula vegetal con un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 6 y generar a partir de la célula vegetal una planta transgénica con una tolerancia incrementada a la sequía en comparación con una planta tipo silvestre correspondiente no transformada.
9. El método de la reivindicación 8, donde el ácido nucleico que codificación SRP se selecciona del grupo que comprende los ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1 y/o homólogos, el cual es al menos 80% homólogo a los ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1 .
- 15 10. Un método para incrementare la tolerancia a la sequía de una planta que comprende: transformar una planta con un ácido nucleico seleccionado del grupo consistente de:
- a. una secuencia de ácido nucleico de SEC ID NO: 1;
- 20 b. un polinucleótido que codifica un polipéptido de SEQ ID NO: 2;
- c. un polinucleótido que tiene al menos 80% de identidad en secuencia con una secuencia de ácido nucleico de SEC ID NO: 1, donde la sobreexpresión de dicho polinucleótido confiere tolerancia incrementada a la sequía en una planta en comparación con una planta correspondiente no transformada, y
- 25 d. un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones restrictivas a una secuencia de ácido nucleico de SEC ID NO: 1, donde la sobreexpresión de dicho polinucleótido confiere tolerancia incrementada a la sequía en una planta en comparación con una planta correspondiente no transformada.
11. El método de la reivindicación 8-10, donde se utiliza un vector de sobreexpresión de acuerdo con la reivindicación 6.
- 30 12. Una célula vegetal que comprende un constructo de ácido nucleico de la reivindicación 5 o un vector de la reivindicación 6.
13. Una planta que comprende una célula de la reivindicación 12.

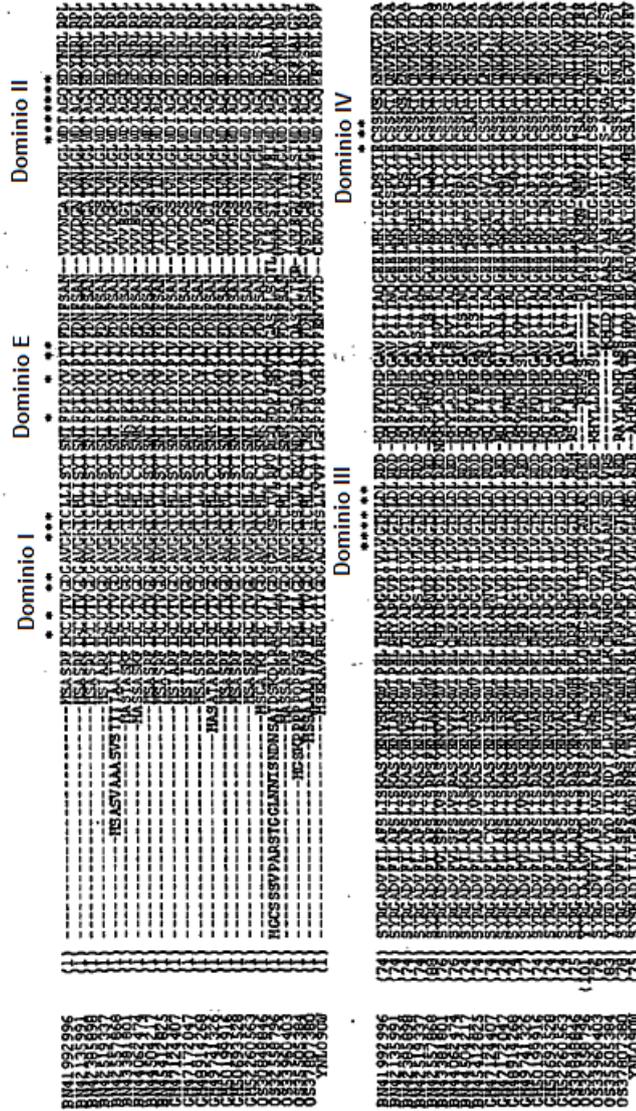


Figura 2. Alineamiento de proteína de GTPasas pequeñas de *Oryza sativa* cv. Nippon-Baer (un arroz japonés), *Brassica napus* cv "AC Excel" "Quantum" y "Cresor" (canola) y *Glycine max* cv. Resnick (soja). En rojo se representan los aminoácidos idénticos. Azul indica identidad en la mayor parte de las secuencias. Verde señala que los aminoácidos muestran características similares.

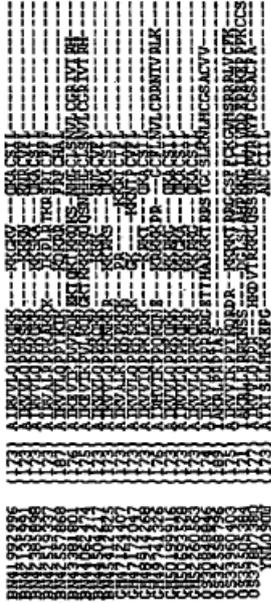


Figura 1-1