

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 607**

51 Int. Cl.:
C12N 15/29 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 5/14 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05819963 .9**
96 Fecha de presentación: **20.12.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1835028**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.09.2007**

54 Título: **EL GEN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN OSNACX DEL ARROZ Y SU USO PARA MEJORAR LA TOLERANCIA DE LAS PLANTAS A LA SEQUÍA Y LA SAL.**

30 Prioridad:
21.12.2004 CN 200410061408

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.01.2012

73 Titular/es:
**HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY
SHIZISHAN STREET, 1
WUHAN, HUBEI 430070, CN**

72 Inventor/es:
**HU, Honghong y
XIONG, Lizhong**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 372 607 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

El gen del factor de transcripción OsNACx del arroz y su uso para mejorar la tolerancia de las plantas a la sequía y la sal.

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un polinucleótido aislado capaz de dar a una planta tolerancia al estrés por sequía y/o sal, que comprende una secuencia de polinucleótidos como se muestra en la SEC ID N.º: 1 capaz de dar a una planta tolerancia al estrés por sequía y/o sal. La presente invención también se refiere a un vector de expresión que comprende dicho nucleótido y a una célula huésped transformada o transfectada con dicho vector de expresión. La presente invención se refiere además a un uso de dicha secuencia de polinucleótidos o promotora en la mejora de la tolerancia de plantas al estrés por sequía y/o sal.

Técnica anterior

15 El crecimiento de las plantas está normalmente influenciado por muchos factores ambientales, entre los que el daño por sequía y/o sal son factores principales que dan como resultado una gran reducción de la producción de cosecha en muchas zonas. Por tanto, siempre es un objetivo principal en las investigaciones de ciencia y tecnología agrícola desarrollar especies de cultivo con tolerancia al estrés.

Para resistir o adaptarse a factores ambientales desfavorables, las plantas reciben cambios extracelulares de las condiciones ambientales y los transfieren a través de muchas rutas al interior de las células para inducir la expresión de algunos genes de respuesta y generar algunas proteínas funcionales, sustancias osmorreguladoras, así como factores de transcripción para transmisión de señales y regulación de la expresión génica, de forma que las plantas sean capaces de elaborar respuestas correspondientes a los cambios ambientales y evitar daños provocados por el estrés por sequía, exceso de sal y/o baja temperatura. (Xiong y col, Cell signaling during cold, drought and salt stress. Plant Cell. 14 (supl), S165-S183, 2002). Los factores de regulación regulan con precisión la expresión de genes funcionales para responder a cambios ambientales. Cuando las plantas se enfrentan a estreses, un factor de transcripción como un gen de control es capaz de regular la expresión de una serie de genes corriente abajo para potenciar la tolerancia de las plantas a los estreses.

Kawasaki y col (2001) utilizó micromatrices para analizar el perfil de expresión temprana del arroz bajo estrés por exceso de sal y divulgó que una gran cantidad de genes estaban inducidos o inhibidos y que la inducción y expresión de estos genes estaban reguladas por factores de transcripción (Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, Galbraith D y Bohnert H J. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice, Plant Cell, 2001, 13: 889-905). Se encuentra que las familias de factores de transcripción de AP2/EREBP, dedos de cinc, Myb, bZIP en Arabidopsis thaliana están inducidas para expresarse o inhibirse bajo diferentes estreses (Shinozaki K y col, Monitoring the Expression Pattern of 1300 Arabidopsis Genes under Drought and Cold Stresses by Using a Full-Length cDNA Microarray, Plant Cell, 2001, 13: 61-72). Por tanto, se considera que estas familias de transcripción son muy importantes en la regulación durante el procedimiento de respuesta al estrés de las plantas. Por lo tanto, la separación e identificación de factores de transcripción que tienen una función reguladora esencial para la respuesta a los estreses y su uso para la mejora genética de los cultivos para resistir estreses son importantes y significativas para el cultivo de semillas.

Basándose en la información conocida sobre los factores de transcripción de Arabidopsis thaliana, se han realizado algunos estudios para mejorar las tolerancias de las plantas. Las plantas de Arabidopsis thaliana transgénicas cultivadas usando EREB1A y DREB2A tienen mayores tolerancias a temperatura baja, sequía y salinidad alta que las de tipo natural (Liu Q y col, Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA domains separate two cellular signal transduction pathways in drought - and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. Plant Cell. 1998, 10: 1391-1406). El grupo de investigación de Thomashow MF de la universidad estatal de Michigan (EE. UU.) también cultivó plantas con tolerancia a la congelación potenciada usando el gen CBF1 de Arabidopsis thaliana en transformación genética.

El arroz es uno de los cultivos alimentarios más importantes. La tolerancia a la sequía y/o sal es especialmente importante para el arroz. Sin embargo, no se ha desarrollado hasta el momento ninguna planta de arroz transgénica con tolerancia a la sequía y/o sal. Por tanto, es significativo e importante descubrir los factores de transcripción asociados con la tolerancia a la sequía y/o sal para cultivar una planta de arroz con tolerancia a la sequía y/o congelación y, de este modo, incrementar la producción de arroz.

Sumario de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un polinucleótido aislado capaz de dar a una planta, preferentemente arroz, tolerancia al estrés por sequía y/o sal, que consiste en una secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEC ID N.º: 1, o una variante conservadora o secuencia degenerada que comprenda una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones en dicha secuencia de nucleótidos, o una secuencia hibridable con dicha secuencia de nucleótidos bajo condiciones moderadamente rigurosas, o una secuencia complementaria a ella, o una variante o un derivado que tenga al menos un 95 % de homología y la misma función biológica que dicha

secuencia de nucleótidos.

En una realización de la presente invención, dicho polinucleótido consiste en la secuencia de ADN que se muestra en las posiciones 1374-2453 de la SEC ID N.º: 1.

5 También se describe un promotor capaz de dar a una planta, preferentemente arroz, tolerancia al estrés por sequía y sal, que comprende una secuencia de nucleótidos como se muestra en la secuencia de ADN de las posiciones 1-1373 de la SEC ID N.º: 1, o una variante conservadora o secuencia degenerada que comprenda una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones en dicha secuencia de nucleótidos, o una secuencia hibridable con dicha secuencia de nucleótidos bajo condiciones moderadamente rigurosas, o una secuencia complementaria a ella, o una variante o un derivado que tenga al menos un 95 % de homología y la misma o similar función biológica que dicha secuencia de nucleótidos. Dicho promotor puede consistir en la secuencia de ADN que se muestra en la secuencia de ADN de las posiciones 1-1373 de la SEC ID N.º: 1.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un vector de expresión que comprenda dicha secuencia de polinucleótidos y/o dicha secuencia promotora.

15 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una célula huésped transformada o transfectada con dicho vector de expresión.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un uso de dicha secuencia de polinucleótidos para incrementar la tolerancia al estrés por sequía y/o sal en una planta, preferentemente arroz.

Descripción detallada de la invención

20 El objetivo de la presente invención es aislar un fragmento de ADN que comprenda la región codificante del gen del factor de transcripción completa, clonarla y usarla para la mejora de la tolerancia del arroz y otras plantas a la sequía. La presente invención se basa en el descubrimiento por análisis estructural del gen obtenido que pertenece a la familia de factores de transcripción NAC específicos de plantas, y por tanto dicho factor de transcripción se denomina OsNACx.

25 En la presente invención, la expresión "polinucleótido aislado capaz de dar a una planta tolerancia al estrés por sequía y/o sal" representa la secuencia de polinucleótidos que se muestra en la SEC ID N.º: 1 y además comprende todas las variantes o derivados que tengan al menos un 95 % de homología y la misma función biológica que la secuencia que se muestra en la SEC ID N.º: 1.

30 El término "aislado" significa cambiado "artificialmente" desde su estado natural y/o aislado de su entorno natural. Por tanto, si un componente "aislado" o sustancia presente en la naturaleza está "aislado", se ha cambiado o retirado de su entorno natural inicial o se ha sometido a ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido naturalmente presente en animales vivos no está "aislado", pero el mismo polinucleótido o polipéptido aislado a partir de su estado natural está "aislado", que es exactamente el término usado en el presente documento.

35 El término "polinucleótido(s)" como se usa en el presente documento, significa un polímero de cadena sencilla o doble de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos e incluye moléculas de ADN y de ARN correspondientes, incluidas moléculas de ARNHn y ARNm, tanto cadenas sentido como antisentido, y comprende ADNc, ADN genómico y ADN recombinante, así como polinucleótidos totalmente o parcialmente sintetizados. Una molécula de ARNHn contiene intrones y corresponde a una molécula de ADN generalmente de forma unívoca. Una molécula de ARNm corresponde a una molécula de ARNHn y ADN de la que se han escindido los intrones. Un polinucleótido puede consistir en un gen entero, o cualquiera de sus porciones. Los polinucleótidos antisentido operables pueden comprender un fragmento del polinucleótido correspondiente y la definición de "polinucleótido" incluye, por lo tanto, todos esos fragmentos antisentido operables.

40 Una "variante" de nucleótidos es una secuencia que difiere de la citada secuencia de nucleótidos en que tiene una o más deleciones, sustituciones o adiciones de nucleótidos. Tales modificaciones pueden introducirse fácilmente usando técnicas de mutagénesis estándar, tales como mutagénesis específica de sitio dirigida a oligonucleótidos, como se enseña, por ejemplo, por Adelman y col. (DNA, 2: 183,1983). Las variantes de nucleótidos pueden ser variantes alélicas naturales o variantes no naturales.

45 El término "homología" cuando se usa en relación con ácidos nucleicos se refiere a un grado de complementariedad. Puede existir homología parcial u homología completa (en otras palabras, identidad). "Identidad de secuencia" se refiere a una medida de relación entre dos o más ácidos nucleicos y se da como un porcentaje con referencia a la longitud de comparación total. El cálculo de la identidad tiene en cuenta aquellos residuos de nucleótido que son idénticos y están en las mismas posiciones relativas en sus respectivas secuencias más largas. Los cálculos de identidad pueden realizarse mediante algoritmos contenidos en programas informáticos, tales como "GAP" (Genetics Computer Group, Madison, Wis.) y "ALIGN" (DNASStar, Madison, Wis.). Una secuencia parcialmente complementaria es una que, al menos parcialmente, inhibe (o compete con) la hibridación de una secuencia completamente complementaria con un ácido nucleico diana y a la que se hace referencia como "sustancialmente homóloga". La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente complementaria con la secuencia diana puede

- 5 examinarse usando un ensayo de hibridación (bandas de Southern o northern, hibridación de soluciones y similares) bajo condiciones poco rigurosas. Una secuencia o sonda sustancialmente homóloga competirá con e inhibirá la unión (en otras palabras, la hibridación) de una secuencia que es completamente homóloga a una diana bajo condiciones poco rigurosas. Esto no quiere decir que las condiciones poco rigurosas sean tales que permitan la unión no específica; las condiciones poco rigurosas requieren que la unión de dos secuencia entre sí sea una interacción específica (en otras palabras, selectiva). La ausencia de unión no específica puede ensayarse mediante el uso de una segunda diana que no tenga siquiera un grado parcial de complementariedad (por ejemplo, identidad de menos de aproximadamente el 30 %); en ausencia de unión no específica, la sonda no hibridará con la segunda diana no complementaria.
- 10 Cuando se usa en referencia a una secuencia de ácidos nucleicos de doble cadena tal como un ADNc o un clon genómico, la expresión "sustancialmente homóloga" se refiere a cualquier sonda que pueda hibridar con cualquiera de las dos cadenas de la secuencia de ácidos nucleicos de doble cadena bajo condiciones poco rigurosas como se describe en.
- 15 Condiciones poco rigurosas cuando se usa en referencia a hibridación de ácidos nucleicos comprende condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 42 °C en una solución que consiste en SSPE 5x (43,8 g/l de NaCl, 6,9 g/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ y 1,85 g/l de EDTA, pH ajustado a 7,4 con NaOH), SDS al 0,1 %, reactivo de Denhardt 5x [Denhardt 50X contiene por 500 ml: 5g de Ficoll (Tipo 400, Pharmacia), 5g de BSA (Fracción V; Sigma)] y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado seguida de lavado en una solución que comprende SSPE 5 X, SDS al 0,1 % a 42 °C cuando se emplea una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud.
- 20 Condiciones muy rigurosas cuando se usa en referencia a hibridación de ácidos nucleicos comprende condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 42 °C en una solución que consiste en SSPE 5x (43,8 g/l de NaCl, 6,9 g/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ y 1,85 g/l de EDTA, pH ajustado a 7,4 con NaOH), SDS al 0,5%, reactivo de Denhardt 5x y 100 g/ml de esperma de salmón desnaturalizado, seguida de lavado en una solución que comprende SSPE 0,1X, SDS al 1,0% a 42 °C cuando se emplea una sonda de unos 500 nucleótidos de longitud.
- 25 Es bien conocido en la técnica que pueden emplearse numerosas condiciones equivalentes para comprender las condiciones poco rigurosas; se tienen en consideración factores tales como la longitud y naturaleza (ADN, ARN, composición de bases) de la sonda y la naturaleza de la diana (ADN, ARN, composición de bases, presente en solución o inmovilizada, etc.) y la concentración de las sales y otros componentes (por ejemplo, la presencia o ausencia de formamida, sulfato de dextrano, polietilenglicol) y puede variarse la solución de hibridación para generar condiciones de hibridación poco rigurosa diferentes, pero equivalentes a las condiciones enumeradas anteriormente.
- 30 Además, en la técnica se conocen condiciones que promueven la hibridación bajo condiciones muy rigurosas (por ejemplo, incrementar la temperatura de las etapas de hibridación y/o lavado, el uso de formamida en la solución de hibridación, etc.).
- 35 Cuando se usa en referencia a una secuencia de ácidos nucleicos de doble cadena tal como un ADNc o un clon genómico, la expresión "sustancialmente homóloga" se refiere a cualquier sonda que pueda hibridar con cualquiera de las dos cadenas de la secuencia de ácidos nucleicos de doble cadena bajo condiciones poco a muy rigurosas como se describe anteriormente.
- 40 Cuando se usa en referencia a una secuencia de ácidos nucleicos de cadena sencilla, la expresión "sustancialmente homóloga" se refiere a cualquier sonda que pueda hibridar (en otras palabras, es complementaria a) con la secuencia de ácidos nucleicos de cadena sencilla bajo condiciones de poco a muy rigurosas como se describe anteriormente.
- 45 El término "hibridación" se refiere al apareamiento de ácidos nucleicos complementarios. La hibridación y la fuerza de la hibridación (en otras palabras, la fuerza de la asociación entre los ácidos nucleicos) están condicionadas por factores tales como el grado de complementariedad entre los ácidos nucleicos, la rigurosidad de las condiciones implicadas, la T_m del híbrido formado y la relación G:C dentro de los ácidos nucleicos. Se dice que una molécula sencilla que contenga apareamientos de ácidos nucleicos complementarios dentro de su estructura está "autohibridada".
- 50 El término " T_m " se refiere a la "temperatura de fusión" de un ácido nucleico. La temperatura de fusión es la temperatura a la que una población de moléculas de ácido nucleico de doble cadena se semidisocia en cadenas sencillas. La ecuación para calcular la T_m de ácidos nucleicos es bien conocida en la técnica. Como indican las referencias estándar, una estimación sencilla del valor de la T_m puede calcularse con la ecuación: $T_m = 81,5 + 0,41 (\% G + C)$, cuando un ácido nucleico está en solución acuosa con 1M de NaCl (véase, por ejemplo, Anderson y Young, Quantitative Filter Hybridization (1985) in Nucleic Acid Hybridization). Otras referencias incluyen cálculos más sofisticados que tienen en cuenta características estructurales, así como características de secuencia para el cálculo de T_m .
- 55 Como se usa en el presente documento, el término "riguroso" se refiere a las condiciones de temperatura, fuerza iónica y la presencia de otros compuestos tales como disolventes orgánicos, bajo las cuales se realizan las hibridaciones de ácidos nucleicos. Con condiciones "muy rigurosas", el apareamiento entre bases de ácidos

nucleicos tendrá lugar sólo entre fragmentos de ácidos nucleicos que tienen una alta frecuencia de secuencias de bases complementarias. Por tanto, suelen requerirse condiciones "poco" rigurosas con ácidos nucleicos procedentes de organismos que son genéticamente distintos, ya que la frecuencia de secuencias complementarias es normalmente menor.

5 Preferentemente, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias alineadas óptimamente sobre una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en la que la parte de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos, normalmente del 5 al 15 por ciento o del 10 al 12 por ciento, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones o deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El
10 porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que las bases de ácidos nucleicos o el residuo aminoacídico idénticos aparecen en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir el tamaño de la ventana) y multiplicando los resultados por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. En general, todos o una parte de los polinucleótidos descritos en el presente documento pueden prepararse usando cualquier de varias técnicas.

En otras palabras, para obtener un polinucleótido con una secuencia de nucleótidos que tenga al menos un 95 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de referencia, podrían deleccionarse o sustituirse por otros nucleótidos hasta el 5 % de los nucleótidos de la secuencia de referencia; o podrían insertarse en la secuencia de referencia hasta el 5 % de los nucleótidos con referencia a los nucleótidos totales de la secuencia de referencia; o podrían someterse a una combinación de deleción, inserción y sustitución hasta el 5 % de los nucleótidos con referencia a los nucleótidos totales de la secuencia de referencia. Estas mutaciones en la secuencia de referencia pueden aparecer en posición 5- o 3-terminal de la secuencia de referencia o en cualquier posición entre estas porciones terminales, y existen en la secuencia de nucleótidos de referencia de forma individual o en uno o más grupos adyacentes.

25 Un aspecto de la presente invención se refiere a un polinucleótido aislado capaz de dar a una planta tolerancia al estrés por sequía y/o sal, que consiste en una secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEC ID N.º: 1, o una variante conservadora o secuencia degenerada que comprenda una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones en dicha secuencia de nucleótidos, o una secuencia hibridable con dicha secuencia bajo condiciones moderadamente rigurosas, o una de sus secuencias complementarias, o una variante o derivado que tenga al menos un 95 % de homología y la misma función biológica que dicha secuencia de nucleótidos.

En una realización de la presente invención, dicho polinucleótido consiste en la secuencia de ADN de las posiciones 1374-2453 de la SEC ID N.º: 1.

Se describe además un promotor capaz de dar a una planta, preferentemente arroz, tolerancia a estrés por sequía y sal, que comprende una secuencia de nucleótidos como se muestra en la secuencia de ADN de las posiciones 1-1373 de la SEC ID N.º: 1, o una variante conservadora o secuencia degenerada que comprenda una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones en dicha secuencia de nucleótidos, o una secuencia hibridable con dicha secuencia bajo condiciones moderadamente rigurosas, o una de sus secuencias complementarias, o una variante o derivado que tenga al menos un 95 % de homología y la misma función biológica que dicha secuencia de nucleótidos. Dicho promotor puede consistir en la secuencia de ADN que se muestra en la secuencia de ADN de las
40 posiciones 1-1373 de la SEC ID N.º: 1.

El gen o gen homólogo de la presente invención puede examinarse a partir de una colección de ADNc y genómica usando una sonda/cebador de oligonucleótidos específica de polinucleótidos tal como el gen OsNACx clonado. Asimismo, el gen OsNACx de la presente invención y cualquier fragmento de ADN de interés o fragmento de ADN homólogo a él también pueden obtenerse a partir de amplificación de genoma, ARNm y ADNc usando tecnología de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Una secuencia que comprenda el gen OsNACx puede aislarse y obtenerse usando las técnicas anteriores y puede obtenerse una planta transgénica con tolerancia al estrés por sequía y sal potenciada transformando una planta con dicha secuencia y cualquier vector de expresión capaz de inducir la expresión de un gen exógeno en la planta.

Por ejemplo, puede usarse la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar una secuencia de ADNc, en la que dicho ADNc se prepara a partir del ARN aislado. Puede diseñarse un cebador específico de secuencia para esta amplificación basándose en la secuencia que se muestra en la SEC ID N.º:1, o puede comprarse o sintetizarse. Después, el producto de PCR puede separarse por electroforesis en gel y detectarse por procedimientos bien conocidos en la técnica por los técnicos expertos en la técnica.

La expresión "cebador/sonda de oligonucleótidos específico de molécula de polinucleótidos" se refiere a una secuencia de oligonucleótidos que tiene al menos un 80 %, preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 % de identidad con el polinucleótido deseado, o a un oligonucleótido antisentido de una secuencia que tiene al menos un 80 %, preferentemente un 90 %, más preferentemente un 95 % de identidad con el polinucleótido deseado.

El muy útil cebador y/o sonda de oligonucleótidos de la presente invención tiene al menos 10-40 nucleótidos. En una realización preferible, el cebador de oligonucleótidos incluye al menos aproximadamente 10 nucleótidos consecutivos de dicho polinucleótido. Preferentemente, el oligonucleótido usado en la presente invención incluye al menos aproximadamente 15 nucleótidos consecutivos de dicho polinucleótido. Las tecnologías a base de ensayo por PCR e hibridación in situ son bien conocidas en la técnica.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende dicha secuencia de polinucleótidos. Cuando el gen de la presente invención se construye en un vector de expresión de plantas, puede añadirse cualquier promotor fuerte o promotor inducible antes de su nucleótido de iniciación para la transcripción. Cuando el gen de la presente invención se construye en un vector de expresión de plantas, también pueden usarse potenciadores, y estas regiones potenciadoras pueden ser codones de iniciación ATG, codones de iniciación de regiones adyacentes, etc., pero deben ser idénticas al marco de lectura de la secuencia codificante con el fin de asegurar la traducción de toda la secuencia.

El vector de expresión que porta la secuencia de polinucleótidos del gen OsNACx de la presente invención puede introducirse en células de plantas mediante procedimientos biológicos convencionales tales como plásmido Ti, vectores víricos de plantas, transformación de ADN directa, microinyección, electroporación y similares (Weissbach, 1998, *Method for Plant Molecular Biology* Vill, Academy Press, New York, pp.411-463; Geiserson y Corey, 1998, *Plant Molecular Biology* (2ª Edición)).

Las plantas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a: tomate, patata, tabaco, pimiento, arroz, maíz, cebada, trigo, Brassica, Arabidopsis, girasol, soja, chopo y pino. La planta preferida es el arroz, también incluye especies no agronómicas que son útiles en el desarrollo de vectores de expresión apropiados tales como tabaco, especies de Brassica de ciclación rápida y Arabidopsis thaliana.

Pueden usarse procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contengan un gen heterólogo y elementos de control transcripcional y traduccional apropiados. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante in vitro, técnicas sintéticas y recombinación genética in vivo. Tales técnicas están ampliamente descritas en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook y col. (1989), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., y Ausubel, F. M. y col. (1989), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.).

En general, estos vectores comprenden la secuencia de polinucleótidos de la invención (como se describe anteriormente) enlazada de forma operable a un promotor y otras secuencias reguladoras (por ejemplo, potenciadores, señales de poliadenilación, etc.) requeridas para la expresión en una planta.

Los promotores usados en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, promotores constitutivos, promotores específicos de tejido, órgano y desarrollo y promotores inducibles. Los ejemplos de promotores incluyen, pero no se limitan a: promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor; un promotor inducible por herida del tomate, aminopeptidasa de leucina ("LAP", Chao y col. (1999), *Plant Physiol* 120: 979-992); un promotor químicamente inducible del tabaco, proteína relacionada con la patogénesis 1 (PR1) (inducida por ácido salicílico y BTH (éster S-metilico del ácido benzotiadiazol-7-carbotioico)); un promotor del inhibidor de la proteínasa II del tomate (PIN2) o promotor LAP (ambos inducibles con metil jasmonato); un promotor de choque térmico (patente de EE. UU. 5.187.267); un promotor inducible por tetraciclina (patente de EE. UU. 5.057.422); y promotores específicos de semilla, tales como aquellos para proteínas de almacenamiento de semillas (por ejemplo, faseolina, napina, oleosina) y un promotor para conglucina beta de la soja (Beachy y col. (1985), *EMBO J.* 4: 3047-3053)).

Los casetes de expresión pueden comprender adicionalmente cualquier secuencia requerida para la expresión de ARNm. Tales secuencias incluyen, pero no se limitan a, terminadores de la transcripción, potenciadores tales como intrones, secuencias víricas y secuencias destinadas a dirigir el producto génico a orgánulos y compartimentos celulares específicos.

Está disponible una variedad de terminadores de la transcripción para su uso en la expresión de secuencias usando los promotores de la presente invención. Los terminadores de la transcripción son responsables de la terminación de la transcripción más allá del transcrito y su correcta poliadenilación. Los terminadores de la transcripción apropiados y aquellos que se sabe que funcionan en plantas incluyen, pero no se limitan a, el terminador CaMV35S, el terminador tml, el terminador rbcS E9 del guisante y el terminador de la sintasa de nopalina y octopina (véase, por ejemplo, Odell y col. (1985) *Nature* 313:810; Rosenberg y col. (1987) *Gene*, 56: 125; Guerineau y col. (1991) *Mol. Gen. Genet.*, 262: 141; Proudfoot (1991) *Cell*, 64: 671; Sanfacon y col. *Genes Dev.*, 5: 141; Mogen y col. (1990) *Plant Cell*, 2: 1261; Munroe y col. (1990) *Gene*, 91: 151; Ballad y col. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 7891; Joshi y col. (1987) *Nucleic Acid Res.*, 15: 9627).

En algunas realizaciones de la presente invención, las construcciones para la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos de interés también incluye un regulador tal como una señal de localización nuclear (Calderone y col. (1984) *Cell* 39: 499; Lassoer y col. (1991) *Plant Molecular Biology* 17: 229), una secuencia consenso traduccional de plantas (Joshi (1987) *Nucleic Acids Research* 15: 6643), un intrón (Luehrsen y Walbot (1991) *Mol. Gen. Genet.* 225:81), y similares, enlazados de forma operable a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica los CPA-FA de la

planta.

5 En la preparación de la construcción que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifican los CPA-PA de la planta, pueden manipularse varios fragmentos de ADN, con el fin de proporcionar las secuencias de ADN en la orientación deseada (por ejemplo, sentido o antisentido) y, según convenga en el marco de lectura apropiado. Por ejemplo, pueden emplearse adaptadores o enlazadores para unir los fragmentos de ADN o pueden usarse otras manipulaciones para proporcionar sitios de restricción adecuados, la retirada de ADN superfluo, la retirada de sitios de restricción o similares. Para este fin, se emplean preferentemente mutagénesis in vitro, reparación de cebadores, restricción, apareamiento, resección, ligación o similares, en las que están implicadas las inserciones, deleciones o sustituciones (por ejemplo, transiciones y transversiones).

10 Están disponibles numerosos vectores de transformación para transformación de plantas. La selección de un vector para su uso dependerá de la técnica de transformación preferida y la especie objetivo para la transformación. Para determinadas especies objetivo, se prefieren diferentes marcadores de selección por antibióticos o herbicidas. Los marcadores de selección usados de forma rutinaria en transformación incluyen el gen nptII, que confiere resistencia a kanamicina y antibióticos relacionados (Messing y Vierra (1982) Gene 19: 259; Bevan y col. (1983) Nature 304: 184), el gen bar que confiere resistencia al herbicida fosfinotricina (White y col. (1990) Nucl Acids Res. 18: 1062; Spencer y col. (1990) Theor. Appl. Genet. 79: 625), el gen hph que confiere resistencia al antibiótico higromicina (Blochinger y Diggelmann (1984) Mol. Cell. Biol. 4: 2929) y el gen dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Bourouis y col. (1983) EMBO J., 2: 1099).

20 En algunas realizaciones preferidas, el vector está adaptado para su uso en un procedimiento de transfección mediado por Agrobacterium (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.º: 5.981.839, 6.051.757, 5.981.840, 5.824.877 y 4.940.838). La construcción de plásmidos Ti y Ri recombinantes generalmente sigue procedimientos usados normalmente con los vectores bacterianos más comunes, tales como pBR322. Puede hacerse un uso adicional de elementos genéticos accesorios que se encuentran a veces con los plásmidos originales y a veces se construyen a partir de secuencias exógenas. Pueden incluir, pero no se limitan a, genes estructurales de resistencia a antibióticos como genes de selección.

30 Existen dos sistemas de sistemas de vectores plasmídicos Ti y Ri recombinantes en uso actualmente. El primer sistema se denomina el sistema "cointegrado". En este sistema, el vector lanzadera que contiene el gen de interés se inserta por recombinación genética en un plásmido Ti no oncogénico que contiene los elementos que actúan tanto en cis como en trans requeridos para la transformación de plantas, como, por ejemplo, en el vector lanzadera pMLJ1 y el plásmido Ti no oncogénico pGV3850. El segundo sistema se denomina el sistema "binario" en el que se usan dos plásmidos; el gen de interés se inserta en un vector lanzadera que contiene los elementos que actúan en cis requeridos para la transformación de plantas. El resto de las funciones necesarias son proporcionadas en trans por el plásmido Ti no oncogénico, como se ejemplifica mediante el vector lanzadera pBIN19 y el plásmido Ti no oncogénico PAL4404. Algunos de estos vectores están comercialmente disponibles.

35 En otras realizaciones de la invención, la secuencia de ácidos nucleicos de interés se dirige hacia un locus concreto del genoma de la planta. La integración dirigida a sitio de la secuencia de ácido nucleico de interés del genoma de la célula de la planta puede lograrse, por ejemplo, por recombinación homóloga usando secuencias derivadas de Agrobacterium. Generalmente, las células de plantas se incuban con una cepa de Agrobacterium que contiene un vector dirigido en el que las secuencias que son homólogas a una secuencia de ADN del interior del locus diana están
40 flanqueadas por secuencias de ADN de transferencia (ADN-T) de Agrobacterium, como se describe anteriormente (en la patente de EE. UU. N.º 5.501.967). Un experto en la técnica sabe que la recombinación homóloga puede lograrse usando vectores dirigidos que contienen secuencias que son homólogas a cualquier parte del gen de la planta dirigido, pertenecientes a los elementos reguladores del gen o a las secuencias codificantes del gen. La recombinación homóloga puede lograrse en cualquier región de un gen de una planta, siempre que se conozca la
45 secuencia de ácidos nucleicos de las regiones que flanquean el sitio diana.

En otras realizaciones más, los ácidos nucleicos de la presente invención se utilizan para construir vectores derivados de virus ARN(+) de plantas (por ejemplo, virus del mosaico del bromo, virus del mosaico del tabaco, virus del mosaico de la alfalfa, virus del mosaico del pepino, virus del mosaico del tomate y sus combinaciones e híbridos). Se describen procedimientos para la construcción y el uso de tales virus en las patentes de EE. UU. N.º 5.846.795; 5.500.360; 5.173.410; 5.965.794; 5.977.438; y 5.866.785.

Los expertos en la técnica apreciarán que la elección del procedimiento puede depender del tipo de planta objetivo de la transformación. En algunas realizaciones, el vector permanece episomal. En otras realizaciones, el vector se integra en el genoma.

55 En algunas realizaciones, se usa la transformación directa en el genoma del plástido para introducir el vector en la célula de la planta (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.º 5.451.513, 5.545.817, 5.545.818 y la solicitud PCT WO95/16783). La técnica básica para transformación de cloroplastos implica introducir regiones de ADN plastídico clonado flanqueando un marcador seleccionable junto con el ácido nucleico que codifica las secuencias de ARN de interés en un tejido objetivo adecuado (por ejemplo, usando biolística o transformación de protoplastos con cloruro de calcio o PEG). Las regiones flanqueantes de 1 a 1,5 kb, denominadas secuencias dirigidas, facilitan la

recombinación homóloga con el genoma del plástido y permiten así el reemplazo o modificación de regiones específicas del plastoma. Inicialmente, se utilizan mutaciones puntuales en los genes del ARNr 16S y rps 12 del cloroplasto que confieren resistencia a espectinomicina y/o estreptomycinina como marcadores seleccionables para transformación (Svab y col. (1990) PNAS, 87: 8526; Staub y Maliga, (1992) Plant Cell, 4: 39). La presencia de sitios de clonación entre estos marcadores permitió la creación de un vector dirigido plástidico para la introducción de moléculas de ADN exógeno (Staub y Maliga (1993) EMBO J., 12:601). Se obtienen incrementos sustanciales en la frecuencia de transformación mediante el reemplazo de los genes recesivos de resistencia a antibióticos del ARNr o r-proteína con una marcador seleccionable dominante, el gen *aadA* bacteriano que codifica la enzima desintoxicadora de espectinomicina aminoglucósido-3'-adeniltransferasa (Svab y Maliga (1993) PNAS, 90: 913). Se conocen otros marcadores seleccionables útiles para transformación de plástidos en la técnica y están comprendidos en el alcance de la presente invención. Se obtienen plantas homoplásmicas para genomas plástidicos que contienen las dos secuencias de ácidos nucleicos separadas por un promotor y, preferentemente, son capaces de una expresión alta de los ARN codificados por la molécula de ADN.

En otras realizaciones, los vectores útiles en la práctica de la presente invención se microinyectan directamente en las células de la planta usando micropipetas para transferir mecánicamente el ADN recombinante (Crossway (1985) Mol. Gen. Genet, 202: 179). En otras realizaciones más, el vector se transfiere al interior de la célula de la planta usando polietilenglicol (Krens y col. (1982) Nature, 296: 72; Crossway y col. (1986) BioTechniques, 4: 320); fusión de protoplastos con otras entidades, minicélulas, células, lisosomas u otros cuerpos con superficies lipídicas fusionables (Frale y col. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. , USA, 79: 1859); transformación de protoplastos (documento EP 0 292 435); transferencia génica directa (Paszowski y col. (1984) EMBO J., 3: 2717; Hayashimoto y col. (1990) Plant Physiol. 93: 857).

En otras realizaciones más, el vector también puede introducirse en las células de la planta por electroporación. (Fromm, y col. (1985) Pro. Natl Acad. Sci. USA 82: 5824; Riggs y col. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5602). En esta técnica, los protoplastos de la planta se someten a electroporación en presencia de plásmidos que contienen la construcción génica. Los impulsos eléctricos de alta intensidad de campo permeabilizan de forma reversible las biomembranas permitiendo la introducción de los plásmidos. Los protoplastos vegetales electroporados vuelven a formar la pared celular, se dividen y forman callos vegetales.

En otras realizaciones más, el vector se introduce mediante aceleración de partículas balística usando dispositivos (por ejemplo, disponibles de Agracetus, Inc., Madison, Wis. y Dupont, Inc. Wilmington, Del) (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 4.945.050; y McCabe y col. (1988) Biotechnology 6: 923). Véase también, Weissinger y col. (1988) Annual Rev. Genet. 22:421; Sanford y col. (1987) Particulate Science and Technology, 5:27 (cebolla); Svab y col. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:8526 (cloroplastos del tabaco); Christou y col. (1988) Plant Physiol., 87:671 (soja); McCabe y col. (1988) Bio/Technology 6:923 (soja); Klein y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:4305 (maíz); Klein y col. (1988) Bio/ Technology, 6:559 (maíz); Klein y col. (1988) Plant Physiol., 91:4404 (maíz); Fromm y col. (1990) Bio/Technology, 8: 833; y Gordon-Kamm y col. (1990) Plant Cell, 2:603 (maíz); Koziel y col. (1993) Biotechnology, 11:194 (maíz); Hill y col. (1995) Euphytica, 85:119 y Koziel y col. (1996) Annals of the New York Academy of Sciences 792:164; Shimamoto y col. (1989) Nature 338:274 (arroz); Christou y col. (1991) Biotechnology, 9:957 (arroz); Datta y col. (1990) Bio/Technology 8:736 (arroz); solicitud de patente europea EP 0.332.581 (dátilo y otras Pooideae); Vasil y col. (1993) Biotechnology, 11:1553 (trigo); Weeks y col. (1993) Plant Physiol., 102:1077 (trigo); Wan y col. (1994) Plant Physiol. 104:37 (cebada); Jahne y col. (1994) Theor. Appl. Genet. 89:525 (cebada); Knudsen y Muller (1991) Planta, 185:330 (cebada); Umbeck y col. (1987) Bio/Technology 5:263 (algodón); Casas y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11212 (sorgo); Somers y col. (1992) Bio/Technology 10:1589 (avena); Torbert y col. (1995) Plant Cell Reports, 14:635 (avena); Weeks y col. (1993) Plant Physiol., 102:1077 (trigo); Chang y col., WO 94/13822 (trigo); y Nehra y col. (1994) The Plant Journal, 5: 285 (trigo).

Además de la transformación directa, en algunas realizaciones, los vectores que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifican CPA-FA de plantas de la presente invención se transfieren usando transformación mediada por *Agrobacterium* (Hinchee y col. (1988) Biotechnology, 6:915; Ishida y col. (1996) Nature Biotechnology 14:745). *Agrobacterium* es un género representativo de las Rhizomaceae gram negativas. Sus especies son responsables de tumores de plantas tales como las enfermedades de agalla de la corona y raíz pilosa. En el tejido diferenciado característico de los tumores, se producen y catabolizan derivados de aminoácido conocidos como opinas. Los genes bacterianos responsables de la expresión de las opinas son una fuente adecuada de elementos de control para los casetes de expresión quiméricos. Las secuencias genéticas heterólogas (por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos enlazadas de forma operable a un promotor); pueden introducirse en células de plantas apropiadas, mediante el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. El plásmido Ti se transmite a las células de la planta mediante infección con *Agrobacterium tumefaciens*, y se integra de forma estable en el genoma de la planta (Schell (1987) Science, 237:1176). Las especies que son susceptibles a la infección con *Agrobacterium* pueden transformarse *in vitro*. Alternativamente, las plantas pueden transformarse *in vivo*, tal como mediante transformación de una planta entera mediante infiltración con *Agrobacterias* de plantas adultas, como en un procedimiento de "inmersión floral" (Bechtold N, Ellis J, Pelletier G (1993) Cr. Acad. Sci.III-Vie 316:1194-1199).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una célula huésped transformada o transfectada por dicho vector de expresión anterior. Los huéspedes que pueden transformarse mediante un vector de expresión que comprende el gen OsNACx de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, tomate, patata, tabaco, pimiento, arroz, maíz,

cebada, trigo, Brassica, Arabidopsis, girasol, soja, chopo y pino, preferentemente arroz.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de dicha secuencia de polinucleótidos anterior para potenciar la tolerancia al estrés por sequía y/o sal de las plantas. Las plantas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, tomate, patata, tabaco, pimienta, arroz, maíz, cebada, trigo, Brassica, Arabidopsis, girasol, soja, chopo y pino, preferentemente arroz.

La expresión de dicha secuencia promotora es una expresión inducible por estrés, de forma que dicho promotor es un promotor inducible. Cuando el fragmento promotor y cualquier gen de interés están enlazados al mismo tiempo en un vector de expresión apropiado y se usan para transformar una planta huésped, la expresión inducible por estrés del gen de interés potencia la tolerancia de la planta al estrés.

10 **Breve descripción de los dibujos**

La SEC ID N.º: 1 del listado de secuencias muestra la secuencia del fragmento de ADN que se aísla y se clona en la presente invención y comprende una región codificante el gen OsNACx y una región promotora.

Fig.1: El diagrama de flujo del aislamiento e identificación del gen OsNACx.

Fig.2: El resultado de la comparación de homología entre el gen OsNACx y los factores de transcripción NAC usando el programa informático ClustalW (un programa informático de dominio público).

Fig.3: El resultado del análisis de la secuencia íntegra del gen OsNACx con el programa informático de predicción de estructura génica GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>). En la Fig.3: Gn representa el número de gen; Ex representa exón; Init representa el exón de iniciación del gen; Term representa el exón de terminación del gen; Prom representa el promotor fundamental; PlyA representa poliA; S representa cadena de ADN, en la que "+" representa la cadena de secuencia de ADN que se introduce durante el procedimiento de análisis; Begin representa la posición de iniciación del exón, promotor o poliA en la secuencia de ADN introducida; End representa la posición de terminación del exón, promotor o poliA en la secuencia de ADN introducida; Len representa la longitud de la secuencia (pb) del exón, promotor o poliA; Fr representa el marco de lectura de la traducción (3 marcos de lectura de la traducción por secuencia de ADN); I/Ac representa la puntuación del sitio de ajuste en 3'; Do/t representa la puntuación del sitio de ajuste en 5'; CodRg representa la puntuación de la región de traducción; P representa la probabilidad del exón; Tscr representa la puntuación del exón.

Fig.4: Los niveles de expresión del gen OsNACx detectados por un ensayo de hibridación de northern en diferentes puntos temporales bajo estreses tales como sequía, salinidad elevada, temperatura baja y ABA, etc.

Fig.5: Las situaciones de expresión del gen OsNACx en plantas transgénicas (la primera es el control y el resto son plantas transgénicas e independientes transgénicas).

Fig.6: El crecimiento de familias transgénicas con sobreexpresión de OsNACx durante la etapa adulta después 22 días de estrés por sequía en el terreno.

Fig.7: El crecimiento de familias transgénicas con sobreexpresión de OsNACx durante la etapa de plántula después de 12 días de salinidad elevada (200 mM), en la que A represente el control, B representa la familia transgénica T40S19, C representa la familia transgénica T40S24, D representa la familia transgénica T40S26, E representa la familia transgénica T40S8 y F representa la familia transgénica T40S25.

Fig.8: Actividad de activación in trans del gen OsNACx que se ensaya de acuerdo con la expresión del gen indicador LacZ después de la transformación de una célula de levadura con el gen OsNACx.

Fig.9: La localización subcelular y la expresión del promotor propio del gen OsNACx en células de plantas. La Fig. 8A muestra la expresión de OsNACx-GFP en callos de resistencia detectados por microscopía de fluorescencia; la Fig. 8B muestra la localización subcelular de OsNACx-GFP en células callosas, en las que (a) es la sección callosa teñida con el fluorocromo yoduro de propidio, (b) es la imagen de expresión de la GFP bajo fluorescencia verde, (c) es el resultado sintético de las fluorescencias roja y verde.

Fig.10: El esquema estructural de la sobreexpresión del transportador PCAMBIA1301 de la presente invención.

Fig.11: El esquema estructural de la localización subcelular del transportador PCAMBIA1301-EGFP de la presente invención.

Ejemplos

Durante el periodo de investigación inicial de la presente invención, el clon de ADNc 04124 de la variedad MingHui 63 de arroz (una variedad de arroz que está muy extendida en China). Dicho ADNc es el fragmento de ADNc del gen OsNACx. Los inventores de la presente invención descubrieron que es un nuevo gen de regulación asociada a estrés.

Específicamente, (1) se descubrió mediante técnicas de chip de ADNc que la cantidad de expresión de dicho clon de ADNc 04124 en la variedad de arroz "Zhonghan N.º 5" (una variedad de arroz que fue proporcionada por la Shanghai Agriculture Academy de China y que fue usada públicamente en China) se incrementaba 3,5 veces después de un tratamiento de estrés por sequía durante 15 días. Los resultados de la secuenciación y el análisis indicaron que el producto codificado de este modo era homólogo hasta en un 64 % con OsNAC4 (Fig.2). Debido a la diferencia significativa de la cantidad de expresión antes y después del tratamiento de sequía y a las características funcionales del clon, se consideró que el gen del clon 04124 participaba en la expresión del gen regulador bajo estrés por sequía; (2) de acuerdo a los análisis del perfil de expresión de dicho gen bajo estrés (véase la Fig.4), se descubrió que la expresión de dicho gen se incrementó significativamente; y (3) la planta transgénica con sobreexpresión del gen intacto mostró una tolerancia a la sequía y salinidad elevada significativamente potenciada (Fig.6 y Fig.7).

Los resultados anteriores muestran que el gen OsNACx es un gen de regulación asociado a estrés y que participa en la regulación de la tolerancia no sólo a la sequía, sino también a la salinidad elevada y el frío.

La presente invención se demuestra en mayor detalle con ejemplos en combinación con figuras y describe procedimientos para aislar y clonar el fragmento de ADN que comprende la región codificante completa del gen OsNACx y para verificar la función del gen OsNACx, basados en las investigaciones iniciales de la presente invención (el procedimiento de la invención se muestra en la Fig. 1).

De acuerdo con la siguiente descripción y ejemplos, un experto en la técnica puede determinar las características técnicas básicas de la presente invención.

Ejemplo 1: Separación y clonación del gen OsNACx y fragmentos de ADN que contienen el gen OsNACx

De acuerdo con el análisis del perfil de expresión del gen inducible por sequía de la variedad de arroz "Zhonghan N.º 5" (una variedad de arroz que proporciona la Shanghai Agriculture Academy de China y que se usa públicamente en China), se descubrió un EST (marcador de secuencia expresada) inducible por sequía (la cantidad de expresión se incrementó en al menos 3,5 veces tras el estrés por sequía), y el análisis de su secuencia indicó que este gen era un miembro de la familia de factores de transcripción NAC y que era una secuencia en la porción del extremo 5'.

El clon de ADNc correspondiente J012130D02 se averiguó mediante una búsqueda en la amplia base de datos de arroz de Japón (<http://cdna01.dna.affrc.go.jp>) y se localizó en el clon AC135594 del tercer cromosoma BAC. De acuerdo con la secuencia del clon BAC AC135594, se predice su región promotora y se diseñaron sus cebadores PF (5-CAGAATTCAAAGCAACAGTGGAGA-GAAAAC, cebador específico de secuencia más sitio EcoRI unido) y FR (5-TAGGATCCCCGAGCCATCTCTTGAC, cebador específico de secuencia más BamHI unido). La secuencia de 9781-12321 pb del clon BAC AC 135594 se amplificó a partir de los ADN totales de la variedad de arroz "Zhonghan No.5", y el producto de amplificación fue la secuencia de 1-2540 pb de la presente invención (Fig.3).

Las etapas específicas comprendieron: extraer los ADN totales de la variedad de arroz "Zhonghan N.º 5" (procedimiento de extracción CTAB, Zhang, y col., genetic diversity and differentiation of indica japonica rice detected by RFLP analysis, 1992, Theor Appl Genet, 83, 495-499) como moldes para la amplificación, en la que las condiciones de reacción fueron: predegeneración a 94 °C durante 3 min; 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s, 72 °C durante 3 min, 30 circulaciones; y elongación a 72 °C durante 5 min; enlazando el producto de amplificación de la PCR a un vector pGEM-T (comprado de Promega & co.); y examinar y secuenciar (secuenciador ABI3730) los clones positivos para obtener el fragmento de ADN deseado que comprende la región del gen OsNACx y el promotor propio predicho. Este clon se denomina PGEM-NAC-PRO.

Se extrajeron los ARN totales de la variedad de arroz "Zhonghan N.º 5" con reactivo TRIZOL (Invitrogen & co.) después del tratamiento de estrés por sequía (la extracción se realizó de acuerdo con las instrucciones del reactivo TRIZOL). Usando una transcriptasa inversa (Invitrogen & co.) se sintetizó la primera cadena de ADNc mediante su transcripción inversa, en la que las condiciones de reacción fueron: 65 °C durante 5 min, 42 °C durante 50 min, 70 °C durante 10 min. Usando los cebadores internos FF (5-TAGG-TACCAGAAGCAAGCAAGAAGCGAT, más KpnI unido) y FR (5-TAGGATCCCCGAGCCATCTCTTGAC, más BamHI unido), se amplificó a partir de los productos de transcripción inversa, donde las condiciones de reacción fueron: predegeneración a 94 °C durante 3 min; 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s, 72 °C durante 3 min, 30 circulaciones; elongación a 72 °C durante 5 min. Los productos de PCR obtenidos mediante la amplificación se enlazaron a un vector pGEM-T (Promega & co.) y se examinó y secuenció un clon positivo para obtener el gen de longitud completa deseado. Dicho clon se denominó PGEM-OsNACx.

Ejemplo 2: Detección de la expresión inducible del gen OsNACx endógeno del arroz

Se utilizó como material la variedad de arroz "Zhonghan N.º 5" y se trató por separado con estreses por sequía, frío, salinidad elevada, así como ABA durante la etapa de 3 hojas. El tratamiento de sequía se realizó sumergiendo la raíz de la plántula en polietilenglicol al 20 % (PEG6000) durante 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, y posteriormente se tomaron muestras. El tratamiento de frío se realizó colocando la plántula en una cámara de crecimiento a 4 °C durante 0 h, 1 h, 8 h y 12 h y después se tomaron muestras. El tratamiento de salinidad elevada se realizó sumergiendo la raíz de la plántula en una solución de NaCl 200 mM/l durante 0 h, 4 h, 8 h y 16 h y después se

tomaron muestras. El tratamiento de ABA se realizó sumergiendo la raíz de la plántula en una solución de ABA 100 $\mu\text{M/l}$ durante 0 h, 0,5 h, 3 h, 6 h, 12 h y 24 h y después se tomaron muestras. Se extrajeron los ARN totales de las hojas (con reactivo Trizol de Invitrogen & co.), después se sometieron a transferencia de membrana de ARN (de acuerdo con los procedimientos experimentales de "Molecular cloning", Science Press, Pekín, 1999), y se realizó una hibridación de northern usando OsNACx como sonda. El resultado mostró que podía inducirse la expresión del gen OsNACx clonado en la presente invención mediante sequía, salinidad elevada, frío y ABA (Fig. 4) y que era un factor de transcripción asociado a estrés.

Ejemplo 3: Construcción y transformación del vector de sobreexpresión del gen OsNACx

De acuerdo con los resultados del Ejemplo 2, podía inducirse la expresión del gen OsNACx de la presente invención mediante sequía, salinidad elevada, frío y ABA. Con el fin de ilustrar en mayor detalle la función de este gen, se sobreexpresó en arroz y se verificó por el genotipo de plantas transgénicas.

El procedimiento comprendió: escindir enzimáticamente el clon positivo plasmídico pGEM-OsNACx del Ejemplo 1 con BamHI y KpnI y recuperar fragmentos exógenos; mientras tanto, escindir enzimáticamente el vector de transformación genética pD35S1301 (que se reconstruye basándose en un vector de transformación genética vegetal común pCAMBIA1301 del laboratorio CAMBIA de Australia (Center for the Application of Molecular Biology to International Agriculture), porta el promotor 35S del virus del mosaico del tabaco doble con características de expresión constitutiva y sobreexpresión y está mediado por Agrobacterium) de la misma manera; después de la escisión, extraer con cloroformo:isopentanol (24:1), purificar el producto de escisión enzimática, realizar la reacción de ligación usando el fragmento de escisión enzimática que comprende el gen OsNACx y el vector pD35S1301 enzimáticamente escindido (véase la Fig. 10), transformar E. coli DH10 β (Invitrogen & co.) y examinar los clones positivos por escisión enzimática para obtener un vector transformado.

Usando el sistema de transformación genética del arroz mediado por Agrobacterium, se introduce en la variedad de arroz "Zhong Hua 11" (una variedad de arroz que proporciona el China Rice Institute y se usa públicamente en China) y se obtiene después una planta transgénica por precultivo, infestación, cocultivo, examen del callo con resistencia a higromicina, diferenciación, enraizamiento, cría de plántulas y trasplante. Basándose en el procedimiento del que se informa en Hiei y col. (Efficient transformation of rice, *Oryza sativa* L., mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA, 1994, Plant Journal 6:271-282), el arroz (*Oryza sativa* L.) mediado por Agrobacterium se optimiza mediante un procedimiento de uso de las siguientes etapas y reactivos principalmente.

(1) Abreviaturas de reactivos y soluciones

Las abreviaturas de fitohormonas usadas en medios de cultivo de la presente invención son las siguientes: 6-BA (6-bencilaminopurina); CN (carbenicilina); KT (cinetina); NAA (ácido naftalenacético); IAA (ácido indol-3-acético); 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético); AS (acetosiringona); CH (hidrolizado enzimático de caseína); HN (higromicina B); DMSO (dimetil sulfóxido); N6max (solución del ingrediente de aplicación N6); N6mix (solución de microconstituyentes N6); Msmax (solución de ingrediente de aplicación MS); Msmix (solución de microconstituyentes MS).

(2) Fórmulas de las soluciones principales

1) Preparación del licor madre de macroelementos N6 (expresado sobre la base de una concentración 10x):

KNO ₃	28,3 g
KH ₂ PO ₄	4,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,63 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,85 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,66 g

Estos compuestos se disolvieron uno a uno y se diluyeron hasta un volumen medido de 1.000 ml con agua destilada a temperatura ambiente.

2) Preparación del licor madre de microelementos N6 (expresado sobre la base de una concentración 100x):

KI	0,08 g
H ₃ BO ₃	0,16 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,44 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,15 g

Estos compuestos se disolvieron y se diluyeron hasta un volumen medido de 1.000ml con agua destilada a temperatura ambiente.

3) Preparación de la solución madre de sal férrica (Fe₂EDTA) (expresado sobre la base de una concentración 100x):

- 5 Se prepararon 800 ml de agua doblemente destilada y se calentaron a 70 °C, después se añadieron 3,73 g de NA₂EDTA·2H₂O, se disolvieron totalmente, se mantuvieron en un baño de agua a 70 °C durante 2 h, se diluyeron hasta un volumen medido de 1.000 ml con agua destilada y se almacenaron a 4 °C como reserva.

4) Preparación de la solución madre de vitaminas (expresado sobre la base de una concentración 100x):

Ácido nicotínico,	0,1 g
Vitamina B1 (tiamina HCl)	0,1 g
Vitamina B6 (piridoxina HCl)	0,1 g
Glicina	0,2 g
Inositol	10 g

Se añadió agua destilada hasta un volumen medido de 1.000 ml y se almacenó a 4 °C como reserva.

10 **5) Preparación del licor madre de macroelementos MS (expresado sobre la base de una concentración 10x):**

NH ₄ NO ₃	16,5 g
KNO ₃	19,0 g
KH ₂ PO ₄	1,7 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,7 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	4,4 g

Estos compuestos se disolvieron a temperatura ambiente y se diluyeron con agua destilada hasta un volumen medido de 1.000 ml.

6) Preparación del licor madre de microelementos MS (expresado sobre la base de una concentración 100x):

KI	0,083 g
H ₃ BO ₃	0,62 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,86 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,025 g
CUSO ₄ ·5H ₂ O	0,0025 g

- 15 Estos compuestos se disolvieron a temperatura ambiente y se diluyeron con agua destilada hasta un volumen medido de 1.000 ml.

7) Preparación de la solución madre de 2,4-D (expresado sobre la base de 1 mg/ml):

Se pesaron 100 mg de 2,4-D y se disolvieron en 1 ml de hidróxido potásico 1 N durante 5 minutos, después se añadieron 10 ml de agua destilada para la disolución completa, la solución se diluyó con agua destilada hasta un volumen medido de 100 ml y se almacenó a temperatura ambiente.

20 **8) Preparación de la solución madre de 6-BA (expresado sobre la base de 1 mg/ml):**

Se pesaron 100 mg de 6-BA y se disolvieron en 1 ml de hidróxido potásico 1 N durante 5 minutos, después se añadieron 10 ml de agua destilada para la disolución completa, la solución se diluyó con agua destilada hasta un volumen medido de 100 ml y se almacenó a temperatura ambiente.

9) Preparación de la solución madre de ácido naftilacético (NAA) (expresado sobre la base de 1 mg/ml):

- 25 Se pesaron 100 mg de NAA y se disolvieron en 1 ml de hidróxido potásico 1 N durante 5 minutos, después se añadieron 10 ml de agua destilada para la disolución completa, la solución se diluyó con agua destilada hasta un volumen medido de 100 ml y se almacenó a 4 °C como reserva.

10) Preparación de la solución madre de ácido indolacético (IAA) (expresado sobre la base de 1 mg/ml):

5 Se pesaron 100 mg de IAA y se disolvieron en 1 ml de hidróxido potásico 1 N durante 5 minutos, después se añadieron 10 ml de agua destilada para la disolución completa y la solución se diluyó con agua destilada hasta un volumen medido de 100 ml y se almacenó a 4 °C en un matraz triangular con 300 ml de agua destilada y 2,78 g de FeSO₄·7H₂O. Se añadieron 300 ml de agua destilada en otro matraz triangular como reserva.

11) Preparación de la solución madre de glucosa (expresado sobre la base de 0,5 g/ml):

Se pesaron 100 mg de glucosa y se disolvieron y diluyeron con agua destilada hasta un volumen medido de 250 ml y se almacenaron a 4 °C tras esterilización.

12) Preparación de solución madre de AS:

10 Se empaquetaron 0,392 g de AS y 10 ml de DMSO en un tubo de centrifuga de 1,5 ml y después se almacenaron a 4 °C como reserva.

13) Preparación de solución madre 1 N:

Se pesaron 5,6g de hidróxido de potasio, se disolvieron y se diluyeron con agua destilada hasta un volumen medido de 100ml y se almacenaron a temperatura ambiente como reserva.

15 **(3) Fórmula del medio de cultivo para transformación genética del arroz**

1) Medio de cultivo de inducción:

Licor madre de N6max (10X)	100 ml
Licor madre de N6mix (10X)	10 ml
Solución madre de Fe ²⁺ EDTA (100X)	10 ml
Solución madre de vitaminas (100X)	10 ml
Solución madre de 2,4-D	2,5 ml
Prolina	0,3 g
CH	0,6 g
Sacarosa	30 g
Phytigel	3 g

Se añadió agua destilada hasta 900 ml y se ajustó el valor de pH a 5,9 con hidróxido potásico 1 N, después el medio se hirvió y se diluyó hasta un volumen medido de 1.000 ml y se subempaquetó en matraces triangulares de 50 ml (25 ml/matraz), se selló y se esterilizó.

20 **2) Medio de cultivo secundario:**

Licor madre de N6max (10X)	100 ml
Licor madre de N6mix (10X)	10 ml
Solución madre de Fe ²⁺ EDTA (100X)	10 ml
Solución madre de vitaminas (100X)	10 ml
Solución madre de 2,4-D	2,0 ml
Prolina	0,5 g
CH	0,6 g
Sacarosa	30 g
Phytigel	3 g

Se añadió agua destilada hasta 900 ml y se ajustó el valor de pH a 5,9 con hidróxido potásico 1 N, después el medio se hirvió y se diluyó hasta un volumen medido de 1.000 ml, se subempaquetó en matraces triangulares de 50 ml (25 ml/matraz), se selló y se esterilizó.

3) Medio precultivado:

Licor madre de N6max (10X)	12,5 ml
Licor madre de N6mix (10X)	1,25ml
Solución madre de Fe ²⁺ EDTA (100X)	2,5 ml
Solución madre de vitaminas (100X)	2,5ml
Solución madre de 2,4-D	0,75 ml
CH	0,15 g
Sacarosa	5 g
Agarosa	1,75 g

Se añadió agua destilada hasta 250 ml y se ajustó el valor de pH a 5,6 con hidróxido potásico 1 N, después el medio se selló y se esterilizó. Antes de su uso, el medio se calentó y se fundió, se añadieron 5 ml de solución madre de glucosa y 250 µl de solución madre de AS, después el medio se vertió en placas de cultivo (25 ml/placa). pH = 5,6.

5 **4) Medio de cocultivo:**

Licor madre de N6max (10X)	12,5 ml
Licor madre de N6mix (10X)	1,25 ml
Solución madre de Fe ²⁺ EDTA (100X)	2,5 ml
Solución madre de vitaminas (100X)	2,5 ml
Solución madre de 2,4-D	0,75 ml
CH	0,2 g
Sacarosa	5 g
Agarosa	1,75 g

Se añadió agua destilada hasta 250 ml y se ajustó el valor de pH a 5,6 con hidróxido potásico 1 N y el medio se selló y se esterilizó. Antes de su uso, el medio se calentó y se fundió, se añadieron 5 ml de solución madre de glucosa y 250 µl de solución madre de AS, después el medio se vertió en placas de cultivo (25 ml/placa).

5) Medio de suspensión:

Licor madre de N6max (10X)	5 ml
Licor madre de N6mix (10X)	0,5 ml
Solución madre de Fe ²⁺ EDTA (100X)	0,5 ml
Solución madre de vitaminas (100X)	1 ml
Solución madre de 2,4-D	0,2 ml
CH	0,08 g
Sacarosa	2 g

10 Se añadió agua destilada hasta 100 ml, el valor de pH se ajustó a 5,4 y después el medio se subempaquetó en dos matraces triangulares, se selló y se esterilizó. Antes de su uso, se añadieron 1 ml de solución madre de glucosa y 100 µl de solución madre de AS.

6) Medio general para medio de cultivo selecto:

Licor madre de N6max (10X)	25 ml
Licor madre de N6mix (10X)	2,5 ml
Solución madre de Fe ²⁺ EDTA (100X)	2,5 ml

ES 2 372 607 T3

Solución madre de vitaminas (100X)	2,5 ml
Solución madre de 2,4-D	0,625 ml
CH	0,15 g
Sacarosa	7,5 g
Agarosa	1,75 g

Se añadió agua destilada hasta 250 ml y se ajustó el valor de pH a 6,0 y después el medio se selló y se esterilizó. Antes de su uso, el medio se disolvió, se añadieron 250 µl de higromicina (50 mg/ml) y 400 ppm de carbenicilina (CN) y después el medio se subempaquetó en placas de cultivo (25 ml/placa).

7) Medio de prediferenciación:

Licor madre de N6max (10X)	25 ml
Licor madre de N6mix (10X)	2,5ml
Solución madre de Fe ²⁺ EDTA (100X)	2,5 ml
Solución madre de vitaminas (100X)	2,5 ml
Solución madre de 6-BA	0,5 ml
Solución madre de KT	0,5 ml
Solución madre de NAA	50 µl
Solución madre de IAA	50 µl
CH	0,15 g
Sacarosa	7,5 g
Agarosa	1,75 g

- 5 Se añadió agua destilada hasta 250 ml, se ajustó el valor de pH a 5,9 con hidróxido potásico 1N y después el medio se selló y se esterilizó. Antes de su uso, se añadieron 250 µl de higromicina (50 mg/ml) y 200 ppm de carbenicilina (CN) y después el medio se subempaquetó en placas de cultivo (25 ml/placa).

8) Medio de diferenciación:

Licor madre de N6max (10X)	100 ml
Licor madre de N6mix (10X)	10 ml
Solución madre de Fe ²⁺ EDTA (100X)	10 ml
Solución madre de vitaminas (100X)	10 ml
Solución madre de 6-BA	2 ml
Solución madre de KT	2 ml
Solución madre de NAA	0,2 µl
Solución madre de IAA	0,2 µl
CH	1 g
Sacarosa	30 g
Phytigel	3 g

- 10 Se añadió agua destilada hasta 900 ml, el valor de pH se ajustó a 6,0 con hidróxido potásico 1 N. Después, se hirvió el medio y se diluyó hasta un volumen medido de 1.000 ml y se subempaquetó en matraces triangulares de 50 ml (25 ml/matraz), se selló y se esterilizó.

9) Medio de cultivo de enraizamiento:

Licor madre de MSmax (10X)	50 ml
Licor madre de MSmix (100X)	5 ml
Solución madre de Fe ²⁺ EDTA (100X)	5 ml
Solución madre de vitaminas (100X)	5 ml
Sacarosa	30 g
Phytigel	3 g

Se añadió agua destilada hasta 900 ml y el valor de pH se ajustó a 5,8 con hidróxido potásico 1 N. Después, se hirvió el medio y se diluyó hasta un volumen medido de 1.000 ml y se subempaquetó en tubos de enraizamiento (25 ml/tubo), se selló y se esterilizó.

5 **(4) Etapas de la transformación genética mediada por Agrobacterium (ejemplos específicos del uso de los medios de cultivo anteriormente mencionados)**

3.1 Inducción de callos

- (1) Se descascarillaron semillas maduras de arroz "ZHONGHUA 11", después se trataron con alcohol al 70 % durante 1 minuto y se desinfectó la superficie de las semillas con HgCl₂ al 0,15 % durante 15 minutos en orden;
- 10 (2) Las semillas se lavaron con agua esterilizada 4-5 veces;
- (3) Las semillas se pusieron en el medio de inducción mencionado anteriormente;
- (4) El medio inoculado se colocó en oscuridad y se cultivó durante 4 semanas a 25 ± 1 °C para obtener callos de arroz

3.2 Subcultivo de callos

- 15 Se seleccionó el callo embriogénico compacto y relativamente seco, amarillo intenso, se puso en el medio de subcultivo mencionado anteriormente y se cultivó en oscuridad durante 2 semanas a 25 ± 1 °C para obtener callos de arroz.

3.3 Precultivo

- 20 Se seleccionó el callo embriogénico compacto y relativamente seco, se puso en el medio precultivado mencionado anteriormente y se cultivó en oscuridad durante 2 semanas a 25 ± 1 °C.

3.4 Cultivo de Agrobacterium

- (1) Se precultivó Agrobacterium EHA105 (Invitrogen & co.) en medio de cultivo LA (un medio usado públicamente) con resistencia correspondiente a 28 °C durante 48 h (2 días);
- 25 (2) El Agrobacterium se transfirió al medio de suspensión mencionado anteriormente y se cultivó en una mesa de agitación a 28 °C durante 2-3 horas.

3.5 Infección con Agrobacterium

- (1) El callo precultivado se transfirió a una botella esterilizada;
- (2) Dicho Agrobacterium anterior se reguló hasta una DO₆₀₀ de 0,8-1,0;
- (3) El callo de arroz se sumergió en la suspensión de Agrobacterium durante 30 minutos;
- 30 (4) El callo de la etapa (3) se transfirió a papel de filtro esterilizado y se secó y después se cultivó en el medio de cocultivo mencionado anteriormente durante 72 h (3 días) a 19-20 °C.

3.6 Lavado y cultivo selecto de callos

- (1) El callo de arroz se cultivó con agua esterilizada hasta que no se observó ninguna agrobacterium;
- (2) El callo de arroz de la etapa (1) se sumergió en agua de esterilización que contenía 400 ppm de carbenicilina (CN) durante 30 minutos;
- 35 (3) El callo de la etapa (2) se transfirió a papel de filtro esterilizado y se secó;

(4) El callo de la etapa (3) se transfirió al medio selecto mencionado anteriormente y se realizó su cultivo selecto 2-3 veces, 2 semanas cada vez. (El medio selecto mencionado anteriormente se calentó y se fundió, después de enfrió hasta 60 °C aproximadamente y ase añadieron higromicina y carbenicilina apropiadas. La concentración de examen fue de 400 mg/l para higromicina y 400 mg/l para carbenicilina en el medio selecto para el primer cultivo y fue de 250 mg/l para higromicina y 250 mg/l para carbenicilina en el medio selecto para el segundo cultivo y los siguientes).

3.7 Diferenciación

(1) El callo de arroz obtenido a partir del medio de cultivo selecto mencionado anteriormente se transfirió al medio de prediferenciación y se cultivó en oscuridad durante 5-7 semanas;

(2) El callo de arroz obtenido a partir del cultivo de prediferenciación de la etapa 1 se transfirió al medio de prediferenciación y se cultivó con luz a 19-20 °C para obtener una planta de arroz transgénica.

3.8 Enraizamiento

(1) Las raíces de la planta de arroz transgénica generadas durante la diferenciación se cortaron;

(2) Después, se transfirió la planta a medio de cultivo de enraizamiento y se cultivó con luz a 26 °C durante 2-3 semanas.

3.9 Trasplante

El medio residual de la raíces de la planta de arroz transgénica se retiró por lavado, la plántula con raíces buenas se transfirió a un invernadero y se mantuvo la humedad durante los primeros días.

La planta de arroz transgénica obtenida se denominó T40SN (donde T40S representa el número del vector, N representa la variedad de arroz transgénico "ZHONGHUA 11"). Finalmente, se obtuvieron 36 plantas de arroz transgénicas independientes.

Ejemplo 4: Examen de la sequía de la familia T1 transgénica del gen OsNACx en el terreno

Con el fin de verificar si la resistencia a la sequía del arroz transgénico está relacionada con el gen OsNACx, se detectó la expresión del gen OsNACx en algunas plantas de arroz transgénico de la presente invención mediante tecnología de hibridación de northern (la Fig. 5 muestra los resultados de hibridación de northern, en los que el procedimiento fue el mismo que en el Ejemplo 2). Mientras tanto, el examen de plantas de generación T1 con resistencia a la sequía de la presente invención se llevó a cabo en el terreno mediante las siguientes etapas. Las semillas de cada familia de generación T1 se sumergieron en una solución acuosa de higromicina (50 mg/ml), se retiraron las semillas que no germinaron, se sembraron otras semillas en un semillero y las plántulas de arroz en la etapa de 5 hojas se trasplantaron a una tierra arenosa en un invernadero anti-sequía, donde se plantaron 20 plantas individuales de cada familia transgénica en 2 filas, y se detuvo el suministro de agua 3 semanas antes de la etapa de espigado. La Fig.6 muestra los resultados del examen de sequía de familias transgénicas y el control bajo estrés por sequía durante 22 días. Los resultados del experimentos mostraron que la resistencia a la sequía de plantas transgénicas era significativamente mayor que la del control. La detección del contenido en agua relativo de dos familia fue del 83,9 % y el 85,2 %, respectivamente, lo que indicó que el contenido en agua relativo no era diferente aparentemente, de forma que se confirmó la relación del gen OsNACx con la resistencia a la sequía y que la sobreexpresión del gen podía mejorar la resistencia a la sequía de plantas transgénicas. Con el fin de demostrar que el gen de la presente invención puede mejorar la resistencia a la sequía de plantas transgénicas, se analizó la tasa de fructificación de familias transgénicas bajo estrés por sequía. Los datos estadísticos mostraron que la tasa de fructificación de plantas transgénicas con sobreexpresión era aparentemente más elevada que la del control y la tasa de fructificación se incrementó del 1,8 % al 25 % (como se muestra en la Tabla 1), mientras que el número de flores y el peso de miles de granos no era aparentemente diferente, lo que probó en otro aspecto que seguramente el gen OsNACx está relacionado con la potenciación de la resistencia a la sequía.

Tabla 1. Comparación de la tasa de fructificación entre familias transgénicas y el control bajo estrés por sequía

Familia de arroz	Número de plantas	Tasa de fructificación media de una planta individual (%)	Desviación estándar	Diferencia significativa en comparación con el control
CK	5	1.78	0.71	-
T40S8	5	24.04	3.39	Significativa (p < 0,001)
T40S24	5	23.97	3.46	Significativa (p < 0,001)
T40S25	5	22.97	3.14	Significativa (p < 0,001)
T40S19	5	31.87	6.06	Significativa (p < 0,001)
T40S21	5	23.34	2.77	Significativa (p < 0,001)

Ejemplo 5: Examen de la resistencia a salinidad elevada de la familia transgénica T1 del gel OsNACx en la etapa de plántula

De acuerdo con el Ejemplo 4, se comprobó que la resistencia a la sequía de las plantas transgénicas para OsNACx en la etapa adulta era aparentemente mayor que la del control. Con el fin de verificar otras resistencias a estrés del arroz transgénico para OsNACx, se creó con estrés a salinidad elevada en la etapa de plántula.

El procedimiento específico fue el siguiente: se seleccionaron cinco familias transgénicas de generación T1 con sobreexpresión, las semillas de generación T1 se sumergieron en una solución acuosa de higromicina (50 mg/ml), se retiraron las semillas que no germinaron, se sembraron otras semillas en macetas redondas pequeñas (el sustrato usado en los experimentos fue una mezcla de sustrato de arroz del sur y arenas en una relación 2:3; se añadió agua isométrica al sustrato equivalente en cada maceta; y el agua se salió de forma natural para asegurar la consistencia de la compactación del sustrato). El experimento se repitió 3 veces. Las plantas sanas en la etapa de 5 hojas se trataron con estrés por salinidad elevada (solución de NaCl 200 mM) hasta que todas las plantas de control murieron y se observó la tasa de supervivencia de las plantas (las plantas individuales con un área de hoja verde de menos del 20 % tuvieron normalmente dificultades para sobrevivir y se consideraron muertas). La Fig.7 muestra la condición de crecimiento de las familias transgénicas con sobreexpresión cuando todas las plantas de control murieron bajo el estrés durante 12 días. La tabla 2 muestra la tasa de supervivencia de cada familia transgénica con sobreexpresión cuando todas las plantas de control murieron. Normalmente, la tasa de supervivencia de cada familia transgénica fue mayor del 80 %. El resultado mostró que las plantas transgénicas para OsNACx podía mejorar la resistencia de las plantas a una salinidad elevada.

Tabla 2. Tasa de supervivencia (%) de cada familia transgénica bajo estrés por salinidad elevada durante 12 días

Familia de arroz	Número repetido	Número de supervivencia/Número total			Tasa de supervivencia
TAOS25	3	21/24	23/27	24/29	85.1±2.4
T40S24	3	20/26	24/28	23/27	82.6±4.9
T40S21	3	18/21	21/24	19/26	82.1±7.9
T40S8	3	25/27	24/28	26/30	88.3±3.7
T40S19	3	21/23	25/27	24/29	88.9±5.3

Ejemplo 6: Verificación de la actividad de transcripción del extremo 3' del gen OsNACx

Dado que el gen de la presente invención era un factor de transcripción inducible, debería tener la función de activación transcripcional y podría activar la expresión génica corriente abajo bajo estrés con el fin de generar resistencia. Con el fin de verificar si el gen OsNACx de la presente invención tiene la función de activación transcripcional o qué región posee la función, se usó un sistema de levaduras en un experimento de activación en trans en el presente ejemplo. En primer lugar, se construyeron una serie de vectores de expresión pDET32 (Invitrogen & co.) de fusión del gen OsNACx y mutones por delección parcial de la levadura GAL4-DB y se usaron para transformar la célula de levadura Y187 (CLONTECH & co.) En el ensayo de actividad β -galactosidasa, se determinó la expresión del gen indicador LacZ basándose en si la levadura mostraba color azul. Los resultados demostraron que el gen OsNACx realmente tenía la función de activación transcripcional, que el dominio funcional de activación estaba situado en el extremo 3' del gen y que la secuencia de aminoácidos del 243 al 273 era necesaria para la función de activación transcripcional del presente gen. La Fig. 8 muestra la situación de expresión

ES 2 372 607 T3

del gen indicador LacZ en la célula de levadura transformada mediante el gen OsNACx o por uno de sus mutantes por delección parcial, en la que CK representa la célula de levadura Y187 transformada con un vector vacío pDEST32; Full representa la célula de levadura Y187 transformada con pDEST32 fusionado con el gen OsNACx de longitud completa; Mut1 representa la célula de levadura Y187 transformada con pDEST32 fusionado con el fragmento 1-166AA (dominio NAM) del gen OsNACx; Mut2 representa la célula de levadura Y187 transformada con pDEST32 fusionado con el fragmento 182-316AA del gen OsNACx; Mut3 representa la célula de levadura Y187 transformada con pDEST32 fusionado con el fragmento 182-273AA del gen OsNACx; Mut4 representa la célula de levadura Y187 transformada con pDESTS32 fusionado con el fragmento 182-243AA del gen OsNACx.

El procedimiento específico fue el siguiente:

10 1. El gen OsNACx de longitud completa y uno de sus mutones por delección parcial se fusionaron con el vector de expresión de levaduras pDEST32 (Invitrogen & co.).

De acuerdo con el marco de lectura del transportador pDEST32 y la secuencia del ADNc xx de longitud completa, se diseñaron los siguientes cebadores génicos (usando el programa informático primer 5.0), respectivamente:

DBF: 5-AGAAGCAAGCAAGAAGCGAT

15 DBR: 5-CCGAGCCATCTCTTGAC

DBM 1 R: 5-TCCGACACAGCACCCAATCATC

DBM3R: 5-TATCGTCGTAGCTCAGGTCCA

DBM4R: 5-CTTTCTTGGGCACCATCAT

DBM5R: 5-ACGGGAAGGGGTCGTTGTCCA

20 DBMF: 5-CTGTACAACAAGAAGAACG

Se añadió después la unión attB1 (5-ggggacaagttgtacaaaaaagcaggct) a los extremos frontales de los cebadores DBF y DBMF; y se añadió la unión attB2 (5-ggggaccacttt gtacaagaaagctgggt) a los extremos frontales de los cebadores DBR, DBM1R, DBM3R, DBM4R y DBM5R. Bajo las condiciones de reacción: predegeneración a 94 °C durante 3 min; 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s, 72 °C durante 3 min, 30 circulaciones; elongación a 72 °C durante 5 min, el producto de la combinación de los cebadores DBF y DBMF fue DBNACF (1-316AA), el producto de los cebadores DBF y DBM1R fue Mut1 (1-182AA), el producto de los cebadores DBMF y DBR fue Mut2 (182-316AA), el producto de los cebadores DBMF y DBM3R fue Mut3 (182-273AA), y el producto de los cebadores DBMF y DBM4R fue Mut4 (182-243AA). Los productos de PCR obtenidos se purificaron a través de PEG8000, y después se sometieron a una reacción de recombinación BP con el vector intermedio pDONR221 (Invitrogen & co.), en la que el sistema de reacción fueron 5ul, 200ng de producto de PCR, 50ng de pDONR221, 2ul de tampón de reacción de clonasa BP 5X y 2ul de mezcla de clonasa BP. La E. coli DH10β (Invitrogen & co.) se transformó a 25 °C durante 5 h, se examinaron los clones positivos y después se fusionó el fragmento génico transportado por el plásmido clónico positivo deseado al vector de expresión de levaduras pDEST32 mediante una reacción de recombinación LR, en la que las etapas comprendieron: se transformó E. coli DH10β (Invitrogen & co.) bajo condiciones de 100 ng de plásmido positivo de reacción BP, 50 ng de pDEST32, 2 ul de tampón de clonasa LR 5X, 2 ul de mezcla de clonasa LR, a 25 °C durante aproximadamente 5 h y se examinaron los clones positivos.

2. Preparación y transformación de levadura competente (CLONTECH, Yeast Protocols Handbook) mediante procedimiento de acetato de litio (LiAc).

1) Reactivo y fórmula

40 A. solución de nutrientes YPD:

20 g peptona Difco

10 g extracto de levadura

20 g glucosa

diluido hasta un volumen medido de 1.000 ml con agua destilada y esterilizado durante 15 minutos.

B. Solución de cultivo SD/Leu:

6,7 g base nitrogenada de levadura sin aminoácido

20 g polvo de agar

ES 2 372 607 T3

20 g glucosa
0,69 g suplemento Leu DO (CLONTECH & co.)

diluido hasta un volumen medido de 1.000 ml con agua destilada y esterilizado durante 15 minutos.

C. Solución tampón 10TE:

Tris-HCl 0,1 M, EDTA 10 mM, pH 7,5, esterilizado

D. 10LiAc:

5 acetato de litio 1 M, pH 7,5, esterilizado

E. Solución PEG/LiAc:

	Concentración final	Para la preparación de 10 ml de solución
PEG4000	40%	8 ml de PEG al 50 %
solución tampón TE	1x	1 ml de TE 10x
LiAc	1x	1 ml de LiAc 10x

2) Procedimiento:

- A. Se dispersaron colonias individuales de levadura con un diámetro de 2-3 mm mediante 1 ml de solución YPD y después se transfirieron a un matraz triangular que contenía 10 ml de medio YPD.
- 10 B. Se cultivaron bajo una rotación de 250 rpm a 30 °C durante 16-18 h, de forma que la DO600>1,5.
- C. Se transfirieron 5 ml de la solución de levadura mencionada anteriormente a otro matraz triangular que contenía 50 ml de medio YPD y se detectó la concentración para obtener una DO600 = 0,2-0,3.
- D. Se cultivaron a 30 °C durante 3 h (230 rpm), DO600 = 0,4-0,6 (si la DO600<0,4, el cultivo puede ponerse en peligro).
- 15 E. La solución de levadura se transfirió a un tubo de centrifuga de 50 ml y se centrifugó a 1000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- F. Se retiró el sobrenadante, las células se suspendieron con agua destilada dos veces esterilizada y se centrifugaron a 1000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 20 G. Se retiró el sobrenadante, las células de levadura se mezclaron de forma homogénea con TE 1x/LiAc 1x que se preparó in situ.
- H. Se transfirieron 200 ng de ADN plasmídico de fusión a un tubo de centrifuga de 1,5 ml y se añadieron y se mezclaron de forma homogénea 100 ul de células de levadura competentes, después se añadieron 600 ul de PEG/LiAc, se centrifugó a velocidad alta y se cultivaron a 30 °C durante 30 min (200 rpm).
- 25 I. Se añadieron 70ul de DMSO (100 %), se invirtieron por inclinación varias veces, se colocaron en un baño de agua a 42 °C durante 15 min y después se colocaron sobre hielo durante 2 min.
- J. Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 s a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y las células de levadura se dispersaron con tampón TE 1x.
- K. 100ul de células transformadas se dispusieron sobre una placa de Leu/DE, se cultivaron por inversión en una incubadora a 30 °C durante 2-4 días, hasta que aparecieron clones.

30 3. Verificación de la actividad transcripcional del gen OsNACx y sus mutones por delección parcial basándose en la expresión del gen indicador LacZ en un experimento con beta-galactosidasa.

1) Reactivo y fórmula

A. Solución tampón Z

Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	16,1 g/l
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5,5 g/l

ES 2 372 607 T3

KCl	0,75 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,246 g/l

pH regulado a 7,0, y esterilizado.

B. Solución madre de X-gal (20 mg/ml)

C. Solución tampón Z /solución X-gal:

100 ml	solución tampón Z:
0,27 ml	β-mercaptoetanol
1,67 ml	solución madre de X-gal

2) Procedimiento:

5 A. El clon transformado creció hasta 1-3 mm (30 °C, 2-4 días).

B. Se colocó papel de filtro de Watman redondo con un tamaño apropiado en una placa aséptica de 10 cm y se añadieron aproximadamente 2,5-5 ml de solución tampón Z/X-gal para mojar el papel de filtro y se evitaron las burbujas.

10 C. Otro papel de filtro aséptico limpio se movió con unas pinzas para colocarlo en la placa con el clon en crecimiento y el papel de filtro se presionó ligeramente con el fin de adherir el clon al papel de filtro.

D. Cuando el papel de filtro estaba mojado, se abrió con las pinzas y la superficie con el clon estaba hacia arriba, después el papel de filtro se colocó en nitrógeno líquido durante 10 s y se descongeló a temperatura ambiente con el fin de romper las células de levadura.

15 F. El papel de filtro cuya superficie con el clon estaba hacia arriba se colocó con cuidado sobre el papel de filtro previamente mojado y se evitaron las burbujas.

G. El papel de filtro se colocó a 30 °C (30 min-8 h) y la evaluó la función de activación del gen en función de la aparición de manchas azules.

Ejemplo 7: Verificación funcional del promotor génico de OsNACx y su localización subcelular

20 Con el fin de confirmar la localización de la expresión del gen OsNACx en la célula y la actividad de su propio promotor (1-1374 pb), se realizó además la construcción de la proteína de fusión GFP-NLS (señal de localización nuclear) y se determinó el perfil de expresión génica en función de la expresión de GFP. En primer lugar, se utilizaron los documentos publicados sobre el gen NAC de Arabidopsis thaliana (Miki Fujita, Kazuo Shinozaki y col., A Dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. Plant J (2004), 39, 863-876). Se dedujo que las señales de localización nuclear (NLS) del gen pueden localizarse en 79-90AA o en 116-182AA y que la localización subcelular del gen podía determinarse de acuerdo con la región expresiva de esta secuencia fusionada con GFP en la célula.

30 El fragmento 1-1641 pb (que incluye los primeros 1374pb de ATG y 1-90AA del gen, es decir, que incluye la región promotora y la señal de localización nuclear) se fusionó con el vector pCAMBIA1381-GFP. Se esperaba que los 1-1374 pb del fragmento ya contuvieran un promotor intacto que pudiera promover la expresión del gen y que la secuencia 1-99AA (que incluye la señal de localización nuclear) del gen estuviera incluida, de forma que la condición expresiva del gen en las células pudiera determinarse de acuerdo con la localización expresiva de GFP. El vector pCAMBIA1381-EGFP se reconstruyó (véase la Fig. 11) basándose en pCAMBIA1381 (un vector de transcripción genética de plantas usado comúnmente en todo el mundo), en el que el gen GUS transportado fue reemplazado con el gen GFP y no había ningún promotor antes del gen GFP. El vector pCAMBIA1381 era del laboratorio CAMBIA de Australia (Center for the Application of Molecular Biology to International Agriculture).

35 El procedimiento específico para la construcción del vector para el gen fusionado fue el siguiente. Se diseñaron los cebadores PF (5-cagaattcaaagcaacagtgagagaaaac, añadido con el sitio EcoRI unido) y PR (5-caaagcttgctgaccattaggatactt, añadido con el sitio HindIII unido), después se usaron como moldes los ADN totales de la variedad de arroz "Zhonghan N.º 5" o el vector pGEM-NAC-PRO construido en el Ejemplo 1 y se empleó el programa de amplificación (predegeneración a 94 °C durante 3 min; 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s, 72 °C durante 3 min, 30 circulaciones; elongación a 72 °C durante 5 min). El producto de amplificación se escindió enzimáticamente con EcoRI y HindIII y se enlazó al vector pCAMBIA1381-EGFP que también se escindió enzimáticamente con EcoRI y HindIII. El callo de arroz se transformó con el vector de fusión p1381-GFP-promotor-NLS usando un sistema de transformación génica mediada por Agrobacterium (véase detalladamente en el Ejemplo 3), se obtuvo el callo con resistencia a higromicina (véase el Ejemplo 3) y se observó la expresión de GFP al microscopio de fluorescencia (véase la Fig. 9A). El resultado mostró que los 1-1374 pb de la secuencia ya habían

contenido el promotor intacto y que éste podía promover la expresión del gen.

5 Con el fin de localizar el gen en la célula, se cortó en láminas el callo de resistencia y se observó al microscopio confocal para determinar la condición de expresión intracelular de GFP. La Fig. 9B mostró que la GFP se expresaba sólo en núcleos al observarla en el microscopio confocal, lo que indicaba que la secuencia 1-99AA ya tenía incluida la NLS de forma que la GFP pudiera localizarse en los núcleos, es decir, la proteína OsNACx estaba localizada en los núcleos. Este ejemplo probó que la secuencia 1-1374 pb de la presente invención incluía un promotor intacto y que podía inducir la expresión del gen. Además, se especuló con que 79-90AA de OsNACx era una NLS y, por lo tanto, la proteína OsNACx se localizaba en el núcleo de la célula.

Listado de secuencias

<110> Huazhong Agriculture University

<120> Gen del factor de transcripción OsNACx del arroz y su uso para mejorar la tolerancia de las plantas a la sequía y la sal

5 <130>

<141> 2004-12-20

<160> 1

<170> Patent In versión 3.1

<210> 1

10 <211> 2540

<212> ADN

<213> E⁶ μ3/4 E⁸Oryza sativa E⁹

<220>

<221> gen

15 <222> (1)..(2540)

<223>

<220>

<221> Intrón

<222> (1848)..(1976)

20 <223>

<220>

<221> exón

<222> (1977)..(2453)

<223>

25 <220>

<221> exón

<222> (1374)..(1847)

<223>

<400> 1

ccaaagcaac agtggagaga aaactaaaaa aaagagaatg cgttagaata tgctcgtggaa
60

taatgggagg ggataagcga tgctgaggta gcggccgaat cttccccgacg cacgccgaac
120

atgcatgata cgagtatatg atttgatttg atgatttttc tggtgccggt accttgaggt
180

tttttttctg tcctgactcc tgagatgaag gaaaaggctc gatcgatgat gcgatcggcg
240

30

ES 2 372 607 T3

atgatgagag tgggtggttcc aagtaacgtg ggggaaatct cgtctctcgg cgcaatgcta
 300
 taaacatgcg gatgaccatc accggagtaa gtagagtaat ttagtcgtac ttgtacctac
 360
 tggaacagtg accacccaac gagcctcaca ttcactgaat catactagtc gtactactac
 420
 tactacaaca ctggaacgga tagaaaacga taaatgacgc cgcataatcg acaacgcatg
 480
 ggaccaaact catgcttata tgctcttgta ctcgtgctta tctcaaatcc acctcatttt
 540
 acatgccctt ttttgccaca gcaactttcg gtcccatcat ggcatatttg caaacgcaaa
 600
 atagtttata aataaaattt tttatatgcg tgtttttata gtgatataaa agcaacggtt
 660
 gaaagataaa tttcgataaa aaaaccttaa aatcagcttt aaatttaaga ttaaaaattt
 720
 aaattttgac tgataataag tattagcgaa aagatgatgt cctaatttcc ccttttcgct
 780
 ccaccccatg acgttggtccg acatctaaat actactccta atcaacttgc aacctaagat
 840
 aatttagtat agtacacgta gtacagcctt tttggagcag taacaaaaga cgcgcgggccc
 900
 acacgtccgt gcagttgcag ccgcccgtgc atccccaccg cgaaaaccac ggcaaaattt
 960
 agcggcggcc gctgtggccg cctcaccccc ccgcccctgg ctgtccacag caacgcacgc
 1020
 acccgcaccc gcaccgcca cccgaccgcg gcgcccagct gtcccattc tgctgacctc
 1080
 ggccgtgacg ccacctcgc acgggtccaa tccccgacgc aggaggtggc ctcttcctc
 1140
 gaaaccacc acctcaccac cacacgtgcc ccatttcata ccactcctc ttcttcccgc
 1200
 agccgccgac tccgctttga ctcatcccc cgcgccgaa ccttcagac tacctcctc
 1260

tatatatccc cccctccgcc cgccatttct ccccatcga gaaatccctc acaaccaca
1320

acattttcaa acaacgcaaa gcagtagcag cagcgagaag caagcaagaa gcg atg
1376

Met

1

ggg atg ggg atg agg agg gag agg gac gcg gag gcg gag ctg aac ctg
1424

Gly Met Gly Met Arg Arg Glu Arg Asp Ala Glu Ala Glu Leu Asn Leu

5

10

15

ccg ccg ggg ttc agg ttc cac ccc acg gac gac gag ctg gtg gag cac
1472

Pro Pro Gly Phe Arg Phe His Pro Thr Asp Asp Glu Leu Val Glu His

20

25

30

tac ctg tgc agg aag gcg gcg ggg cag cgc ctg ccg gtg ccg atc atc
1520

Tyr Leu Cys Arg Lys Ala Ala Gly Gln Arg Leu Pro Val Pro Ile Ile

35

40

45

gcc gag gtg gat ctc tac aag ttc gac ccg tgg gat ctg ccc gag cgc
1568

Ala Glu Val Asp Leu Tyr Lys Phe Asp Pro Trp Asp Leu Pro Glu Arg

50

55

60

65

gcg ctg ttc ggc gcc agg gag tgg tac ttc ttc acc ccg cgg gat cgc
1616

Ala Leu Phe Gly Ala Arg Glu Trp Tyr Phe Phe Thr Pro Arg Asp Arg

70

75

80

aag tat cct aat ggg tca cgc ccc aac cgc gcc gcc ggc aac ggg tac
1664

Lys Tyr Pro Asn Gly Ser Arg Pro Asn Arg Ala Ala Gly Asn Gly Tyr

85

90

95

ES 2 372 607 T3

tgg aag gcc acc ggc gcc gac aag ccc gtc gcg ccg cgg ggg cgc acg
1712

Trp Lys Ala Thr Gly Ala Asp Lys Pro Val Ala Pro Arg Gly Arg Thr

100

105

110

ctt ggg atc aag aag gcg ctc gtg ttc tac gcc ggc aag gcg ccg cga
1760

Leu Gly Ile Lys Lys Ala Leu Val Phe Tyr Ala Gly Lys Ala Pro Arg

115

120

125

ggg gtc aag act gat tgg atc atg cat gag tac cgg ctc gcc gat gct
1808

Gly Val Lys Thr Asp Trp Ile Met His Glu Tyr Arg Leu Ala Asp Ala

130

135

140

145

ggc cgc gcc gcc gcg ggc gcc aag aag gga tct ctc agg gtaagcttag
1857

Gly Arg Ala Ala Ala Gly Ala Lys Lys Gly Ser Leu Arg

150

155

ctcagattca tccgaattac tagcaatgat ccttgcttcg atcgaagatt attcgggtggg
1917

agtgatgatc gataattgga tcgtggtctg atctgatctg gtgtgaattg tttgtgcag
1976

ttg gat gat tgg gtg ctg tgt cgg ctg tac aac aag aag aac gag tgg
2024

Leu Asp Asp Trp Val Leu Cys Arg Leu Tyr Asn Lys Lys Asn Glu Trp

160

165

170

gag aag atg cag cag ggg aag gag gtg aag gag gag gcg tcc gac atg
2072

Glu Lys Met Gln Gln Gly Lys Glu Val Lys Glu Glu Ala Ser Asp Met

175

180

185

190

gtt acg tcg cag tcg cac tcg cac acc cac tcg tgg ggc gag acg cgc
2120

Val Thr Ser Gln Ser His Ser His Thr His Ser Trp Gly Glu Thr Arg

ES 2 372 607 T3

	195		200		205
acg ccg gag tcg gag atc gtg gac aac gac ccc ttc ccg gag ctg gac 2168					
Thr Pro Glu Ser Glu Ile Val Asp Asn Asp Pro Phe Pro Glu Leu Asp					
	210		215		220
tcg ttc ccg gcg ttc cag cct gcg ccg ccg ccg gcg acg gcg atg atg 2216					
Ser Phe Pro Ala Phe Gln Pro Ala Pro Pro Pro Ala Thr Ala Met Met					
	225		230		235
gtg ccc aag aaa gaa tcg atg gac gac gcc acc gcg gcc gcc gcc gcc 2264					
Val Pro Lys Lys Glu Ser Met Asp Asp Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala					
	240		245		250
gcc gcc acc atc ccc agg aac aac agc agc ctg ttc gtg gac ctg agc 2312					
Ala Ala Thr Ile Pro Arg Asn Asn Ser Ser Leu Phe Val Asp Leu Ser					
	255		260		265
270					
tac gac gat atc cag ggc atg tac agc ggc ctc gac atg ctg ccg ccg 2360					
Tyr Asp Asp Ile Gln Gly Met Tyr Ser Gly Leu Asp Met Leu Pro Pro					
	275		280		285
ggc gac gac ttc tac tcg tcg ctc ttc gcg tcg ccg cgg gtg aag ggg 2408					
Gly Asp Asp Phe Tyr Ser Ser Leu Phe Ala Ser Pro Arg Val Lys Gly					
	290		295		300
acg acg cca cgc gcc ggc gcc ggc atg ggc atg gtc ccg ttc tga 2453					
Thr Thr Pro Arg Ala Gly Ala Gly Met Gly Met Val Pro Phe					
	305		310		315

ES 2 372 607 T3

ggtgacggcg acgcatcga acaggtggtg atcgatgctg caacgtgtgt aaatatacag
2513

cgccggctgg gtcaagagat ggctcgg
2540

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido aislado capaz de dar a una planta tolerancia al estrés por sequía y/o sal, que consiste en una secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEC ID N.º: 1, o una de sus variantes idéntica al menos en un 95 % que tenga la misma función biológica.
- 5 2. Un polinucleótido aislado, que consiste en la secuencia de ADN como se muestra en las posiciones 1374-2453 de la SEC ID N.º: 1.
3. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha planta se selecciona del grupo que consiste en arroz, tomate, patata, tabaco, pimiento, maíz, cebada, trigo, Brassica, Arabidopsis, girasol, soja, chopo y pino, preferentemente arroz.
- 10 4. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 o un promotor enlazado de forma operable al polinucleótido de la reivindicación 2.
5. Una célula huésped transformada o transfectada con el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 4.
6. El uso del polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 para incrementar la tolerancia al estrés por sequía y/o sal en una planta.
- 15 7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha planta se selecciona del grupo que consiste en arroz, tomate, patata, tabaco, pimiento, maíz, cebada, trigo, Brassica, Arabidopsis, girasol, soja, chopo y pino, preferentemente arroz.

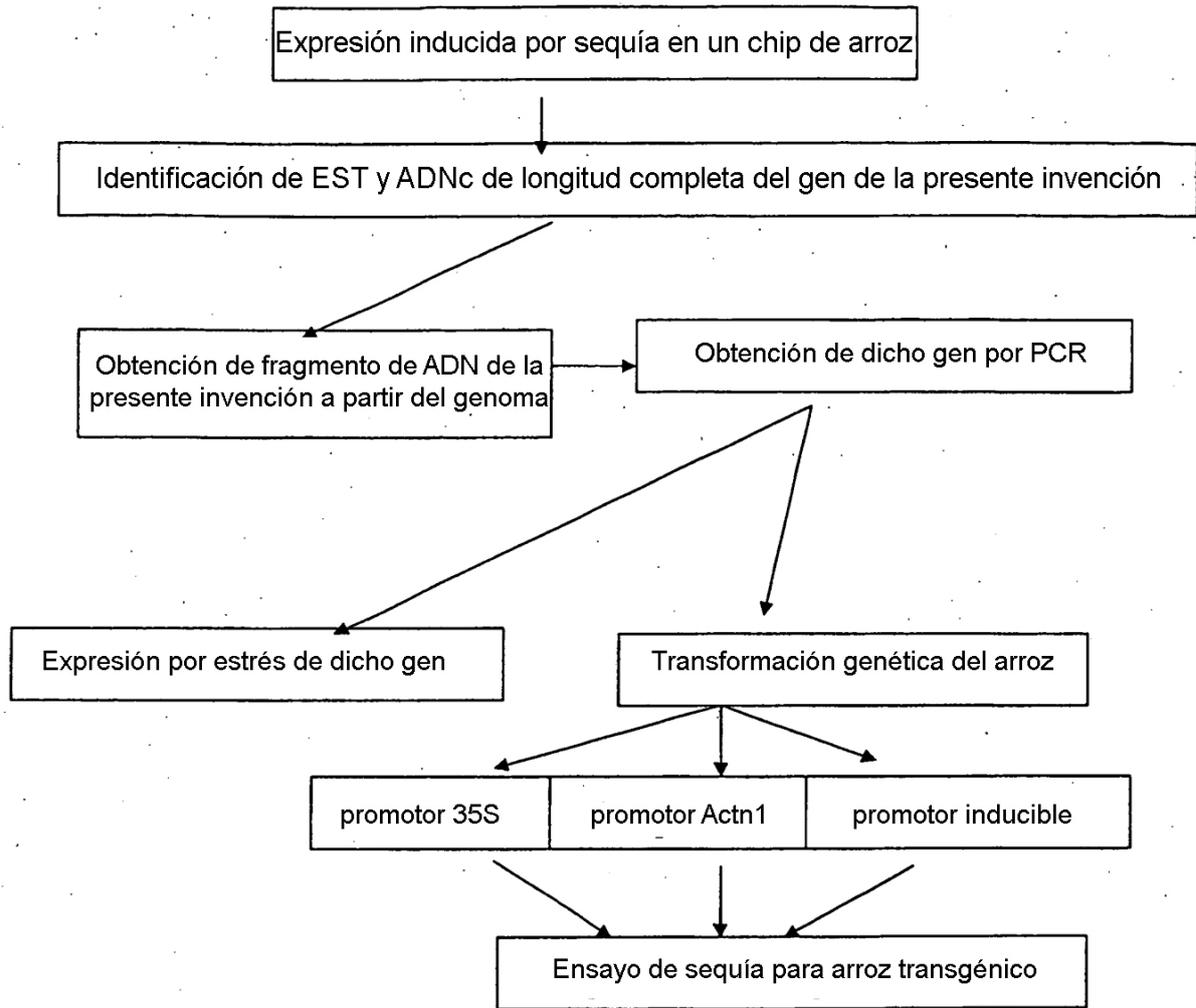


Fig.1

```

ObNACx : MGHCHRRR--RDAAEADN LPPGGRF ICDQD BLVETIYV LKRAKQ ORLYV DITAEVDLNF DDDDLERALF CARQYFEETBRDRK : 82
ObNAC3 : MAAAKRRV--RDAAEADN LPPGGRF ICDQD BLVAHYV LKRAKQ RAADV DITAEVDLNF DDDDLERALF CARQYFEETBRDRK : 82
ObNAC4 : MAAAVGGGRRRDAAEADN LPPGGRF ICDQD BLVAVHYV LKRAKQ RPLAV DITAEVDLNF DDDDLERALF CARQYFEETBRDRK : 84
ObNAC6 : -----MSGGODL LPPGGRF ICDQD BLVAVHYV LKRAKQ RPLAV DITAEVDLNF DDDDLERALF CARQYFEETBRDRK : 74
RD26 : MGVREK-----DPLACD LPPGGRF ICDQD BLVAVHYV LKRAKQ RPLAV DITAEVDLNF DDDDLERALF CARQYFEETBRDRK : 79
AtNAC1 : MEEEEKKESSISHVEAK LPPGGRF ICDQD SLVCDMLRRSLHNHREPLV LVDLNF DDDDLERALF CARQYFEETBRDRK : 85
      m 1 LPPGGRFHPtD EL6 YLcr4 a 66 6Dly4 dPw6P A1 G 4eWYF53pDRK

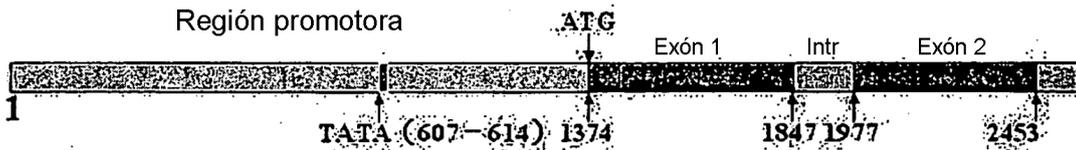
ObNACx : YENCSRENRAAGN GYWKATCADK DVAAPR--PTLGIKHALVEV AKKPRGKTDWIMHEYRI ADAGAAAGAKKESLR LDDVVLV : 165
ObNAC3 : YENCSRENRAAGN GYWKATCADK DVAAPR--PTLGIKHALVEV AKKPRGKTDWIMHEYRI ADAGAAAGAKKESLR LDDVVLV : 165
ObNAC4 : YENCSRENRAAGN GYWKATCADK DVAAPR--PTLGIKHALVEV AKKPRGKTDWIMHEYRI ADAGAAAGAKKESLR LDDVVLV : 168
ObNAC6 : YENCSRENRAAGN GYWKATCADK DVAAPR--PTLGIKHALVEV AKKPRGKTDWIMHEYRI ADAGAAAGAKKESLR LDDVVLV : 154
RD26 : YENCSRENRAAGN GYWKATCADK DVAAPR--PTLGIKHALVEV AKKPRGKTDWIMHEYRI ADAGAAAGAKKESLR LDDVVLV : 157
AtNAC1 : YATCLRTNRATA GYWKATCADK DVAAPR--PTLGIKHALVEV AKKPRGKTDWIMHEYRI ADAGAAAGAKKESLR LDDVVLV : 166
      YpnGsrPnRaa GYWKATG D4 6 g 964KsLVFY G4eP4G KT W6MHE5RL s 1ddVVLV

ObNACx : RLYNKKNEWEMMOOGKEVKEEASDHVTSOSHSHHTSHWQETRTPEE-----IVDNDPEPELDBFPAFQFAPP-----PATA : 236
ObNAC3 : RLYNKKNEWEMMOBRK-----EEEEHAAAOS-----WQETRTPEE-----VVDSDAEEHD-----YSLPAA-----SPDD : 223
ObNAC4 : RLYNKKNEWEMVLEQ-----QDVASAAAAAPRNHHHONGEVHDAAAA-----DTHSDBSOTHDSBDIDNASAGLRHGGCGGGPFD : 244
ObNAC6 : RLYNKKGGLSPFAAA-----VAAAGVSSGGGVQRKPNVGVNAAVSSPPEQKPVVACPAEDLAAAYDRPDSHMPR-LHADSCBE : 235
RD26 : RLYNKKTECSQAVTP-----VOACREHSTN-----SSSSSSSD-----LDDVLDSEPEKQDSFNLPRHNLRLTLNGWDM : 227
AtNAC1 : RLVHNTTEGVICRDNHGBCFDETABASLPLMDPYINEDOEPSSYLS-----DDHHYITNEHVPCFBNLSQNOTLNLNLTNSVW : 246
      R65 K

ObNACx : HMYBRK---ESHDDATAAAAAAATI PRNNSLFDVLSLQDQOG-----YSGLDHPPGDDFYSSLFASPRVKGTTPRAG : 308
ObNAC3 : ALDQKE---EARDDD-----BLMGSLSLQDQOG-----LGS---LLOADL---SMLAPFPAKTEP--- : 270
ObNAC4 : VAPERNGFVTVKEDN-----DWFGLNLSLQDQOGPPYMMNLOHMOQMVNFAADPGHGGYLOSISSPONKHWT--- : 311
ObNAC6 : QVPSPEFACEVQSDPK-----ISEBERTATVQD-----LNPAASTLDPAGSGGLGCGGGSDPLLDLIL : 296
RD26 : ASLAAGLNDIPELAPTN-----GLPBYCGYDAFRAEG-----EASGSHVNRQONSGLTOSFCYSSSGFCVS--- : 289
AtNAC1 : LKRPCKNPNPLPTGGS-----ASATLTGSSFCSSDQ-----MVERALLSQTAKIDGSLGPKRSSQYGGGSSSL : 312
      g

ObNACx : AGHMYVFF---- : 316
ObNAC3 : --LAPFF---- : 276
ObNAC4 : ---ILVFF---- : 316
ObNAC6 : MYRKEFF---- : 303
RD26 : ---QTFEERO- : 297
AtNAC1 : TDIEISTVWNC : 324
      g
  
```

Fig. 2



Gr.Ex	Tipo	S.	Begin	End	Len	Fr	Ph	I/Ac	Do/T	CodRg	P...	Isér..
1.02	Intr	-	356	173	184	2	1	28	81	146	0.946	7.78
1.01	Init	-	1094	1023	72	2	0	96	73	136	0.803	11.92
1.00	Prom.	-	1166	1127	40							14.13
2.00	Prom	+	1256	1295	40							1.21
2.01	Init	+	1374	1847	474	2	0	86	98	816	0.761	75.91
2.02	Term	+	1977	2453	477	2	0	41	51	842	0.949	71.03

Fig.3

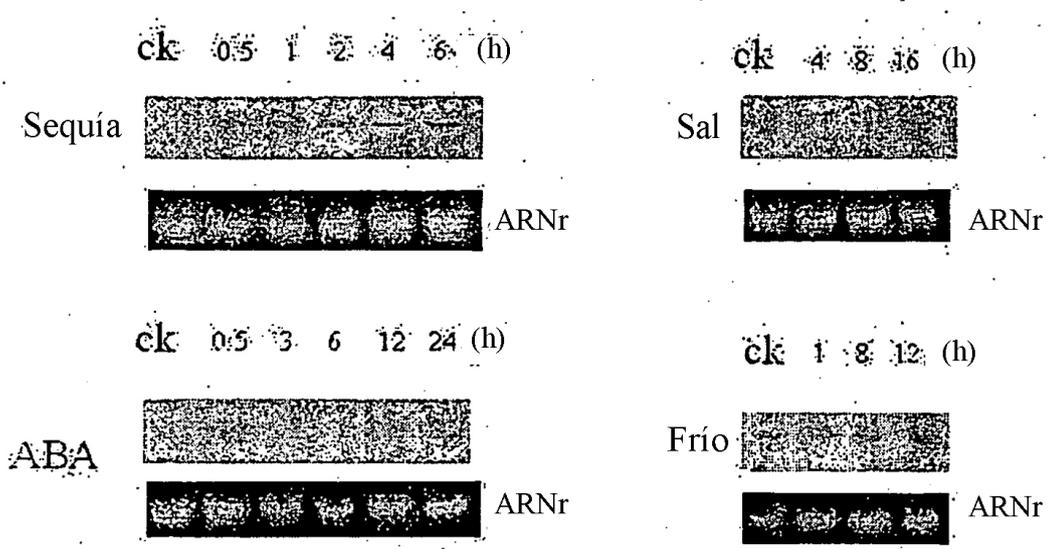


Fig.4

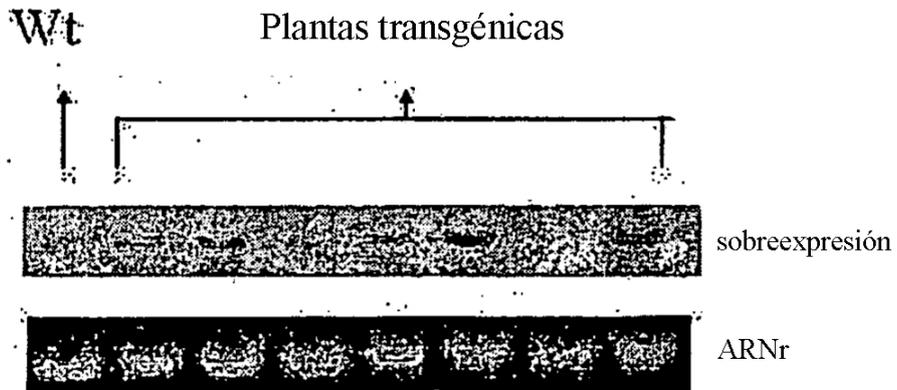


Fig.5

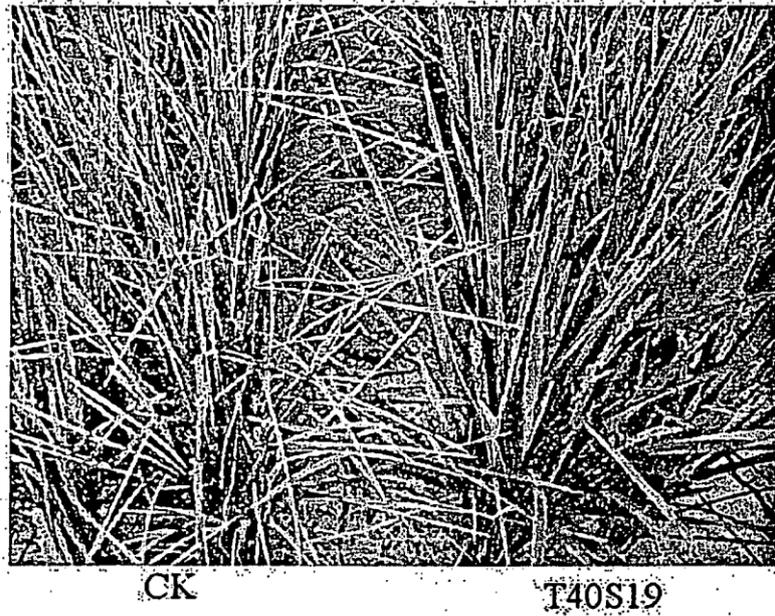


Fig. 6

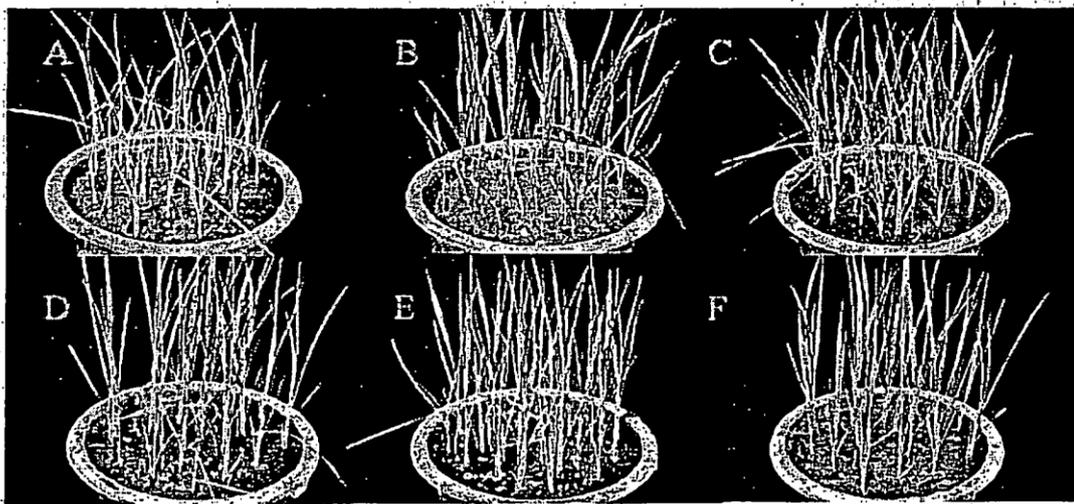


Fig. 7

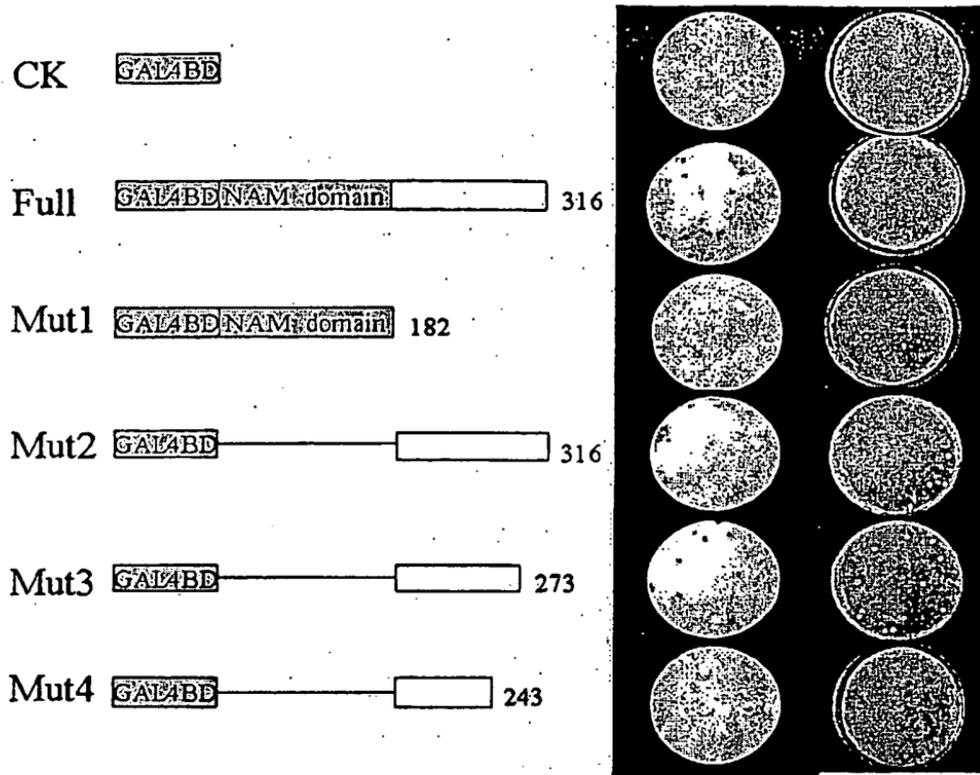


Fig. 8

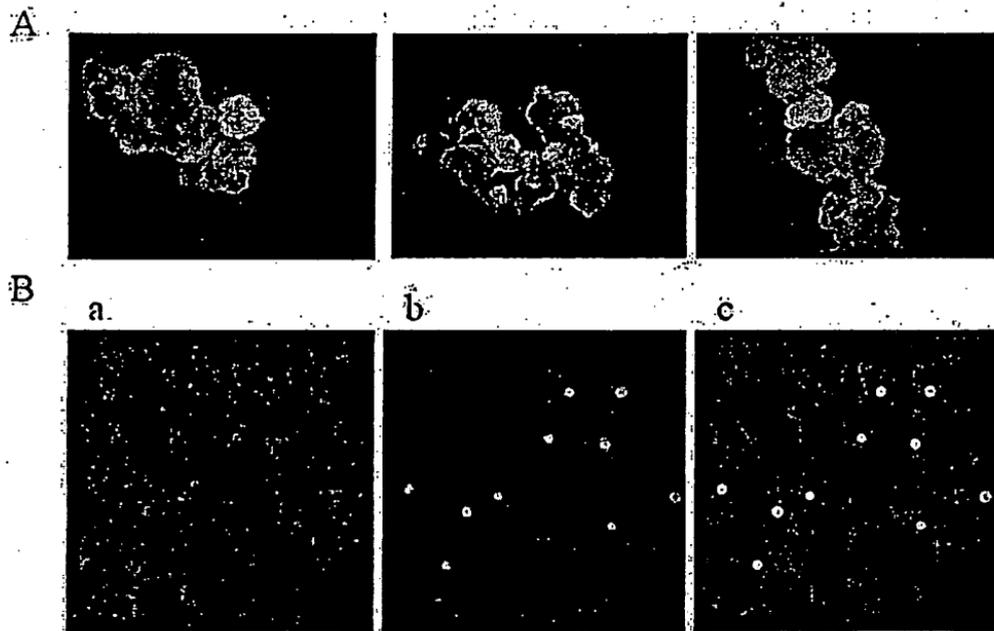


Fig. 9

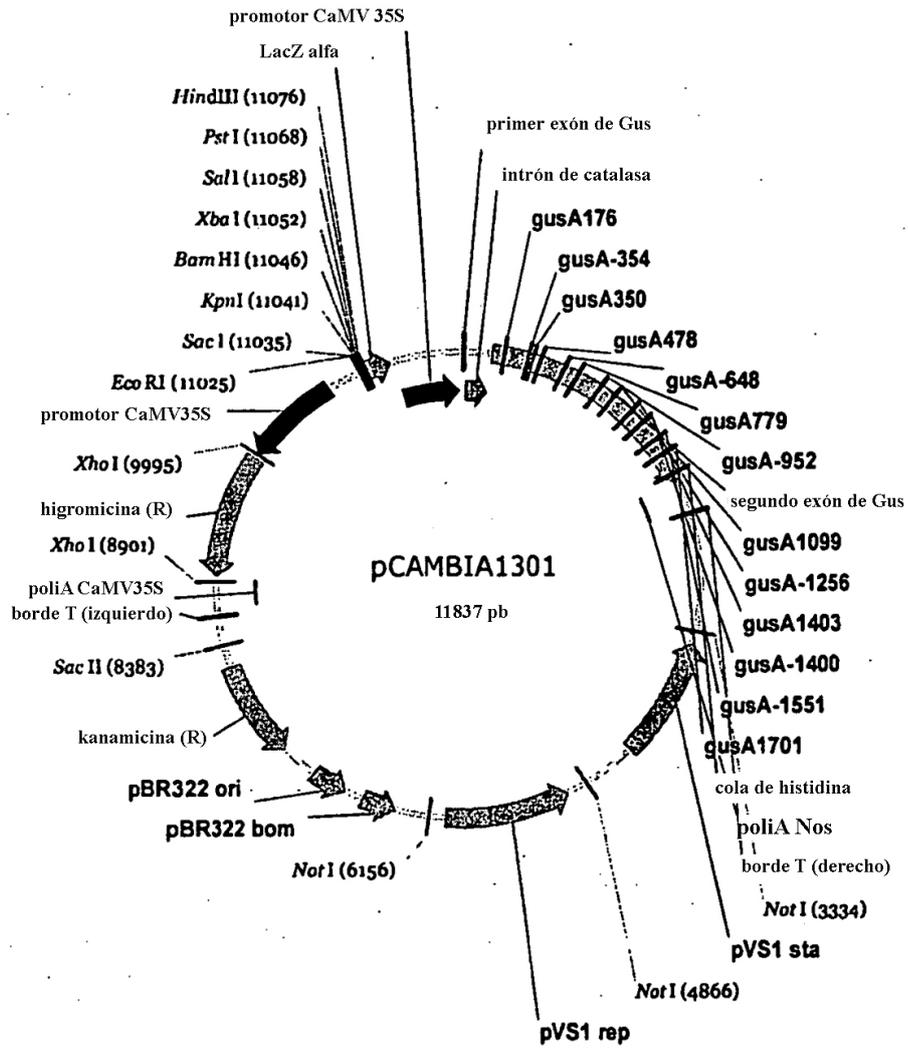


Fig. 10

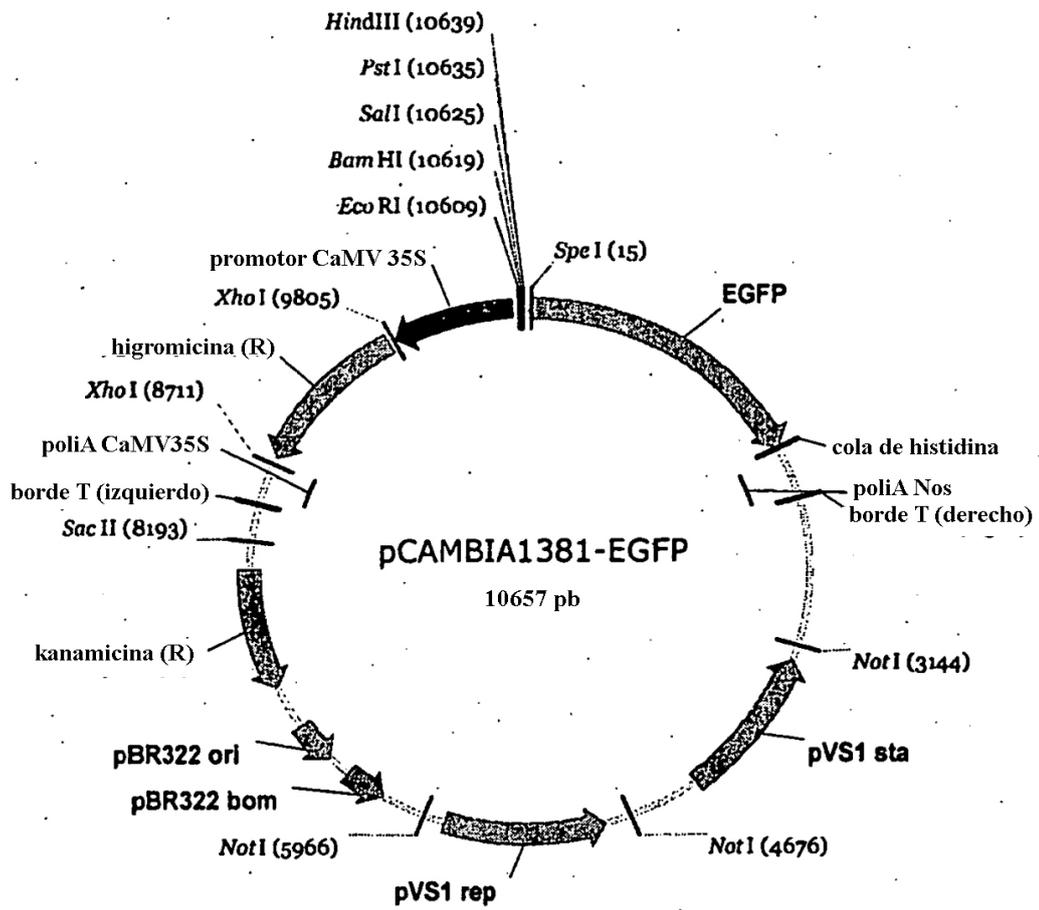


Fig. 11