

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 924**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06739467 .6**  
96 Fecha de presentación: **21.03.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1863334**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.12.2007**

54 Título: **MÉTODOS PARA GENERAR PLANTAS RESISTENTES A LA SEQUÍA.**

30 Prioridad:  
**21.03.2005 US 664035 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**20.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**20.03.2012**

73 Titular/es:  
**The Regents of The University of California  
12th Floor 1111 Franklin Street  
Oakland, CA 94607-5200, US y  
Technion Research & Development Foundation**

72 Inventor/es:  
**GEPSTEIN, Shimon;  
GEPSTEIN, Amira y  
BLUMWALD, Eduardo**

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 376 924 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

Métodos para generar plantas resistentes a la sequía

**Antecedentes de la invención**

5 Los estudios fisiológicos y genéticos indican que la senescencia es un proceso muy regulado (Nooden, Senescence and Aging in Plants, (L.D. Nooden y A.C. Leopold, Ed.), págs. 391-439, Academic Press, San Diego, Calif., 1988; Thomas, et al., Ann. Rev. Plant Physiol. 31:83-111, 1980). Los estudios moleculares sugieren que los cambios en la expresión génica están asociados con el programa de senescencia. Por ejemplo, la concentración de proteínas que codifican ARNm implicadas en la fotosíntesis se reduce durante la senescencia (Bate, et al., J. Exp. Bot. 42:801-811, 1991; Hensel, et al., Plant Cell 5:553-564, 1993; Jiang, et al., Plant Physiol. 101:105-112, 1993), mientras que la  
10 concentración del ARNm de los genes que codifican proteínas que se cree que están implicadas en el programa de senescencia, aumentan (Graham, et al., Plant Cell 4:349-357, 1992, Hensel, et al., Plant Cell 5:553-564, 1993; Kamachi, et al., Plant Physiol. 93:1323-1329, 1992; Taylor, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5118-5122, 1993).

Se ha sugerido que se pueden usar promotores específicos de senescencia para dirigir la expresión de genes seleccionados durante la senescencia. Por ejemplo, la patente de EE.UU 5.689.042, utiliza una construcción génica  
15 que comprende un promotor específico de senescencia, SAG12, ligado operativamente a una secuencia de ADN que codifica isopentenil-transferasa de *Agrobacterium* (IPT), no conectada nativamente a la secuencia del promotor. Las plantas transgénicas que comprenden esta construcción mantienen las hojas verdes más tiempo, dirigiendo la expresión de IPT mediante el promotor SAG12. Se sabe que IPT incrementa la concentración de citoquinina, una clase de hormona vegetal cuya concentración se reduce durante la senescencia y, por tanto, puede jugar un papel  
20 para controlar la senescencia de las hojas.

De forma similar, Gan y Amasino muestran que la inhibición de la senescencia de las hojas se puede lograr mediante la producción autorregulada de citoquinina (Gao, et al, Science 270:1986-1988, 1995). Se han identificado otros promotores inducibles por senescencia. Por ejemplo, se describe el promotor SARK de *Phaseolus vulgaris* en WO 99/29159 y en Hajouj et al. Plant Physiol.124:1305-1314 (2000).

25 Un aspecto útil y deseable de regular internamente la expresión del gen de interés está en la capacidad de regular la expresión sólo en aquellas células que experimentan la senescencia, dejando por tanto a las células normales invariables y libres de los posibles efectos negativos de la sobreproducción de citoquinina.

Aunque se ha demostrado que el uso de la expresión de ITP controlada por SAG12 controla la senescencia de las hojas, otros fenotipos de tales plantas no se comprenden bien. La presente invención se dirige a éstas y otras  
30 necesidades.

**Resumen breve de la invención**

La presente invención se refiere al desarrollo de plantas resistentes a la sequía. Los métodos de la invención proporcionan plantas con resistencia a la sequía incrementada y otras características ventajosas, como el rendimiento incrementado. Además, las plantas de la invención también presentan una mayor eficiencia de uso del  
35 agua. Esta invención se refiere a la preparación de plantas transgénicas que expresan una isopentenil-transferasa bajo el control de un promotor inducible por senescencia.

Los métodos de la invención comprenden (a) transformar una población de plantas con una casete de expresión recombinante que comprende un promotor SARK inducible por senescencia, que es idéntico, al menos en un 95%, al promotor de SEQ ID N°:1, ligado operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica isopentenil-transferasa; y (b) seleccionar una planta que es resistente al estrés por sequía, en la que la resistencia al estrés por  
40 sequía se confiere a la planta mediante la presencia de una casete de expresión recombinante. La etapa de transformación con la casete de expresión se puede realizar usando cualquier método conocido. Por ejemplo, la población de plantas se puede transformar con la casete de expresión usando *Agrobacterium*. La invención proporciona así mismo el uso de una casete de expresión recombinante que comprende un promotor SARK inducible por senescencia, que es idéntico, al menos en un 95%, al promotor de SEQ ID N°:1, ligado operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica isopentenil-transferasa, para preparar una planta resistente al estrés por sequía.  
45

El promotor SARK se prepara convenientemente a partir de *Phaseolus vulgaris* y tiene una secuencia idéntica, al menos en un 95%, al promotor de SEQ ID N°:1. En algunas realizaciones, la isopentenil-transferasa (IPT) es de  
50 *Agrobacterium*. Una secuencia modelo (IPT) es una que sea idéntica al menos en un 95% a la SEQ ID N°:3.

Los métodos se pueden realizar en cualquier planta susceptible de transformación con construcciones de expresión recombinante. Se ejemplifica aquí la expresión en tabaco. Otras plantas usadas convenientemente en la invención incluyen hierbas de césped.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra que las plantas de tabaco WT presentaban un marchitamiento progresivo de las hojas, mientras que dos líneas transgénicas independientes no mostraban síntomas de marchitamiento durante un estrés por sequía de 5 y 7 días sin agua.

- 5 Las Figuras 2A-2L muestran plantas de tabaco de 4 meses de edad sometidas a estrés por sequía seguido por rehidratación. Tanto las plantas de tipo silvestre (Fig. 2A) como las de tipo transgénico (Figs. 2B y 2C) presentaban síntomas de marchitamiento de las hojas tras 7 días de sequía. Los síntomas de marchitamiento de las hojas se hacían más pronunciados tras 18 días de sequía, tanto en las WT (Fig. 2D), como en las dos líneas transgénicas (Figs. 2B y 2F). La rehidratación de las plantas durante 7 días producía escasos efectos sobre las plantas WT marchitas (Fig. 2G), pero inducía la recuperación parcial de las líneas transgénicas (Figs. 2H y 2I), mostrando la línea transgénica T4-24 (Fig. 2I) una recuperación mejor que la línea transgénica T2-36 (Fig. 2H). La rehidratación de las plantas durante 14 días no recuperó las plantas WT (Fig. 2J), pero recuperó totalmente ambas líneas transgénicas (Figs. 2K y 2L).

- 15 La Figura 3 muestra el peso fresco de las plantas mostradas en la Fig. 2 tras 14 días de volver a regar. Los valores son Media  $\pm$  desviación estándar (n = 40).

La Figura 4 muestra plantas de *Arabidopsis* WT y plantas transgénicas T1 (pSARK, TPT) tras estrés por sequía y 5 días de rehidratación.

### Descripción detallada de la invención

#### Definiciones

- 20 Según se usan aquí, los términos “resistencia a la sequía” o “tolerancia a la sequía” se refieren a la capacidad de una planta para recuperarse de períodos de estrés por sequía (es decir, poca o ninguna agua durante un período de días). Típicamente, el estrés por sequía será al menos de 5 días, y puede ser de hasta 18 a 20 días.

- 25 El término “eficiencia de uso de agua” se refiere a la capacidad de una planta para crecer sin sufrir las consecuencias en su rendimiento, bajo períodos prolongados con cantidades de agua inferiores a las normales (típicamente aproximadamente la mitad).

El término “senescencia” (también denominado muerte celular programada), se refiere a un proceso activo, controlado genéticamente, mediante el que las células y tejidos vegetales pierden su organización y función.

El término “gen asociado a senescencia”, se refiere a un gen implicado en la senescencia. La expresión de tal gen se puede inducir (o alterar) durante el proceso de la senescencia.

- 30 Según se usa aquí, el término “promotor” incluye todas las secuencias capaces de dirigir la transcripción de una secuencia codificadora en una célula vegetal. Por tanto, los promotores usados en las construcciones de la invención incluyen elementos de control transcripcional que actúan en cis y secuencias reguladoras que están implicadas en regular o modular la sincronización y/o velocidad de transcripción de un gen. Por ejemplo, un promotor puede ser un elemento de control transcripcional que actúa en cis, incluyendo un activador, un promotor, un terminador de la transcripción, un origen de replicación, una secuencia de integración cromosómica, regiones en 5' y 35 3' no traducidas, o una secuencia intrónica, que están implicadas en la regulación transcripcional. Estas secuencias que actúan en cis, interaccionan típicamente con proteínas u otras biomoléculas para realizar (iniciar/detener, modular, etc.) la transcripción.

- 40 Un “promotor inducible por maduración” es un promotor que confiere especificidad temporal a una secuencia codificadora ligada operativamente, de forma que la expresión se produce una vez completada la maduración y/o durante el proceso de senescencia.

Un “promotor inducible por senescencia” es un promotor que confiere especificidad temporal a una secuencia codificadora ligada operativamente, de forma que la expresión se produce durante el proceso de senescencia.

- 45 El término “planta” incluye plantas completas, estructuras/órganos de vástagos vegetativos (p.ej. hojas, tallos y tubérculos), raíces, flores y órganos/estructuras florales (p.ej. brácteas, sépalos, pétalos, estambres, carpelos, anteras y óvulos), semillas (incluyendo embrión, endospermo y cubierta de la semilla) y fruta (el ovario maduro), tejido vegetal (p.ej. tejido vascular, tejido subterráneo y similares) y células (p.ej. células guarda, células del huevo, tricomas y similares), y la progenie de las mismas. El tipo de plantas que se puede utilizar en el método de la invención es generalmente tan amplio como la clase de plantas superior e inferior susceptible de técnicas de transformación, incluyendo angiospermas (plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas), gimnospermas, helechos y algas multicelulares. Incluye plantas de diversos niveles de ploidía, incluyendo aneuploides, poliploides, diploides, haploides y hemizigotos.

Dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos se llaman “idénticas” si la secuencia de nucleótidos o residuos aminoácidos, respectivamente, en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para una correspondencia

máxima, según se describe más abajo. El término “complementario a” se usa aquí para significar que la secuencia es complementaria a toda o una parte de una secuencia polinucleotídica de referencia.

5 El alineamiento óptimo de secuencias para comparación se puede realizar mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Add. APL. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología of Needleman y Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 2444 (1988), mediante aplicaciones automatizadas de dichos algoritmos (GAP, BSTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

10 El “porcentaje de identidad de secuencia” se determina comparando dos secuencias alineadas óptimamente sobre una ventana de comparación, en la que la porción de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos), comparada con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que aparece la base del ácido nucleico o el residuo aminoácido exacto en ambas secuencias, para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

15 El término “identidad sustancial” de secuencias polinucleotídicas significa que un polinucleótido comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 70%, una identidad de secuencia de al menos 70%, al menos 85%, 90%, 93%, 95% o 97%, comparado con una secuencia de referencia, usando los programas aquí descritos; preferiblemente BLAST usando parámetros estándar, según se describe más abajo. El experto en la materia reconocerá que estos valores se pueden ajustar apropiadamente para determinar la identidad correspondiente de proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degeneración del código genético, la similitud de aminoácidos, el posicionamiento en el marco de lectura y similares. La identidad sustancial de secuencias de aminoácidos para estos propósitos normalmente significa una identidad de secuencia de al menos 40%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 97%, comparada con una secuencia de referencia usando los programas aquí descritos. Los polipéptidos que son “sustancialmente similares” comparten secuencias según se indicó anteriormente, excepto porque aquellas posiciones de residuos que no son idénticos pueden diferir por cambios de aminoácidos conservativos. Las sustituciones de aminoácidos conservativas se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas hidroxílicas es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales amida es asparragina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservativos preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, ácido aspártico-ácido glutámico, y asparragina-glutamina.

20 Otra indicación de que las secuencias nucleotídicas son sustancialmente idénticas es si dos moléculas hibridan entre sí, o con un tercer ácido nucleico, bajo condiciones restrictivas. Las condiciones restrictivas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en distintas circunstancias. Generalmente, las condiciones restrictivas se seleccionan para que sean aproximadamente 5°C inferiores al punto de fusión térmico (T<sub>m</sub>) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T<sub>m</sub> es la temperatura (a una fuerza iónica y pH definidos), a la que el 50% de la secuencia diana híbrida con una sonda que coincide perfectamente. Típicamente, las condiciones restrictivas serán aquéllas en las que la concentración de sal es aproximadamente 0,02 molar a pH 7 y la temperatura es al menos 60°C.

25 Para los fines de esta divulgación, condiciones restrictivas para hibridaciones son aquéllas que incluyen al menos un lavado en 0,2X SSC a 63°C durante 20 minutos, o condiciones equivalentes. Condiciones moderadamente restrictivas incluyen al menos un lavado (normalmente 2) en 0,2XSSC a una temperatura de al menos aproximadamente 50°C, normalmente aproximadamente 55°C, durante 20 minutos, o condiciones equivalentes.

30 El término “casete de expresión” se refiere a cualquier sistema de expresión recombinante para el propósito de expresar una secuencia de ácido nucleico de la invención *in vitro* o *in vivo*, constitutiva o induciblemente, en cualquier célula, incluyendo, además de células vegetales, células procarióticas, de levaduras, hongos, insectos o mamíferos. El término incluye sistemas de expresión lineales o circulares. El término incluye todos los vectores. Las casetes pueden permanecer episomales o integrarse en el genoma de la célula hospedadora. Las casetes de expresión pueden tener la capacidad de autorreplicarse o no, es decir, de dirigir sólo transitoriamente la expresión en una célula. El término incluye casetes de expresión recombinantes que contienen sólo los mínimos elementos necesarios para la transcripción del ácido nucleico recombinante.

### Preparación de casetes de expresión

Las casetes de expresión comprenden un promotor de senescencia inducible SARK, que es idéntico al menos en un 95% al promotor de SEQ ID N°:1. El promotor SARK de *Phaseolus vulgaris* se ejemplifica más abajo. El promotor se

describe en WO 99/29159 y en Hajouj et al Plant Physiol. 124:1305-1314 (2000). Un experto en la materia reconocerá el promotor particular usado en las construcciones de la invención, a condición de que la expresión se induzca por senescencia. Así, por ejemplo, se pueden usar convenientemente en las casetes de expresión de la invención, promotores de homólogos de los genes SARK de otras especies.

- 5 Los promotores se usan para dirigir la expresión de un gen que codifica una proteína que inhibe o ralentiza el proceso de senescencia. El gen codifica isopentenil-transferasa (IPT), que cataliza la síntesis de citoquinina. Se presentan Ejemplos de secuencias de IPT en: Crespi et al, EMBO J. 11:795-804 (1992); Goldberg et al, Nucleic Acids. Res. 12:4665-4677 (1984); Heide Kamp et al., Nucleic Acids Res., 11:6211-6223 (1983); Strabala et al, Mol. Gen. Genet. 216:388- 394 (1989) GenBank Accession Number: NC\_003308, así como X14410 (véanse SEQ ID N°: 2 y 3)

### Producción de plantas transgénicas

- 15 Se pueden introducir construcciones de ADN según se divulgan aquí, en el genoma de la planta hospedadora deseada mediante diversas técnicas convencionales. Por ejemplo, la construcción de ADN se puede introducir directamente en el ADN genómico de la célula vegetal usando técnicas como la electroporación y la microinyección de protoplastos de células vegetales, o las construcciones de ADN se pueden introducir directamente en el tejido vegetal usando métodos biolísticos, como el bombardeo con partículas de ADN. Alternativamente, las construcciones de ADN se pueden combinar con regiones flanqueantes de ADN-T adecuadas e introducirse en un vector hospedador de *Agrobacterium tumefaciens* convencional. Las funciones de virulencia del hospedador de *Agrobacterium tumefaciens* dirigirán la inserción de la construcción y el marcador adyacente hacia el ADN de la célula vegetal cuando la célula es infectada por la bacteria.

- 20 Las técnicas de microinyección se conocen bien en la técnica y están bien descritas en la literatura científica y de patentes. La introducción de construcciones de ADN usando precipitación de polietilenglicol se describe en Paszkowski et al. Embo J. 3:2717-2722 (1984). Las técnicas de electroporación se describen en Fromm et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5824 (1985). Las técnicas de transformación biolística se describen en Klein et al. Nature 327:70-73 (1987).

Las técnicas de transformación en las que interviene *Agrobacterium tumefaciens*, incluyendo el desarmado y uso de vectores binarios, se describen bien en la literatura científica. Véanse, por ejemplo Horsch et al, Science 233:496-498 (1984), y Fraley et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4803 (1983).

- 30 Las células vegetales transformadas que se derivan mediante cualquiera de las técnicas de transformación anteriores se pueden cultivar para regenerar una planta completa que posee el genotipo transformado y, por tanto, el fenotipo deseado, como falta de semillas. Tales técnicas de regeneración se basan en la manipulación de ciertas fitohormonas en un medio de crecimiento de cultivo celular, típicamente basado en un marcador de biocida y/o herbicida, que se ha introducido junto con las secuencias nucleotídicas deseadas. La regeneración de plantas a partir de protoplastos cultivados se describe Evans et al., Protoplasts Isolation y Culture, Handbook of Plant Cell Culture, págs. 124-176, MacMillan Publishing Company, New York, 1983; y Binding, Regeneration of Plants, Plant Protoplasts, págs. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985. La regeneración también se puede obtener del callo, explantes, órganos o partes de los mismos. Tales técnicas de regeneración se describen generalmente en Klee et al. Ann. Rev. of Plant Phys. 38:467-486 (1987).

- 40 Un experto en la materia reconocerá que una vez que la casete de expresión se incorpora de forma estable en las plantas transgénicas y se confirma que es utilizable, se puede introducir en otras plantas mediante cruzamiento sexual. Se puede usar cualquier número de técnicas de cruzamiento estándar, dependiendo de las especies a cruzar.

- 45 Se pueden usar las casetes de expresión aquí divulgadas para conferir resistencia a la sequía esencialmente a cualquier planta. Por tanto, la invención se puede usar en un amplio rango de plantas, incluyendo especies de los géneros *Asparagus*, *Atropa*, *Avena*, *Brassica*, *Citrus*, *Citrullus*, *Capsicum*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Daucus*, *Fragaria*, *Glycine*, *Gossypium*, *Helianthus*, *Heterocallis*, *Hordeum*, *Hyoscyamus*, *Lactuca*, *Linum*, *Lolium*, *Lycopersicon*, *Malus*, *Manihot*, *Majorana*, *Medicago*, *Nicotiana*, *Oryza*, *Panicum*, *Pannasetum*, *Persea*, *Pisum*, *Pyrus*, *Prunus*, *Raphanus*, *Secale*, *Senecio*, *Sinapis*, *Solanum*, *Sorghum*, *Trigonella*, *Triticum*, *Vitis*, *Vigna*, y, *Zea*.

- 50 En algunas realizaciones, los métodos de la invención se usan para conferir resistencia a la sequía a hierbas de césped. Los expertos en la materia conocen diversas hierbas para césped. por ejemplo se pueden usar, festuca, *Festuca spp.* (p.ej., *F. arundinacea*, *F. rubra* *F. ovina var. duriuscula*, y *F. ovina*). Otros céspedes incluyen poa pratense *Poa pratensis* y agrostis rastrera *Agrostis palustris*.

- 55 Los expertos en la materia reconocerán que se pueden usar diversas especies de plantas como modelos para predecir los efectos fenotípicos de la expresión de transgenes en otras plantas. Por ejemplo, se reconoce que tanto las plantas de tabaco (*Nicotiana*) como las de *Arabidopsis* son modelos útiles de expresión de transgenes, particularmente en otras dicotiledóneas.

La resistencia a la sequía se puede ensayar según cualquiera entre varias técnicas bien conocidas. Por ejemplo, se

pueden cultivar plantas en condiciones en las que se proporciona a la planta menos del agua óptima. La resistencia a la sequía se puede determinar mediante cualquiera entre varias mediciones estándar, incluyendo la presión de turgencia, crecimiento, productividad y similares. En algunas realizaciones se pueden usar convenientemente los métodos descritos en la sección de los ejemplos, más abajo.

## 5 Ejemplos

### Identificación del gen SARK (quinasa de receptor asociado con la senescencia)

El ADNc del gen SARK se aisló de *Phaseolus vulgaris* mediante una técnica de visualización diferencial, según se describe en Hajouj et al (2000). La secuencia de la totalidad del ADNc de SARK reveló que codifica una serina/treonina proteína-quinasa. Se observó un dominio transmembranar hidrófobo, sugiriendo que el gen SARK codifica una quinasa de receptor (Hajouj et al 2000). El análisis de transferencia de Northern reveló la sobrerregulación del gen SARK durante las etapas tempranas de senescencia de las hojas. La iniciación de la expresión del gen SARK precedió cualquier señal visual (amarilleamiento) de senescencia de las hojas de judía unidas. Los discos de las hojas, cuando se incubaban en la oscuridad, mostraban un amarilleamiento acelerado.

De forma similar a las hojas unidas intactas, las concentraciones de transcritos del gen SARK se incrementaban al inicio del proceso de senescencia, previamente a cualquier amarilleamiento visual de la hoja (Hajouj et al (2000)). Por tanto, podemos definir el gen SARK como un gen asociado a senescencia (SAG). Además, la apariencia de los transcritos de SARK en las etapas muy tempranas de la senescencia, tanto en las hojas unidas como desprendidas, sugiere un papel regulatorio en el proceso de senescencia. Se produjeron anticuerpos frente a la proteína SARK y se usaron para análisis de transferencia western. El patrón temporal de las concentraciones de la proteína SARK se asemejaba al del ARN y además soporta la teoría de que la proteína SARK está asociada con los procesos de senescencia de las hojas unidas y desprendidas.

### Aislamiento del promotor SARK

Se aisló la región aguas arriba del gen SARK mediante un enfoque de PCR inversa, según se describió por Maniatis et al. (Molecular cloning, a laboratory manual 2ª edición). El ADN genómico de judía se aisló mediante un kit de extracción de ADN de plantas (Scotlab), según las instrucciones del fabricante. El ADN se digirió con la enzima de restricción XbaI y se recircularizó mediante religamiento. Se usaron los siguientes cebadores para la reacción PCR.

- 1) 5' ACGTCCAACCAAAGACC 3'
- 2) 5' TCTGCAGCTAGTGCATATCC 3'

La reacción PCR se realizó en las siguientes condiciones: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 2 min a 72°C durante 40 ciclos y luego 10 min a 72°C.

Se amplificó un fragmento de ADN de 1,4 kb. La secuenciación del ADN de este fragmento reveló que incluía 340 pb del extremo 5' del ADN de SARK. Esta secuencia reveló la existencia de un intrón próximo al extremo 5' del gen SARK.

Para aislar un fragmento más largo aguas arriba de la región 5' del gen SARK, se realizó una técnica PCR térmica de entrelazado asimétrico (TAIL), según Liu et al (Plant J. 8:457-463). Se usaron tres cebadores:

- 1) 5' TCTGCAGCTAGTGCATATCC 3'
- 2) 5' TTGGTGGATGAATAATGGAG3'
- 3) 5' ACTGTAACCTACAAATTAGA 3'

Se realizaron tres reacciones PCR para amplificar las secuencias diana.

Se secuenciaron los productos de PCR. Se identificaron aproximadamente 800 pb del extremo 5' del ADNc y se muestran en la SEQ ID N°:1. El fragmento de PCR se clonó en pUC57.

### Creación de plantas transgénicas que llevan la construcción pSARK:IPT.

La ipt (isopentenil-transferasa) de *Agrobacterium*, la enzima que cataliza la etapa limitante de velocidad en la biosíntesis de citoquininas, se fusionó con el promotor SARK. Gan y Amasino (Science 270; 1996 (1995)) han demostrado que el promotor del gen SAG12 de *Arabidopsis* (gen asociado a senescencia), cuando estaba vinculado al gen IPT inducía la síntesis de citoquininas y retrasaba el proceso de senescencia de las hojas. El IPT de *Agrobacterium* estaba vinculado operativamente al promotor de 830 nucleótidos de longitud del gen SARK y se introdujo como fragmento HinIII/XbaI en pBI101 (ClonTech), para producir el pBIp-SARK:IPT. La transformación de *Agrobacterium* se realizó mediante electroporación.

Transformación de tabaco

Se transformaron plantas mediante el método de transformación mediado por *Agrobacterium*. La expresión del gen de isopentenil-transferasa de *Agrobacterium* (IPT) bajo la regulación del promotor SARK, producía senescencia retrasada de las hojas de tabaco. El tabaco transgénico que contiene el p-SARK-IPT ha mostrado un retraso considerable en la senescencia regular tanto de las hojas individuales como de las plantas completas. Las plantas WT florecen normalmente de 3 a 3,5 meses tras la germinación y comienzan a presentar amarilleamiento de las primeras hojas (en su base) tras 4 meses. Sin embargo, las plantas transgénicas presentaban una senescencia significativamente retrasada y no mostraban ningún amarilleamiento de las primeras hojas hasta 10 meses después de la germinación.

Las hojas desprendidas de tabaco transgénico mostraban también un retraso considerable en el amarilleamiento cuando se incubaban en condiciones de oscuridad. Normalmente, las hojas desprendidas muestran un amarilleamiento inicial tras 5-6 días de incubación en la oscuridad y completan su amarilleamiento tras 10-12 días. Las hojas desprendidas de las plantas transgénicas, sin embargo, no mostraban ninguna señal de amarilleamiento durante 20 días, e incluso tras 30 días de incubación en la oscuridad estaban todavía verdes, aunque se observaba un amarilleamiento inicial. Estos resultados demostraron que, además de las hojas unidas, el mecanismo autorregulador de la síntesis de citoquininas en las hojas desprendidas de las plantas transgénicas era también funcional.

Transformación de *Arabidopsis*

Se realizó la amplificación por PCR del pSARK:IPT usando los siguientes cebadores con la polimerasa de ADN turbo Pfu (Stratagene).

SARKIPF        5'TTCCTTAGATGCTGTCACAATCA3'  
SARKIPTR       5'GAACATCTTATCCAGATGAAGACAG3'

El molde para la amplificación por PCR fue el ADN de tabaco transgénico que contenía el pSARK:IPT.

El producto de PCR (pSARK:IPT) se clonó con el kit de clonaje TOPO en células competentes para Topo (DH5 - T1), según las instrucciones del fabricante (Invitrogen).

Se realizaron minipreparaciones del plásmido de ADN con el kit Qiaprep (Qiagen).

El plásmido se digirió con BgIII y EcoRI y se ligó con el vector Cambia 1380 (CAMBIA, Canberra, Australia).

La electroporación del vector Cambia que llevaba pSARK:IPT se realizó en células (DH5) competentes. Se realizó una minipreparación del plásmido de ADN de las colonias DH5 transfectedas con el kit Qiaprep (Qiagen). El vector Cambia que contenía el pSARK:IPT se introdujo electroforéticamente en *Agrobacterium* para transformación de plantas. Plantas de *Arabidopsis thaliana* se transformaron mediante la técnica de infiltración de vacío con *Agrobacterium tumefaciens* que contenía el pSARK:IPT y el gen de resistencia a higromicina (gen hptII) para selección en plantas.

**Expresión de isopentenil-transferasa (IPT) bajo la regulación del promotor del gen SASRK en plantas de tabaco confiere resistencia a la sequía.**

Se cultivaron plantas de tabaco transgénicas que llevaban pSARK:IPT en el invernadero durante 2-3 meses. No se pudieron visualizar diferencias morfológicas entre las plantas transgénicas y WT durante los primeros 3-4 meses.

Después de la iniciación de la floración, se sometió a plantas de tabaco de 3 meses de edad a estrés por sequía (no se añadió agua a las macetas) durante 5-16 días. Las plantas WT mostraban un marchitamiento progresivo de las hojas (Fig. 1). Sin embargo, las plantas transgénicas (dos líneas independientes) no mostraban síntomas de marchitamiento (Fig. 1) durante un estrés por sequía de 5 y 7 días sin agua. Los períodos de deshidratación largos, de 16 días, causaban un marchitamiento grave e irreversible de las plantas WT y un marchitamiento menos grave y reversible en las plantas que llevaban el pSARK:IPT. La rehidratación (volver a regar las plantas deshidratadas) producía la recuperación de las plantas pSARK:IPT transgénicas, mientras que las plantas WT no se podían recuperar (Fig. 1) del estrés por sequía.

Se cultivaron en el invernadero durante 5 meses plantas de tipo silvestre (WT) y dos líneas transgénicas de plantas de tabaco que llevaban el pSARK:IPT (T2-36 y T4-24). No se pudieron observar diferencias morfológicas entre las plantas transgénicas y las de tipo silvestre durante los primeros 3-4 meses de crecimiento en condiciones óptimas. Después de la iniciación de la floración, plantas de tabaco de 4 meses de edad se sometieron a estrés por sequía (no se añadió agua a las macetas) durante un período de 18 días consecutivos (Fig. 2, A-F). Tanto las plantas de tipo silvestre (Fig. 2<sup>a</sup>) como las plantas transgénicas (Figs. 2B y 2C) mostraron síntomas de marchitamiento de las hojas tras 7 días de sequía. Los síntomas de marchitamiento de las hojas se hicieron más pronunciados tras 18 días de sequía, tanto en las WT (Fig. 2D) como en las dos líneas transgénicas (Figs. 2E y 2F). La rehidratación de las plantas durante 7 días produjo escasos efectos en plantas WT marchitas (Fig. 2G), pero indujo la recuperación

parcial de las líneas transgénicas (Figs. 2H y 2I), mostrando la línea transgénica T4-24 (Fig. 2I) una recuperación mejor que la línea transgénica T2-36 (Fig. 2H). La rehidratación de las plantas durante 14 días no recuperó las plantas WT (Fig. 2J), pero recuperó totalmente ambas líneas transgénicas (Figs. 2K y 2L). Las mediciones del peso fresco de las plantas de tipo silvestre y transgénico al final del período de rehidratación mostró que las líneas transgénicas alcanzaban un peso fresco de ~250 gramos/planta, mientras que el tipo silvestre permanecía seco, con un peso que no excedía el 20% del de las líneas transgénicas (Fig. 2). La Figura 3 muestra el peso fresco de las plantas mostradas en Fig. 2 tras 14 días de regar de nuevo. Los valores son Media±desviación estándar (n = 40).

**La expresión del gen IPT bajo la regulación del promotor del gen SARK confiere resistencia a la sequía a plantas transgénicas de *Arabidopsis***

- 10 Se cultivaron plantas de *Arabidopsis thaliana* bajo un régimen de día largo (16/8 h) a 23°C. No se pudieron distinguir diferencias morfológicas ni de desarrollo entre las plantas WT y las transgénicas (pSARK:IPT) cultivadas en condiciones normales. Sin embargo, cuando se sometía a plantas de dos meses de edad (en la etapa de floración avanzada) a estrés por sequía (no se añadía agua a las macetas), presentaban resistencia a la sequía diferencial. Las plantas WT sufrían un marchitamiento grave irreversible y amarilleamiento de las hojas tras 12 días de deshidratación, mientras que 10 líneas independientes diferentes de las plantas transgénicas T1 (pSARK:IPT), mostraban un marchitamiento ligero y se recuperaban del estrés por sequía tras 5 días de rehidratación (Fig. 4).

SEQ ID NO: .1

TTCTTCCTTAGATGCTGTCACAATCATTTTCATTATTTTTATATTTGGTTTTACTGC  
 ACAAGTGACATAATGAGTGCTGAATTGTGGTATTGTGGGAACCTTAAGCAATAGT  
 TTCATTAGACCACCTGTGCAGGTTTTTGGGGTGGTAGAAGGAATGCTCGTGTCT  
 CTGAATGAGTTCTATTTTCATCTTTAGAACTAGTAATTTAGTTAGTTTTGGGTCT  
 CGTGGTCTACAGAGGGTTGAGATACTTTTGAAGTATCTCTCTTTTATTATATTAT  
 ACTTTTTGCTGATAAAAAAAGGIAGGTAGTTTTTTTTTGGGAATATTTGTAGGATTT  
 TGTGGAGGTGTTTGGTATAAGGATTGAAATATTTCAAAAATATTTCCATTTAATTT  
 ACTTTTTCTTATAAAAAAAATCCTCCATGAAACAAGATCATCTTCTAGAAACAAC  
 AAGTAATATATTAGAATCTCTTTCTGAATTTTCTCATTGTGAGTTATAGTACTTT  
 TTTTCCAATAATAATTATAAGTGGTAAGATGTGTGGTTGTGGAAGTTGGAAGGAA  
 AGAAGGAAAAGAAAAGGTTAGTTTTTGTTTGTATTTGAAAAGTAAGTCAAGGTCATT  
 GGCTTAGGGTTCTACCACTGCAACTATTCCACATTGGCTTCTACCACTGCAATTAT  
 TCCACATTGGCTTGTACTGTAAGGACAAAACCTTGGCATGTCAAATACTTTTCATC  
 ACATATAACCATATTATAAACTACTTTCCATCTCCATTATTCATCCACCAAAAATCT  
 AGAGTCACTGAGAGTGCAGATAACACAATTCTCTAATATAAAAAATCAGTTTGTAT  
 TCAATATACTGCAAAAAACTTATGGACCTGCATCTAATTTTTCGGTCCAACCTTGCA  
 CAGGAAAGACGACGACCGCGATAGCTCTTGCCCAGCAGACAGGGCTTCCAGTCC  
 TTTCGCTTGATCGGGTCCAATGCTGTCTCAACTATCAACCGGAAGCGGACGACC  
 AACAGTGGAAGAACTGAAAGGAACGACGCGTCTCTACCTTGATGATCGGCCTCT  
 GGTGGAGGGTATCATCGCAGCCAAGCAAGCTCATCATAGGCTGATCGAGGAGGT  
 GTATAATCATGAGGCCAACGGCGGGCTTATCTTGAGGGAGGATCCACCTCGTTG  
 CTCAACTGCATGGCGCGAAACAGCTATTGGAGTGCAGATTTTCGTTGGCATATTA  
 TTCGCCACAAGTTACCCGACCAAGAGACCTTCATGAAAGCGGCCAAGGCCAGAG  
 TTAAGCAGATGTTGCAACCCGCTGCAGGCCATTCTATTATTCAAGAGTTGGTTTA  
 TCTTTGGAATGAACCTCGGCTGAGGCCATTCTGAAAGAGATCGATGGATATCGA  
 TATGCCATGTTGTTTGTAGCCAGAACCAGATCACGGCAGATATGCTATTGCAGC  
 TTGACGCAAATATGGAAGGTAAGTTGATTAATGGGATCGCTCAGGAGTATTTTCAT  
 CCATGCGCGCCAACAGGAACAGAAAATCCCCCAAGTTAACGCAGCCGCTTTCGA  
 CGGATTCGAAGGTCATCCGTTCCGAATGTATTAGGTTACGCCAGCCCTGCGTCGC  
 ACCTGTCTTCATCTGGATAAGATGTTTCAGATC

SEQ ID NO: 2

```

1  ggatcccgtt  acaagtattg  cacgttttgt  aaattgcata  ttaatgcaat  ctggatgttt
61  aataacgaat  gtaatggcgt  agaaatatgt  attttattgt  atttatcttt  cactatgttg
121  aagtttgcaa  taatatgcta  atgtaaaatt  aaaaaattat  gtaactgccg  atttgttcaa
181  atggcgccgt  tatttcaaaa  atatctttga  ttttgttacg  aggacaacga  ctgcaggaag
241  taaataaaaag  acgctgttgt  taagaaattg  ctatcatatg  tgcccagcta  tagggccatt
301  taagttcaat  tgtgaaatag  ccgcccttat  ttgacgtct  catcaaatca  aatattaaaa
361  aatatctcac  tctgtcgcca  gcaatgatgt  aataaccgca  gaaaagtgag  agtaaatcgc
421  ggaaaaacgt  cgccgagtgg  catgaatagc  ggectccgta  ttgctgattt  agtcagcttt
481  atttgactta  aggggtgcc  cgttagtgac  aaattgcttt  caaggagaca  gccatgcccc
541  acactttgtt  gaaaaacaag  ttgccttttg  ggaagaacct  aaagccactt  gctcttcaag
601  gaggaatabc  gaggaagaga  atataacage  ctctggtaca  gacttctctt  gtgcaaaaat
661  caatttgtat  tcaacatate  gcaagacoga  ttgcccagca  gactggcctc  ccagtctctt
721  gcacaggaaa  gacatcgact  gogatagtc  ttgcccagca  gactggcctc  ccagtctctt
781  cgctcgatcg  cgtccaatgc  tgtcctcaac  tatcaaccgg  aagcgggcca  ccaacagtgg
841  aagaactgaa  aggaacgact  cgtctgtacc  ttgatgatcg  ccctttggta  aagggtatca
901  ttacagccaa  gcaagctcat  gaacggctca  ttgcccagca  gcaaatcac  gaggccaaag
961  gggggcttat  tcttgagggg  ggatctatct  cgttgcctcg  gtgcatggcg  caaagtctgt
1021  attggaacgc  ggatcttctg  tggcatatta  ttgcgaacga  gttagcagac  gaggagagct
1081  tcatgagcgt  ggccaagacc  agagttaage  agatgttacg  cccctctgca  ggtcttctta
1141  ttatccaaga  gttgggtcaa  ctttggaggg  agcctcggct  gaggccata  ctggaagggg
1201  tcgatggata  tcgatatgcc  ctgctatctg  ctaccagaa  ccagatcacg  ccgatatgc
1261  tattgcagct  cgaacgagat  atggagaata  aattgattca  cggatctcgt  caggagtctt
1321  taatccatgc  gcgtogacag  gaacagaaat  tccctttggt  gggcgcgaca  gctgtcgaag
1381  cgtttgaagg  accaccattt  cgaatgtgat  agattgcacc  agttttgttt  cagacttgtc
1441  gctatttgaa  taagatgttc  gttctttgtt  gtgttgggtg  gttgtgatag  aggcaagtgg
1501  tttgaaactt  gtttttactg  gtttattttc  agtctcttgg  acgatgtttt  acaaatataa
1561  tattgtgaaa  attgtggttt  tatattcgta  gaacgaaata  aatggtaagt  atagccgtta
1621  tcaaaaattt  gcaaaaattg  ttaaagggtc  ttttatgceg  tgaggttgtc  gacttttcat
1681  cattgtcgcg  taaggagtta  cggatatcca  taactgtaa  aacgcgcgag  aatttacggg
1741  tgggtgcatt  agtttgccgt  tcaacatgat  tttggcaata  gttggtaac  aagcactagc
1801  caaccgttcg  ataactcact  aatcgatgga  accgttcagc  tttcctctgt  gaggtctctc
1861  ttgatgatga  gctgccgtct  agtttttata  acgcccgggt  acgcattata  gacaagctt

```

SEQ ID NO: 3

```

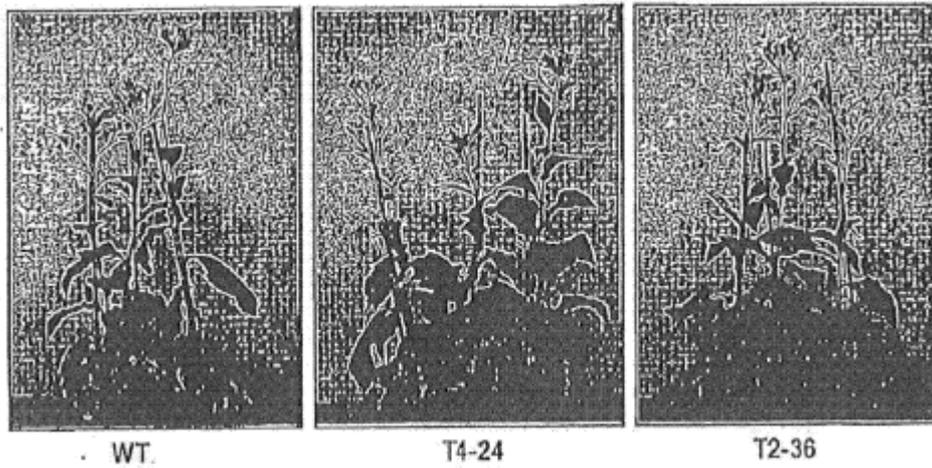
MDLRLIFGPTCTGKSTSTAIALAQQTGLFVLSLDRVQCCPQLSTGSGRPTVEELKGTTRLYLDDRPLVKGIITAKQ
AHERLIAEVHNHEAKGGLILEGGSISLLRCMAQSRYWNADFRWHIIRNELADEESFMSVAKTRVVKQMLRPSAGLS
IIQELVQIWRPRLRPILEGIDGYRYALLFATQNQITPDMLLQLDADMENKLIHGIAQEPLIHARRQEQKFLVIG
ATAVEAFEGPPFRM

```

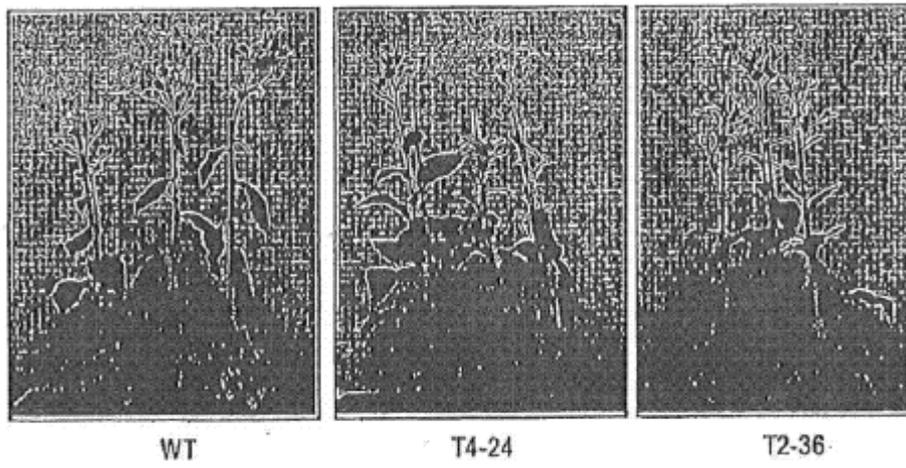
**REIVINDICACIONES**

- 1.- Método de preparación de una planta resistente al estrés por sequía, que comprende:
  - (a) Transformar una población de plantas con una casete de expresión recombinante que comprende un promotor SARK inducible por senescencia que es idéntico, al menos en un 95%, al promotor de SEQ ID N°:1, ligado operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica isopentenil-transferasa; y
  - (b) seleccionar una planta que es resistente al estrés por sequía.
- 2.- El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de transformación se realiza usando *Agrobacterium*.
- 3.- El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que el promotor SARK es de *Phaseolus vulgaris*.
- 4.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica la isopentenil-transferasa es de *Agrobacterium*.
- 5.- El método de la reivindicación 4, en el que la isopentenil-transferasa es idéntica al menos en un 95% a SEQ ID N°:3.
- 6.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la planta es una dicotiledónea.
- 7.- El método de la reivindicación 6, en el que la planta es tabaco.
- 8.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la planta es monocotiledónea.
- 9.- El método de la reivindicación 8, en el que la planta es del género *Oryza*.
- 10.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la planta es de uno de los siguientes géneros: *Asparagus, Atropa, Avena, brassica, Citrus, Citrullus capsicum, Cucumis, Cucurbita, Daucus, Festuca, Fragaria, Glycine, Gossypium, Helianthus, Heterocallis, Hordeum, Hyoscyamus, Lactuca, Linum, Lolium, Lycopersicon, Malus, Manihot, Majorana, Medicago, Nicotiana, Oryza, Panieum, Pannesetum, Persea, Pisum, Pyrus, Prunus, Raphanus, Secale, Senecio, Sinapis, Solanum, Sorghum, Trigonella, Triticum, Vitis, Vigna* y *Zea*.
- 11.- Uso de una casete de expresión recombinante que comprende un promotor SARK inducible por senescencia, que es idéntico, al menos en un 95%, al promotor de SEQ ID N°:1 ligado operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica isopentenil-transferasa, para preparar una planta resistente al estrés por sequía.
- 12.- Uso según la reivindicación 11, en el que el promotor SARK es tal y como se define en la reivindicación 3.
- 13.- Uso según la reivindicación 11 ó 12, en el que la secuencia de ácido nucleico es según se define en la reivindicación 4 ó 5.
- 14.- Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que la planta es según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10.

FIG. 1

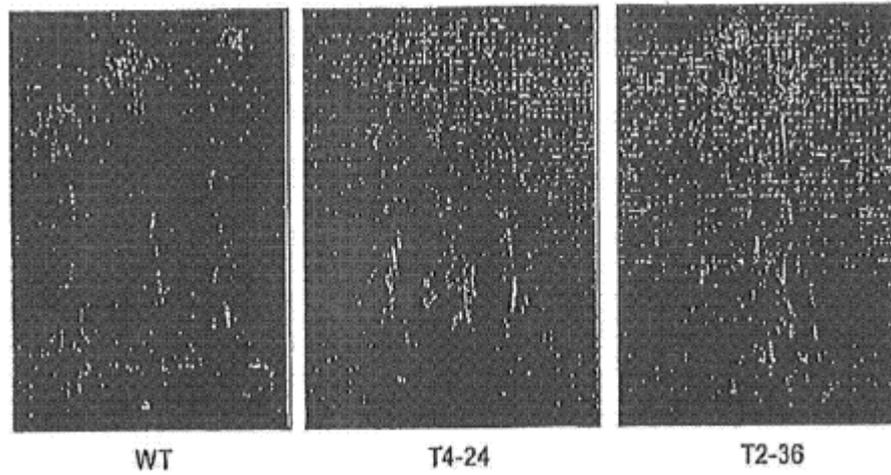


5 días de deshidratación

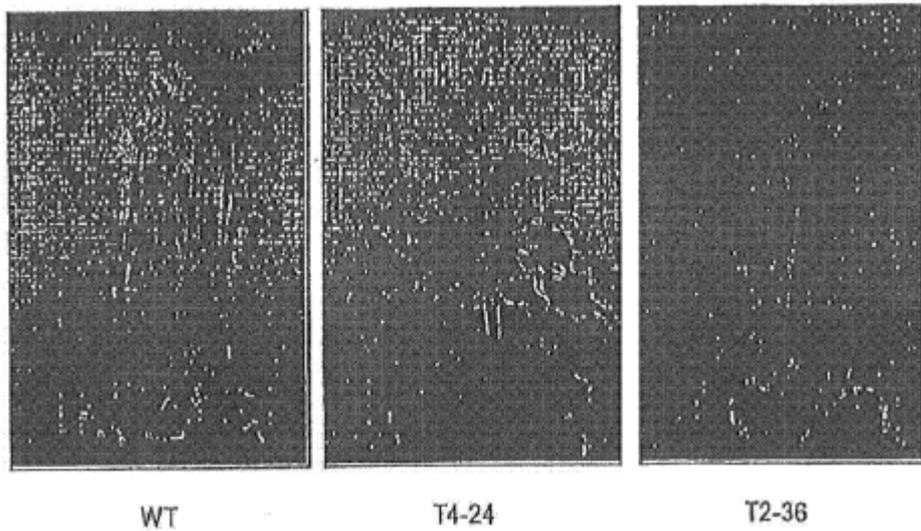


7 días de deshidratación

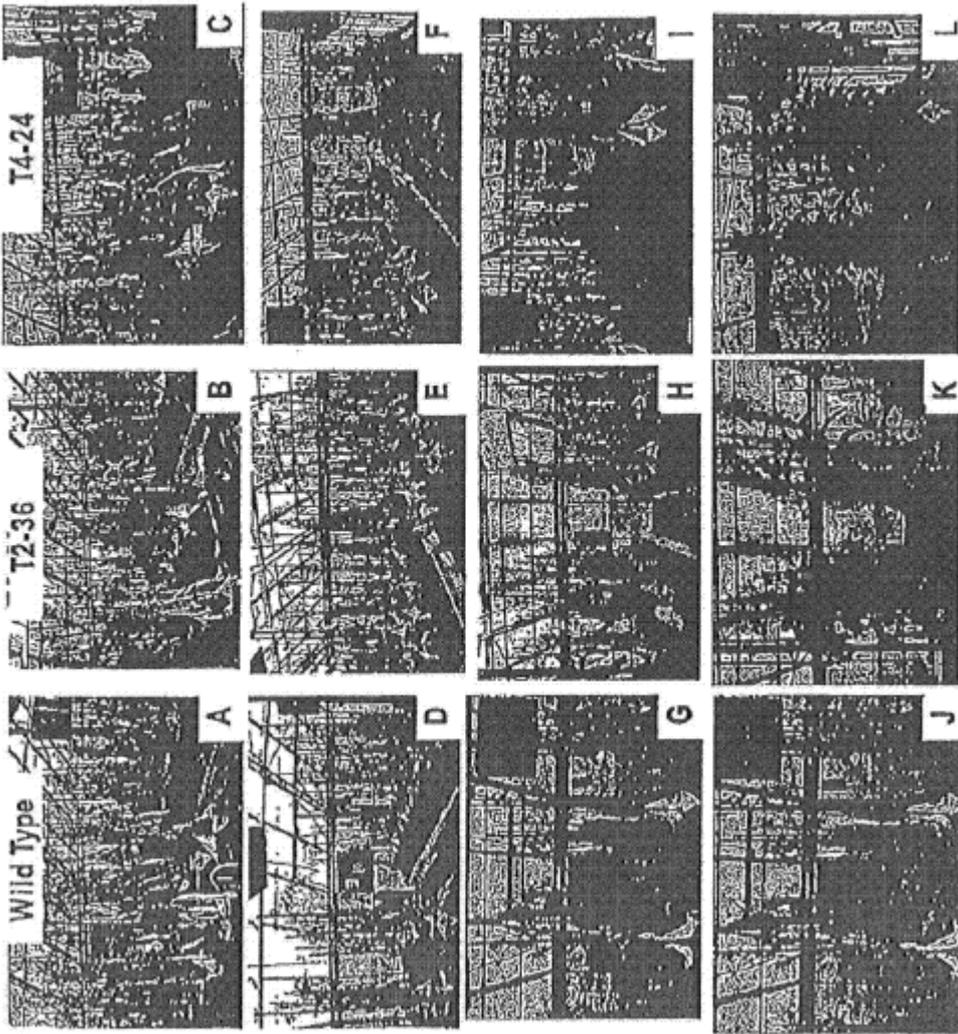
FIG. 1(Cont.)



16 días de rehidratación



8 días de rehidratación



**FIG. 2**

7 días de sequía

18 días de sequía

7 días de rehidratación

14 días de rehidratación

**FIG. 3**

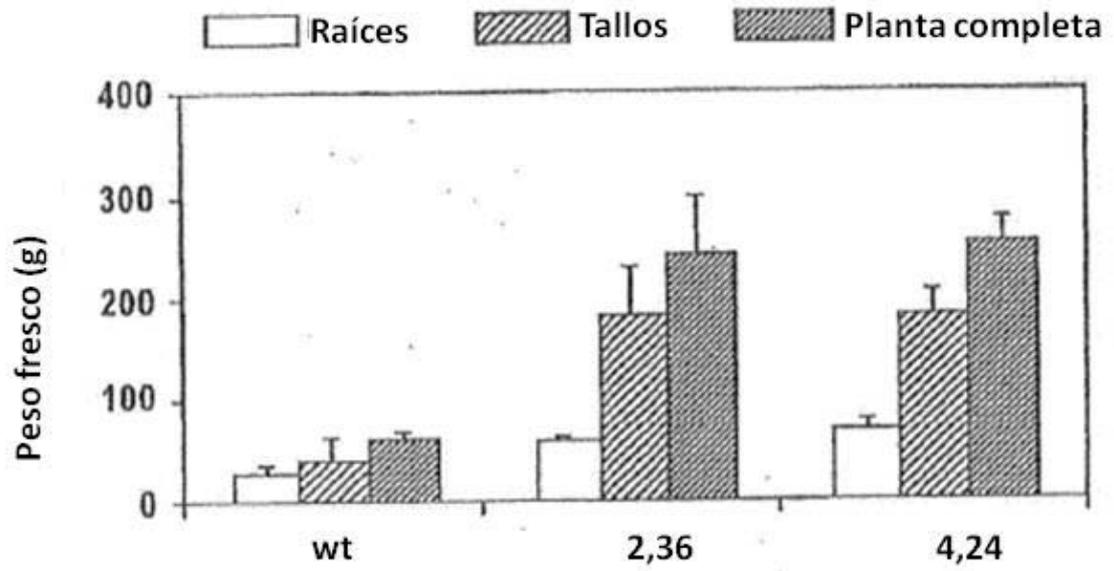
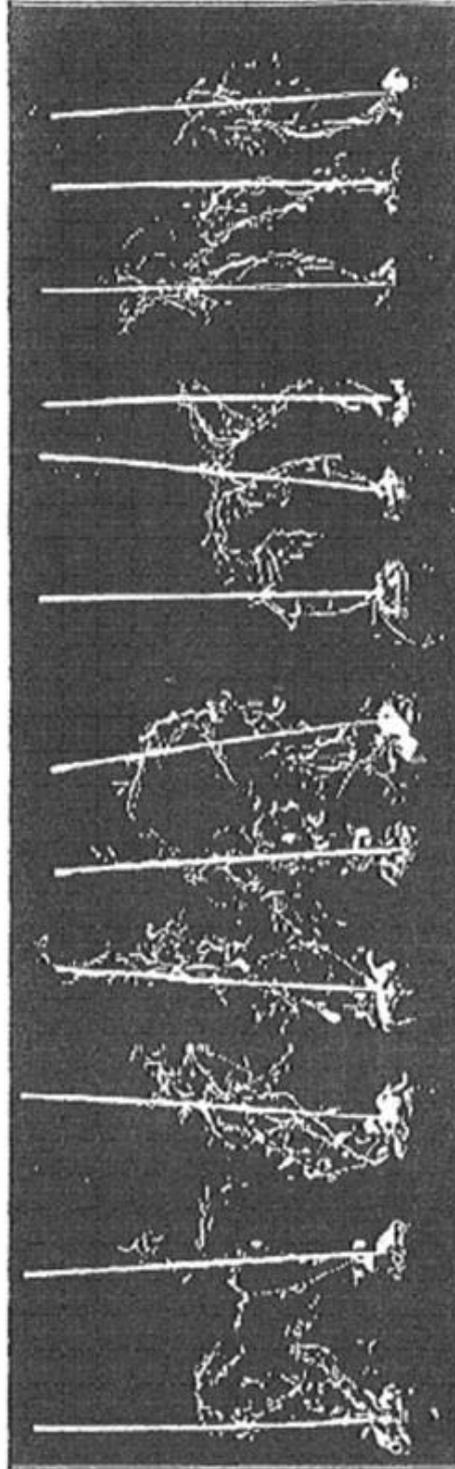


FIG. 4



WT

Arabidopsis transgénica pSARK:IPT