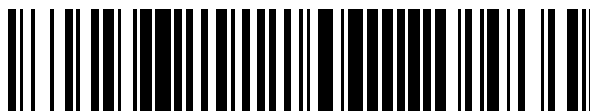


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 807**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/415** (2006.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 15/90** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2003 E 03764428 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2013 EP 1539961**

54 Título: **Transportadores mejorados y sus usos**

30 Prioridad:

**12.07.2002 US 395662 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**12.04.2013**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)  
1111 FRANKLIN STREET, 12TH FLOOR  
OAKLAND, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**SHI, HUAZHONG y  
BLUMWALD, EDUARDO**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 400 807 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

Transportadores mejorados y sus usos

**Campo de la Invención**

5 La presente invención está relacionada en general con la ingeniería genética de plantas. En particular, la invención se dirige a ácidos nucleicos y métodos para conferir tolerancia a la sal en plantas y otros organismos.

**Antecedentes de la Invención**

10 El estrés ambiental debido a la salinidad es uno de los factores más importantes que limitan la productividad de las cosechas agrícolas, que son sensibles de manera predominante a la presencia de concentraciones elevadas de sales en la tierra. Grandes áreas terrestres del mundo están afectadas por niveles de sal perjudiciales para el cultivo de plantas. Se estima que un 35-45% de los 279 millones de hectáreas de terreno de regadío está afectado actual-  
15 mente por la salinidad. Esto es exclusivo de las regiones clasificadas como terrenos áridos y desérticos (que constituyen un 25% del terreno total de nuestro planeta). La salinidad ha sido un factor importante en la historia humana y en la duración de los sistemas agrícolas. La incidencia de la sal en las tierras agrícolas ha creado inestabilidad, y con frecuencia ha destruido sociedades agrícolas antiguas y recientes. El poder de la cultura sumeria decayó en el mundo antiguo debido a la acumulación de sal en los valles de los ríos Eufrates y Tigris. Grandes áreas del subcon-  
20 tinento indio se han vuelto improductivas debido a la acumulación de sal y a prácticas de irrigación de mala calidad. En este siglo, otras áreas, que incluyen extensas regiones de Australia, Europa, suroeste de los EE.UU., las llanuras canadienses y otras, han visto descensos considerables de la productividad de los cultivos.

25 Aunque hay disponibles técnicas de ingeniería para combatir este problema, por medio del drenaje y el aporte de agua de alta calidad, estas medidas son extremadamente costosas. En la mayoría de los casos, debido a la necesidad creciente de agricultura extensiva, no es aplicable ni una eficacia de irrigación mejorada ni la instalación de sistemas de drenaje. Además, en las regiones áridas y semiáridas del mundo, la evaporación de agua supera a la precipitación. Estas tierras tienen un contenido de sal intrínsecamente elevado, y requieren grandes cantidades de irrigación para hacerse productivas. Debido a que el agua de irrigación contiene sales y minerales disueltos, la apli-  
30 cación de agua es también la aplicación de la sal, que agrava el problema de la salinidad.

35 Se está poniendo cada vez más énfasis en la modificación de plantas para adaptarse a las condiciones de cultivo restrictivas impuestas por la salinidad. Si las cosechas económicamente importantes se pudieran manipular y hacer resistentes a la sal, este terreno se podría cultivar, lo que daría como resultado mayores ventas de semillas y mayor producción de cultivos útiles. Se ha intentado la mejora genética convencional con respecto a la tolerancia a la sal durante mucho tiempo. Estas prácticas de mejora genética se han basado principalmente en las siguientes estrate-  
40 gias: a) el uso de cruces amplios entre plantas de cultivo y sus parientes salvajes más tolerantes a la sal (Rush y Epstein, *J. Amer. Hort. Sci.*, 106: 699-704 (1981)), b) cribando y seleccionando en función de una variación dentro de un fenotipo particular (Norlyn, en *Genetic Engineering of Osmoregulation*, págs. 293-309 (1980)), c) diseñando fenotipos nuevos por medio de la selección recurrente (Tal, *Plant & Soil*, 89: 199-226 (1985)). El fracaso en la generación de variedades tolerantes (dado el número bajo de variedades comercializadas y su tolerancia limitada a la sal) (Flowers y Yeo, *Aust. J. Plant. Physiol.*, 22: 875-884 (1995)) indicaría que las prácticas de mejora genética conven-  
45 cionales no son suficientes, y que para tener éxito un programa de mejora genética debería incluir la modificación de cultivos transgénicos (Bonhert y Jensen, *Aust. J. Plant. Physiol.*, 23: 661-667 (1996)).

50 Se han caracterizado varias rutas bioquímicas asociadas a la tolerancia al estrés en diferentes plantas, y se han identificado algunos de estos genes implicados en estos procesos, y en ciertos casos se ha investigado el posible papel de las proteínas en experimentos transgénicos/de sobreexpresión. Se ha propuesto que varios solutos compa-  
55 tibles desempeñan un papel en la osmorregulación bajo estrés. Se ha demostrado que tales solutos compatibles, que incluyen los carbohidratos (Tarcynski et al., *Science*, 259: 508-510 (1995)), aminoácidos (Kishor et al., *Plant Physiol.*, 108: 1387-1394 (1995)) y compuestos de N cuaternario (Ishtani et al., *Plant Mol. Biol.*, 27: 307- 317 (1995)) incrementan la osmorregulación bajo estrés. Además, se ha propuesto que las proteínas que se expresan normal-  
mente durante la maduración de las semillas (LEAs, proteínas abundantes en la embriogénesis tardía) desempeñan un papel en la retención de agua y en la protección de otras proteínas durante el estrés. La sobreexpresión de LEA en arroz proporcionó un beneficio moderado a las plantas durante el estrés hídrico (Xu et al., *Plant Physiol.*, 110: 249-  
257 (1996), y Wu y Ho, documento WO 97/13843).

50 Se ha demostrado que un único gen (*sod2*) que codifica un antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> confiere tolerancia al sodio en la levadura de fisión (Jia et al., *EMBO J.*, 11: 1631-1640 (1992) y Young y Zheng, documento WO 91/06651), aunque el papel de esta proteína asociada a la membrana plasmática parece limitarse solamente a la levadura. Una de las desventajas principales de usar este gen para la transformación de plantas está asociada a los problemas típicos que se encuentran en la expresión de genes heterólogos, es decir, el plegamiento incorrecto del producto del gen, el transporte de la proteína a la membrana de interés y la regulación de la función de la proteína.  
55

Se han identificado antiportadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> con actividad antiportadora vacuolar en tejido de almacenamiento de remolacha roja y una diversidad de especies de plantas halófitas y glicofíticas tolerantes a la sal (Barkla y Pantoja, *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 47: 159 (1996), y Blumwald y Gelli, *Adv. Bot. Res.* 25: 401 (1997)). Más recientemente, se

ha aislado un gen que codifica un antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  vacuolar de *Arabidopsis thaliana*, denominado *AtNHX1* (Blumwald et al., documento WO 99/47679). Se ha demostrado que la sobreexpresión de este gen en *Arabidopsis*, tomate, y colza aumenta la tolerancia a la sal en las plantas transgénicas (Apse et al., Science, 285: 1256-1258 (1999), Zhang y Blumwald, Nat. Biotechnol., 19: 765-768 (2001), y Zhang et al., PNAS USA, 98: 12832-12836 (2001)).

El documento WO99/47679 describe moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  para la expulsión de cationes monovalentes desde el citosol de células con tolerancia incrementada a la sal. Los ácidos nucleicos se obtienen de *Arabidopsis thaliana*.

### Breve Compendio de la Invención

La presente invención proporciona un método para aumentar la tolerancia a la sal en una planta, y el método comprende, a) introducir en la planta un polinucleótido que codifica un polipéptido transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  truncado en el extremo C-terminal, que cuando se expresa confiere una tolerancia incrementada a la sal en la planta; y en el que el polipéptido transportador truncado consiste en una secuencia de aminoácidos que es: i) al menos un 80% idéntica a SEQ ID N°:2 a lo largo de toda la longitud del polipéptido transportador truncado; y ii) menor de una longitud de 475 aminoácidos; y b) seleccionar una planta que exhibe una tolerancia incrementada a la sal en comparación con una planta en la que se ha introducido un polipéptido que codifica un péptido de SEQ ID N°:2. En ciertos aspectos, la presente invención proporciona un método para aumentar la tolerancia a la sal de una planta, y el método comprende, a) introducir en la planta un polinucleótido que codifica un polipéptido transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , que cuando se expresa confiere una tolerancia incrementada a la sal en la planta; y en el que el polipéptido transportador comprende: i) una secuencia de aminoácidos al menos un 80% idéntica a SEQ ID N°:2 a lo largo de toda la longitud del polipéptido transportador; y ii) en el que el residuo correspondiente a la serina de la posición 508 en SEQ ID N°:2 se sustituye por un aminoácido que confiere la tolerancia incrementada a la sal del polipéptido transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ; y b) seleccionar una planta con una tolerancia aumentada a la sal en comparación con una planta en la que se ha introducido un polipéptido que codifica un péptido de SEQ ID N°:2.

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona un vector de ADN recombinante adecuado para transformar células vegetales que comprende un promotor y una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  truncado en el extremo C-terminal que cuando se expresa confiere una tolerancia incrementada a la sal en una planta en comparación con una planta en la que se ha introducido un polipéptido que codifica un péptido de SEQ ID N°:2; en el que el polipéptido transportador truncado consiste en una secuencia de aminoácidos que es: i) al menos un 90% idéntica a SEQ ID N°:2 a lo largo de toda la longitud del polipéptido transportador truncado; y ii) menor de una longitud de 475 aminoácidos.

En ciertos aspectos, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  que cuando se expresa confiere una tolerancia incrementada a la sal en una planta en comparación con una planta en la que se ha introducido un polipéptido que codifica un péptido de SEQ ID N°:2, en el que el polipéptido transportador comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80% idéntica a SEQ ID N°:2 a lo largo de toda la longitud del polipéptido transportador, en el que el residuo correspondiente a la serina de la posición 508 en SEQ ID N°:2 se sustituye por un aminoácido que confiere la tolerancia incrementada a la sal.

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona una planta que comprende un polinucleótido seleccionado de (a) y (b): (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  truncado en el extremo C-terminal, que cuando se expresa confiere una tolerancia incrementada a la sal en la planta en comparación con una planta en la que se ha introducido un polipéptido que codifica un péptido de SEQ ID N°:2; y en el que el polipéptido transportador truncado consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a SEQ ID N°:2 a lo largo de toda la longitud del polipéptido transportador truncado, y en el que el polipéptido es menor de una longitud de 475 aminoácidos; y (b) un polinucleótido que codifica un polipéptido transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID N°:6; SEQ ID N°:8; y SEQ ID N°:10.

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona una planta que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , que cuando se expresa confiere una tolerancia incrementada a la sal en la planta en comparación con una planta en la que se ha introducido un polipéptido que codifica un péptido de SEQ ID N°:2; y en la que el polipéptido transportador comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80% idéntica a SEQ ID N°:2 a lo largo de toda la longitud del polipéptido transportador; y en la que el residuo correspondiente a la serina de la posición 508 en SEQ ID N°:2 se sustituye por un aminoácido que confiere la tolerancia incrementada a la sal.

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona el uso de un polinucleótido para aumentar la tolerancia a la sal en una planta, y dicho polinucleótido se selecciona de: (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  truncado en el extremo C-terminal, que cuando se expresa confiere una tolerancia incrementada a la sal en la planta; y en el que el polipéptido transportador truncado consiste en una secuencia de aminoácidos que es: i) al menos un 80% idéntica a SEQ ID N°:2 a lo largo de toda la longitud del polipéptido transportador truncado; y ii) el polipéptido transportador es menor de una longitud de 475 aminoácidos; y en el que el polinucleótido se introduce en una planta, y se selecciona una planta que exhibe una tolerancia incrementada a la sal en comparación con una

planta en la que se ha introducido un polipéptido que codifica un péptido de SEQ ID N°:2; y (b) un polinucleótido que codifica un polipéptido transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de: i) SEQ ID N°:6; ii) SEQ ID N°: 8; y iii) SEQ ID N°: 10.

5 Opcionalmente, el método incluye la introducción de un polinucleótido que tiene una secuencia que consiste en SEQ ID N°:5, 7, y 9, para conferir la tolerancia a la sal a la planta.

Opcionalmente, el método incluye la introducción de un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia que consiste en SEQ ID N°:6, 8 ó 10 para conferir la tolerancia a la sal a la planta.

Opcionalmente, el método incluye la introducción de un polinucleótido que codifica un polipéptido menor de una longitud de 475 aminoácidos para conferir la tolerancia a la sal a la planta.

10 Opcionalmente, el método para aumentar la tolerancia a la sal de una planta comprende introducir en la planta un polinucleótido que codifica un polipéptido transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> con una secuencia de aminoácidos al menos un 80% idéntica a SEQ ID N°:2 en la que en el residuo correspondiente a la serina de la posición 508 en SEQ ID N°:2 se sustituye por un aminoácido que confiere la tolerancia incrementada a la sal del polipéptido transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>.

En ciertas realizaciones, un aminoácido neutro o polar sustituye a la serina de la posición 508 en SEQ ID N°:2.

15 En ciertas realizaciones, el aminoácido neutro o polar correspondiente a la serina de la posición 508 en SEQ ID N°:2 es treonina, metionina, cisteína, asparagina o glutamina.

En ciertas realizaciones, la secuencia polinucleotídica purificada que codifica un polipéptido transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> que confiere tolerancia a la sal es SEQ ID N°:3.

20 En ciertas realizaciones, la secuencia del polipéptido transportador Na codificada por el polinucleótido purificado es SEQ ID N°:4.

Opcionalmente, la planta comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, que cuando se expresa confiere una tolerancia incrementada a la sal en la planta; y en el que el polipéptido transportador comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80% idéntica a SEQ ID N°:2 de menos de 530 aminoácidos.

25 Opcionalmente, la planta transgénica que comprende un polipéptido transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> que confiere una tolerancia incrementada a la sal en la planta tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 80% idéntica a SEQ ID N°:2, y el residuo correspondiente a la serina de la posición 508 en SEQ ID N°:2 se sustituye por un aminoácido que confiere la tolerancia incrementada a la sal. En ciertas realizaciones de la invención, el aminoácido de sustitución es un aminoácido polar o neutro, tal como cisteína.

#### Definiciones

30 El término "planta" incluye plantas completas, brotes, órganos vegetativos y/o estructuras (p.ej. hojas, tallos y tubérculos), raíces, flores y órganos florales (p.ej. brácteas, sépalos, pétalos, estambres, carpelos, anteras), óvulos (que incluyen células huevo y células centrales), semilla (que incluye cigoto, embrión, endosperma, y envoltura de la semilla), fruto (p.ej., el ovario maduro), plántulas, tejido vegetal (p.ej., tejido vascular, tejido fundamental, y similares), células (p.ej. células de guarda, células huevo, tricomas y similares), y la progenie de las mismas. La clase de plantas que se pueden usar en el método de la invención es en general tan amplia como la clase de plantas superiores e inferiores adaptables a las técnicas de transformación, que incluyen angiospermas (plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas), gimnospermas, helechos, y algas multicelulares. Se incluyen plantas de una diversidad de niveles de ploidía, que incluye aneuploidía, poliploidía, diploidía, haploidía y hemigotas.

40 La frase "secuencia de ácido nucleico" se refiere a un polímero monocatenario o bicatenario de bases de desoxirribonucleótido o ribonucleótido leído desde el extremo 5' al extremo 3'. Incluye el ADN cromosómico, plásmidos autorreplicantes, polímeros infecciosos de ADN o ARN y ADN o ARN que lleva a cabo un papel principalmente estructural.

45 La frase "secuencia heteróloga" se refiere a una secuencia que se origina a partir de una especie exógena, o, si es de la misma especie, se modifica a partir de su forma original. Por ejemplo, un promotor unido de forma operable a una secuencia codificante heteróloga se refiere a una secuencia codificante de una especie diferente de la cual procedió el promotor, o, si es de la misma especie, una secuencia codificante que no está asociada de manera natural con el promotor (p.ej., una secuencia codificante modificada mediante ingeniería genética o un alelo de un ecotipo o variedad diferente).

50 Un polinucleótido "exógeno respecto de" una planta individual es un polinucleótido que se introduce en la planta mediante cualquier medio diferente del cruce sexual. Los ejemplos de medios por los cuales esto se puede llevar a cabo se describen más adelante, e incluyen la transformación mediada por *Agrobacterium*, métodos de biolística, electroporación, y similares. Tal planta que contiene el ácido nucleico exógeno se denomina en la presente memoria planta transgénica de generación T1 (p.ej., en *Arabidopsis* mediante infiltración al vacío) o R0 (para plantas regeneradas a partir de células transformadas in vitro). Las plantas transgénicas que surgen de un cruce sexual o mediante

autopolinización son los descendientes de dicha planta.

Un "ácido nucleico *NHX1*" o "secuencia polinucleotídica *NHX1*" de la invención es una subsecuencia o polinucleótido de longitud completa que codifica un polipéptido *NHX1* y su complemento, p.ej. SEQ ID N°S: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, o 15. Un ejemplo de un gen *NHX1*, de *Arabidopsis*, es *AtNHX1*. Los productos del gen *NHX1* de la invención (p.ej., mARNs o polipéptidos) se caracterizan por la capacidad de conferir una tolerancia incrementada a la sal. Un polinucleótido *NHX1* de la invención comprende en general una secuencia codificante de al menos alrededor de 250 nucleótidos a alrededor de 2000 nucleótidos de longitud. Normalmente, los ácidos nucleicos *NHX1* de la invención son de alrededor de 400 a alrededor de 1600 nucleótidos.

En la expresión de transgenes, un experto reconocerá que no es necesario que la secuencia polinucleotídica insertada sea idéntica, y puede ser "sustancialmente idéntica" a una secuencia del gen del que procede. Como se explica más adelante, esta expresión cubre específicamente estas variantes.

En el caso en el que la secuencia polinucleotídica insertada se transcribe y se traduce para producir un polipéptido *NHX1* funcional, un experto reconocerá que debido a la degeneración de los codones, varias secuencias polinucleotídicas codificarán el mismo polipéptido. Estas variantes se cubren específicamente mediante los términos "secuencia polinucleotídica *NHX1*" o "secuencia polinucleotídica *NHX1*". Además, los términos incluyen específicamente aquellas secuencias de longitud completa sustancialmente idénticas (determinadas como se describe más adelante) a una secuencia del gen *NHX1* y que codifican proteínas que conservan la función de las proteínas codificadas. Así, en el caso del gen *AtNHX1* de *Arabidopsis* descrito en la presente memoria, el término anterior incluye secuencias polinucleotídicas variantes que tienen una identidad sustancial con las secuencias descritas en la presente memoria, y que codifican proteínas capaces de conferir tolerancia a la sal en una planta transgénica que comprende la secuencia.

Se dice que los polinucleótidos o polipéptidos son "idénticos" si la secuencia de nucleótidos o de residuos de aminoácidos, respectivamente, en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para obtener la máxima correspondencia como se describe más adelante. La expresión "complementario a" se usa en la presente memoria para significar que la secuencia complementaria es idéntica a la totalidad o una porción de una secuencia polinucleotídica de referencia.

Se llevan a cabo comparaciones de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos o polipéptidos comparando las secuencias de las dos secuencias a lo largo de un segmento o "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. El segmento usado para fines de comparación puede ser al menos alrededor de 20 posiciones contiguas, normalmente alrededor de 50 a alrededor de 200, más normalmente alrededor de 100 a alrededor de 150, en el que una secuencia se puede comparar respecto de una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de haber alineado de manera óptima las dos secuencias.

La alineación óptima de secuencias para la comparación se puede llevar a cabo mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineación por homología de 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 las implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante inspección. El "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias alineadas de manera óptima a lo largo de una ventana de comparación, en la que la porción de la secuencia polinucleotídica de la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico o residuo de aminoácido idéntico se da en ambas secuencias para proporcionar 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 proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia.

El término "identidad sustancial" de secuencias polinucleotídicas significa que un polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 60% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 90% de y lo más preferiblemente al menos un 95%, en comparación con una secuencia de referencia mediante el uso de los programas descritos anteriormente (preferiblemente BESTFIT) con el uso de los parámetros habituales. Un experto reconocerá que estos valores se pueden ajustar de manera adecuada para determinar la identidad correspondiente de las proteínas codificadas por dos secuencias nucleotídicas teniendo en cuenta la degeneración de los codones, la similitud de los aminoácidos, la colocación del marco de lectura y similares. Una identidad sustancial de secuencias de aminoácidos con este fin significa normalmente una identidad de secuencia de al menos un 40%, preferiblemente al menos un 60%, más preferiblemente al menos un 90%, y lo más preferiblemente al menos un 95%. Los polipéptidos que son "sustancialmente similares" comparten secuencias como se indicó anteriormente, excepto porque las posiciones de los residuos que no son idénticos pueden diferir por cambios de aminoácidos conservativos. Las sustituciones de aminoácidos conservativas se refieren a la posibilidad de intercambio 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

5 cadenas laterales alifáticas-hidroxflicas es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina 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 sustituciones conservativas de aminoácidos preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparagina-glutamina.

10 Otra indicación de que las secuencias nucleotídicas son sustancialmente idénticas es si dos moléculas hibridan entre sí en condiciones rigurosas. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia, y serán diferentes en diferentes circunstancias. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean alrededor de 5 °C a alrededor de 20 °C menores que el 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 un 50% de la secuencia de interés hibrida a una sonda perfectamente coincidente. En general, las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es de alrededor de 0,02 molar a pH 7 y la temperatura es al menos alrededor de 60 °C.

15 Sin embargo, los ácidos nucleicos que no hibridan entre sí en condiciones rigurosas todavía son sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto puede ocurrir, p.ej., cuando se crea una copia de un ácido nucleico mediante el uso de la máxima degeneración de codones permitida por el código genético.

20 Tal como se usa en la presente memoria, un homólogo de un gen *NHX1* particular (p.ej., los genes *AtNHX1* de *Arabidopsis* descritos en la presente memoria) es un segundo gen (en la misma especie o en una especie diferente) que tiene una secuencia polinucleotídica de al menos 50 nucleótidos contiguos que son sustancialmente idénticos (determinado como se describió anteriormente) a una secuencia en el primer gen. Se cree que, en general, los homólogos comparten un pasado evolutivo común.

#### Breve Descripción de los Dibujos

25 La FIG. 1 muestra los resultados del ensayo de transformación de levadura que indican que *AtNHX1* modificado incrementa la tolerancia a la sal.

La FIG. 2 muestra los resultados del ensayo de transformación de levadura que demuestran que las deleciones en el extremo C-terminal de *AtNHX1* controlan la selectividad Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> del transportador.

La FIG. 3 muestra los resultados del ensayo de transformación de levadura que indican que *AtNHX1* modificado incrementa la tolerancia a Li<sup>+</sup>.

30 La FIG. 4 muestra los resultados del ensayo de transformación de levadura que indican que *AtNHX1* modificado incrementa la tolerancia al estrés osmótico.

La FIG. 5 muestra los resultados de los ensayos de transformación de levadura llevados a cabo para caracterizar la actividad del extremo N-terminal de *AtNHX1* y los dominios transmembrana. El objeto de la figura 5 no es parte de la invención.

35 La FIG. 6 muestra los sitios de mutagénesis dirigida y de truncamiento de *AtNHX1* que confieren la tolerancia a la sal.

#### Descripción Detallada de la Invención

40 La presente invención proporciona nuevas moléculas de ácido nucleico aisladas modificadas que codifican proteínas para el transporte de iones sodio a través de una membrana de una célula, por ejemplo, del citosol de una célula a una vacuola, para proporcionar a la célula tolerancia a la sal.

45 Los genes *NHX1* codifican transportadores antiportadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> asociados a membrana que conducen Na<sup>+</sup> a través de una membrana mediante el uso de un gradiente electroquímico de protones, generado, por ejemplo, mediante la H<sup>+</sup>-adenosina trifosfatasa (ATPasa) vacuolar y H<sup>+</sup>-pirofosfatasa inorgánica (PP<sub>i</sub>asa). En la presente invención, se han creado formas mutadas y truncadas de *NHX1* que contienen una actividad de transporte aumentada. Los productos génicos modificados (proteínas) permiten más acumulación de iones sodio del citosol en los compartimentos intracelulares, tales como la vacuola, en comparación con la proteína completa. Estos genes permiten la modificación de plantas tolerantes a la sal mediante la transformación de las cosechas sensibles a la sal que sobreexpresan este gen.

50 La invención también incluye antiportadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> modificados que tienen una selectividad iónica o permeabilidad iónica alteradas, lo que conduce a una tolerancia osmótica o a la sequía o a la sal incrementada.

La invención se refiere también a la modificación de genes *NHX1* mediante el uso de mutagénesis dirigida y deleciones basadas en amplificación mediante PCR para cribar las formas de la proteína modificadas con una actividad de transporte incrementada o una selectividad iónica alterada.

## Aislamiento de los ácidos nucleicos de la invención

En general, la nomenclatura y los procedimientos de laboratorio de la tecnología de ADN recombinante descritos más adelante son los conocidos y empleados habitualmente en la técnica. Se usan las técnicas habituales para la clonación, el aislamiento de ADN y ARN, la amplificación y la purificación. En general, las reacciones enzimáticas que implican la ADN ligasa, ADN polimerasa, endonucleasas de restricción y similares se llevan a cabo según las especificaciones del fabricante. Estas técnicas y otras diversas técnicas se llevan a cabo en general según Sambrook et al., *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, (1989) o *Current Protocols in Molecular Biology*. Volúmenes 1-3, John Wiley & Sons, Inc. (1994-1998).

Mediante el uso de las secuencias proporcionadas en la presente memoria, se puede llevar a cabo el aislamiento de los ácidos nucleicos *NHX1* mediante varias técnicas. Por ejemplo, se pueden usar sondas oligonucleotídicas basadas en las secuencias descritas en la presente memoria para identificar el gen deseado en una biblioteca de cADN o una biblioteca de ADN genómico. Para construir las bibliotecas genómicas, se generan segmentos largos de ADN genómico mediante fragmentación aleatoria, p.ej. mediante el uso de endonucleasas de restricción, y se ligan con un ADN vector para formar concatémeros que se pueden empaquetar en el vector adecuado. Para preparar una biblioteca de cADN, se aísla mRNA a partir del órgano deseado, tal como las flores, y se prepara una biblioteca de cADN que contiene el transcrito del gen *NHX1* a partir del mRNA. De manera alternativa, se puede preparar cADN a partir de mRNA extraído de otros tejidos en los que se expresan los genes *AtNHX1* u homólogos.

La biblioteca de cADN o biblioteca genómica se puede cribar mediante el uso de una sonda basada en la secuencia de un gen *NHX1* clonado o fragmento del mismo descrito en la presente memoria. Se pueden usar sondas para hibridarlas con secuencias de ADN genómico o de cADN para aislar genes homólogos en la misma o diferentes especies de plantas. De manera alternativa, se pueden usar anticuerpos generados hacia un polipéptido *NHX1* o fragmento del mismo para cribar una biblioteca de expresión de mRNA.

De manera alternativa, los ácidos nucleicos de interés se pueden amplificar a partir de muestras de ácido nucleico mediante el uso de técnicas de amplificación. Por ejemplo, se puede usar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar las secuencias de los genes *NHX1* directamente a partir de ADN genómico, de cADN, de bibliotecas genómicas o bibliotecas de cADN. La PCR y otros métodos de amplificación *in vitro* también pueden ser útiles, por ejemplo, para clonar secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas a expresar, para producir ácidos nucleicos para usarlos como sondas para detectar la presencia del mRNA deseado en las muestras, para la secuenciación de ácidos nucleicos, o para otros fines. Para una revisión general de PCR, véase PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. (Innis, M, Gleaned, D., Sninsky, J. y White, T., eds.), Academic Press, San Diego (1990).

Los polinucleótidos se pueden sintetizar también mediante técnicas muy conocidas como se describe en la bibliografía técnica. Véase, p.ej., Carruthers et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 47: 411-418 (1982), y Adams et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 105: 661 (1983). Se pueden obtener fragmentos de ADN bicatenarios sintetizando la cadena complementaria y renaturalizando las cadenas en condiciones adecuadas, o añadiendo la cadena complementaria mediante el uso de una ADN polimerasa con una secuencia cebadora adecuada.

Los ácidos nucleicos *NHX1* de interés se pueden identificar también realizando búsquedas en bases de datos de ácidos nucleicos, p.ej., las bases de datos EST e identificando las secuencias con una similitud elevada respecto de una secuencia de ácido nucleico *NHX1* conocida. Una vez que se ha identificado un ácido nucleico *NHX1* candidato o secuencia polinucleotídica de la invención, se pueden usar métodos habituales para determinar si el supuesto ácido nucleico es un ácido nucleico *NHX1* de la invención. Los métodos para ensayar la actividad *NHX1* se conocen en la técnica, p.ej., véase el ejemplo 1 y Apse et al., *Science*. 285, 1256-1258.

## Preparación de vectores recombinantes

Para usar las secuencias aisladas para la transformación y otras técnicas de biología molecular, se preparan vectores de ADN recombinante adecuados para la transformación de las células vegetales. Las técnicas para transformar una amplia diversidad de especies vegetales superiores se conocen bien y se describen en la bibliografía técnica y científica. Véase, por ejemplo, Weising et al. *Ann. Rev. Genet.*, 22: 421-477 (1988). Se combinará preferiblemente una secuencia de ADN que codifica el polipéptido deseado, por ejemplo una secuencia de cADN que codifica una proteína de longitud completa, con secuencias reguladoras de la iniciación transcripcional y traduccional que dirigirán la transcripción de la secuencia del gen en los tejidos deseados de la planta transformada.

Por ejemplo, para la sobreexpresión, se puede emplear un fragmento promotor vegetal que dirigirá la expresión del gen en todos los tejidos de una planta regenerada. Tales promotores se denominan en la presente memoria promotores "constitutivos", y son activos en la mayoría de las condiciones ambientales y de etapas del desarrollo o la diferenciación celular. Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen la región de iniciación de la transcripción de 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el promotor 1' o 2' derivado del T-ADN de *Agrobacterium tumefaciens*, y otras regiones de iniciación de la transcripción de diversos genes de plantas conocidas para los expertos. Tales genes incluyen, por ejemplo, ACT11 de *Arabidopsis* (Huang et al. *Plant Mol. Biol.*, 33:125-139 (1996)), Cat3 de *Arabidopsis* (Nº de GenBank U43147, Zhong et al., *Mol. Gen. Genet.*, 251: 196-203 (1996)), el gen que codifica la

estearoil-(proteína portadora de acilo) desaturasa de *Brassica napus* (Nº de Genbank X74782, Solocombe et al. Plant Physiol., 104: 1167-1176 (1994)), Gpc1 de maíz (Nº de GenBank X15596, Martinez et al. J. Mol. Biol., 208:551-565 (1989)), y Gpc2 de maíz (Nº de GenBank U45855, Manjunath et al., Plant Mol. Biol., 33: 97-112 (1997)).

5 De manera alternativa, el promotor vegetal puede dirigir la expresión del ácido nucleico *NHX1* en un tejido específico, órgano o tipo de célula (es decir, promotores específicos de tejido, promotores específicos de órgano) o puede estar de otra manera bajo un control ambiental o del desarrollo más preciso (es decir, promotores inducibles). Los ejemplos de condiciones ambientales que pueden efectuar la transcripción mediante promotores inducibles incluyen las condiciones anaerobias, temperatura elevada, la presencia de luz, o la pulverización de productos químicos/hormonas. Un experto reconocerá que un promotor específico de órgano puede controlar la expresión de las  
10 secuencias unidas de forma operable en órganos diferentes del órgano objetivo. Así, tal como se usa en la presente memoria, un promotor específico de órgano es uno que controla la expresión preferentemente en el órgano objetivo, pero también puede conducir a cierta expresión en otros órganos.

También se pueden usar varios promotores específicos de tejido en la invención. Por ejemplo, los promotores de la raíz que dirigen la expresión de los ácidos nucleicos del tejido de la raíz tienen una importancia especial en la presente invención.  
15

Si se desea la expresión del polipéptido adecuado, se debería incluir una región de poliadenilación en el extremo 3' de la región codificante. La región de poliadenilación puede proceder del gen natural, de una diversidad de otros genes vegetales, o del T-ADN.

20 El vector que comprende las secuencias (p.ej., promotores o regiones codificantes) de los genes de la invención comprenderá en general un gen marcador que confiere un fenotipo seleccionable en las células vegetales. Por ejemplo, el marcador puede codificar una resistencia a biocidas, en particular resistencia de antibióticos, tal como resistencia a kanamicina, G418, bleomicina, higromicina, o resistencia a herbicidas, tal como resistencia a clorosulfuron o Basta.

#### Producción de plantas

25 Las construcciones de ADN de la invención se pueden introducir en el genoma del hospedador vegetal deseado mediante una diversidad de técnicas convencionales. Por ejemplo, la construcción de ADN se puede introducir directamente en el ADN genómico de la célula vegetal mediante el uso de técnicas tales como electroporación y microinyección de protoplastos de células vegetales, o las construcciones de ADN se pueden introducir directamente en el tejido vegetal mediante el uso de biolística, p.ej., bombardeo con partículas de ADN.

30 Las técnicas de microinyección se conocen en la técnica, y se describen en la bibliografía científica y de patentes. La introducción de construcciones de ADN mediante el uso de precipitación con polietileno glicol 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).

35 De manera alternativa, las construcciones de ADN se pueden combinar con regiones flanqueantes del T-ADN adecuadas e introducir las en un vector hospedador de *Agrobacterium tumefaciens* convencional. Las funciones de virulencia del hospedador *Agrobacterium tumefaciens* dirigirán la inserción de la construcción y los marcadores adyacentes en el ADN de la célula vegetal cuando la célula sea infectada por las bacterias. Las técnicas de transformación mediadas por *Agrobacterium tumefaciens*, que incluyen el desarme y el uso de vectores binarios, se describen en la bibliografía científica. Véase, por ejemplo, Horsch et al. Science, 233: 496-498 (1984), y Fraley et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 4803 (1983) y Gene Transfer to Plants, Potrykus, ed. (Springer-Verlag, Berlín 1995).  
40

Las células vegetales transformadas que se obtienen mediante cualquiera de las técnicas de transformación anteriores se pueden cultivar para regenerar una planta completa que posee el genotipo transformado, y así el fenotipo deseado, tal como una actividad disminuida de farnesil transferasa. Tales técnicas de regeneración se basan en la manipulación de ciertas fitohormonas en un medio de cultivo de tejidos, y se basa en general 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 en Evans et al., Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture, págs. 124-176, MacMillan Publishing Company, Nueva York, 1983; y Binding, Regeneration of Plants, Plant Protoplasts, págs. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985. La regeneración se puede obtener también a  
45 partir de callos vegetales, explantos, órganos, o partes de los mismos. Tales técnicas de regeneración se describen en general en Klee et al., Ann. Rev. of Plant Phys., 38: 467-486 (1987).  
50

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden usar para conferir rasgos deseados básicamente en cualquier planta. Así, la invención tiene uso en una amplia diversidad de plantas, que incluyen especies de los géneros *Anacardium*, *Arachis*, *Asparagus*, *Atropa*, *Avena*, *Brassica*, *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Citrus*, *Citrullus*, *Capsicum*,  
55 *Carthamus*, *Cocos*, *Coffea*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Cyrtomium*, *Daucus*, *Elaeis*, *Fragaria*, *Glycine*, *Gossypium*, *Helianthus*, *Heterocallis*, *Hordeum*, *Hyoseyamus*, *Lactuca*, *Laminaria*, *Linum*, *Lolium*, *Lupinus*, *Lycopersicon*, *Macrocyctis*, *Malus*, *Manihot*, *Majorana*, *Medicago*, *Nereocystis*, *Nicotiana*, *Olea*, *Oryza*, *Osmunda*, *Panicum*, *Pannasetum*, *Persea*, *Phaseolus*, *Pistachia*, *Pisum*, *Pyrus*, *Polypodium*, *Prunus*, *Pteridium*, *Raphanus*, *Ricinus*, *Secale*, *Senecio*,



*Sinapis, Solanum, Sorghum, Theobromus, Trigonella, Triticum, Vicia, Vitis, Vigna, y Zea.*

Un experto reconocerá que después de incorporar de manera estable el casete de expresión en las plantas transgénicas y confirmar que es operable, se puede introducir en otras plantas mediante cruce sexual. Se puede usar cualquiera de varias técnicas habituales de mejora genética, dependiendo de la especie a cruzar.

- 5 Mediante el uso de procedimientos conocidos, un experto puede cribar en busca de plantas de la invención detectando el incremento o la disminución del mRNA o la proteína *NHX1* en las plantas transgénicas. Los medios para detectar y cuantificar mRNAs o proteínas se conocen bien en la técnica, p.ej., transferencias de Northern, transferencias de Western o ensayos de actividad. Las plantas de la invención se pueden identificar también detectando el fenotipo deseado. Por ejemplo, midiendo la tolerancia a la sal o la tolerancia a la sequía mediante el uso de métodos como se describe más adelante.

10

Detección de organismos transgénicos de la invención

Las cepas de levadura transformadas que contienen los polinucleótidos de la invención se pueden analizar mediante el uso de técnicas de biología molecular establecidas, así como mediante la monitorización de las tasas de crecimiento con el uso de un medio de cultivo selectivo para una amplia diversidad de fenotipos, que incluyen la tolerancia a la sal.

15

De manera alternativa, las plantas transgénicas de la invención pueden ser el objeto del análisis. Tras la preparación de los casetes de expresión que contienen los polinucleótidos de la presente invención y la introducción de los casetes en una planta, se puede ensayar en las plantas transgénicas resultantes las características fenotípicas asociadas a la expresión incrementada o disminuida de *NHX1*. Por ejemplo, tras la introducción del casete en una planta, las plantas se criban en busca de la presencia del transgén y se cruzan con una línea endogámica o híbrida. Las plantas de la progenie se criban después en busca de la presencia del transgén, y se autopolinizan. Se cultiva la progenie de las plantas autopolinizadas. Se puede ensayar en las plantas transgénicas resultantes la tolerancia incrementada a la sal y la tolerancia incrementada a la sequía, y la sensibilidad disminuida a toxinas. Por ejemplo, se puede ensayar en una planta transgénica la tolerancia incrementada a la sal o la tolerancia incrementada a la sequía. Se conocen los métodos para ensayar la tolerancia incrementada a la sal, e incluyen medir la tasa de crecimiento de las plantas a concentraciones crecientes de sal. Biomasa vegetal, proporciones raíz/brote, y contenido iónico tisular. Las tasas de crecimiento de la raíz e hipocótilo se pueden medir y correlacionar con el contenido tisular de agua de plantas que crecen a diferentes concentraciones de sal. Los métodos para ensayar la tolerancia incrementada a la sequía también están bien establecidos, e incluyen medir las tasas de transpiración de los tejidos de las plantas transgénicas, la conductancia estomática, la tasa de pérdida de agua en un ensayo de hoja suelta o examinar la turgencia foliar. Las plantas transgénicas con tasas de transpiración disminuidas, por ejemplo, tienen una tolerancia incrementada a la sequía.

20

25

30

## Ejemplos

Ejemplo 1: Mutagénesis dirigida y clonación de *AtNHX1* truncado

- 35 El cADN de longitud completa de *AtNHX1* se obtuvo mediante RT-PCR y se clonó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen). La secuencia se confirmó mediante secuenciación del marco de lectura abierto completo. El cADN de longitud completa se subclonó después en el vector de levadura pYPGE15 mediante el uso de sitios de clonación BamHI y EcoRI. La mutagénesis dirigida se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del equipo de mutagénesis dirigida QuickChange (Stratagene). Los cebadores que se usaron para la generación de SM-23 son los siguientes: SM-23-F, ggagacaattgatgactgcttcacgacccgctc; SM-23-R, gacgggtcgcacgaagcagctcatcaaatgtctcc. Para la clonación de *AtNHX1* truncado, el cADN truncado se amplificó mediante PCR y se clonó en el vector pYPGE15. Los cebadores para la clonación de *AtNHX1* truncado son los siguientes: EXCH-5, agctaggatccggatctagaagaagataacaatgttg; EXCH-DL-1, agctgaattcctaggtacaaagccacgacctc; EXCH-DL-2, agctgaattcctacaagaagccacgtatactg; EXCH-DL-3, agctgaattcctaagataacatgctcgtggtg. Todas las secuencias se verificaron mediante secuenciación.

40

45

Ejemplo 2: Transformación de levadura y ensayos de goteo

Las células de levadura se transformaron mediante el uso del método de acetato de litio/PEG. Las células de levadura se inocularon en el medio líquido de goteo y se cultivaron durante la noche a 30 °C. Las células se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron en medio APG (Rodríguez-Navarro y Ramos, J. Bacteriol., 159: 940-945 (1984)) y se ajustó la DO600 a 1,0. Se realizaron diluciones 1/10 en serie y se cargaron 3 µl de las células en medio APG con diferentes complementos de sal, o en medio YPD (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de glucosa) con 10 mg/L de higromicina.

50

Ejemplo 3: Tolerancia incrementada a la sal conferida por *AtNHX1* modificado

Tal como se muestra en la FIG. 1, la cepa mutante de levadura (enal nhx1) que carecía de antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  *NHX1* endógeno fue más sensible a NaCl, así como a higromicina, que la cepa de control (enal). La expresión de *AtNHX1* en el mutante de levadura recuperó parcialmente el fenotipo mutante, lo que indica que *AtNHX1* funciona como antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  para distribuir el  $\text{Na}^+$  a la vacuola. El *AtNHX1* modificado, que incluye SM-23, D1-1, D1-2, y D1-3,

55

confirió a la célula mutante de levadura más tolerancia a la sal e higromicina que la forma completa. Este resultado indica que el *AtNHX1* modificado tiene una actividad antiportadora superior, y podría transportar más  $\text{Na}^+$  a la vacuola.

Ejemplo 4: selectividad iónica alterada de *AtNHX1* modificado

5 Cuando se cultivaron en el medio APG sin NaCl, las células de levadura crecieron igualmente independientemente de la expresión de *AtNHX1* completo o modificado (FIG. 2). Sin embargo, las células de levadura que expresaron *AtNHX1* modificado mostraron una tolerancia superior a NaCl que las que expresaron la forma completa de *AtNHX1*, cuando se incrementó K en el medio. Este resultado indica que el extremo C-terminal de los genes *NHX1* controla la selectividad  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .

10 Ejemplo 5: tolerancia incrementada a  $\text{Li}^+$  conferida por *AtNHX1* modificado

*NHX1* de levadura puede transportar tanto  $\text{Na}^+$  como  $\text{Li}^+$ . El mutante de levadura que carece del gen *NHX1* es más sensible a  $\text{Li}^+$  que la cepa de levadura de control (FIG. 3). Aunque *AtNHX1* pudo rescatar el fenotipo sensible a  $\text{Na}^+$  del mutante de levadura (Fig. 1), *AtNHX1* fue incapaz de restaurar el fenotipo sensible a  $\text{Li}^+$  del mutante de levadura, tal como se muestra en la figura 3, lo que indica que *AtNHX1* tiene poca o ninguna actividad para el transporte de  $\text{Li}^+$ .  
15 Sorprendentemente, las células mutantes de levadura que expresaron *AtNHX1* modificado exhibieron una tolerancia a  $\text{Li}^+$  casi al nivel de la cepa de levadura de control. Este resultado proporciona la posibilidad de modificar los transportadores capaces de detoxificar diferentes iones, y de modificar las plantas para que puedan tener tolerancia a diferentes iones tóxicos cuando se sobreexpresan los transportadores modificados.

Ejemplo 6: Tolerancia elevada al estrés osmótico en levaduras que expresan *AtNHX1* modificado

20 El antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  vacuolar puede capturar  $\text{Na}^+$  en la vacuola y mantener la presión de turgencia de la célula. La regulación de la presión de turgencia puede funcionar para conducir el flujo de agua hacia la célula bajo estrés osmótico. Las células mutantes de levadura que carecieron de *NHX1* mostraron un fenotipo sensible después de añadir KCl mayor de 1 M al medio de cultivo (FIG. 4), lo que indica que *NHX1* también es importante en la regulación osmótica. Debido a que no había  $\text{Na}^+$  en el medio de cultivo, la regulación osmótica mediante *NHX1* se llevó a cabo  
25 posiblemente mediante el transporte de  $\text{K}^+$  a la vacuola. La expresión de la forma completa de *AtNHX1* no pudo complementar el fenotipo mutante, pero las formas modificadas de *AtNHX1* rescataron el crecimiento de las células mutantes hasta el nivel que consiguió el de tipo natural (enal), lo que indica que las formas modificadas de *AtNHX1* tienen una actividad de transporte de  $\text{K}^+$  mayor que la forma completa.

30 Es posible usar las formas modificadas de *NHX1* para modificar plantas para que sean más tolerantes a la sequía. Debido a que las formas modificadas de *AtNHX1* podrían transportar más  $\text{K}^+$  a la vacuola, la concentración mayor de  $\text{K}^+$  en la vacuola podría controlar la absorción de agua hacia la célula, lo que generaría una concentración mayor para forzar un flujo de agua mayor a través de la corriente del xilema. Teóricamente, las plantas transgénicas que sobreexpresan estas formas modificadas de *AtNHX1* podrían captar agua de manera más eficaz, y podrían tener más tolerancia al estrés por sequía.

35 Ejemplo 7: *NHX1* modificado

Mediante el uso de los métodos descritos previamente en los Ejemplos 1 y 2, se generaron polinucleótidos *NHX1* modificados que incluían 23 mutaciones puntuales, 3 deleciones del extremo N-terminal, y 3 deleciones del extremo C-terminal de cADN de *AtNHX1* (Véase la Tabla 1, y la FIG. 5). Los cADNs de *AtNHX1* modificados en el vector de levadura se transfirieron a un mutante de levadura que carecía del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  endógeno *NHX1* y de la bomba de  $\text{Na}^+$  ENA1-4. Las actividades y la selectividad iónica de los transformantes se determinaron ensayando el  
40 crecimiento de la levadura que albergaba las diferentes formas de *AtNHX1* en diferentes condiciones de cultivo.

TABLA 1

Nombre	Mutación	Crecimiento
Completo	NA	++++
SM-1	Y85C/L86R	+
SM-2	D137C	+++++
SM-3	D142C	+
SM-4	D145C	++++
SM-5	D157C	++++
SM-6	D168C/E169V	++++

Nombre	Mutación	Crecimiento
Completo	NA	++++
SM-7	E180V	++++
SM-8	D185C	+++
SM-9	H202A	+++
SM-10	H205A	++++
SM-11	H210A	
SM-12 H285A		++++
SM-13	H289A	++++
SM-14	N290D	++++
SM-15	H301A	++++
SM-16	R390C	++++
SM-17	G391E	++++
SM-18	R404C	++++
SM-19	H407A	++++
SM-20	R411C	++++
SM-21	H499A	++++
SM-22	D506C/D507C	+++++
SM-23	S508C	+++++
DL-1	deleción de 17 aa	+++++
DL-2	deleción de 47 aa	+++++
DL-3	deleción de 84 aa	+++++
NDL-1	deleción de 17 aa	+++++++
NDL-2	deleción de 69 aa	+++
DDL-3	deleción de 98 aa	+++
SM-1 a SM-22 y NDL-1 a NDL-3 no son parte de la invención.		

Ejemplo 8: Caracterización del extremo N-terminal y los dominios transmembrana de AtNHX1

El objeto del Ejemplo 8 no es parte de la invención.

Las funciones del extremo N-terminal libre y los primeros dominios transmembrana de AtNHX1 se caracterizaron mediante el uso de los métodos descritos en los Ejemplos 1 y 2 anteriores. Se crearon tres formas con deleción N-terminal de AtNHX1 y se analizaron en ensayos de complementación de levadura. La deleción del extremo N-terminal libre de AtNHX1 (NDL-1, deleción de los primeros 17 aminoácidos) confirió a la cepa mutante de levadura (*Δena/Δnhx1*) mayor tolerancia a higromicina y NaCl en comparación con el AtNHX1 completo. El crecimiento de las células de levadura que expresaron NDL-1 fue aproximadamente 30 veces mayor que el de las que expresaron AtNHX1 completo, lo que indica que el extremo N-terminal libre de AtNHX1 es un regulador negativo de la función antiportadora en las células de levadura. La deleción de los dos primeros dominios transmembrana (NDL-2) y la deleción de los tres primeros dominios transmembrana (NDL-3) eliminó la función de AtNHX1 en cierto grado. Estos resultados proporcionan la posibilidad de modificar una planta para que tenga más tolerancia a la sal mediante la sobreexpresión de formas modificadas de AtNHX1 con una actividad antiportadora elevada, por ejemplo, NDL-1.

#### Referencias

15 Rush, PW y Epstein, E (1981). J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106, 699-704.

Norlyn, JD (1980). En: Genetic Engineering of Osmoregulation (Eds. DW Rains, RC Valentine y A Hollaender) págs. 293-309. Plenum Press: Nueva York.

- Tal, M (1985). *Plant & Soil* 89, 199-226.
- Flowers, TJ y Yeo, AR (1995). *Aust. J. Plant Physiol.* 22, 875-884.
- Bonhert, HJ y Jensen, RG (1996). *Aust J. Plant Physiol.* 23, 661-667.
- Tarcynski, MC, Jensen, RG y Bonhert, HJ. (1995) *Science* 259, 508-510.
- 5 Kishor et al. (1995). *Plant Physiol.* 108, 1387-1394.
- Ishitani, M, et al., (1995). *Plant Mol. Biol.* 27,307-317
- Xu, et al. (1996) *Plant Physiol.* 110, 249-257.
- Wu, R y Ho, THD. Patente nº WO9713843.
- Jia, ZP, et al., (1992). *EMBO J.* 11, 1631-1640.
- 10 Young, PG y Zheng, P. J. Patente nº WO9106651.
- Ichida, AM y Schroeder, JI. (1996) *J. Membrane Biol.* 151, 53-62.
- Rubio, F. et al., (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 6839-6847.
- Liu, W, Schachtman DP y Zhang, W. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 27924-27932.
- Kinclov, O. et al., (2001) *Mol. Microbiol.* 40, 656-668.
- 15 Waditee, R. et al., (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 36931-36938.
- Apse, MP. et al., (1999) *Science* 285, 1256-1258.
- Zhang, HX y Blumwald, E. (2001) *Nat. Biotechnol.* 19, 765-768.
- Zhang, HX. et al., (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 12832-12836.
- Rodriguez-Navarro, A y Ramos, J. (1984) *J. Bacteriol.* 159, 940-945.
- 20 Barkla y Pantoja, (1996) *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 47, 159.
- Blumwald y Gelli, (1997) *Adv. Bot. Res.* 25, 401.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

SEQ ID N°:1

*AtNHX1* de tipo natural

1 atgttgatt ctctagtgc gaaactgcct tcgtatcga catctgatca cgcttctgtg  
 61 gttgcgttga atctcttgt tgcacttctt tgtgcttga ttgtcttgg tcatctttg  
 121 gaagagaata gatggatgaa cgaatccatc accgcctgt tgaatggct aggcactggt  
 181 gttaccatt tgtgattag taaaggaaaa agctcgcac ttctcgtct tagtgaagat  
 241 cttttctca tatactttt gccaccatt atattcaatg cagggttca agtaaaaaag  
 301 aagcagttt tccgcaatt cgtgactatt atgcttttg gtgctgttg gactattatt  
 361 tctgcacaa tcatatctt aggtgtaaca cagttctta agaagtgga cattggaacc  
 421 ttgactgg gtgattatct tctattggg gccatattg ctgcaacaga ttcagtatg  
 481 aactgcagg ttctgaatca agacgagaca ccttgctt acagtctgt attcggagag  
 541 ggtgttga atgatgcaac gtcagttgt gtctcaacg cgattcagag cttgatctc  
 601 actcacctaa accacgaagc tgccttcat cttctggaa acttctgta tttgttctc  
 661 ctaagacct tcttggcgc tgaaccggg ctgataatg cgtatgtat caagaagcta  
 721 tacttggaa ggcactcaac tgaccgagag gttgccctta tgatgctat gccgtatct  
 781 tctatatgc ttgctgagct ttctgactg agcggatcc tactgtgtt tttctgtgt  
 841 attgtatgt cccattacac atggcacaat gtaacggaga gctcaagaat aacaacaag  
 901 cataccttg caacttgc atttctgag gagacatta tttctgta ttttggatg  
 961 gatgcctgg acattgacaa gtggagatcc gtgagtaca caccgggaac atcgatcgca  
 1021 gtgagctcaa tcctaatgg tctggtcatg gttggaagag cagcgtctt cttccgta

1081 tcttctat ctaacttagc caagaagaat caaagcgaga aatcaact taacatgag  
 1141 gtttgattt ggtgctcgg tctcatgaga ggtgctgtat ctatggctt tgcatacaac  
 1201 aagttacaa gggccgggca cacagatga cgcgggaatg caatcatgat cacgagtacg  
 1261 ataactgtc tcttttag cacagtggg tttggtatgc tgaccaaacc actcataagc  
 1321 tacctattac cgcaccagaa cgcaccacg agcatgtat ctgatgacaa caccctcaaa  
 1381 tccatacata tccttgtt ggaccaagac tcttcttgg agcctcagg gaaccacaat  
 1441 gtgcctggc ctgacagat acgtggctt tgacacggc cactcgaac cgtgcattac  
 1501 tactggagac aattgatga ctctcatg cgaccctct ttggaggtc tggcttga  
 1561 cccttctc caggtctcc aactgagaga aacctctg atcttagtaa ggct

5 SEQ ID N°:2

*AtNHX1* de tipo natural, secuencia proteica

MLDSLVS KLPSLSTSDHASWALNLFVALLCACIVLGHLLLENR  
 WMNESITALLIGLGTGVTILLISKGKSSHLLVFSEDLFFIYLLPPIIFNAGFQVKKKQ  
 FFRNFVTIMLFGAVGTIISCTIISLGV TQFFKLDIGTFDLGDYLAIGAIFAATDSVC  
 TLQVLNQDETPLLYSLVFGEGVNDATSWWFNAIQSFDLTHLNHEAAFHLLGNFLY  
 LFLSTLLGAATGLISAYVIKKLYFGRHSTDREVALMMLMAYLSYMLAELFDLSGIL  
 TVFFCGIVMSHYTWHNVTESSRITTKHTFATLSFLAETFIFLYVGM DALDIDKWRVS  
 DTPGTSIAVSSILMGLVMVGRAAFVPLSFLSNLAKKNQSEKINFMQVVIWWWSGLM  
 RGAVSMALAYNKFTRAGHTDVRGNAMITSTITVCLFSTVVFGLTKPLISYLLPHQ  
 NATTSMLSDDNTPKSIHIPLLDQDSFIEPSGNHNVPRPDSIRGFLTRPTRTVHYYWRQF  
 DDS FMRPVFGGRGFVFPVPGSPTERNPPDLSKA

SEQ ID N°:3

SM-23, S508C, cambio de ácido nucleico simple, secuencia de cADN

atgttgattctctagtgtcgaaactgccttcggtatcgacatctgatcacgcttctgtggtgctgaatctcttgt  
tgcactcttgtgcttattgttcttggcactcttggagaagagaatagatggatgaacgaatccatcaccgcctgt  
tgattgggctaggcactgggtaccatttggtagtaaaaggaaaaagctcgatcttctcgtctttagtaagat  
ctttctcatatcttggccaccattataatcaatgcagggttcaagtaaaaaagaagcagtttccgcaatt  
cgtgactattatgcttttggctgttgggactatttctgcacaatcatatctctaggtgaacacagttctta  
agaagttggacattggaaccttggactgggtgattatcttgctattgggtccatatttctgcaacagattcagatgt  
acactgcaggttctgaatcaagacgagacaccttggctttacagcttattcgagaggggtgtgtgaatgatgcaac  
gtcagttggtctcaacgagattcagagcttgcactcactcaactaaaccaagctgctttcatctcttggaa  
actctgtatttctcctaagtaccttggctgtgcaaccggctgataagtcgatgttatcaagaagcta  
tacttgaaggcactcaactgaccgagaggtgccctatgatgcttggcgtatcttcttatatgcttgcagct  
ttcgcactgagcggatcctcactgttttctgtggtattgtgatgccattacacatggcacaatgtaacggaga  
gctcaagaataacaacaagcataaccttgaacttgcatttctgaggagacattatttctgtatgttgaatg  
gatgccttggacattgacaagtgagatccgtgagtgacacaccgggaacatcgatcgagtgagctcaatcctaagg  
tctggtcatggttgaagagcagcgttcttccggtatcgttctatctaacttagccaagaagaatcaaagcgaga  
aatcaacttaacatgcaggttgtgattgggtctggtctcatgagaggtgctgtatctatggctcttgatacaac  
aagttacaagggccgggcacacagatgtacgcgggaatgcaatcatgatcacgagtagcagataactgtctgtctttag  
cacagtggtgttggtagctgaccaaaccactcataagctacctattaccgcaccagaacgccaccacgagcatgtat  
ctgatgacaacaccccaaaatccatacatatcccttggtagcaagactcgttcattgagcctcaggaaccacaat  
gtgcctcggcctgacagtatacgtggtcttgacacggcccactcgaaccgtgcattactactggagacaattgatga  
ctGcttcatgcgaccgtcttggaggtcgtggcttgtacccttgtccaggttctccaactgagagaaaccctctg  
▲  
atcttagtaaggct

SEQ ID N°:4

SM-23, S508C, SUSTITUCIÓN DE AMINOÁCIDO SIMPLE, SECUENCIA PROTEICA

MLDSLVS KLPSLSTSDHASWALNLFVALLCACIVLGHLLLEENRWMNESITALLIGLGTGVT  
ILLISKGKSSHLLVFSEDLFFIYLLPPIIFNAGFQVKKKQFFRNFTIMLFGAVGTIISCTIISLG  
VTQFFKLDIGTDFLDGYLAIGAIFAATDSVCTLQVLNQEDETPLLYSLVFGEGWNDATSV  
WFNAIQSFDLTHLNHEAAFHLLGNFLYLFLSTLLGAATGLISAYVIKKLYFGRHSTDREVA  
LMMLMAYLSYMLAELFDLSGILTVFFCGIVMSHYTWHNVTESSRITTKHTFATLSFLAETFI  
FLYVGM DALDIDKWR SVSDTPGTSIAVSSILMGLVMVGRAAFVPLSFLSNLAKKNQSEK  
INFNMQWIWW SGLMRGAVSMALAYNKFTFRAGHTDVRGNAIMITSTITVCLFSTWFGMLT  
KPLISYLLPHQNATTSM LSDDNTPKSIHIPLLDQDSFIEPSGNHNVPRPDSIRGFLTRPTRT  
VHYYWRQFD DCFMRPVFGGRGFVPFVPGSPTERNPPDLSKA

SEQ ID N°:5

DL-1, delección de 17 aminoácidos del extremo C-terminal, secuencia de cADN

ATGTTGGATTCTCTAGTGT CGAAACTGCCTTCGTTATCGACATCTGATCACGCTTC  
TGTGGTTGCGTTGAATCTCTTTGTTGCACTTCTTTGTGCTTGTATTGTTCTTGGTCA  
TCTTTT GGAAGAGAATAGATGGATGAACGAATCCATCACCGCCTTGTTGATTGGG  
CTAGGCACTGGTGTTACCATTTTGTGATTAGTAAAGGAAAAAGCTCGCATCTTC  
TCGTCTTTAGTGAAGATCTTTTCTTCATATATCTTTTGCCACCCATTATATTCAATG  
CAGGGTTTCAAGTAAAAAAGAAGCAGTTTTTCCGCAATTCGTGACTATTATGCT  
TTTTGGTGCTGTTGGGACTATTATTTCTTGACAATCATATCTCTAGGTGTAACAC  
AGTTCTTTAAGAAGTTGGACATTGGAACCTTTGACTTGGGTGATTATCTTGCTATT  
GGTGCCATATTTGCTGCAACAGATTCAGTATGTACACTGCAGGTTCTGAATCAAG

ACGAGACACCTTTGCTTTACAGTCTTGTATTCCGGAGAGGGTGTGTTGTGAATGATGC  
AACGTCAGTTGTGGTCTTCAACGCGATTGAGAGCTTTGATCTCACTCACCTAAAC  
CACGAAGCTGCTTTTCATCTTCTTGAAACTTCTTGTATTTGTTTCTCCTAAGTAC  
CTTGCTTGGTGTGCTGCAACCGGTCTGATAAGTGCATGTTATCAAGAAGCTA  
TACTTTGGAAGGCACTCAACTGACCGAGAGGTTGCCCTTATGATGCTTATGGCGT  
ATCTTTCTTATATGCTTGTGAGCTTTTCGACTTGAGCGGTATCCTCACTGTGTTTT  
TCTGTGGTATTGTGATGTCCATTACACATGGCACAATGTAACGGAGAGCTCAAG  
AATAACAACAAAGCATACCTTTGCAACTTTGTCATTTCTTGCGGAGACATTTATTT  
TCTTGTATGTTGGAATGGATGCCTTGGACATTGACAAGTGGAGATCCGTGAGTGA  
CACACCGGGAACATCGATCGCAGTGAGCTCAATCCTAATGGGTCTGGTCATGGTT  
GGAAGAGCAGCGTTCGTCTTTCCGTTATCGTTTTCTATCTAACTTAGCCAAGAAGA  
ATCAAAGCGAGAAAATCAACTTTAACATGCAGGTTGTGATTTGGTGGTCTGGTCT  
CATGAGAGGTGCTGTATCTATGGCTCTTGC ATACAAC AAGTTTACAAGGGCCGGG  
CACACAGATGTACGCGGGAATGCAATCATGATCACGAGTACGATAACTGTCTGT  
CTTTTTAGCACAGTGGTGTGTTGGTATGCTGACCAAACCACTCATAAGCTACCTATT  
ACCGCACCCAGAACGCCACCACGAGCATGTTATCTGATGACAACACCCCAAATC  
CATACATATCCCTTTGTTGGACCAAGACTCGTTCATTGAGCCTTCAGGGAACCAC  
AATGTGCCTCGGCCTGACAGTATACGTGGCTTCTTGACACGGCCCACTCGAACCG  
TGCATTACTACTGGAGACAATTTGATGACTCCTTCATGCGACCCGTCTTTGGAGG  
TCGTGGCTTTGTACCC

SEQ ID N°:6

DL-1, DELECIÓN DE 17 AMINOÁCIDOS DEL EXTREMO C-TERMINAL, SECUENCIA PROTEICA

MLDSLVS KLPSLSTSDHASVVALNLFVALLCACFVLGHLLEENRWMNESITALLIGLG  
TGV TILLISKGSSHLL SEDLFFIYLLPPIIFNAGFQVKKKQFFRN FVTTFMLFGAVGTI  
ISCTTISLGV TQFFKKLDIGTFDLGDYLAIGAFFAATDSVCTLQVLNQEDETPLLYSLVFG  
EGWNDATSWVFNAIQSFDLTHLNHEAAFHLLGNFLYL FLLSTLLGAATGLISAYVI  
KKLYFGRHSTDREVALMMLMAYLSYMLAELFDLSGILTVFFCGIVMSHYTWHNVTE  
SSRITTKHTFATLSFLAETFFFLYVGMDALDΓDKWRSVSDTPGTSIAVSSILMGLVMVG  
RAAFVFP LSF LSNLAKK-NQSEKINFNMQVVIWWSGLMRGAVSMALAYNKFTRAGH  
TDVRGNAIMITSTITVCLFSTVVF GMLTKPLISYLLPHQNATTSMLSDDNTPKSGHFPLL  
DQDSFIEPSGNFINVPRPDSIRGFLTRPRTRVHYYWRQFDDSFMRPVFGGRGF VP

5 SEQ ID N°:7

DL-2, DELECIÓN DE 47 AMINOÁCIDOS DEL EXTREMO C-TERMINAL, SECUENCIA DE CADN



atgltggattctctagtgctgaaactgccttcgttatcgacatctgatcacgcttctgtggtgctggaatctctttgt  
tgcacttcttctgtctgtattgttcttggtcatctttggaagagaatagatggatgaacgaatccatcaccgcctgt  
tgattgggctaggcactgggtgtaccatcttggattagtaaaggaaaaagctcgcatcttctcgtcttttagtgaagat  
ctttctcatatatactttgccaccattatattcaatgcaggggttcaagtaaaaaagaagcagttttccgcaattt  
cgtgactattatgcttttgggtgctgtgggactattttctgcacaatcatatctctaggtgtaacacagttcttta  
agaagttggacattggaaccttggactgggtgattatctgctattgggtccatatttctgcaacagattcagatgt  
aactgcaggttctgaatcaagacgagacaccttgccttacagtctgtattcggagaggggtgtggaatgatgcaac  
gtcagttggttctcaacgcgattcagagcttgcctcactcacctaaaccacgaagctctttcatcttctggaa  
actcttctgattgtttctcctaagcttgccttgggtgctgcaaccgggtctgataagtgctgatgttatcaagaagcta  
tactttggaaggcactcaactgaccgagaggttgccttatgatgcttatggcgtatctttcttatatgcttgcgtgagct  
ttcgcacttgagcggatcctcactgtgttttctgtggtattgtgatgtccattacacatggcacaatgtaacggaga  
gctcaagaataacaacaagcataaccttgcaccttgcattcttgcggagacattatcttctgtatgttggaaatg  
gatgccttggacattgacaagtgagatccgtgagtgacacaccgggaacatcgatcgagtgagctcaatcctaagggg  
tctggtcatggttgaagagcagcgttcttccgttatcgtttctatctaacttagccaagaagaatcaaagcgaga  
aaatcaacttaacatgcaggttgtgattgggtgctggtctcatgagaggtgctgtatctatggctcttgcatacaac  
aagttacaaggccggggcacacagatgtacgcgggaatgcaatcatgatcacgagtagcgaactgtctgtcttttag  
cacagtggtgtttggtatgctgaccaaaacctcataagctacctattaccgcaccagaacgccaccacgagcatggtat  
ctgatgacaacaccccaaaatccatacatatcccttgttggaccaagactcgttcattgagccttcaggggaaccacaat  
gtgcctcggcctgacagtatacgtggcttcttg

SEQ ID N°:8

DL-2, DELECIÓN DE 47 AMINOÁCIDOS DEL EXTREMO C-TERMINAL, SECUENCIA PROTEICA  
MLDSLVS KLPSLSTSDHASVVALNLFVALLCACRVLGHLLEENRWMNESITALLI  
GLGTGVTILLISKGKSSHLLVFSEDLFFIYLLPPIIFNAGFQVKKKQFFRNFTIMLFG  
AVGTIISCTIISLGVTQFFKLDIGTFDLGDYLAIGAFFAATDSVCTLQVLNQDETPL  
LYSLVFGEGVVNDATSVWFNAIQSFDLTHLNHEAAFHLLGNFLYLFLSTLLGAA  
TGLISAYVIKKLYFGRHSTDREVALMMLMAYLSYMLAELFDLSGILTFFCGIVMS

HYTWHNVTESSRITTKHTFATLSFLAETFFFLYVGM DALDIDKWRSVSDTPGTSIA  
VSSILMGLVMVGRAAFPLSFLSNLAKKNQSEKFNFMQVVIWWSGLMRGAVSM  
ALAYNKFTRAGHTDVRGNAFMITSTITVCLFSTVVFVGM LTKPLISYLLPHQNATTS  
MLSDDNTPKSIHFPLLDQDSFIEPSGNHNVPRPDSFRGFL

SEQ ID N°:9

DL-3, DELECIÓN DE 84 AMINOÁCIDOS DEL EXTREMO C-TERMINAL, SECUENCIA DE CADN

atgttgattctctagtgcgaaactgccttcgttatcgacatctgatcacgcttctgtggtgcgtgaatctcttfgt  
tgcactctcttctgcttattgttcttggcatcttttgaagagaatagatggatgaacgaatccatcaccgcttfgt  
tgattgggctaggcactgggttaccatttggtagtagtaaaggaaaaagctcgcatcttctgctttagtgaagat  
ctttctcatatatctttgccaccattatatt  
cgtgactattatgcttttgggtgctgtgggactatttcttgcacaatcatatctctaggtgtaacacagttctta  
agaagtggacattggaacctltgacttgggtgattatcttctattgggtgcatatttctgcaacagattcagtatgt  
acactgcaggttctgaatcaagacgagacaccttcttacagtcttcttattcggagagggtgtgtgaatgatgcaac  
gtcagttgtggtcttcaacgcgattcagagcttctcactcacctaaaccgaagctgctttcatcttcttggaa  
acttctgtattgtttctcctaagtaccttgggtgctgcaaccggctgataagtgcgtatgttatcaagaagcta  
tactttggaaggcactcaactgaccgagaggtgcccttatgatgcttatggcgtatcttcttatatgcttctgagct  
tttcgacttgagcggatcctcactgtgttttctgtggtattgtgatgtccattacacatggcacaatgtaacggaga  
gctcaagaataacaacaaagcataaccttgaacttctcatttcttgcggagacattatttcttctgtatgttggaaatg  
gatgccttggacattgacaagtgagatccgtgagtgacacaccgggaacatcgatcgagtgagctcaatcctaaggg  
tctggtcatggttgaagagcagcgttcttccggtatcgttctatctaacttagccaagaagaatcaaacggaga  
aaatcaactttaacatgcaggttgtgattgggtgctggtctcatgagaggtgctgtatctatggctcttgcataaac  
aagttacaagggccgggcacacagatgtacggggaatgcaatcatgatcacgagtagataactgtctgtcttttag  
cacagtggtgttggtagctgaccaaaccactcataagctacctattaccgcaccagaacgccaccacgagcatgttat ct

5 SEQ ID N°:10

DL-3, DELECIÓN DE 84 AMINOÁCIDOS DEL EXTREMO C-TERMINAL, SECUENCIA PROTEICA

MLDSL VSKLPSLSTSDHASVVALNLFVALLCACTVLGHILLEENRWMNESITALLIL  
GTGVTILLISKGKSSHLLVFSEDLFFIYLLPPIIFNAGFQVKKKQFFRNFTIMLFGA  
VGTIISCTIISLGV TQFFKLDIGTFDLGDYLAIGAFFAATDSVCTLQVLNQDETPLL  
YSLVFGEGWNDATSVVVFNAIQSFDLTHLNHEAAFHLLGNFLYLFLSTLLGAAT  
GLISAYVIKKLYFGRHSTDREVALMMLMAYLSYMLAELFDLSGILTVFFCGIVMSF  
IYTWHNVTSSRITTKHTFATLSFLAETFFFLYVGMDALDΓDKWRSVSDTPGTSIA  
VSSILMGLVMVGPVAAFVFP LSF LSNLAKKNQSEKINFNMQVVIWWSGLMRGAV  
SMALAYNKFTRAGHDVRGNAΓMITSTITVCLFSTVVF GMLTKPLISYLLPHQNATT  
SMLS

SEQ ID N°S: 11-16 no forman parte de la invención

SEQ ID N°:11

Secuencia de cADN de NDL-1

atggcttctgtggtgcgttgaatctcttggcacttcttgccttgattgcttggatcatttggagagaa  
tagatggatgaacgaatccatcaccgccttggattgggctaggcactgggtgtaccatttggtagtaagaa  
aaagctcgcattctctctttagtgaagatcttctcatatatttggcaccattatcaatgcagggtt  
caagtaaaaaaagcagtn tccgaattcgtgactattatgcttttgggtgctgtggactatttctgcac  
aatcatatcttaggtgaacacagttcttaagaagttggacattggaaccttggactgggtgattatctgctattg  
gtccatatttctgcaacagattcagatgtactgacaggttgaatcaagacgagacaccttgccttacagctt  
gtattcggagagggtgtgtgaatgatgcaacgtcagttgtggtctcaacgcgattcagagcttgcctcactcac  
aaaccacgaagctcttcatcttctggaaactctgtattgttctcctaagtacctgcttgggtgctgcaaccg  
gtctgataagtgctgatgtatcaagaagctatacttggaggcactcaactgaccgagagggtgcccttatgatgctt  
atggcgtatcttcttatatgcttgcagcttctgactgagcggatcctcactgtgtttctgtggtattgtgat  
gtccattacacatggcacaatgtaacggagagctcaagaataacaacaagcataccttggcaacttgcattcttg  
cggagacatttcttctgtatgttggaatggatgcctggacattgacaagtgagatccgtgagtgacacaccggga  
acatcgcagcagtgagctcaatcctaagggtctgtgatggttggagagcagcgttcgtcttccgttatcgttct  
atctaacttagccaagaagaatcaaaagcagagaaaatcaacttaacatgcaggtgtgattgggtgctgctcatga  
gagggtgctgtatctatggctcttgatacaacaagttacaagggccgggcacacagatgtacgagggaatgcaatcatg  
atcacgagtagataactgtctgtctttagcacagtggtgttggatgctgaccaaaccactcataagctacatt  
accgcaccagaacgccaccagcatgtatctgatgacaacaccccaaatccatacatatcccttggggaccaag  
actcgttcattgagcctcagggaaaccacaatgtgcctcggcctgacagatagctggcttctgacacggcccactcga

accgtgcattactactggagacaattgatgactccttcatgcgacccttggaggctgtggcttgtacccttgt  
tccaggttctcaactgagagaaaccctcctgatcttagtaaggct

5

SEQ ID N°: 12

Secuencia proteica de NDL-1

MASVVALNLFVALLCACTVLGHLLEENRWMNESITALLIGLGTGVTILLISKGKSS  
HLLSEDLFFIYLLPPIIFNAGFQVKKKQFFRNFTIMLFGAVGTIISCTIISLGVTOFF  
KKLDIGTFDLGDYLAIGAIFAATDSVCTLQVLNQDETPLYSLVFGEGVVNDATSV  
WFNAIQSFDLTHLNHEAAFHLLGNELYFLFLLSTLLGAATGLISAYVIKKLYFGRHS  
TDREVALMMLMAYLSYMLAELFDLSGILTVFFCGIVMSHYTWHNVTESSRITTKH  
TFATLSFLAETFFFLYVGM DALDIDK WRSVSDTPGTSIAVSSILMGLVMVGRAAFV  
FPLSFLSNLAKKNQSEKINFNMQVVIWWSGLMRGAVSMALAYNKFTRAGHTDVR  
GNAIMITSTITVCLFSTVVTGMLTKPLISYLLPHQNATTSMLSDDNTPKSFLLPLL  
DQDSFIEPSGNHNWRPDSIRGFLTRPRTVHYYWRQFDDSFMRPVFGGRGFVPFV  
PGSPTERNPPDLSKA

SEQ ID Nº: 13

Secuencia de cADN de NDL-2

atgaaaagctcgcattctctcgtcttttagtgaagatcttttctcatatcttttccaccattatattcaatgcagg  
gtttcaagtaaaaagaagcagttttccgcaattcgtgactattatgcttttggctgctgttgggactattattctt  
gcacaatcatatctctaggtgaacacagttcttaagaagttggacattggaaccttgacttgggtgattatcttgc  
attggtgccatatttgcgaacagattcagatgtacactgcaggtctgaatcaagacgagacaccttgccttacag  
tctgtattcggagaggggtgtgaatgatgcaacgtcagttgtggtctcaacgcgattcagagcttgcctcactc  
acctaaaccacgaagctgctttcatcttctggaaactctgtattgttctcctaagtaccttgccttggctgctga  
accggtctgataagtcggtatgtatcaagaagctatacttggaggcactcaactgaccgagaggttgccttatgat  
gcttatggcgtatctttcttatatgcttgcgactttgcactgagcggatcctcactgtgttttctgtggtattg  
tgatgtccattacacatggcacaatgtaacggagagctcaagaataacaacaagcataccttgcacttgcattt  
cttgcggagacattatttcttctgtatgttggatggatgccttggacattgacaagtggagatccgtgagtgacacacc  
gggaacatcgcagcagtgagctcaatcctaattgggtctggtcatggttggagagcagcgttcgctttccggtatcgt  
ttctatctaacttagccaagaagaatcaaagcgagaaaatcaacttaacatgcaggttgatttgggtgctggtctc  
atgagaggtgctgtatctatggctcttgcatacaacaagttacaagggccgggcacacagatgtacggggaatgcaat  
catgatcacgagtagataactgctgtcttttagcacagtggtgttggatgctgaccaaaccactcataagctacc  
tattaccgaccagaacgccaccacgagcatgttatctgatgacaacaccccaaatccatacatatcccttggggac  
caagactcgttattgagcctcaggaaccacaatgtgcctcggcctgacagtatactggttcttgcacggccacc  
tcgaaccgtgcattactactggagacaattgatgactcctcatgcgaccgcttggaggctcgtggcttgcacct  
ttgtccaggttctccaactgagagaaccctcctgatcttagtaaggct

5 SEQ ID Nº: 14

Secuencia proteica de NDL-2

MKSSHLLSEDLFFIYLLPPIIFNAGFQVKKKQFFRNFTIMLFGAVGTIISCTIISLGV  
TQFFKKLDIGTFDLGDYLAIGAIFAATDSVCTLQVLNQDETPLYSLVFGEGWVND  
TSVVVFNAIQSFDLTHLNHEAAFHLLGNFLYFLFLLSTLLGAATGLISAYVIKKLYFG  
RHSTDREVALMMLMAYLSYMLAELFDLSGILTVFFCGIVMSHYTWHNVTESSRIT  
TKHTFATLSFLAETFFFLYVGM DALDIDK WRSVSDTPGTSIAVSSILMGLVMVGRA  
AFVPLSFLSNLAKKNQSEKIJOTNMQVVIWWSGLMRGAVSMALAYNKFTRAGH

TDVRGNAIMITSTITVCLFSTVVTGMLTKPLISYLLPHQNATTSMLSDDNTPKSFHT  
PLLDQDSFIEPSGNHNVRPDSIRGFLTRPRTVHYYWRQFDDSFMRPVFGGRGF  
VPFVPGSPTERNPPDLSKA

SEQ ID Nº: 15

Secuencia de cADN de NDL-3

atgaaaagaagcagttttccgcaatttcgtgactattatgcttttggctgttgggactattattcttgcaaat  
catactctaggtgtaacacagttcttaagaagttggacattggaaccttgactgggtgattatcttgctattggtg  
ccatattgctgcaacagattcagtatgtacactgcaggttctgaatcaagacgagacaccttgctttacagcttga  
ttcggagagggtgttgatgatgcaacgtcagttggtcttcaacgcgattcagagctttgatctcactcacctaaa  
ccacgaagctgctttcatcttcttgaaactcttgatttgttctcctaagtaccttgcttggctgcaaccggtc  
tgataagtcgctatgtatcaagaagctatacttgggaaggcactcaactgaccgagaggtgcccttatgatgcttatg  
gcgtatcttcttatatgctgtgctgagcttttcgactgagcggatcctcactgtgttttctgtggtattgtgatgc  
ccattacacatggcacaatgtaacggagagctcaagaataacaacaaagcataaccttgcaacttgcatttctgcgg  
agacattatcttctgtatgttggatggatgccttggacattgacaagtggagatccgtgagtgacacaccgggaaca  
tcgatcgcagtgagctcaatcctaagggctgtgctatggttggaaagcagcgttcgtcttccgttatcgtttctatc  
taacttagccaagaagaatcaaagcgagaaaatcaacttaacatgacaggttgtatttgggtgctgtctcatgagag  
gtgctgtatctatggctctgcatacaacaagttacaagggccgggacacagatgtacgcgggaatgcaatcatgatc  
acgagtagcataactgtctgtcttttagcacagtgggtgttggatgctgaccaaacactcataagctacctattacc  
gcaccagaacgccaccacgagcatgttatctgatgacaacaccccaaatccatacatatcccttggccaagact  
cgttcattgagccttcaggaaccacaatgtgcctcggcctgacagtatacgtggcttctgacacggccactcgaacc  
gtgcattactactggagacaattgatgactcctcatgcacccgtcttggaggctcgtggcttgtaccttgttcc  
aggctctcaactgagagaaccctcctgatcttagtaaggct

SEQ ID N°: 16

Secuencia proteica de NDL-3

MKKKQFFRNFTIMLFGAVGTIISCTIISLGVTVQFFKKLDIGTFDLGDYLAIGAFFA  
ATDSVCTLQVLNQDETPLLYSLVFGEGVNDATSWVFNAIQSFDLTHLNHEAAFH  
LLGNFLYLFLSTLLGAATGLISAYVIKKLYFGRHSTDREVALMMLMAYLSYMLA  
ELFDLSGILTVFFCGIVMSHYTWHNVTESSRITTKHTFATLSFLAETFFFLYVGMMA  
LDIDKWRVSDTPGTSLAVSSILMGLVMVGPVAAFPLSFLSNLAKKNQSEKTNFN  
MQVVIWWSGLMRGAVSMALAYNKFTRAGHTDVRGNAGMITSTITVCLFSTVVFG  
MLTKPLISYLLPHQNATTSMLSDDNTPKSFFLLPLLDQDSFIEPSGNHNWRPDS  
GFLTRPTRTVHYYWRQFDDSFMRPVFGGRGFVFPVPGSPTERNPPDLSKA

## REIVINDICACIONES

1. Un método para aumentar la tolerancia a la sal en una planta, y el método comprende,
  - a. introducir en la planta un polinucleótido que codifica un polipéptido transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> truncado en el extremo C-terminal, que cuando se expresa confiere una tolerancia incrementada a la sal en la planta; y en el que el polipéptido transportador truncado consiste en una secuencia de aminoácidos que es:
    - i. al menos un 80% idéntica a SEQ ID N°:2 a lo largo de toda la longitud del polipéptido transportador truncado; y
    - ii. menor de una longitud de 475 aminoácidos; y
  - b. seleccionar una planta que exhibe una tolerancia incrementada a la sal en comparación con una planta en la que se ha introducido un polipéptido que codifica un péptido de SEQ ID N°:2.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el polipéptido transportador está truncado en el extremo C-terminal mediante la delección de 84 aminoácidos del extremo C-terminal.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el polinucleótido es SEQ ID N°: 9 y/o codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 10.
4. Un método para aumentar la tolerancia a la sal de una planta, y el método comprende,
  - a. introducir en la planta un polinucleótido que codifica un polipéptido transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, que cuando se expresa confiere una tolerancia incrementada a la sal en la planta; y en el que el polipéptido transportador comprende:
    - i. una secuencia de aminoácidos al menos un 80% idéntica a SEQ ID N°:2 a lo largo de toda la longitud del polipéptido transportador; y
    - ii. en el que el residuo correspondiente a la serina de la posición 508 en SEQ ID N°:2 se sustituye por un aminoácido que confiere la tolerancia incrementada a la sal del polipéptido transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>; y
  - b. seleccionar una planta con una tolerancia aumentada a la sal en comparación con una planta en la que se ha introducido un polipéptido que codifica un péptido de SEQ ID N°:2.
5. El método según la reivindicación 4, en el que el aminoácido que sustituye la serina de la posición 508 es un aminoácido polar neutro.
6. El método según la reivindicación 4, en el que el aminoácido que sustituye la serina de la posición 508 se selecciona del grupo que consiste en treonina, metionina, cisteína, asparagina y glutamina.
7. El método según la reivindicación 6, en el que el aminoácido que sustituye la serina de la posición 508 es cisteína.
8. Un vector de ADN recombinante adecuado para transformar células vegetales que comprende un promotor y una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> truncado en el extremo C-terminal que cuando se expresa confiere una tolerancia incrementada a la sal en una planta en comparación con una planta en la que se ha introducido un polipéptido que codifica un péptido de SEQ ID N°:2; en el que el polipéptido transportador truncado consiste en una secuencia de aminoácidos que es:
  - i. al menos un 90% idéntica a SEQ ID N°:2 a lo largo de toda la longitud del polipéptido transportador truncado; y
  - ii. menor de una longitud de 475 aminoácidos.
9. El vector de la reivindicación 8, en el que la secuencia nucleotídica es SEQ ID N°:9 y/o codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°: 10.
10. Un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> que cuando se expresa confiere una tolerancia incrementada a la sal en una planta en comparación con una planta en la que se ha introducido un polipéptido que codifica un péptido de SEQ ID N°:2, en el que el polipéptido transportador comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80% idéntica a SEQ ID N°:2 a lo largo de toda la longitud del polipéptido transportador, en el que el residuo correspondiente a la serina de la posición 508 en SEQ ID N°:2 se sustituye por un aminoácido que confiere la tolerancia incrementada a la sal.
11. El polinucleótido según la reivindicación 10, en el que el aminoácido que sustituye la serina de la posición 508 es un aminoácido polar neutro.

12. El polinucleótido según la reivindicación 10, en el que el aminoácido que sustituye la serina de la posición 508 se selecciona del grupo que consiste en treonina, metionina, cisteína, asparagina y glutamina.
13. El polinucleótido según la reivindicación 10, en el que el aminoácido que sustituye la serina de la posición 508 es cisteína.
- 5 14. El polinucleótido según la reivindicación 10, en el que la secuencia nucleotídica es SEQ ID N°:3.
15. El polipéptido según la reivindicación 10, que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°:4.
16. Una planta que comprende un polinucleótido seleccionado de (a) y (b):
- 10 (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> truncado en el extremo C-terminal, que cuando se expresa confiere una tolerancia incrementada a la sal en la planta en comparación con una planta en la que se ha introducido un polipéptido que codifica un péptido de SEQ ID N°:2; y en el que el polipéptido transportador truncado consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a SEQ ID N°:2 a lo largo de toda la longitud del polipéptido transportador truncado, y en el que el polipéptido es menor de una longitud de 475 aminoácidos; y
- 15 (b) un polinucleótido que codifica un polipéptido transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID N°:6; SEQ ID N°: 8; y SEQ ID N°: 10.
17. La planta según la reivindicación 16, en la que el polinucleótido es SEQ ID N°: 9 y/o codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 10.
- 20 18. Una planta que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, que cuando se expresa confiere una tolerancia incrementada a la sal en la planta en comparación con una planta en la que se ha introducido un polipéptido que codifica un péptido de SEQ ID N°:2; y en la que el polipéptido transportador comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80% idéntica a SEQ ID N°:2 a lo largo de toda la longitud del polipéptido transportador; y
- 25 en la que el residuo correspondiente a la serina de la posición 508 en SEQ ID N°:2 se sustituye por un aminoácido que confiere la tolerancia incrementada a la sal.
19. La planta según la reivindicación 18, en la que el aminoácido que sustituye la serina de la posición 508 es un aminoácido polar neutro.
20. La planta según la reivindicación 18, en la que el aminoácido que sustituye la serina de la posición 508 se selecciona del grupo que consiste en treonina, metionina, cisteína, asparagina y glutamina.
- 30 21. La planta según la reivindicación 18, en la que el aminoácido que sustituye la serina de la posición 508 es cisteína.
22. La planta según la reivindicación 18, en la que la secuencia nucleotídica es SEQ ID N°:3 y/o el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°:4.
- 35 23. El uso de un polinucleótido para aumentar la tolerancia a la sal en una planta, y el polinucleótido se selecciona de:
- (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> truncado en el extremo C-terminal, que cuando se expresa confiere una tolerancia incrementada a la sal en la planta; y en el que el polipéptido transportador truncado consiste en una secuencia de aminoácidos que es:
- 40 i. al menos un 80% idéntica a SEQ ID N°:2 a lo largo de toda la longitud del polipéptido transportador truncado; y
- ii. el polipéptido transportador es menor de una longitud de 475 aminoácidos; y
- en el que el polinucleótido se introduce en una planta, y se selecciona una planta que exhibe una tolerancia incrementada a la sal en comparación con una planta en la que se ha introducido un polipéptido que codifica un péptido de SEQ ID N°:2; y
- 45 (b) un polinucleótido que codifica un polipéptido transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de:
- i) SEQ ID N°:6;
- ii) SEQ ID N°: 8; y

iii) SEQ ID N°: 10.



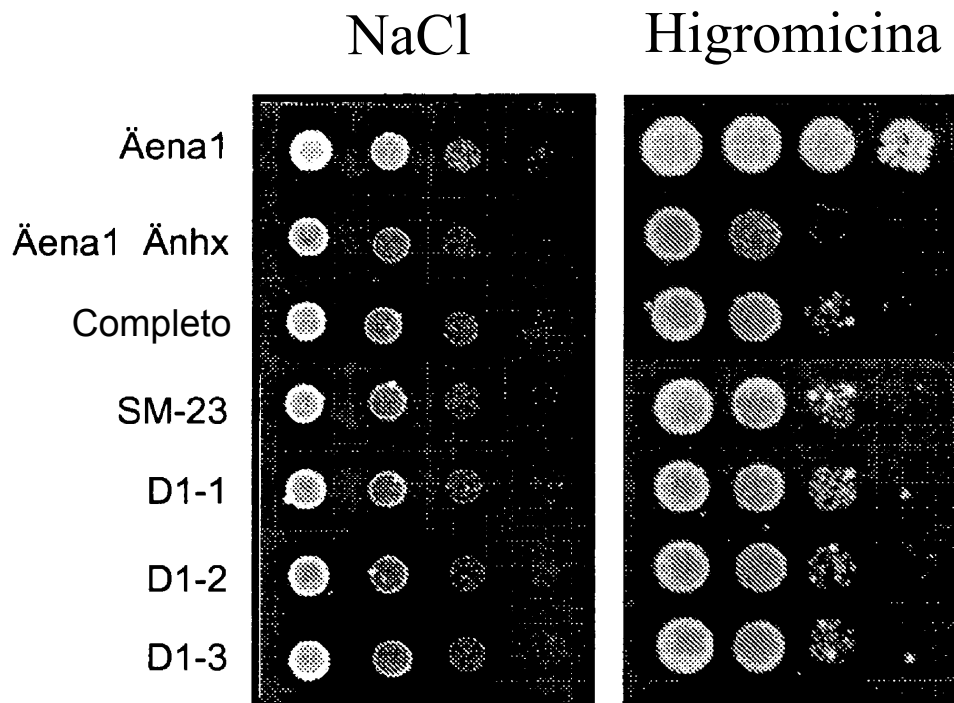


FIG. 1

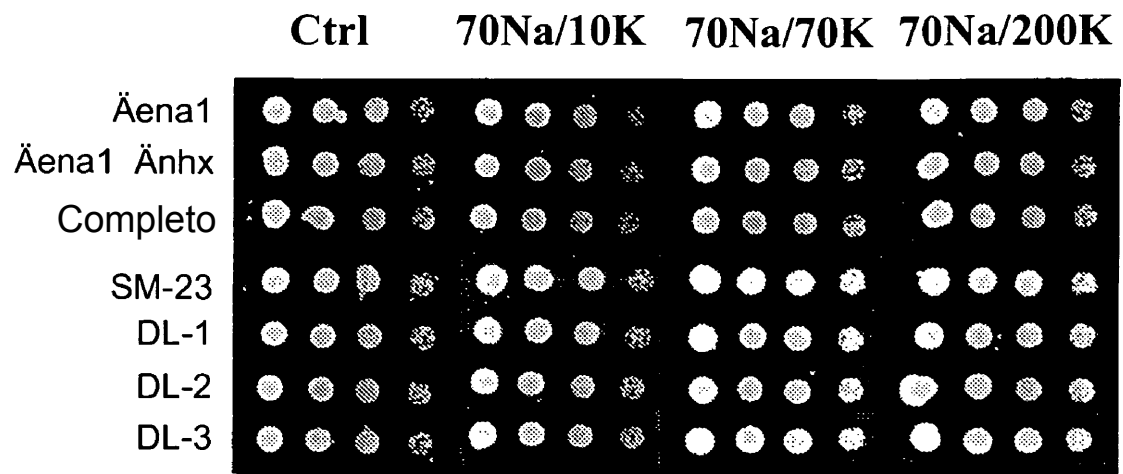
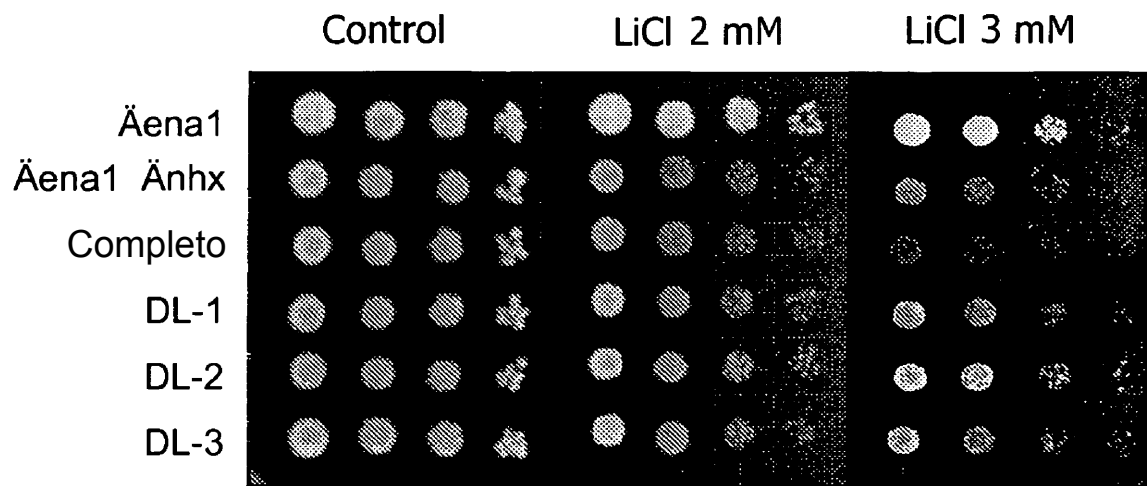
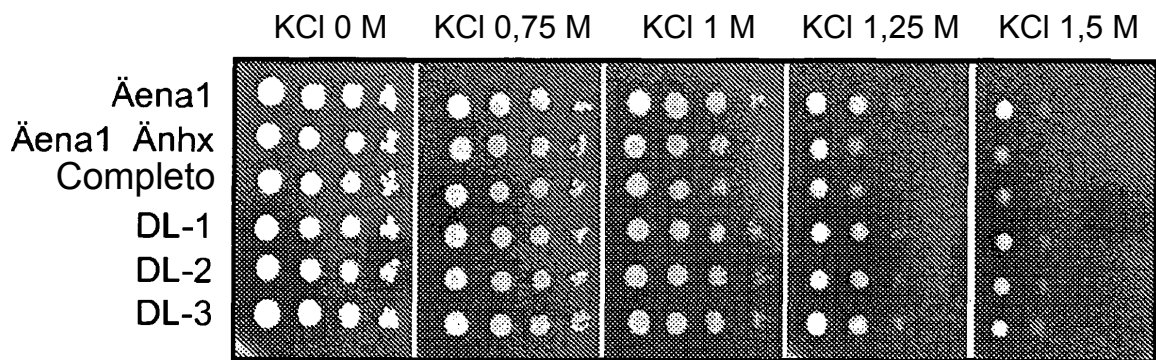


FIG. 2



**FIG. 3**



**FIG. 4**

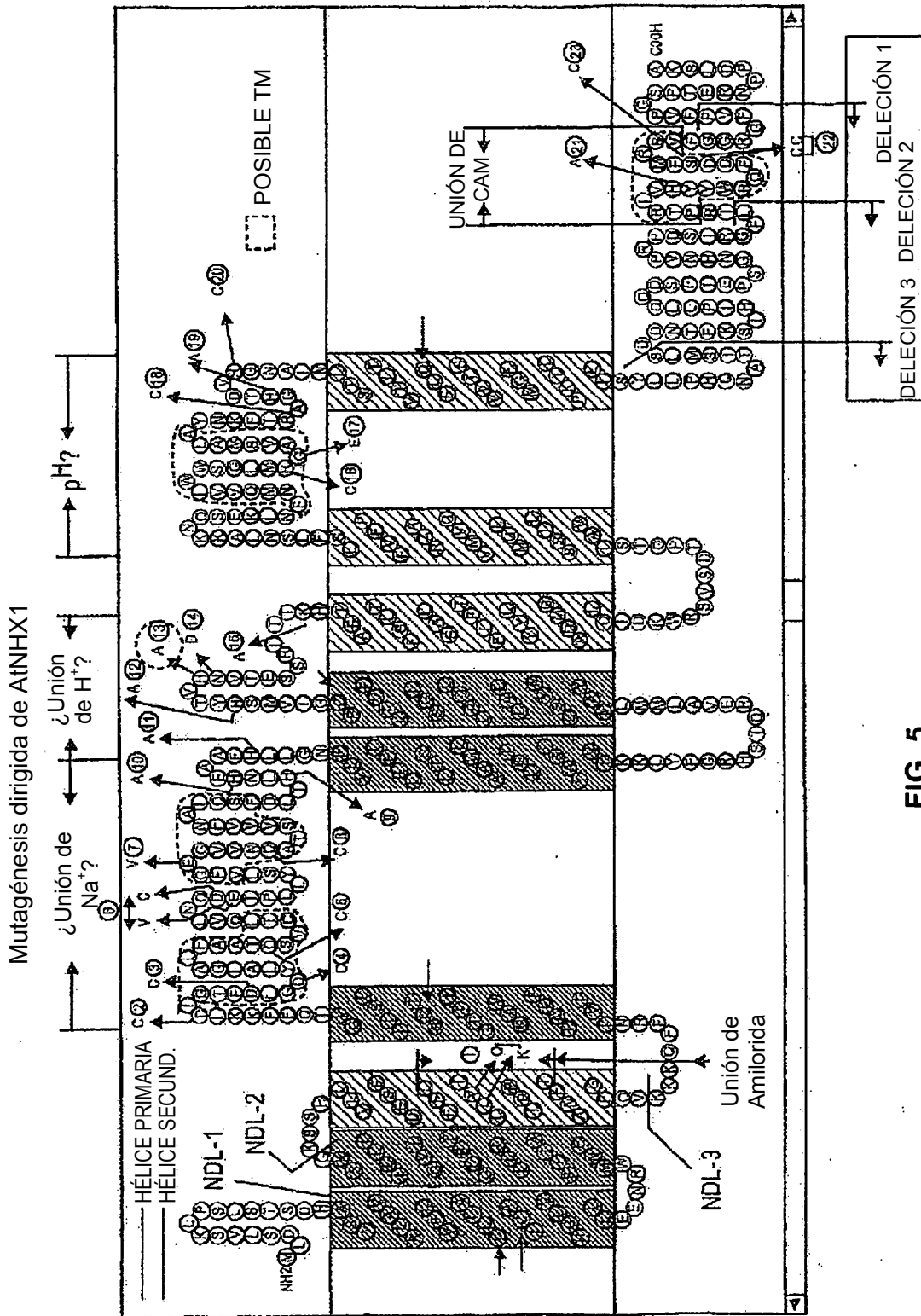


FIG. 5