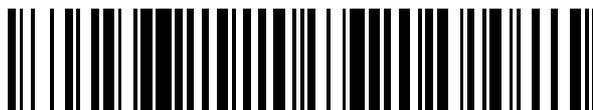


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 418 362**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2002 E 02766000 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 1422991**

54 Título: **Método para aumentar la tolerancia al estrés en plantas**

30 Prioridad:

06.09.2001 US 317724 P

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

13.08.2013

73 Titular/es:

**THE ARIZONA BOARD OF REGENTS ON BEHALF
OF THE UNIVERSITY OF ARIZONA (100.0%)
P.O. BOX 210151
TUCSON AZ 85721-0151, US**

72 Inventor/es:

**ZHU, JIAN -KANG y
XIONG, LIMING**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 418 362 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

Método para aumentar la tolerancia al estrés en plantas.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un método para aumentar la tolerancia al estrés en plantas. Más específicamente, el método de la presente invención es para mejorar la resistencia a la sequía y la tolerancia a la sal.

Antecedentes de la invención

10 Las plantas responden a estímulos ambientales alterando en parte su perfil de expresión génica, lo que conduce finalmente a diversas respuestas adaptativas a niveles celular y de planta completa (Bray, 1993; Thomashow, 1999; Hasegawa et al., 2000; Zhu et al., 1997; Ingram y Bartel, 1996). Un importante regulador de las respuestas de las plantas a ambientes de estrés abiótico es la fitohormona ácido abscísico (ABA; del inglés, *abscisic acid*). El ABA está implicado en las respuestas de las plantas a estreses abióticos tales como baja temperatura, sequía y salinidad, así como en la regulación del crecimiento y el desarrollo de las plantas, incluyendo la embriogénesis, la inactividad de las semillas, el crecimiento de brotes y raíces y la transpiración de las hojas (Koornneef et al., 1998; McCourt, 1999; Leung y Giraudat, 1998; Rock, 2000). La evidencia de un papel del ABA en la regulación génica sensible al estrés en las plantas ha sido doble. En primer lugar, bajo condiciones de estrés por frío, sequía o sal, las plantas acumulan una cantidad aumentada de ABA, ejerciendo el estrés por sequía el efecto más prominente sobre la acumulación de ABA. En segundo lugar, el ABA exógeno induce la expresión de muchos genes sensibles al estrés, y su capacidad de inducción por estrés está disminuida en plantas mutantes defectuosas en cuanto a la biosíntesis de ABA o a la sensibilidad al ABA.

20 Un análisis genético basado en el efecto inhibitorio del ABA sobre la germinación de semillas ha permitido producir mutantes con una biosíntesis reducida de ABA o una sensibilidad alterada al ABA (Koornneef et al., 1998; McCourt, 1999; Leung y Giraudat, 1998; Rock, 2000). El primer grupo de mutantes en *Arabidopsis* incluye *aba1*, *aba2* y *aba3*. El gen *ABA1* codifica una zeaxantina epoxidasa que actúa en una etapa precoz de la biosíntesis de ABA convirtiendo zeaxantina en violaxantina. Hasta ahora no se ha comunicado la clonación molecular de *ABA2* ni *ABA3*. Los fenotipos comunes de estos mutantes *aba* incluyen pérdida de la inactividad de las semillas, resistencia de la germinación al estrés por NaCl, y marchitamiento cuando son transferidos de condiciones de humedad elevada a condiciones de humedad baja. La utilización de mutantes deficientes en ABA junto con mutantes sensibles a ABA en estudios de regulación génica por estrés condujo a la idea de que la expresión génica sensible al estrés en las plantas está mediada por vías tanto dependientes de ABA como independientes de ABA (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1977; Leung y Giraudat, 1998; Rock, 2000; Thomashow, 1999. Aunque los mecanismos moleculares que subyacen a las diferencias entre la regulación génica dependiente de ABA y la independiente de ABA no están claros, el análisis de los promotores de genes sensibles al estrés y el aislamiento de factores de transcripción que activan estos genes respaldan el hecho de que hay distintos mecanismos regulatorios para las diferentes vías. En estos promotores, el complejo *ABRE* [elemento sensible a ABA (del inglés, ABA-responsive element)] media en la inducción génica por ABA (Guiltinan et al., 1990; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994; Shen y Ho, 1995; Vasil et al., 1995), mientras que el *DRE/CRT* (elemento sensible a la deshidratación) media en la sensibilidad al estrés osmótico y por frío independientemente de ABA (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994; Stockinger et al., 1997). A pesar de estas diferencias en la activación transcripcional, el análisis genético ha indicado que las vías dependientes de ABA y las independientes de ABA presentan vastas interacciones o interferencias en cuanto al control de la expresión génica bajo estreses abióticos (Ishitani et al., 1997; Xiong et al., 1999a).

Como bien se aprecia en este campo técnico, aún existe la necesidad de métodos para mejorar la resistencia de las plantas a la sequía.

Sumario de la invención

- 45 Un objeto de la presente invención es proporcionar métodos y composiciones para aumentar la tolerancia al estrés en las plantas.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar plantas y células vegetales que tengan una resistencia aumentada al estrés.

50 Los objetos de la presente invención pueden ser llevados a cabo con un método para aumentar la tolerancia a la sequía o la tolerancia a la sal en una planta, que comprende hacer que se sobreexpresen un cofactor de molibdeno sulfurasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 en la planta. Preferiblemente, el cofactor de molibdeno sulfurasa es codificado por un ácido nucleico que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1.

55 La presente invención ha sido llevada a cabo usando un planteamiento de gen informador para diseccionar genéticamente la transducción de señales de ABA y el estrés en *Arabidopsis*. Se construyeron plantas bioluminiscentes sensibles a ABA y al estrés introduciendo el gen informador de luciferasa de luciérnaga bajo el

control del promotor *RD29A* (que contiene tanto elementos *ABRE* como *DRE/CRT*; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994) en *Arabidopsis*. Se sometieron las plantas *RD29A-LUC* a mutagénesis y se aislaron mutantes con una bioluminiscencia anormal en respuesta al frío, la sequía, la sal o el ABA (Ishitani et al., 1997). Un grupo de mutantes presenta respuestas de luminiscencia reducidas al estrés por NaCl. Aquí presentamos la caracterización y clonación de dos mutantes alélicos de este grupo. Estos dos mutantes, denominados *los5-1* y *los5-2* (baja expresión de genes osmóticamente sensibles), muestran una expresión reducida de genes sensibles al estrés bajo condiciones de estrés tanto osmótico como por frío. Aunque el papel de LOS5 en la regulación por estrés osmótico de la expresión génica es mediado por ABA, la regulación de la sensibilidad al frío por LOS5 no depende de ABA. La función de LOS5 en la expresión de genes sensibles al estrés osmótico y por frío es independiente de los factores de transcripción CBF/DREB1 y DREB2A. Las plantas mutantes *los5* son más susceptibles al daño por estreses por congelación, sal y sequía, lo que sugiere que LOS5 es crítico para la tolerancia de las plantas al estrés. Las plantas mutantes también muestran una pérdida aumentada de agua de transpiración y acumulan menos ABA en respuesta al estrés por sequía. Pruebas alélicas muestran que *los5* es alélico con respecto a la mutación *aba3*. La clonación de *LOS5/ABA3* basada en mapas revela que codifica una supuesta cofactor de molibdeno [MoCo (del inglés, molybdenum cofactor)] sulfurasa que cataliza la sulfuración de la forma desulfuro de MoCo, lo que es consistente con hallazgos previos relativos a que la alteración en *aba3* está en la introducción de S en MoCo (Schwartz et al., 1997a). El MoCo sulfurilado es un cofactor de la ABA-aldehído oxidasa que actúa en la última etapa de la biosíntesis de ABA. La expresión del gen *LOS5/ABA3* es suprarregulada por ABA y estreses por sal y sequía. Estos datos proporcionan importantes conocimientos sobre la biosíntesis de ABA y promueven significativamente la comprensión de la regulación génica por estrés y la tolerancia al estrés.

Se obtendrá fácilmente una apreciación más completa de la invención y de muchas de las ventajas concomitantes de la misma conforme la invención llegue a ser mejor conocida por referencia a las Figuras siguientes junto con la posterior descripción detallada.

Breve descripción de las Figuras

Figura 1: Fenotipos de luminiscencia de plantas mutantes *los5*.

(A) Morfología de plántones *los5-1* (derecha) y de tipo silvestre (izquierda) en una placa de agar.

(B) Luminiscencia de (A) después de un tratamiento a baja temperatura, a 0 °C, durante 48 horas.

(C) Morfología de plántones *los5-1* (derecha) y de tipo silvestre (izquierda) en una placa de agar.

(D) Luminiscencia después de un tratamiento con ABA 100 µM durante 4 horas.

(E) Morfología de plántones *los5-1* (derecha) y de tipo silvestre (izquierda) sobre papel de filtro saturado con NaCl 300 mM.

(F) Luminiscencia de (E) después de 5 horas de tratamiento con NaCl 300 mM.

(G) Cuantificación de las intensidades de luminiscencia de plantas *los5-1* y de tipo silvestre en respuesta a tratamientos con frío (0 °C durante 48 horas), ABA (100 µM durante 4 horas) o NaCl (300 mM durante 5 horas), como se muestra en las Figuras 1B, 1D y 1F. También se muestra las de plantas no tratadas (testigo).

(H) Curva de dosis de temperatura baja-respuesta. Los tratamientos a -5 °C o -10 °C duraron 3 horas, y fueron seguidos de incubación a temperatura ambiental durante 2 horas. Los tratamientos a otras temperaturas duraron 48 horas antes de la obtención de imágenes.

(I) Curva de dosis de NaCl-respuesta. El tiempo de tratamiento fue 3 horas.

La escala cromática situada a la derecha muestra la intensidad de luminiscencia desde el azul oscuro (la menor) al blanco (la mayor). Los datos de (G) a (I) representan valores medios y errores estándares (n = 20). Símbolos blancos: tipo silvestre; símbolos negros: *los5-1*.

Figura 2: Niveles de transcritos de genes sensibles al estrés en plantas *los5-1* y de tipo silvestre. Los plántones no se trataron (testigo, C) o se trataron con baja temperatura (Frío, 0 °C durante 24 horas), ABA 100 µM durante 2 horas, NaCl 300 mM durante 3 horas, o PEG al 30% durante 5 horas. Se usó actina como un testigo de carga. WT (del inglés, wild type): tipo silvestre.

Figura 3: Sensibilidad de plantas *los5-1* a la congelación.

(A) Plantas antes del tratamiento por congelación.

(B) Plantas después del tratamiento por congelación (-7 °C durante 5 horas). La fotografía se tomó 7 días después del tratamiento por congelación.

Figura 4: Acumulación de prolina y sensibilidad al estrés osmótico de plantas mutantes *los5-1*.

(A) Acumulación de prolina en plantas *los5-1* y de tipo silvestre que no fueron tratadas (testigo) o fueron tratadas con NaCl 150 mM o fueron tratadas con ABA 50 μ M. Los datos representan valores medios y errores estándares (n = 3).

5 (B) Sensibilidad a la sequía, según se mide por pérdida de electrolitos, en plantas *los5-1* y de tipo silvestre tratadas con PEG al 30%. Los datos representan valores medios y errores estándares (n = 4).

(C) Las plantas *los5-1* son más sensibles al estrés por NaCl. Se transfirieron plántones *los5-1*, *los6/aba1* y de tipo silvestre, de una semana de edad, de medio de agar nutriente MS a una placa de agar MS sin NaCl (NaCl 0 mM) o con NaCl 100 mM. Advértase que las hojas de los mutantes *los5-1* se decoloraron a causa del estrés por NaCl. Las fotografías se tomaron 3 semanas después de que se transfirieran los plántones a las placas de tratamiento.

10 Figura 5: Morfología de hojas y fenotipos marchitos de plantas mutantes *los5-1*.

(A) Plantas de tipo silvestre en suelo.

(B) Plantas mutantes *los5-1* en suelo.

(C) Las plantas en roseta *los5-1* y de tipo silvestre están turgentes inmediatamente después de la segregación radicular.

15 (D) Las plantas *los5-1* están marchitas 10 minutos después de la segregación radicular. La flecha apunta a una hoja marchita de *los5-1*.

(E) Morfología de la inflorescencia de tipo silvestre (izquierda) y de *los5-1* 10 minutos después de ser pasadas de una humedad relativa del 90% a una humedad relativa de ~30%. Advértase que las plantas *los5-1* están marchitas.

20 (F) Pérdida acumulativa de agua de transpiración en brotes de *los5-1* y del tipo silvestre segregados, con o sin tratamiento con ABA 100 μ M. Los datos son valores medios y errores estándares (n = 4).

Figura 6: Regulación por estrés por frío o sal, de la expresión de *RD29A-LUC* en plántones de tipo silvestre, *los5-1* y *los6/aba1*, según resulta afectada por ABA exógeno.

(A) La sensibilidad al estrés por sal en mutantes *los5-1* y *los6-1* se recupera mediante la aplicación de ABA.

25 (B) La sensibilidad al frío en el mutante *los5-1* no se recupera mediante la aplicación de ABA.

Los datos son valores medios y errores estándares (n = 20). Frío: 0 °C durante 48 horas; ABA: 100 μ M durante 4 horas; y Na: NaCl 300 mM durante 4 horas.

Figura 7: Clonación posicional de *LOS5* y organización del gen *LOS5* y el producto del gen *LOS5*.

(A): Se mapeó *LOS5* en el brazo superior del cromosoma I y se situó en el clon BAC F19K19.

30 (B) Estructura del gen *LOS5* y posición de mutaciones *los5/aba3*. Las posiciones son relativas al codón de iniciación de la traducción. Los rectángulos rellenos indican el marco de lectura abierto, y las líneas entre rectángulos indican intrones.

(C) Estructura global de la proteína *LOS5*.

Figura 8: Secuencia de la secuencia de cDNA que codifica la proteína *LOS5*.

35 Figura 9: Alineación secuencial de *LOS5* y sus compuestos homólogos de otros organismos. Los restos en fondo negro indican identidad y el fondo gris indica similitud. Las líneas de puntos indican huecos que se introdujeron para maximizar la alineación. El supuesto motivo ligante de fosfato de piridoxal está subrayado con línea continua y el motivo de cisteína conservado está subrayado con línea discontinua. El resto de lisina crítico conservado del dominio PLP se indica con un asterisco, y el resto de cisteína conservado se indica con un cuadrado. También se muestran las posiciones de mutaciones *los5/aba3* (los círculos rellenos indican un codón de parada introducido). Los números de acceso de secuencias para *LOS5/ABA3* y sus compuestos homólogos son los siguientes: *LOS5/ABA3*, AY034895; ser humano, BAA91354; mosca de la fruta (proteína Mal de *Drosophila melanogaster*), AAF50901; ganado vacuno (MCSU de *Bos taurus*), BAA98133; y *Aspergillus* (HxB de *Aspergillus nidulans*), AAF22564.

40

45 Figura 10: Expresión del gen *LOS5/ABA3* y regulación génica por estrés en mutantes deficientes en ABA o insensibles al ABA.

(A) Expresión de *LOS5* en diferentes partes de plantas.

(B) Suprarregulación de la expresión de *LOS5* por sequía en plántones de tipo silvestre.

(C) Expresión de *LOS5* bajo diferentes tratamientos por estrés en plantas de tipo silvestre y *los5-1*.

(D) Expresión de *LOS5* y otros genes sensibles al estrés seleccionados, en plantas *los5-1*, *aba1-1* y *abi1-1*.

(E) Expresión de *CBF2* y *DREB2A* en mutantes deficientes en ABA.

5 Testigo, sin tratamiento; frío, 4 °C durante 12 horas; ABA, ABA 100 µM durante 4 horas; NaCl, NaCl 300 mM durante 5 horas; PEG, PEG al 30% durante 5 horas. Se muestran *tubulina* y *actina* como testigos de carga.

Figura 11: Reacción catalizada por LOS5/ABA3

10 La forma desulfo/dioxio del cofactor de molibdeno (MoCo) (izquierda) ha de ser sulfurada en uno de los dos grupos oxio terminales por la cofactor de molibdeno sulfurasa LOS5/ABA3 para generar la forma sulfuro del MoCo (derecha). La forma sulfuro del MoCo es un cofactor de la aldehído oxidasa (AO) y la xantina deshidrogenasa (XDH), mientras que la forma dioxio del MoCo es el cofactor para la nitrato reductasa (NR) y la sulfito oxidasa (SOX). La AO cataliza la última etapa de la biosíntesis de ABA. El dador de azufre inmediato podría ser un resto de cisteína, procedente de LOS5/ABA3 u otras fuentes. La estructura de la pterina y su esquema de numeración son de acuerdo con Rajagopant (1991).

15 Figura 12: Índice reducido de pérdida de agua de hojas de plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan el gen *LOS5*. Se segregaron hojas de plántones cultivados en suelo, en fase de roseta, y se colocaron bajo condiciones ambientales bajo luz. Las fotos se tomaron en el momento indicado después de la segregación.

Descripción detallada de la invención

Descripción de las realizaciones preferidas

20 Como se describe con detalle en los Ejemplos posteriores, la sobreexpresión de la cofactor de molibdeno sulfurasa descrita en esta memoria proporciona a las plantas una resistencia mejorada a la sequía. También se espera que dichas plantas sean más resistentes al estrés por sal y el estrés por congelación. Esto es así porque la tolerancia a la sequía está íntimamente relacionada con la tolerancia a la sal y a la congelación, especialmente con respecto a ABA. Los mutantes *los5* con pérdida de función son más sensibles al estrés por sal o congelación, lo que también sugiere que es probable que las plantas con sobreexpresión sean más tolerantes a los estreses por sal y congelación. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, la expresión "aumentar la tolerancia al estrés en las plantas" se refiere a uno, o a cualquier combinación, de los puntos siguientes: tolerancia aumentada a la sequía, resistencia aumentada a la sal (es decir, la salinidad del suelo) y tolerancia aumentada a la congelación. Como apreciarán fácilmente quienes tienen experiencia en la técnica, la tolerancia aumentada al estrés en las plantas que sobreexpresan la cofactor de molibdeno sulfurasa se refiere a las plantas correspondientes que no sobreexpresan esta enzima.

30 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en esta memoria tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por quien tiene una experiencia normal en el campo de la biología molecular. Aunque en la práctica o el ensayo de la presente invención se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria, en esta memoria se describen métodos y materiales adecuados.

40 Se hace referencia a libros de texto estándares de biología molecular que contienen definiciones y métodos y medios para llevar a cabo técnicas básicas, abarcados por la presente invención. Véanse, por ejemplo, Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1982), y Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989); *Methods in Plant Molecular Biology*, redactado por Maliga et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1995); *Arabidopsis*, redactado por Meyerowitz et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1994) y las diversas referencias en ellos citadas.

45 El término "planta" incluye plantas completas, órganos de plantas (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas y células vegetales y progenie de las mismas. La clase de plantas que se puede utilizar en los métodos de la invención es generalmente tan amplia como la clase de plantas superiores sensibles a técnicas de transformación, incluyendo plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. Las plantas preferidas incluyen arroz, maíz, trigo, algodón, cacahuete y soja.

50 De este modo, en una realización de la presente invención, la tolerancia de una planta a la sal puede ser potenciada o aumentada al aumentar la cantidad de proteína disponible en la planta, preferiblemente mediante la potenciación del gen de la cofactor de molibdeno sulfurasa en la planta.

De este modo, una realización de la presente invención son células vegetales que portan los polinucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y preferiblemente plantas transgénicas que portan dichos polinucleótidos.

- Como se utiliza en esta memoria, el término "potenciación" significa aumentar la actividad intracelular de una o más enzimas en una célula vegetal y/o una planta, que son codificadas por el correspondiente DNA. La potenciación puede ser alcanzada con la ayuda de diversas manipulaciones de la célula bacteriana. Con objeto de alcanzar la potenciación, particularmente la sobreexpresión, se puede aumentar el número de copias del gen correspondiente, se puede utilizar un promotor potente, o se puede mutar la región promotora y reguladora o el sitio de unión al ribosoma que está situado cadena arriba del gen estructural. Los casetes de expresión que se incorporan cadena arriba del gen estructural actúan de la misma manera. Además, es posible aumentar la expresión empleando promotores inducibles. También se puede utilizar un gen que codifique una correspondiente enzima con una actividad elevada. También se puede mejorar la expresión mediante medidas para prolongar la vida del mRNA. Además, se aumenta la actividad enzimática en conjunto previniendo la degradación de la enzima. Más aún, estas medidas pueden ser opcionalmente combinadas de cualquier modo deseado. Se conocen estos y otros métodos para alterar la actividad génica en una planta, como se describe, por ejemplo, en *Methods in Plant Molecular Biology*, redactado por Maliga et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1995).
- La presente descripción también se refiere a polinucleótidos que contienen el gen completo con la secuencia polinucleotídica que corresponde a SEQ ID NO: 1 o fragmentos de la misma, y que se pueden obtener mediante exploración por medio de la hibridación de un correspondiente banco de genes con una sonda que contiene la secuencia de dicho polinucleótido que corresponde a SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma, y el aislamiento de la secuencia de DNA.
- Las secuencias polinucleotídicas descritas en esta memoria son adecuadas como sondas de hibridación para RNA, cDNA y DNA, con objeto de aislar aquellos cDNAs o genes que presentan un elevado grado de similitud con la secuencia de SEQ ID NO: 1.
- Las secuencias polinucleotídicas descritas en esta memoria son también adecuadas como cebadores para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, *polymerase chain reaction*), para la producción de DNA que codifica una enzima que tiene actividad cofactor de molibdeno sulfurasa.
- Oligonucleótidos tales como estos, que sirven como sondas o cebadores, pueden contener más de 30, preferiblemente hasta 30, más preferiblemente hasta 20, lo más preferiblemente al menos 15, nucleótidos sucesivos. También son adecuados los oligonucleótidos con una longitud de al menos 40 o 50 nucleótidos.
- El término "aislado" significa separado de su entorno natural.
- El término "polinucleótido" se refiere, en general, a polirribonucleótidos y polidesoxirribonucleótidos, y puede significar un RNA o DNA no modificado o un RNA o DNA modificado.
- Se ha de entender que el término "polipéptidos" significa péptidos o proteínas que contienen dos o más aminoácidos que están unidos por medio de enlaces peptídicos.
- La descripción también se refiere a secuencias de DNA codificadoras que resultan de la SEQ ID NO: 1 por degeneración del código genético.
- Finalmente, la presente descripción se refiere a secuencias de DNA que se producen mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) al usar cebadores oligonucleotídicos que resultan de la SEQ ID NO: 1. Los oligonucleótidos de este tipo tienen típicamente una longitud de al menos 15 nucleótidos.
- Las secuencias polinucleotídicas para uso en la presente invención pueden ser portadas por uno o más vectores plasmídicos adecuados, como es sabido en la técnica para plantas o similares.
- En una realización, para propagar el polinucleótido puede resultar ventajoso portarlo en una cepa bacteriana o fúngica con el apropiado vector adecuado para el tipo celular. Los métodos ordinarios para propagar polinucleótidos y producir proteínas en estos tipos celulares son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1982), y Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989).
- En otra realización preferida, los polinucleótidos para uso en la presente invención están en un vector y/o una célula huésped. Preferiblemente, los polinucleótidos están en una célula vegetal o una planta transgénica. Preferiblemente, la planta es *Arabidopsis thaliana* o una seleccionada del grupo que consiste en trigo, maíz, cacahuate, algodón, avena y soja. En una realización preferida, los polinucleótidos están operativamente ligados a un promotor, preferiblemente un promotor inducible.
- La presente descripción proporciona un procedimiento para explorar polinucleótidos que codifican una proteína que tiene actividad cofactor de molibdeno sulfurasa, que comprende hibridar el polinucleótido de la invención con el polinucleótido que se va a explorar; hacer que se exprese el polinucleótido para producir una proteína; y detectar la presencia o ausencia de actividad cofactor de molibdeno sulfurasa en la proteína.
- La presente descripción proporciona un método para preparar la proteína cofactor de molibdeno sulfurasa, que

comprende cultivar la célula huésped que porta los polinucleótidos de la invención durante un tiempo y bajo unas condiciones adecuadas para la expresión de la cofactor de molibdeno sulfurasa, y recoger la proteína cofactor de molibdeno sulfurasa.

5 La presente descripción proporciona un método para producir una planta transgénica, que comprende introducir los polinucleótidos de la invención en la planta.

En una realización, la presente invención proporciona un método para aumentar la tolerancia a la sal de una planta que lo necesita, que comprende introducir los polinucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 en dicha planta.

10 Los métodos, vectores y composiciones para transformar plantas y células vegetales de acuerdo con la invención son bien conocidos por los expertos en la técnica y no están particularmente limitados. Para un ejemplo descriptivo, véase Karimi et al., TRENDS in Plant Science, volumen 7, nº 5, mayo de 2002, páginas 193-195.

15 Para entender la señalización de los estreses por baja temperatura y osmótico en plantas, aislamos y caracterizamos dos mutantes alélicos de *Arabidopsis*, *los5-1* y *los5-2*, que están alterados en cuanto a la inducción génica por estreses por frío y osmótico. La expresión de *RD29A-LUC* (gen informador de luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor *RD29A* sensible al estrés) en respuesta a frío y sal/sequía está reducida en los mutantes *los5*, pero la respuesta a ABA permanece inalterada. Un análisis por transferencia de RNA indica que la mutación *los5* reduce la inducción por frío de varios genes sensibles al estrés y disminuye intensamente o incluso bloquea completamente la inducción de *RD29A*, *COR15*, *COR47*, *RD22* y *P5CS* por estreses osmóticos. Las plantas mutantes *los5* están comprometidas en cuanto a su tolerancia al estrés por congelación, sal o sequía. Las plantas *los5* son deficientes en ABA, como viene indicado por una pérdida aumentada de agua de transpiración y una acumulación reducida de ABA bajo estrés por sequía en el mutante. Una comparación con otro mutante deficiente en ABA, *aba1*, revela que la alterada regulación génica por baja temperatura es específica de la mutación *los5*. Ensayos genéticos sugieren que *los5* es alélico en relación con *aba3*. La clonación basada en mapas revela que *LOS5/ABA3* codifica un cofactor de molibdeno (MoCo) sulfurasa. La MoCo sulfurasa cataliza la generación de la forma sulfurilada de MoCo, un cofactor requerido por la aldehído oxidasa que actúa en la última etapa de la biosíntesis de ABA en las plantas. El gen *LOS5/ABA3* se expresa ubicuamente en diferentes partes de la planta, y el nivel de expresión aumenta en respuesta a la sequía, la sal o el tratamiento con ABA. Nuestros resultados muestran que *LOS5/ABA3* es un regulador esencial de la biosíntesis de ABA, la expresión de genes sensibles al estrés y la tolerancia al estrés.

30 Resultados

Aislamiento de mutantes de *Arabidopsis* con una inducción reducida de *RD29A-LUC* por estrés salino

35 Se sometieron semillas de plantas de *Arabidopsis* que expresan el transgén *RD29A-LUC* (a las que se hace referencia como "tipo silvestre") a mutagénesis con metanosulfonato de etilo (EMS; del inglés, *ethyl methanesulfonate*) y se examinaron plántones de la generación M₂ en cuanto a mutantes con una regulación alterada del transgén (Ishitani et al., 1997). Se aisló un grupo de mutantes que presentaban una clara reducción de la luminiscencia inducida por NaCl. Para una caracterización detallada se escogieron dos mutantes alélicos, denominados *los5* (*los1* a *los4* son mutantes con defectos específicos en la señalización por baja temperatura; J.-K. Zhu, datos no publicados), que muestran una reducida inducción de luminiscencia en respuesta tanto al NaCl como al frío.

40 Como se muestra en la Figura 1, las intensidades de luminiscencia en los plántones mutantes *los5-1* eran considerablemente menores que aquéllas en el tipo silvestre cuando se trataban con frío (0 °C) durante 48 horas (Figura 1B) o con NaCl 300 mM durante 5 horas (Figura 1F). Por contraste, la expresión de luminiscencia en respuesta a ABA (100 µM durante 5 horas) no es menor que aquélla en el tipo silvestre (Figura 1D). Sin el tratamiento con estrés no hubo casi expresión de luminiscencia en el tipo silvestre ni en el mutante *los5*. La cuantificación de las intensidades de luminiscencia de la Figura 1 indica que los niveles de expresión de *RD29A-LUC* en los plántones *los5-1* son sólo el 8% y el 2% de los niveles en el tipo silvestre para los tratamientos con frío y NaCl, respectivamente, mientras que los niveles de expresión bajo el tratamiento con ABA son casi los mismos para el mutante y el tipo silvestre (Figura 1G).

50 Para determinar si el mutante *los5* tiene una respuesta umbral alterada al estrés por frío o por sal, se aplicaron bajas temperaturas diferentes o dosis de NaCl diferentes y se cuantificó la expresión de luminiscencia en las plantas *los5* y de tipo silvestre. Los resultados muestran que las plantas mutantes *los5* presentaban una expresión de luminiscencia consistentemente menor bajo las temperaturas probadas (Figura 1H), y las concentraciones aumentadas de NaCl tampoco dieron lugar a una recuperación de la expresión hasta los niveles del tipo silvestre (Figura 1I). Esto indica que la sensibilidad reducida al estrés osmótico o por frío en *los5* no se debe a umbrales de inducción alterados de estos estreses.

55 Se retrocruzaron plantas mutantes *los5-1* con las plantas de tipo silvestre. El análisis de la expresión de luminiscencia de los plántones F₁ y la población F₂ endogámica indicó que *los5* es una mutación recesiva en un gen

nuclear (Tabla 1). Los cruces por parejas con otros mutantes que también muestran respuestas de luminiscencia reducidas al tratamiento con NaCl permitieron identificar un segundo alelo, *los5-2* (Tabla 1). El mutante *los5-2* tiene fenotipos idénticos a los de *los5-1* (datos no mostrados).

Regulación génica reducida por sal, sequía y frío en mutantes *los5*

- 5 Para evaluar si la mutación *los5* ejerce sobre la expresión del *RD29A* endógeno un efecto similar al que ejerce sobre el transgén *RD29A-LUC*, se llevó a cabo un análisis por transferencia de RNA con RNA total aislado de plantones *los5-1* y de tipo silvestre que no habían sido tratados con estrés (testigo) o habían sido tratados con frío (0 °C) durante 24 horas, ABA 100 µM durante 2 horas, NaCl 300 mM durante 3 horas o PEG al 30% durante 5 horas. Los resultados muestran que, mientras que la inducción del *RD29A* endógeno por ABA no resultaba sustancialmente afectada, la inducción por NaCl era casi completamente bloqueada por la mutación *los5* (Figura 2). La mutación también reducía claramente la expresión de *RD29A* en respuesta a un tratamiento con frío. Para distinguir si el efecto del NaCl se debe a un estrés iónico u osmótico, se utilizó polietilenglicerol (PEG, peso molecular medio de 6000). El nivel de transcritos de *RD29A* en estado estacionario resultó también muy reducido en *los5* en respuesta al tratamiento con PEG (Figura 2). Esto indica que la mutación *los5* reduce la expresión génica bajo estrés osmótico.
- 10
- 15 La mutación *los5* también ejerce drásticos efectos sobre la expresión de otros genes sensibles al estrés bajo un tratamiento de estrés osmótico o por frío. Se analizaron diversos genes sensibles al estrés, incluyendo *COR15A* (Lin y Thomashow, 1992), *KIN1* (Karkela y Franck, 1990), *COR47* (Gilmour et al., 1992), *RD22* (Yamaguchi-Shinozaki et al., 1992) y *P5CS*. La mutación *los5* bloquea casi completamente la inducción de *COR15A*, *KIN1* y *P5CS* (Figura 2) por estrés osmótico. También reduce sustancialmente la inducción de *RD22* y *COR47* por NaCl y PEG. Es interesante que, mientras que la inducción de *COR47* por ABA es potenciada por la mutación *los5*, la inducción de *COR15A* y *P5CS* por ABA es reducida por la mutación (Figura 2). Como testigo se determinó el nivel de transcritos de un gen de actina, y el resultado muestra que su expresión no es cambiada por los tratamientos con estrés y no es sustancialmente diferente entre el mutante y el tipo silvestre bajo los respectivos tratamientos (Figura 2).
- 20

Las plantas mutantes *los5* son más sensibles al estrés por congelación

- 25 La reducida expresión de *RD29A* y otros genes sensibles al estrés en *los5* podría ejercer un impacto sobre la tolerancia de las plantas mutantes al estrés. Para probar la sensibilidad de plantas mutantes *los5* a una baja temperatura, se incubaron plantas *los5-1* y de tipo silvestre a 4 °C durante hasta 4 semanas. No se halló diferencia significativa alguna de crecimiento entre el mutante y el tipo silvestre, lo que indica que *LOS5* no es crítico para la resistencia al enfriamiento. Para probar si las plantas mutantes *los5* son defectuosas en cuanto a la aclimatación al frío, se aclimataron al frío (4 °C bajo luz), durante 48 horas, plantas de tipo silvestre y *los5-1* en roseta que crecían en suelo (Figura 3A). Las plantas fueron luego tratadas a -7 °C durante 5 horas. Después de una incubación en la cámara de crecimiento durante un día, se observó una clara diferencia: mientras que el 97% de las plantas de tipo silvestre sobrevivían a la congelación a -7 °C, todas las plantas mutantes *los5-1* murieron (Figura 3B y datos no mostrados). El resultado muestra que las plantas mutantes *los5* tienen una tolerancia reducida a la congelación.
- 30

- 35 Las plantas mutantes *los5* son más sensibles al daño por estreses por sequía y sal

- Los niveles de RNA en estado estacionario, como se muestra en la Figura 2, han revelado en plantas mutantes *los5-1* una notable reducción de la expresión de genes sensibles al estrés en respuesta a tratamientos con sal o sequía (es decir, PEG). Excepto para el gen *P5CS* (Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintasa), la función de la mayoría de los genes examinados no está clara. El *P5CS* cataliza la etapa limitante de la velocidad en la biosíntesis de prolina, un principal osmolito importante para la tolerancia de las plantas a los estreses por congelación, sequía y sal (por ejemplo, Xin y Browse, 1998; Roosens et al., 1999; Hong et al., 2000). Se midieron los contenidos de prolina en plantas de tipo silvestre y *los5-1* tratadas con ABA o estrés salino. En ausencia del tratamiento por estrés (es decir, testigo), las plantas mutantes *los5-1* tenían un contenido de prolina ligeramente mayor que las plantas de tipo silvestre. El contenido de prolina aumentaba en respuesta a un tratamiento con NaCl 150 mM tanto en las plantas *los5-1* como en las de tipo silvestre. Sin embargo, el aumento es menor en las plantas *los5-1* que en las plantas de tipo silvestre. Las plantas mutantes *los5-1* y las de tipo silvestre tenían contenidos similares de prolina cuando se trataban con ABA 50 µM (Figura 4A).
- 40
- 45

- Para determinar la sensibilidad a la sequía en plantas mutantes *los5*, se trataron plantones *los5-1* y de tipo silvestre con PEG al 30% y se midió la pérdida de electrolitos como un indicador del daño celular inducido por la sequía. Aunque los plantones *los5-1* tenían una mayor pérdida de electrolitos que el tipo silvestre incluso sin tratamiento por estrés, el tratamiento con PEG daba lugar a una pérdida de electrolitos en el mutante que era el doble que en las plantas de tipo silvestre (Figura 4B), lo que indica que las plantas mutantes *los5* son más sensibles al estrés por sequía.
- 50

- Aunque las semillas mutantes *los5-1* eran más tolerantes al estrés por NaCl en la germinación, el crecimiento radicular del mutante no difería del crecimiento del tipo silvestre en cuanto a su sensibilidad al NaCl (datos no mostrados). A pesar de los niveles similares de inhibición del crecimiento radicular por el estrés por NaCl, las plantas mutantes *los5-1* mostraron una sensibilidad aumentada al NaCl en el brote. Con NaCl en concentraciones de 75 mM o superiores, los plantones mutantes *los5-1* se volvieron amarillentos y murieron por la exposición prolongada al
- 55

estrés, mientras que las plantas de tipo silvestre sobrevivieron (Figura 4C, y datos no mostrados).

Las plantas mutantes *los5* son deficientes en cuanto a acumulación de ABA inducida por estrés

Además de los cambios en la sensibilidad al estrés, las plantas mutantes *los5* están también alteradas en cuanto al desarrollo. Bajo nuestras condiciones de crecimiento de días largos, las plantas *los5-1* florecieron aproximadamente 5 días antes que las plantas de tipo silvestre. Además de tener un color verde más oscuro, las hojas de mutantes *los5-1* son más estrechas y con un borde ligeramente dentado en comparación con las hojas más redondas de las plantas de tipo silvestre (Figuras 5A y 5B). De hecho, las plantas mutantes *los5* se pueden distinguir del tipo silvestre basándose en estas características de las hojas. Estos fenotipos visibles son compartidos por las plantas mutantes *los5-2*, segregan conjuntamente con los fenotipos de luminiscencia de *los5* y están presentes en plantas *los5-1* que han sido retrocruzadas 4 veces con el tipo silvestre.

Cuando las partes situadas por encima del suelo fueron segregadas de las raíces en la fase de roseta (Figura 5C), las hojas más jóvenes de las plantas *los5-1* se marchitaron en 10 minutos bajo nuestras condiciones ambientales (22 ± 2 °C, ~ 30% de humedad relativa). Por contraste, las hojas de tipo silvestre permanecieron turgentes bajo las mismas condiciones (Figura 5D). La inflorescencia de las plantas *los5* adultas también se marchitó rápidamente cuando las plantas fueron pasadas de las cámaras de crecimiento (22 °C \pm 2 °C, 90% de humedad relativa) a nuestras condiciones ambientales, mientras que la inflorescencia de tipo silvestre permaneció turgente (figura 5E). Estas observaciones sugieren que las plantas mutantes *los5* pueden tener un mayor índice de transpiración. La medición de la pérdida de agua de transpiración muestra que las plantas mutantes *los5* realmente pierden agua mucho más rápidamente que las plantas de tipo silvestre (Figura 5F), lo que indica posibles defectos en la regulación de los estomas, que es un fenotipo típico de mutantes deficientes en ABA o insensibles al ABA.

Para determinar si las plantas mutantes *los5* son deficientes en ABA o son insensibles al ABA, se pulverizó ABA 100 μ M sobre plantas de tipo silvestre y *los5-1* en fase de roseta 3 horas antes de segregar las partes aéreas para la medición de la pérdida de agua. La Figura 5F muestra que, mientras que el tratamiento con ABA no afectó significativamente a la pérdida de agua de transpiración de las plantas de tipo silvestre, el tratamiento redujo sustancialmente el índice de pérdida de agua de las plantas *los5-1*. Esta observación es consistente con una deficiencia de ABA en plantas mutantes *los5-1* y sugiere que *los5-1* no es insensible al ABA.

Se midieron los contenidos de ABA en plantas *los5-1* y de tipo silvestre utilizando un inmunoensayo. En ausencia de tratamiento por estrés, los contenidos de ABA en las hojas de tipo silvestre y las hojas *los5-1* son esencialmente los mismos (Tabla 2). Cuando se dejó que las hojas segregadas perdieran el 30% de su peso en estado fresco, los contenidos de ABA aumentaron tanto en el tipo silvestre como en el mutante *los5-1*. Sin embargo, las magnitudes de los aumentos son bastante diferentes. Mientras que el contenido de ABA en el tipo silvestre aumentó más de un 300% en respuesta al estrés acuoso, el aumento en las hojas *los5* fue sólo de 80%, teniendo el tipo silvestre casi un 250% más ABA que el mutante (Tabla 2).

Estos datos muestran claramente que *los5-1* es un mutante deficiente en ABA. Para probar si *los5* es alélico con respecto a mutantes deficientes en ABA conocidos, se cruzó inicialmente *los5-1* con *aba1* y *aba2*. El análisis de las plantas F_1 indicó que *los5-1* no es alélico con respecto a ninguno de ellos (Tabla 1 y datos no mostrados). Cuando más tarde se pudo disponer del mutante *aba3-1*, lo cruzamos con *los5-1* y analizamos los fenotipos de los plantones F_1 y F_2 mediante obtención de imágenes por luciferasa y medición de la pérdida de agua. Las imágenes de luminiscencia mostraron que los plantones F_1 resultantes tenían una baja expresión de luminiscencia cuando se trataban con NaCl 300 mM, lo que indica que *los5* es probablemente alélico con respecto a *aba3*. Sin embargo, la medición de la pérdida de agua de transpiración en los plantones F_1 fue menos concluyente, en parte porque, cuando se cruzaron con las plantas *RD29A-LUC* de tipo silvestre (fondo C24), las plantas heterocigóticas *aba3/ABA3* mostraron un fenotipo recesivo incompleto, es decir, las plantas F_1 perdieron agua más lentamente que *aba3* pero más rápidamente que el tipo silvestre *RD29A-LUC*. Aunque las plantas F_1 (*los5/aba3*) de un cruce entre *los5-1* y *aba3-1* perdían agua más rápidamente que las plantas F_1 de un cruce entre el tipo silvestre *RD29A-LUC* y *aba3-1*, el índice de pérdida de agua de las plantas heterocigóticas *los5-1/aba3-1* era aún menor que la de cualquiera de los mutantes *los5-1* y *aba3-1* (datos no mostrados). Los fenotipos intermedios probablemente tengan que ver con las diferencias genéticas entre los dos ecotipos (C24 frente a Columbia).

LOS5 regula la expresión de genes sensibles a estreses por frío y osmótico a través de distintos mecanismos

Un análisis de la expresión génica en plantas mutantes *los5-1* sugiere un papel crítico de *LOS5* en la regulación por sal y sequía y, en menor grado, por frío, de genes sensibles al estrés (Figura 1 y Figura 2). En nuestra exploración de mutantes, un segundo locus genético, *LOS6*, fue definido por plantas mutantes *los6-1* que muestran una inducción génica reducida por tratamientos con sal/sequía (J.-K. Zhu, observación no publicada). Resulta interesante que el análisis genético mostró que *los6* es alélico con respecto a *aba1*. Esto proporciona una excelente oportunidad para estudiar el papel de ABA en la regulación de la expresión génica por estreses por frío y osmótico usando el muy sensible y fiable informador *RD29A-LUC* y comparando dos diferentes mutantes deficientes en ABA, *los5* y *los6*. La inducción de *RD29A-LUC* por estrés salino está significativamente reducida en *los5* y *los6* (Figura 6A). Resulta interesante que, cuando se administró simultáneamente ABA con el estrés salino, se restableció la expresión de *RD29A-LUC* tanto en *los5* como en *los6/aba1* hasta el nivel de tipo silvestre o superior, lo que indica

que el ABA exógeno complementa el fenotipo reducido por inducción salina. Esto sugiere que la inducción génica reducida por sal y sequía en los mutantes tanto *los5-1* como *los6/aba1* puede ser únicamente explicada por una deficiencia de ABA.

5 También se analizó la inducción génica por frío usando estos dos mutantes. Sin tratamiento por estrés, *los6*, como *los5* y el tipo silvestre, no mostró ninguna expresión de luminiscencia (datos no mostrados). Para nuestra sorpresa, mientras que la inducción de *RD29A-LUC* por frío está significativamente reducida en *los5-1*, la expresión en *los6/aba1* está significativamente aumentada (Figura 6B). Esta expresión de luminiscencia aumentada en *los6* se observó consistentemente en numerosos experimentos independientes. Para probar el papel de ABA en la regulación génica por frío, se administró ABA junto con el tratamiento por frío. La medición de la expresión de *RD29A-LUC* muestra que el tratamiento con ABA restablece la expresión de luminiscencia en *los6/aba1* casi hasta el nivel de tipo silvestre (Figura 6B), lo que indica que la elevada inducción por frío en *los6/aba1* puede ser una consecuencia indirecta de la deficiencia de ABA. Por contraste, la aplicación de ABA a plantones mutantes *los5* no pudo restablecer la expresión de *RD29A-LUC* hasta el nivel de tipo silvestre. En realidad, no parecía que las plantas *los5* respondieran a este tratamiento con ABA en comparación con el tratamiento sólo por frío (Figura 6B), lo que sugiere que la reducida inducción génica por frío en los mutantes *los5* no es un resultado de la deficiencia de ABA.

Clonación del gen *LOS5* basada en mapas

Para clonar el gen *LOS5*, se cruzaron plantas mutantes *los5-1* homocigóticas en el ecotipo C24 con plantas de tipo silvestre en el ecotipo Columbia. Se dejó que las plantas F_1 resultantes se autopolinizaran. Inicialmente, se sembraron las semillas F_2 en placas de agar MS y se analizaron los plantones en cuanto a expresión de luminiscencia. Se seleccionaron supuestos mutantes por su expresión de luminiscencia reducida bajo tratamiento con frío así como bajo tratamiento con sal. Luego se transfirieron los plantones seleccionados a suelo y se examinaron las plantas adultas en cuanto al fenotipo marchito bajo condiciones de humedad reducidas. Para el mapeo genético se usaron marcadores de polimorfismos de longitud de secuencia simple (SSLP; del inglés, simple sequence length polymorphism) distribuidos por los cinco cromosomas de *Arabidopsis* que presentan un polimorfismo de tamaño entre los ecotipos C24 y Columbia. El mapeo genético situaba el locus *LOS5* en el brazo superior del cromosoma I, entre los marcadores SSLP *AtEAT1* y *nga248* (Figura 7A). Esta región corresponde aproximadamente a la región donde se mapeó el locus *ABA3* (Léon-Kloosterzie et al., 1996). Puesto que la mayoría de los plantones mutantes seleccionados después del tratamiento con NaCl no sobrevivieron, usamos luego el fenotipo de tolerancia salina de las semillas mutantes *los5* durante la germinación para seleccionar mutantes para el mapeo. Específicamente, se sembraron las semillas F_2 segregadoras en medio de agar complementado con NaCl 200 mM, una concentración de sal que inhibe la germinación de las semillas de tipo silvestre pero no de las semillas mutantes *los5*. Los supuestos plantones *los5* fueron luego transferidos a suelo y fueron confirmados más tarde mediante el examen de su fenotipo marchito.

Mientras estaba en curso el mapeo fino de *LOS5*, se anunció la secuencia de DNA genómico correspondiente a la región *LOS5*. Dado el fenotipo con deficiencia de ABA, la disponibilidad de la secuencia genómica hace posible seleccionar candidatos génicos para hallar la mutación *los5*. Un examen detallado de los genes sobre clones BAC en esta región (<http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/maps/5chrom>) permitió identificar varios candidatos que posiblemente podrían actuar en la biosíntesis de ABA. Entre ellos, parece que el gen F19K19.13 sobre el clon BAC F19K19 es un buen candidato (Figura 7A). Búsquedas mediante BLAST sugieren que el producto génico implicado presenta una elevada similitud con la cofactor de molibdeno sulfurasa de otros organismos. Estudios previos han indicado que la alteración genética en *aba3* está en la introducción de S en el factor de molibdeno (MoCo) (Schwartz et al., 1997a) y que el MoCo sulfurilado es requerido por la aldehído oxidasa (Schwartz et al., 1997a; Akaba et al., 1998; Sagi et al., 1999) que actúa en la última etapa de la biosíntesis de ABA (Schwartz et al., 1997a).

El DNA genómico correspondiente a F19K19.13 fue multiplicado por PCR a partir de plantas mutantes *los5-1* y de tipo silvestre y fue secuenciado. Una comparación entre las secuencias reveló un cambio de G a A 1083 pares de bases (bp; del inglés, base pairs) cadena abajo del previsto codón de inicio de la traducción en *los5-1*. El gen F19K19.13 fue luego multiplicado a partir de *los5-2* y fue secuenciado. El análisis de la secuencia permitió identificar un cambio de G a A en *los5-2*, 1040 bp cadena abajo del previsto codón de inicio de la traducción. Estos resultados sugieren acusadamente que el gen F19K19.13 es *LOS5*.

Se prevé que el producto del gen F19K19.13 actúe en la biosíntesis de ABA en una etapa correspondiente a *ABA3*. Nuestro análisis genético también sugería que *los5-1* es probablemente alélico con respecto a *aba3-1* (Tabla 2). Tomados en conjunto, estos resultados sugerían acusadamente que F19K19.13 es el gen *ABA3/LOS5*. Para probar esta hipótesis, secuenciamos el gen F19K19.13 a partir de los alelos *aba3-1* y *aba3-2* y se compararon las secuencias de DNA con las de plantas de tipo silvestre Columbia (fondo *aba3-1*) y Landsberg (fondo *aba3-2*), respectivamente. Los resultados mostraron que en *aba3-1* aparecía un cambio de G a A en la posición 3707 mientras que, en el alelo *aba3-2*, hay tres mutaciones en una fila con un solo nucleótido no mutado que las separa: un cambio de G a A en la posición 3176, un cambio de T a A en la posición 3178 y una delección de T en la posición 3180. La naturaleza de las mutaciones es consistente con el tipo de mutágeno utilizado: *aba3-1* fue causado por EMS, mientras que *aba3-2* fue causado por irradiación con rayos γ (Léon-Kloosterzie et al., 1996).

Se prevé que todos los cambios en la secuencia de DNA de F19K19.13 de los cuatro alelos mutantes de *los5/aba3*

causen cambios en el previsto marco de lectura abierto. En conjunto, los datos anteriores demuestran inequívocamente que el locus *LOS5* es idéntico al *ABA3* y que el gen *LOS5/ABA3* es F19K19.13. Una vez que hubimos identificado la mutación *los5*, se anunció recientemente un tercer alelo mutante de *ABA3*, *frs1/aba3-3* (Llorente et al., 2000). El fenotipo sensible a la congelación y el grado de deficiencia en ABA de *frs1/aba3-3* (Llorente et al., 2000) son muy similares a los de *los5*. Por coherencia, proponemos renombrar a *los5-1* como *aba3-4*, y a *los5-2* como *aba3-5*.

LOS5/ABA3 codifica una cofactor de molibdopterina sulfurasa

Para obtener la secuencia de cDNA de *LOS5*, se llevó a cabo una PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR; del inglés, *reverse transcriptase-PCR*), con mRNA extraído de plantas Columbia de tipo silvestre. El producto de RT-PCR fue clonado y secuenciado (número de acceso AY034895). Una vez que se hubo clonado el cDNA de *LOS5*, se anunció en Genbank una secuencia idéntica (número de acceso AF325457, enviada por F. Bittner y R. R. Mendel). La comparación con la secuencia de DNA genómica reveló que el gen *LOS5* consiste en 21 exones y 20 intrones (Figura 7B). El marco de lectura abierto consiste en 2457 nucleótidos y se prevé que codifique una proteína de 819 aminoácidos con un peso molecular estimado de 91,8 kDa. En la Figura 8 se muestran las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos (SEQ ID NO: 1 y 2).

La mutación *los5-1* aparecía en el 4º exón y cambia un resto de triptófano de la posición de aminoácido 120 por un codón de parada y, por lo tanto, trunca la proteína. La mutación *los5-2* también aparecía en el 4º exón y cambia un pequeño resto de glicocola de la posición 106 por un resto de ácido glutámico más grande y negativamente cargado. La mutación *aba3-1* aparecía en el 13º exón y cambia una glicocola de la posición 469 por un resto de ácido glutámico. Las mutaciones *aba3-2* aparecían en la unión entre los exones 10º y 11º. La mutación *aba3-2* cambia el resto de leucina de la posición 387 por un codón de parada y, por lo tanto, trunca la proteína a partir del 11º exón (Figuras 7B y 8).

Búsquedas en bases de datos mostraron que *LOS5/ABA3* presenta una elevada homología secuencial con la cofactor de molibdopterina sulfurasa (MCSU; del inglés, *molybdopterin cofactor sulfurase*) recientemente identificada en ganado vacuno (Watanabe et al., 2000), que pertenece a una familia de proteínas muy conservadas halladas en desde bacterias a seres humanos (Figura 10). En conjunto, la proteína *LOS5* tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de 35% y una similitud de 53% con respecto al compuesto homólogo humano, una identidad de 34% y una similitud de 49% con respecto a la proteína Mal de *Drosophila melanogaster*, una identidad de 35% y una similitud de 51% con respecto a la MCSU de ganado vacuno (Watanabe et al., 2000), y una identidad de 31% y una similitud de 48% con respecto a la proteína HxB de *Aspergillus nidulans* (Amrani et al., 1999). Parece que la secuencia completa de *LOS5/ABA3* consiste en tres dominios. El dominio N-terminal muestra una elevada homología secuencial con respecto a las aminotransferasas de Clase V dependientes de piridoxal 5'-fosfato, de plegadura tipo I, representadas por la isopenicilina N epimerasa, la fosfoserina aminotransferasa, la aspartato descarboxilasa, la subunidad pequeña de la hidrogenasa cianobacteriana soluble y las proteínas NifS de *Azotobacter vinelandii*. Recientemente se resolvieron las estructuras de diversas proteínas de tipo NifS (Fuji et al., 2000; Kaiser et al., 2000), lo que hizo posible identificar motivos conservados en el dominio de tipo NifS de *LOS5/ABA3* (Figura 7C). Esto incluye un supuesto motivo ligante de fosfato de piridoxal y un motivo de cisteína conservado (Figura 7C). Los respectivos restos clave de estos motivos están marcados en la Figura 10. Es digno de mención que varias supuestas proteínas del genoma de *Arabidopsis* muestren una significativa similitud secuencial con este dominio de tipo NifS (datos no mostrados). El segundo dominio, la unión que conecta el dominio de tipo NifS con el dominio C-terminal, muestra poca homología secuencial con otras proteínas salvo entre miembros de esta familia de MCSU. El dominio C-terminal muestra una significativa similitud secuencial con un grupo de proteínas desconocidas, halladas tanto en *Arabidopsis* como en otros organismos. Sin embargo, el genoma de *Arabidopsis* no contiene ninguna otra proteína con una significativa homología secuencial global con respecto a la proteína *LOS5/ABA3* de longitud completa, lo que implica que *LOS5/ABA3* es un gen de copia única en el genoma.

LOS5/ABA3 se expresa ubicuamente y su expresión es potenciada por ABA y estrés por sequía

Para analizar el patrón de expresión del gen *LOS5/ABA3*, se utilizó cDNA de *LOS5* de longitud completa como una sonda en un análisis por transferencia de RNA, usando RNA total extraído de diferentes partes de plantas de tipo silvestre no estresadas. El resultado indica que *LOS5* se expresa constitutivamente a un nivel relativamente bajo en todas las partes de la planta examinadas, incluyendo raíces, tallos, hojas, flores y silicuas (Figura 10A). Resulta interesante que el nivel de transcritos de *LOS5* aumente significativamente en respuesta a tratamientos por sequía (Figura 10B), ABA, NaCl o PEG (Figura 10C). El tratamiento con frío no ejerce efecto significativo alguno sobre la expresión de *LOS5* (Figuras 10C y 10D). Los niveles de transcritos de *LOS5* en estado estacionario de los plantones *los5-1* son considerablemente menores que los del tipo silvestre bajo las condiciones de tratamiento (Figura 10D), lo que sugiere que el transcrito mutante con un codón de parada prematuro puede desencadenar mecanismos de vigilancia de RNA que eliminen transcritos anormales (Hilleren y Parker, 1999).

También se analizó la expresión de *LOS5* en otro mutante deficiente en ABA, *aba1-1* (Koornneef et al., 1982), y en un mutante insensible a ABA, *abi1-1* (Koornneef et al., 1984). Los resultados indican que la inducción de *LOS5* por estrés osmótico en *aba1* no es sustancialmente diferente de aquella en el tipo silvestre. En el mutante *abi1-1*, parece que la inducción de *LOS5* es ligeramente menor que aquella en el tipo silvestre (Figura 10D).

Comparación entre los efectos de las mutaciones *los5/aba3*, *aba1* y *abi1* sobre la regulación génica por estrés

Por contraste con *los5-1*, la mutación *aba1-1* no disminuye la inducción del transcrito de *RD29A* por frío o ABA (Figura 10D). En realidad, la inducción de *RD29A* por frío parece mayor en *aba1-1* que en el tipo silvestre. La mutación *aba1-1* disminuye la inducción de *RD29A* por estrés por NaCl o PEG, aunque el efecto no es tan drástico como el de *los5-1*. Los diferentes efectos sobre la inducción de transcritos de *RD29A* por *los5-1* y *aba1-1* están en general de acuerdo con los hallazgos sobre los efectos de *los5-1* y *los6-1* (un alelo *aba1* diferente) sobre la expresión de *RD29A-LUC* (Figura 6). *aba1-1* potencia la inducción de *ADH* por frío y ABA pero disminuye la inducción por estrés por NaCl o PEG (Figura 10D). Esto está de nuevo en acusado contraste con la mutación *los5-1*, que disminuye la inducción de *ADH* por frío, ABA, NaCl o PEG (Figura 10D). Tanto *aba1-1* como *los5-1* bloquean casi completamente la inducción de *RAB18* por estreses osmóticos (Figura 10D). Sin embargo, *los5-1*, pero no *aba1-1*, también bloquea la inducción de *RAB18* por ABA (Figura 10D). En comparación con *aba1-1* o *los5-1*, la mutación *abi1-1* ejerce poco efecto sobre la inducción de *RD29A* o *ADH* por los estreses (Figura 10D). No obstante, la inducción de *RAB18* por ABA, NaCl o PEG está reducida en el mutante *abi1-1* (Figura 10D).

Puesto que se sabe que las familias CBF (Stockinger et al., 1997) y DREB2 (Liu et al., 1998) de factores de transcripción se unen al elemento *DRE* presente en los promotores de *RD29A* y otros diferentes genes sensibles al estrés, estuvimos interesados en determinar si la inducción de estos factores de transcripción por estrés se ve afectada por las mutaciones deficientes en ABA o insensibles al ABA. Los resultados muestran que la expresión del *CBF2/DREB1C* específico del frío no se ve significativamente afectada por *los5-1/aba3-4* ni *aba3-1*, pero se ve potenciada en el mutante *aba2-1* (Figura 10E). Se ha comunicado que *DREB2A* es específicamente inducido por estrés osmótico (Liu et al., 1998). Bajo nuestras condiciones de tratamiento, la expresión de *DREB2A* es también suprarregulada por estrés por frío. Resulta interesante que, mientras que ninguna de las mutaciones deficientes en ABA afecta significativamente a la inducción de *DREB2A* por estrés osmótico, *los5* muestra una inducción aumentada de *DREB2A* por frío en comparación con el tipo silvestre (Figura 10E).

Discusión

La fitohormona ABA desempeña muchos papeles significativos en el crecimiento y el desarrollo de las plantas y en las respuestas de las plantas a estreses ambientales. Por lo tanto, la comprensión de las vías de biosíntesis de ABA en las plantas tiene una importancia crítica. Los mutantes en cuanto a la biosíntesis de ABA sirven como excelentes herramientas para comprender la biosíntesis de ABA y para estudiar la regulación génica en respuesta a entornos estresantes. En *Arabidopsis* y otras plantas tales como el maíz, el tabaco y el tomate, el análisis genético basado en la promoción de la inactividad de las semillas por ABA ha producido una serie de mutantes que son defectuosos en cuanto a la biosíntesis de ABA (para una reciente revisión, véanse Koornneef et al., 1998; Cutler y Krochko, 1999; y Loitenberg et al., 1999). La caracterización de estos mutantes junto con estudios bioquímicos han revelado que en las plantas se sintetiza ABA a partir de una vía "indirecta" por medio de la escisión de un precursor carotenoide. El mutante *aba1* de *Arabidopsis* (y *aba2* del tabaco) es defectuoso en cuanto a la epoxidación de zeaxantina y anteraxantina hasta violaxantina (Rock y Zeevaart, 1991), y el gen afectado codifica una zeaxantina epoxidasa (Marin et al., 1996). La escisión oxidativa de la 9-cis-neoxantina por la proteína VP14 produce xantoxina. El gen *VP14* fue aislado usando el mutante *vp14* de maíz (Tan et al., 1997) y codifica una 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED) (Schwartz et al., 1997b). Se cree que la xantoxina es convertida en ABA mediante una reacción de dos etapas a través de AB-aldehído. El mutante *aba2* de *Arabidopsis* está afectado en cuanto a la primera etapa de esta reacción, por lo que es incapaz de convertir xantoxina en AB-aldehído. El mutante *aba3* de *Arabidopsis* es defectuoso en cuanto a la última etapa de la biosíntesis de ABA, es decir, la conversión de AB-aldehído en ABA (Schwartz et al., 1997a), que es catalizada por la AB-aldehído oxidasa. Mutaciones en la apoproteína de la aldehído oxidasa (por ejemplo, Seo et al., 2000b) o en la cofactor de molibdeno (MoCo) sintasa afectan a la biosíntesis de ABA y conducen a deficiencia de ABA en las plantas.

El cofactor de molibdeno consiste en un único átomo de Mo coordinado con los átomos de azufre de un grupo orgánico, la molibdopterina. El MoCo está muy conservado en los organismos celulares y se usa para la transferencia de un átomo de oxígeno en reacciones redox implicadas en el metabolismo del nitrógeno, el azufre y el carbono (para una revisión, véase Kisher et al., 1997). Se ha comunicado que defectos en la biosíntesis de MoCo están asociados con muchas enfermedades en seres humanos y otros animales (para una revisión, véase Reiss, 2000). En las plantas, se han descrito tres grupos de enzimas que contienen MoCo (para una revisión, véase Mendel y Schwartz, 1999): la nitrato reductasa (NR), la xantina deshidrogenasa (XDH) y la aldehído oxidasa (AO). En el genoma completamente secuenciado de *Arabidopsis* también existe un cuarto grupo, la sulfito oxidasa. Sin embargo, a diferencia de la nitrato reductasa y la sulfito oxidasa que emplean la forma dioxio de MoCo, tanto la xantina deshidrogenasa como la aldehído oxidasa requieren que el MoCo sea modificado en la última etapa de la biosíntesis con la inserción de un átomo de azufre para reemplazar uno de los dos átomos de oxígeno terminales (Figura 11). Esta reacción de sulfuración es catalizada por la cofactor de molibdopterina sulfurasa (MCSU). Se han identificado mutantes defectuosos en cuanto a esta etapa en *Drosophila melanogaster* (tipo castaño, *mal*) (Wahl et al., 1982), *Aspergillus nidulans* (*hxB*) (Scazzocchio, 1973; Amrani et al., 1999) y ganado vacuno (Watanabe et al., 2000). También se han identificado mutantes de plantas defectuosos en cuanto a esta etapa de sulfuración, es decir, *aba1* de tabaco (Leydecker et al., 1995), *flacca* de tomate (Marin y Marion-Poll, 1997) y *aba3* de *Arabidopsis* (Schwartz et al., 1997a). Las caracterizaciones bioquímicas sugieren que estos mutantes de plantas son todos

defectuosos en cuanto a la última etapa de la biosíntesis de ABA. Como se esperaba, los defectos son específicos para AO y XDH pero no para NR (Leydecker et al., 1995; Marin y Marion-Poll, 1997; Schwartz et al., 1997a). Como en el mutante *mal* de *Drosophila*, la resulfuración de los extractos de mutantes de plantas con Na₂S restablece las actividades XDH y AO en *aba3* de *Arabidopsis* (Schwartz et al., 1997a), *aba1* de tabaco (Akaba et al., 1998) y *flacca* de tomate (Sagi et al., 1999). Estos estudios previos sugieren que los genes de tipo silvestre que corresponden a las respectivas mutaciones probablemente codifican cofactor de molibdeno sulfuradas que actúan en la última etapa de la modificación de MoCo, que es específicamente requerida por aldehído oxidadasas y xantina deshidrogenasas para sus actividades catalíticas.

La identificación de mutantes *los5* como alterados en cuanto a la biosíntesis de ABA y la clonación del gen *LOS5/ABA3* demuestran que realmente *LOS5/ABA3* codifica una supuesta cofactor de molibdeno sulfurasa (MCSU). Puesto que el cofactor de molibdeno libre es muy inestable, hasta la fecha no ha habido comunicado alguno sobre la actividad enzimática de sulfuración de MCSU usando MoCo u otros sustratos. Sin embargo, una abundante evidencia de estudios tanto en plantas como en animales sobre que la resulfuración de extractos de mutantes restablece las actividades AO y XDH u otras actividades enzimáticas sugiere acusadamente que MCSU tiene actividad de sulfuración *in vivo* sobre la forma desulfo de MoCo. Además, comparaciones secuenciales con otras proteínas también respaldan la posible propiedad catalítica de MCSU.

Como otras proteínas MCSU, el producto del gen *LOS5/ABA3* presenta una amplia similitud secuencial con la proteína de tipo NifS en su región N-terminal (Figura 7C). La proteína NifS de *Azotobacter vinelandii* es necesaria para la actividad de nitrogenasa, la única enzima que contiene Mo y no utiliza el cofactor de molibdopterina sino que requiere una agrupación de hierro-molibdeno-azufre para la transferencia de electrones. Aunque no se conoce la función exacta de la proteína NifS en la fijación de nitrógeno, se ha mostrado que NifS es capaz de utilizar *in vitro* L-cisteína como sustrato para formar alanina y sulfuro. De esta manera, parece que NifS actúa como una cisteína desulfurasa en la biogénesis de la agrupación metálica al movilizar un sulfuro inorgánico originado a partir del sustrato L-cisteína (Zheng et al., 1993). Esta reacción es bastante similar a las reacciones químicas que se espera que sean catalizadas por *LOS5/ABA3* en la sulfuración del desulfo-MoCo. En realidad, tanto el motivo ligante de fosfato de piridoxal como el motivo de cisteína conservados requeridos por NifS están bien conservados en *LOS5/ABA3* y en sus compuestos homólogos en otros organismos (Figuras 7C y 8). Tanto por analogía con miembros de las proteínas de tipo aminotransferasa de clase V como por análisis experimental (Zheng et al., 1993), se halló que el fosfato de piridoxal (PLP) es un cofactor para la proteína NifS. Dada la elevada similitud con NifS y otras proteínas dependientes de PLP de esta clase, es probable que PLP también sea un cofactor para *LOS5/ABA3*. Al comparar *LOS5/ABA3* con otras proteínas NifS cuyas estructuras han sido resueltas recientemente (Fujii et al., 2000; Kaiser et al., 2000), la lisina conservada de la posición 271 (Figura 9) es probablemente el resto donde se fija covalentemente el PLP para generar una base de Schiff (Fujii et al., 2000). Asimismo, el resto de cisteína conservado de la posición 430 (Figura 10) es un probable dador de S para la reacción de trans-sulfuración (Figura 11). Ambos motivos conservados se encuentran en todos los compuestos homólogos de *LOS5/ABA3* (Figura 10). Se supone que tanto el PLP como los motivos de cisteína son necesarios para la actividad catalítica de *LOS5/ABA3*. Resulta interesante que la mutación *aba3-1* aparezca justo fuera del dominio de tipo NifS, pero aún es una región muy conservada, lo que sugiere que esta región es también necesaria para la función enzimática.

La estructura global de *LOS5/ABA3* hace pensar en una proteína quimérica que ha evolucionado por fusión de dos proteínas distintas. El dominio C-terminal no tiene aún una función conocida, pero probablemente es también importante considerando la elevada similitud en este dominio entre las proteínas MCSU de diversos organismos y su elevada similitud con varias proteínas desconocidas del genoma de *Arabidopsis*.

Una interesante cuestión relacionada con la estructura aparentemente múltiple del dominio funcional es que tanto los mutantes *los5-1* como los *los5-2* tienen una morfología de hojas única (Figura 5B), mientras que en *aba3-1* y *aba3-2* no hay tan clara alteración en la forma de las hojas (datos no mostrados). Es digno de mención que tanto las mutaciones *los5-1* como las *los5-2* aparecieran en la parte N-terminal, mientras que las mutaciones *aba3-1* y *aba3-2* aparecían en mitad de la proteína. Por lo tanto, es tentador especular con que el dominio N-terminal de las proteínas mutantes *aba3-1* y *aba3-2* pueda tener aún cierta actividad que sea necesaria para el mantenimiento de la morfología de las hojas de tipo silvestre. Por otra parte, puede que las formas mutantes *los5-1* y *los5-2* hayan perdido esta actividad, lo que daría lugar a una forma de hoja alterada.

Puesto que *LOS5/ABA3* es un gen de una sola copia del genoma de *Arabidopsis*, no es sorprendente que se exprese ubicuamente (Figura 10A). Esto contrasta con la familia génica de la aldehído oxidasa (AAO), donde cada miembro tiene un patrón de expresión diferente (Seo et al., 2000b). Sin embargo, es interesante advertir que se comunicó que el mutante *flacca* de tomate pierde las actividades AO y XDH en los brotes pero conserva actividades mensurables en las raíces, donde acumula una notable cantidad de ABA (Sagi et al., 1999). Esto plantea la posibilidad de que pueda existir más de un gen de MCSU de tipo *LOS5/ABA3* en el tomate, y que pueda(n) permanecer activa(s) una(s) isoforma(s) específica(s) de la raíz en el mutante *flacca*. Además de una biosíntesis de ABA alterada en el brote del mutante *flacca*, se mostró que la mutación podría también reducir el transporte de ABA de la raíz al brote (Sagi et al., 1999).

En el presente estudio, mostramos que la expresión del gen *LOS5/ABA3* está suprarregulada cuando las plantas

son tratadas con sequía, sal o ABA (Figura 10). Advertimos que la región promotora de *LOS5/ABA3* contiene supuestos *ABREs* (por ejemplo, ACGTGG a -253 cadena arriba del codón de inicio de la traducción) y elementos de tipo *DRE/CRT*, lo que sugiere que el gen *LOS5/ABA3* puede ser regulado por ABA y estrés por sequía/sal de un modo similar a otros genes sensibles al estrés. En la vía de la biosíntesis de ABA, se cree generalmente que la fase limitante de la velocidad está en la escisión oxidativa de la 9-cis-neoxantina, catalizada por la proteína VP14 (Tan et al., 1997; Schwartz et al., 1997b; Loitenberg et al., 1999; Luchi et al., 2000; Thompson et al., 2000; Taylor et al., 2000). Dada la poca abundancia relativa del transcrito de *LOS5/ABA3* y el hecho de que es el único gen que codifica MCSU en *Arabidopsis*, es probable que *LOS5/ABA3* pueda también regular la biosíntesis de ABA. Parece que la baja temperatura ejerce poco efecto sobre la expresión de *LOS5/ABA3* (Figuras 9C y 9D), lo que es consistente con su efecto limitado sobre la biosíntesis de ABA endógeno (Thomashow, 1999). Qin y Zeevart (1999) también hallaron que la baja temperatura no inducía la expresión de *PvNECD1* (un compuesto homólogo de *VP14* en la judía). Los tratamientos por sequía (20% de pérdida de peso en estado fresco e incubación durante 3 o 6 horas) aumentaban significativamente la expresión de *LOS5/ABA3* (Figura 10B); sin embargo, los mismos tratamientos no pudieron suprarregular la expresión del gen *AAO3* (datos no mostrados). Esta falta de inducción de *AAO3* difiere de la observación de Seo et al. (2000a) de que la deshidratación (es decir, en una campana con flujo de aire durante 3 horas) inducía significativamente la expresión de *AAO3* en el brote de *Arabidopsis*. La razón de esta discrepancia se debe probablemente a que nuestra condición de estrés (deshidratación en aire quieto durante aproximadamente 40 minutos para perder el 20% del peso en estado fresco, seguida de incubación con una humedad de 100% durante 3 o 6 horas) no era tan drástica. Nuestro resultado implica que *LOS5/ABA3* puede ser el regulador clave en esta última etapa de la biosíntesis de ABA. Consistentemente con esta especulación, Sagi et al. (1999) hallaron que la sulfuración con Na₂S "superinducía" la actividad de AO y XDH en extractos crudos de tomate de tipo silvestre, lo que sugiere que la sulfuración de MoCo limita la actividad AB-aldehído oxidasa. La suprarregulación de la expresión de *LOS5/ABA3* por ABA (Figuras 9C y 9D) es muy intrigante y puede sugerir una regulación por retroalimentación positiva de la biosíntesis de ABA por ABA.

La disponibilidad de mutantes de plantas defectuosos en cuanto a la biosíntesis de ABA ha proporcionado una excelente oportunidad para estudiar la regulación génica por ABA bajo diversas condiciones de estrés abiótico. Al hacer esto, la mayoría de los investigadores han usado *aba1* o *abi1* y *abi2* junto con los respectivos tipos silvestres. El mutante *aba1* de *Arabidopsis* deficiente en ABA fue el primer mutante aislado de *Arabidopsis*, defectuoso en cuanto a la biosíntesis de ABA (Koornneef et al., 1982). Recientemente se ha podido disponer de mutantes adicionales de *Arabidopsis* deficientes en ABA, *aba2* y *aba3* (Léon-Kloosterziel et al., 1996). Sin embargo, no se ha informado de la regulación génica por estrés en estos mutantes recién aislados.

Amplios estudios con mutantes *aba1* o *abi1/2* han producido una considerable, aunque a veces contrapuesta, información. Por ejemplo, por un lado Savoure et al. (1997) comunicaron que la expresión de genes *P5CS* es independiente de ABA ya que observaron que el nivel de expresión es similar en el tipo silvestre y en *aba1* bajo tratamientos por frío o sequía. Sugirieron que ABA podría afectar postranscripcionalmente a la biosíntesis de prolina (Savoure et al., 1997). Por otro lado, Yoshiba et al. (1999) comunicaron que la inducción de *AtP5CS1* mediante estrés por sequía y sal es regulada tanto por vías dependientes de ABA como por vías independientes de ABA. Además, Strizhov et al. (1997) hallaron que la expresión del gen *P5CS1* inducida por estrés requiere absolutamente ABA, lo que es consistente con nuestros presentes hallazgos (Figura 2). Para ayudar a aclarar la confusión, se han publicado varias revisiones y se han alcanzado ciertos consensos (Leung y Giraudat, 1998; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Thomashow, 1999; Rock, 2000). Aunque el tratamiento a baja temperatura puede desencadenar un aumento transitorio de ABA, y la aplicación de ABA puede inducir la expresión de genes sensibles al frío a temperaturas cálidas y aumenta la tolerancia de la planta a la congelación, un consenso general es que ABA no ejerce un papel importante en la regulación de la expresión de la clase *DRE/CRT* de genes (Thomashow, 1999). En el presente estudio, hallamos que plantones *los5-1* muestran una drástica reducción de la expresión del transgén *RD29A-LUC* bajo un tratamiento a baja temperatura (Figuras 1B y 1G). El análisis por transferencia de RNA mostró que la inducción de *COR15*, *KIN1*, *COR47*, *RD29A*, *RAB18* y *ADH* por baja temperatura está también significativamente reducida en plantas mutantes *los5-1* (Figuras 2 y 9D). Sin embargo, la reducción de la expresión génica regulada por frío que se ve en *los5-1* no se observó en *aba1-1* (Figura 10D). En realidad, la inducción tanto de *ADH* como de *RD29A* por frío estaba potenciada en *aba1-1* (Figura 10D). Similarmente, la inducción de la expresión de *RD29A-LUC* por frío estaba potenciada en los plantones mutantes *los6/aba1* (Figura 6B). Nuestros resultados con *los6/aba1* son consistentes con los estudios previos sobre expresión génica regulada por frío llevados a cabo con *aba1-1* (revisado en Thomashow, 1999). Los diferentes efectos de las mutaciones *los5* y *aba1* plantean la cuestión de si el significativo papel desempeñado por *LOS5/ABA3* en la expresión génica regulada por frío es el resultado de una deficiencia de ABA. A esto se dirigió parcialmente nuestro experimento mostrado en la Figura 6B; mientras que el tratamiento con ABA complementó el defecto de *los6/aba1* en la expresión de *RD29A-LUC* regulada por frío, el mismo tratamiento no pudo rescatar a *los5/aba3* (Figura 6B). Esto sugiere que, además de su papel en la biosíntesis de ABA, *LOS5/ABA3* puede tener papeles adicionales en la regulación por frío. Consistente con esta idea es el hallazgo de que, aunque el ABA exógeno alcanza una expresión similar o ligeramente mayor de *COR47*, *RD22*, *RD29A* y *ADH* (Figuras 2, 6 y 9D) en *los5* con respecto a la expresión en el tipo silvestre, ABA no induce la expresión de *COR15* ni *P5CS* y ejerce una inducción reducida de *KIN1* (Figura 2). Estos resultados sugieren acusadamente que la señalización por frío requiere una función de *LOS5/ABA3* que no está directamente relacionada con la biosíntesis de ABA. Actualmente no está claro cómo *LOS5/ABA3* está implicado en la regulación de ciertos genes por frío o ABA.

En contraste con la temperatura baja, el estrés por sequía puede estimular drásticamente la biosíntesis *de novo* de ABA, y, por lo tanto, ABA está más íntimamente implicado en respuestas a estrés por sequía/sal (Ingram y Bartels, 1996; Bray, 1993). Se ha creído que la regulación génica por sequía implica tanto vías dependientes de ABA como vías independientes de ABA (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Puesto que genes tales como *RD29A*, *KIN1* y *COR47* tienen tanto el complejo *ABRE* como los elementos *DRE/CRT*, presumiblemente pueden ser activados por un estrés abiótico solo en ausencia de ABA. Un análisis utilizando mutantes *aba1* o *abi* mostró ciertamente que éste es probablemente el caso (Thomashow, 1999; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Sin embargo, nuestros resultados con mutantes *los5* presentan claramente un cuadro bastante diferente. Bajo estrés osmótico, la expresión de *RD29A-LUC* está casi suprimida en *los5* (Figuras 1F y 1G). Mediante los análisis por transferencia de RNA también se halló que la mutación *los5* casi bloquea la inducción de *COR15*, *KIN1*, *RD22*, *P5CS* y *RAB18* por estrés por sal y sequía (PEG) (Figuras 2 y 9D) y altera intensamente la inducción de *RD29A*, *COR47* y *ADH* por los estreses (Figuras 2 y 9D). Para determinar si el efecto de *los5* sobre la expresión génica regulada por estrés osmótico es explicado por una deficiencia de ABA, aplicamos ABA junto con estrés por sal y analizamos la expresión de *RD29A-LUC*. El resultado indica que ABA restablece la expresión de *RD29A-LUC* hasta los niveles del tipo silvestre tanto en *los5-1* como en *los6/aba1* (Figura 6A). Nuestro análisis previo por transferencia de RNA con las plantas de tipo silvestre mostró que, bajo esta condición de tratamiento, la expresión de luminiscencia de *RD29A-LUC* refleja fielmente el patrón de la expresión de *RD29A* endógeno (Xiong et al., 1999b). Estos resultados sugieren que los defectos observados en la expresión génica regulada por sal/sequía en plantas mutantes *los5* son muy probablemente una consecuencia de una deficiencia de ABA. Actualmente no se puede descartar completamente la posibilidad alternativa de que *LOS5* pueda tener papeles aún desconocidos en la regulación de la señalización por estrés osmótico "independiente de ABA" que no estén relacionados con la biosíntesis de ABA. Esto es porque la magnitud reducida de la inducción génica por sequía o sal en *aba1/los6* no fue tan drástica como en *los5* (Figura 6A), aunque estos mutantes muestran un grado similar de deficiencia de ABA por medición cuantitativa masiva.

Parece que la mutación *los5* ejerce poco efecto sobre la expresión de *DREB2A* regulada por estrés salino (Figura 10E). Esto plantea la posibilidad de que la función de *DREB2A* pueda requerir un(os) factor(es) dependiente(s) de ABA para activar la expresión de genes cadena abajo. Previamente, nuestro análisis genético utilizando *RD29A-LUC* como marcador molecular ha mostrado que puede que las vías de señalización dependientes de ABA y las independientes de ABA no actúen independientemente unas de otras. Más bien, existen vastas conexiones o "interferencias" entre ellas (Ishitani et al., 1997; Xiong et al., 1999a). La presente caracterización molecular de mutantes *los5* arroja además dudas sobre la independencia de ABA de las vías de transducción de señales por estrés "independientes de ABA", al menos en cuanto se refiere a los genes *DRE/CRT*. Además, se ha mostrado que la expresión ectópica de *DREB2A* solo no activa la expresión de genes cadena abajo (Liu et al., 1998). Como ha sido sugerido por Liu et al. (1998), la actividad de *DREB2A* en cuanto a activar genes sensibles al estrés puede requerir modificaciones postranscripcionales. Por lo tanto, es posible que la fosforilación/desfosforilación de *DREB2A* o las funciones de sus cofactores puedan depender de moléculas reguladas por ABA, tales como *ABI1*, *ABI2*, *CDPKs*, u otros numerosos factores reguladores sensibles a ABA (por ejemplo, Leung et al., 1997; Leung y Giraudat, 1998; Finkelstein y Lynch, 2000; Rock, 2000; y Merlot et al., 2001). Esta interdependencia entre ABA y la señalización por estrés puede ser la base de los mecanismos para el efecto sinérgico de ABA y el estrés por sequía/sal sobre la regulación de genes sensibles al estrés, como se observa en el presente estudio (Figura 6A) y en otra parte (Bostock y Quatrano, 1992; Xiong et al., 1999b).

Ejemplos

Habiéndose descrito de forma general esta invención, se puede obtener una comprensión ulterior por referencia a ciertos ejemplos específicos que se proporcionan en esta memoria sólo con fines de ilustración y no están destinados a ser restrictivos a menos que se especifique otra cosa.

Ejemplo 1

Caracterización del locus *LOS5/ABA3*

Aislamiento de mutantes *los5*

Se obtuvo *Arabidopsis thaliana* (ecotipo C24) que expresaba el transgén *RD29A-LUC* (al que se hace referencia como "el tipo silvestre) por transformación mediada por *Agrobacterium* (Ishitani et al., 1997). Se sometieron semillas de tipo silvestre *RD29A-LUC* a mutagénesis mediante metanosulfonato de etilo (Ishitani et al., 1997). Se plantaron M2 en placas de agar al 0,6% que contenían base salina Murashige y Skoog (base salina MS; JRH Biosciences, Lenex, Kansas) de graduación total y se germinaron y cultivaron a 22 ± 2 °C bajo luz blanca continua. Los plantones de una semana de edad fueron explorados en cuanto a mutantes con expresión (es decir, luminiscencia) alterada de *RD29A-LUC* en respuesta a una temperatura baja, ABA o estrés osmótico, usando una cámara CCD termoelectricamente enfriada. Para la obtención de imágenes de luminiscencia, se pulverizó luciferina 1 mM en Triton X-100 al 0,01% sobre las plantas y luego se mantuvieron éstas en la oscuridad durante 5 minutos antes de la obtención de imágenes. Todas las imágenes se obtuvieron con un tiempo de exposición de 5 minutos. La intensidad de luminiscencia de cada plantón fue cuantificada con el software WinView.

Tratamiento con estrés y ABA

Para el tratamiento con ABA, se pulverizó uniformemente ácido (\pm)-cis,trans-abscísico 100 μ M en H₂O sobre las hojas de los plantones y se incubaron las plantas a temperatura ambiental bajo luz blanca-fría durante 4 horas (para la obtención de imágenes de luminiscencia) o 3 horas (para el análisis de RNA). Para el tratamiento con NaCl o PEG, se transfirieron los plantones de las placas MS a papel de filtro saturado con disolución MS complementada con NaCl 300 mM o 30% de polietilenglicol (peso molecular de 6000) y se incubaron durante 5 horas. A menos que se afirme otra cosa, el tratamiento con frío para el análisis de imágenes y el análisis de RNA se realizó incubando plantones que crecían en placas a 0 °C en la oscuridad durante 48 horas (para la obtención de imágenes) o 12 horas (para el análisis de RNA). Puesto que un tratamiento más prolongado a -5 o -10 °C dará lugar a la congelación de los medios de agar, estos tratamientos a temperatura de congelación sólo duraron 3 horas. Después del tratamiento, las placas se pusieron a temperatura ambiental durante 2 horas para su descongelación antes de la adquisición de imágenes de luminiscencia. Para el tratamiento con ABA más NaCl, se transfirieron los plantones a un papel de filtro saturado con NaCl 300 mM en disolución MS y se pulverizó inmediatamente ABA 100 μ M. Las plantas fueron luego incubadas bajo luz blanca-fría durante 4 horas antes de la obtención de imágenes mediante luciferasa. Para el tratamiento a baja temperatura más ABA, se incubaron brevemente los plantones en placas de agar a 0 \pm 1 °C durante 10 minutos y luego se pulverizó ABA 100 μ M y se incubaron los plantones en la oscuridad a 0 \pm 1 °C durante 48 horas antes del análisis de las imágenes.

Análisis genético de mutantes *los5* y clonación de *LOS5* basada en mapas

Para el análisis genético, se cruzaron los mutantes *los5* con el tipo silvestre y se aislaron otros mutantes con fenotipos de luminiscencia similares. Los plantones F₁ y F₂ fueron sometidos a un análisis de luminiscencia y fueron calificados en cuanto a fenotipos de luminiscencia *los5*. También se cruzó *los5-1* con mutantes *aba1*, *aba2* y *aba3* (obtenidos del Arabidopsis Biological Resource Center, Columbus, Ohio). Parte de los plantones F₁ y F₂ resultantes se trató con NaCl 300 mM para el análisis de imágenes de luminiscencia y parte se plantó directamente en suelo para la calificación de fenotipos marchitos bajo humedad reducida. Para el mapeo genético de la mutación *los5*, se cruzó el mutante *los5-1* del ecotipo C24 con plantas de tipo silvestre del ecotipo Columbia. Se dejó que las plantas F₁ resultantes se autopolinizaran y se seleccionaron mutantes *los5-1* homocigóticos en la población F₂ segregadora basándose en su luminiscencia reducida cuando se trataron con frío, y se utilizó un tratamiento testigo con ABA para descartar aquellos que no tenían el transgén *RD29A-LUC*. También se examinó una parte de los plantones en cuanto a su luminiscencia reducida bajo tratamiento con NaCl. El mapeo de *LOS5* se llevó a cabo del modo previamente descrito (Lee et al., 2001). Se desarrollaron marcadores de SSLP inspeccionando secuencias liberadas de DNA genómico en cuanto a repeticiones simples, utilizando el programa RepeatMasker (<http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker>). Como marcadores moleculares para el mapeo, se usaron parejas de cebadores que flanquean estas repeticiones simples, que generan productos de PCR con polimorfismos de tamaño en geles de agarosa al 4% entre los ecotipos C24 y Columbia.

Análisis de RNA

Se trataron plantones de 10 días de edad, en placas de agar MS, con frío, ABA, NaCl o PEG del modo descrito en la sección anterior. Para el tratamiento por sequía, plantones en fase de roseta en suelo puesto en macetas fueron segregados de la superficie del suelo, y se dejó que perdieran el 20% de su peso en estado fresco. Los materiales deshidratados fueron luego incubados en un recipiente con humedad relativa del 100% durante 3 horas o 6 horas antes de ser congelados en N₂ líquido para la extracción de RNA. El RNA total de las plantas testigo o tratadas fue extraído y analizado del modo descrito (Ishitani et al., 1998). Las sondas específicas de genes fueron las descritas (Ishitani et al., 1998; Lee et al., 2001).

Ensayos de tolerancia al estrés

Para el ensayo de sensibilidad a la congelación, plantones de tipo silvestre y *los5* que crecían en suelo puesto en macetas en una cámara de crecimiento (22 \pm 2 °C, 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) durante 3 semanas fueron primero incubados a 4 °C bajo luz durante 48 horas para que se aclimataran al frío. Después de esta aclimatación al frío, las plantas fueron sometidas a congelación a -7 °C durante 5 horas. Una vez acabado el tratamiento, las plantas fueron inmediatamente transferidas a 4 °C bajo luz blanca y fueron incubadas durante la noche. A la mañana siguiente, las plantas fueron colocadas en una cámara de crecimiento. Se calificó el daño en los plantones en los momentos que se indican en el texto.

Para los ensayos de tolerancia a NaCl, plantones de 7 días de edad de *los5-1* y de tipo silvestre que crecían en placas de MS (solidificadas con agar al 1,2%) fueron transferidos a placas de agar MS complementadas con NaCl en diferentes concentraciones. Luego se colocaron las placas verticalmente a 22 \pm 2 °C bajo luz blanca y se midió diariamente la elongación de las raíces durante hasta 10 días. Para medir en los plantones la pérdida de iones inducida por el tratamiento con PEG, plantones *los5-1* y de tipo silvestre de una semana de edad que crecían en placas de agar MS fueron cuidadosamente separados de la placa, enjuagados brevemente en agua destilada y colocados en disoluciones que contenían 30% de polietilenglicol (PEG) (peso molecular de 6000) durante 5 horas. Después del tratamiento, los plantones fueron enjuagados brevemente en agua destilada y puestos inmediatamente en un tubo con 5 ml de H₂O. El tubo fue luego suavemente agitado durante 3 horas antes de que se midiera el contenido de electrolitos. Se realizaron cuatro duplicados de cada tratamiento.

Mediciones de pérdida de agua

5 Para la medición de la pérdida de agua, plantas en fase de roseta fueron segregadas de la superficie del suelo y fueron inmediatamente pesadas en una cubeta de plástico para pesaje. La cubeta con las plantas fue luego colocada sobre una mesa de laboratorio (humedad relativa de ~ 30%) y fue pesada a intervalos de tiempo designados. Hubo cuatro duplicados para cada línea. El porcentaje de pérdida de peso en estado fresco se calculó basándose en el peso inicial de las plantas.

Ensayos de prolina

10 Plantones de una semana de edad de *los5-1* y de tipo silvestre cultivados en placas de agar MS fueron sometidos a la pulverización de ABA 50 μ M o fueron transferidos a un papel de filtro en una placa Petri saturada con NaCl 150 mM y fueron incubados a 22 ± 2 °C bajo luz blanca durante 24 horas. Después del tratamiento, las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y fueron mantenidas a -80 °C para el ensayo de prolina. La concentración de prolina se determinó del modo descrito por Bates et al. (1973).

Medición de ABA

15 Se cortaron hojas en roseta de plantas mutantes y de tipo silvestre de 3 semanas de edad cultivadas en suelo y se pusieron sobre una mesa de laboratorio. Una vez que las hojas hubieron perdido el 30% del peso inicial en estado fresco (a lo largo de un periodo de aproximadamente 2 horas), se colocaron con toallitas de papel húmedas en una bolsa de plástico herméticamente cerrada durante 5 horas adicionales. Las hojas testigo no estresadas se colocaron directamente en una bolsa de plástico con alta humedad y herméticamente cerrada sin haber perdido peso en estado fresco. Los tejidos fueron luego congelados en nitrógeno líquido y fueron triturados hasta un polvo. Se suspendió un gramo de los tejidos en 15 ml de una disolución de extracción que contenía metanol al 80%, 100 mg/l de hidroxitolueno butilado y 0,5 g/l de monohidrato de ácido cítrico. La suspensión fue agitada durante la noche a 4 °C y fue centrifugada a 1000 g durante 20 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y fue secado bajo vacío. El residuo seco se disolvió con 100 μ l de metanol mas 900 μ l de disolución salina tamponada con Tris (Tris 50 mM, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,1 mM, NaCl 0,15 M, pH de 7,8). Luego se determinó la concentración de ABA en la disolución utilizando el kit Phytodetek para inmunoensayos de ABA (Idetek, Inc., Sunnyvale, California).

Ejemplo 2

La sobreexpresión del gen *LOS5* aumenta la tolerancia de las plantas al estrés por sequía

30 Puesto que las mutaciones con pérdida de función en el gen *LOS5* daban lugar a una expresión desregulada de genes sensibles al estrés y aumentaban la sensibilidad al estrés por sequía y sal, se planteó la hipótesis de que la expresión aumentada de *LOS5* podría afectar al patrón de expresión génica bajo estrés y aumentar la tolerancia de las plantas a la sequía.

35 Para probar esta posibilidad, se fusionó transcripcionalmente cDNA de longitud completa de *LOS5* con el promotor 35S de CaMV y un potenciador transcripcional. El inserto fue clonado en el vector binario pCAMBIA 1200. El plásmido resultante fue transferido a ecotipos Columbia y C24 de *Arabidopsis* (que contienen el gen informador *RD29A-LUC*), respectivamente. Se seleccionaron cerca de 70 transformantes en cada fondo de ecotipo para otros ensayos. Para examinar el impacto de la sobreexpresión del gen *LOS5* sobre la regulación génica por estrés y las relaciones de agua de las plantas, se examinaron plantones de plantas transgénicas en cuanto a 1) su expresión del transgén *RD29A-LUC* bajo un tratamiento por estrés salino; 2) sus índices de transpiración midiendo el índice de pérdida de agua de hojas segregadas; y 3) la tolerancia a la sequía en plantas que crecen en suelo.

40 Los resultados con 7 líneas en el fondo C24 indicaron que, tras el tratamiento con NaCl 300 mM, el nivel de expresión para el gen informador *RD29A-LUC* en la línea que sobreexpresa *LOS5* es de 39 a 96 por ciento mayor que en las plantas de tipo silvestre. Durante un periodo de 4 horas, el índice de transpiración de agua de las hojas segregadas de las plantas que sobreexpresan *LOS5* es significativamente menor que el de las plantas de tipo silvestre en tres líneas ensayadas. Esta transpiración reducida también se pudo ver cuando se dejó que las hojas segregadas se secaran en la condición ambiental (véase la Figura 12). La transpiración reducida aumentará significativamente la tolerancia de las plantas a la sequía.

Referencias

- 45 Akaba, S., Leydecker, M.T., Moureaux, T., Oritani, T., y Koshiba, T. (1998). Aldehyde oxidase in wild type and *aba1* mutant leaves of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Cell Physiol.* **39**, 1281-1286.
- Amrani, L., Cecchetto, G., Scazzocchio, C., y Glatigny, A. (1999). The *hxB* gene, necessary for the post-translational activation of purine hydroxylases in *Aspergillus nidulans*, is independently controlled by the purine utilization and the nicotinate utilization transcriptional activating systems. *Mol. Microbiol.* **31**, 1065-1073.
- Bostock, R.M., y Quatrano, R.S. (1992). Regulation of *Em* gene expression in rice, interaction between osmotic stress and abscisic acid. *Plant Physiol.* **98**, 1356-1363.

- Bray, E.A. (1993). Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* **103**, 1035-1040.
- Bates, L.S. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil.* **39**, 205-207.
- Cutler, A.J., y Krochko, J.E. (1999). Formation and breakdown of ABA. *Trends Plant Sci.* **4**, 472-478.
- 5 Finkelstein, R.R., y Lynch, T.J. (2000). The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcriptional factor. *Plant Cell* **12**, 599-609.
- Fujii, T., Maeda, M., Mihara, H., Kurihara, T., Esaki, N., y Hata, Y. (2000). Structure of a NifS homologue: X-ray structure analysis of CsdB, an *Escherichia coli* counterpart of mammalian selenocysteine lyase. *Biochemistry* **39**, 1263-1273.
- 10 Gilmour, S.J., Artus, N.N., y Thomashow, M.F. (1992). cDNA sequence analysis and expression of two cold-regulated genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **18**, 13-32.
- Guiltinan, M.J., Marcotte, W.R., y Quatrano, R.S. (1990). A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* **250**, 267-271.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., y Bohnert, H.J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**, 463-499.
- 15 Hilleren, P., y Parker, R. (1999). Mechanisms of mRNA surveillance in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **33**, 229-260.
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., y Verma, D.P.S. (2000). Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol.* **122**, 1129-1136.
- 20 Ingram, J., y Bartel, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 377-403.
- Ishitani, M., Xiong, L., Lee, H., Stevenson, B., y Zhu, J.K. (1998). *HOS1*, a genetic locus involved in cold-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1151-1161.
- Ishitani, M., Xiong, L., Stevenson, B., y Zhu, J.-K. (1997). Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: Interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *Plant Cell* **9**, 1935-1949.
- 25 Iuchi, S., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., y Shinozaki, K. (2000). A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea. *Plant Physiol.* **123**, 553-562.
- Kaiser, J.T., Clausen, T., Bourenkow, G.P., Bartunik, H.-D., Steinbacher, S., y Huber, R. (2000). Crystal structure of a NifS-like protein from *Thermotoga maritima*: Implications for iron sulphur cluster assembly. *J. Mol. Biol.* **297**, 451-464.
- 30 Kisher, C, Schindelin, H., y Rees, D.C. (1997). Molybdenum-cofactor-containing enzymes: structure and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 233-267.
- Koornneef, M., Jorna, M.L., Brinkhorst-van der Swan, D.L.C., y Karssen, C.M. (1982). The isolation of abscisic acid deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana*. *Theor. Appl. Genet.* **61**, 385-393.
- 35 Koornneef, M., Léon-Kloosterziel, K.M., Schwartz, S.H., y Zeevaart, J.A.D. (1998). The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* **36**, 83-89.
- Koornneef, M., Reuling, G., y Karssen, C.M. (1984). The isolation and characterization of abscisic acid insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* **61**, 377-383.
- 40 Kurkela, S., y Franck, M. (1990). Cloning and characterization of a cold- and ABA-inducible *Arabidopsis* gene. *Plant Mol. Biol.* **15**, 137-144.
- Lee, H., Xiong, L., Gong, Z., Ishitani, M., Stevenson, B., y Zhu, J.-K. (2001). The *Arabidopsis HOS1* gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning. *Genes Dev.* **15**, 912-924.
- 45 Léon-Kloosterzie, K.M., Gil, M.A., Ruijs, G.J., Jacobsen, S.E., Olszewski, N.E., Schwartz, S.H., Zeevaart, J.A., y Koornneef, M. (1996). Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. *Plant J.* **10**, 655-661.

- Leung, J., y Giraudat, J. (1998). Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**,199-222.
- Leung, J., Merlot, S., y Giraudat, J. (1997). *The Arabidopsis ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 2 (ABI2)* and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell* **9**, 759-771.
- 5 Leydecker, M.T., Moureaux, T., Kraepiel, Y., Schnorr, K., y Caboche, M. (1995). Molybdenum cofactor mutants, specifically impaired in xanthine dehydrogenase activity and abscisic acid biosynthesis, simultaneously overexpress nitrate reductase. *Plant Physiol.* **107**, 1427-1431.
- Lin, C., y Thomashow, M.F. (1992). DNA sequence analysis of a complementary DNA for cold-regulated *Arabidopsis* gene *cor15* and characterization of the *COR15* polypeptide. *Plant Physiol.* **99**, 519-525.
- 10 Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., y Shinozaki, K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1391-1406.
- 15 Liotenberg, S., North, H., y Marion-Poll, A. (1999). Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants. *Plant Physiol. Biochem.* **37**, 341-350.
- Llorente, F., Oliveros, J.C., Martinez-Zapater, J.M., y Salinas, J. (2000). A freezing-sensitive mutant of *Arabidopsis*, *frs1*, is a new *aba3* allele. *Planta* **211**, 648-655.
- 20 Marin, E., Nussaume, L., Quesada, A., Gonneau, M., Sotta, B., Hugueney, P., Frey, A., y Marion-Poll, A. (1996). Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO. J.* **15**, 2331-2342.
- Marin, E., y Marion-Poll, A. (1997). Tomato *flacca* mutant is impaired in ABA aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase activities. *Plant Physiol. Biochem.* **35**, 369-372.
- McCourt, P. (1999). Genetic analysis of hormone signaling. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 219-243.
- 25 Mendel, R.R., y Schwarz, G. (1999). Molybdoenzymes and molybdenum cofactor in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **18**, 33-69.
- Merlot, S., Costi, F., Guerrier, D., Vavasseur, A., y Giraudat, J. (2001). The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant J.* **25**, 295-603.
- Qin, X., y Zeevaart, J.A.D. (1999). The 9-*cis*-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**,15.354-15.361.
- 30 Rajagopant, K.V. (1991). Novel aspects of the biochemistry of the molybdenum cofactor. *Adv Enzymol.* **64**, 215-90.
- Reiss, J. (2000). Genetics of molybdenum cofactor deficiency. *Human Genetics* **106**, 157-163.
- Rock, C.D. (2000). Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytol.* **148**, 357-396.
- Rock, C.D., y Zeevaart, J.A.D. (1991). The *aba* mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 7496-7499.
- 35 Roosens, N.H., Willem, R., Li, Y., Verbruggen, I., Biesemans, M., y Jacobs, M. (1999). Proline metabolism in the wild-type and in a salt-tolerant mutant of *Nicotiana plumbaginifolia* studied by ¹³C-nuclear magnetic resonance imaging. *Plant Physiol* **121**, 1281-1290.
- Sagi, M., Fluhr, R., y Lips, S.H. (1999). Aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in a *flacca* tomato mutant with deficient abscisic acid and wilty phenotype. *Plant Physiol.* **120**, 571-577.
- 40 Savoure, A., Hua, X.-J., Bertauche, N., Van-Montagu, M., y Verbruggen, N. (1997). Abscisic acid-independent and abscisic acid dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **254**, 104-109.
- Scazzocchio, C. (1973). The genetic control of molybdoflavoproteins in *Aspergillus nidulans*. Use of the NADH dehydrogenase activity associated with xanthine dehydrogenase to investigate substrate and production induction. *Mol. Gen. Genet.* **125**, 147-155.
- 45 Schwatz, S.H., Léon-Kloosterzie, K.M., Koornneerf, M., y Zeevaart, J.A.D. (1997a). Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **114**,161-166.

- Schwartz, S.H., Tan, B.C., Gage, D.A., Zeevaart, J.A.D., y McCarty, D.R. (1997b). Specific oxidative cleavage of carotenoid by VP14 of maize. *Science* **276**, 1872-1874.
- Seo, M., Koiwa, H., Akaba, S., Komano, T., Oritani, T., Kamiya, Y., y Koshihara T. (2000a). Abscisic acid aldehyde oxidase of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **23**, 481-488.
- 5 Seo, M., Peeters, A.J.M., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-Poll, A., Zeevaart, J.A.D., Koorneef, M., Kamiya, Y., y Koshihara, T. (2000b). The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (*AAO3*) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 12.908-12.913.
- Shen, Q., y Ho. T.H.D. (1995). Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel *cis*-acting element. *Plant Cell* **7**, 295-307.
- 10 Shinozaki, K., y Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997). Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* **115**, 327-334.
- Stockinger, E.J., Gilmour, S.J., y Thomashow, M.F. (1997). *Arabidopsis thaliana* *CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a *cis*-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1035-1040.
- 15 Strizhov, N., Abraham, E., Okresz, L., Blickling, S., Zilberstein, A., Schell, J., Koncz, C, y Szabados, L. (1997). Differential expression of two *P5CS* genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*. *Plant J.* **12**, 557-569.
- Tan, B.C., Schwartz, S.H., Zeevaart, J.A.D., y McCarty, D.R. (1997). Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12.235-12.240.
- 20 Taylor, I.B., Burbidge, A., y Thompson, A.J. (2000). Control of abscisic acid synthesis. *J. Exp. Bot.* **51**, 1563-1574.
- Thomashow, M.F. (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 571-599.
- Thompson, A.J., Jackson, A.C., Symonds, R.C., Mulholland, B.J., Dadswell, A.R., Blake, P.S., Burbidge, A., y Taylor, I.B. (2000). Ectopic expression of a tomato *9-cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene causes over-production of abscisic acid. *Plant J.* **23**, 363-374.
- 25 Vasil, V., Marcotte, W.R.Jr., Rosenkrans, L., Cociolone, S.M., Vasil, I.K., Quatrano, R.S., y McCarty, D.R. (1995). Overlap of Viviparous1 (*Vp1*) and abscisic acid response elements in the *Em* promoter: G-box elements are sufficient but not necessary for VP1 transactivation. *Plant Cell* **7**, 1511-1518.
- 30 Wahl, R., Warner, C.K., Finnerty, V., y Rajagopalan, K. (1982). *Drosophila melanogaster ma-1* mutants are defective in the sulfuration of desulfo Mo hydroxylases. *J. Biol. Chem.* **257**, 3958-3962.
- Watanabe, T., Ihara, N., Itoh, T., Fujita, T., y Sugimoto, Y. (2000). Deletion mutation in *Drosophila ma-1* homologous, putative molybdopterin cofactor sulfurase gene is associated with bovine xanthinuria Type II. *J. Biol. Chem.* **275**, 21.789-21.792.
- 35 Xin, Z., y Browse, J. (1998). *eskimo1* mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezing-tolerant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7799-7804.
- Xiong, L., Ishitani, M., Lee, H., y Zhu, J.K. (1999a). HOS5-a negative regulator of osmotic stress-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **19**, 569-578.
- 40 Xiong, L., Ishitani, M., y Zhu, J.K. (1999b). Interaction of osmotic stress, temperature, and abscisic acid in the regulation of gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **119**, 205-211.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Koizumi, M., Urao, S., y Shinozaki, K. (1992). Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiol.* **33**, 217-224.
- 45 Yamaguchi-Shinozaki, K., y Shinozaki, K. (1994). A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* **6**, 251-264.
- Yoshihara, Y., Nanjo, T., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., y Shinozaki, K. (1999). Stress-responsive and developmental regulation of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase 1 (*P5CS1*) gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **261**, 766-772.
- Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L., Jack, R.F., y Dean, D.R. (1993). Cysteine desulfurase activity indicates a role for

NifS in metallocluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2754-2758.

Zhu, J.K., Hasegawa, P.M., y Bressan, RA. (1997). Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **16**, 253-277.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ZHU, JIAN-KANG XIONG, LIMING
 <120> MÉTODO PARA AUMENTAR LA TOLERANCIA AL ESTRÉS EN PLANTAS
 <130> 227010US20
 5 <160> 6
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 2460
 <212> DNA
 10 <213> Arabidopsis sp.

<400> 1
 atggaagcat ttcttaagga attcggagat tattatggat acccagatgg tcccaagaac 60
 attcaagaga tccgcgacac cgaattcaag agattagata aagtggtgt atacttggat 120
 catgctgggt ctactttgta ttctgagttg cagatggaat atatttttaa ggacttcaca 180
 agcaatggtt ttggaaatcc acatagtcaa agtgatatca gttcggccac cagtgcacct 240
 atageggatg ctcgacatca ggtgcttgaa tactttaatg catctcctga agattacagt 300
 tgcttattca cctccggagc cacagcagcg ctgaagcttg tcggagagac ttttccgtgg 360
 acccaagaca gtaatttttt gtataccatg gagaatcaca acagtgtact tggattagg 420
 gaatatgcat tagctcaagg tgcttcagca tgtgcagtg atattgaaga ggcagctaac 480
 caaccaggcc agcttacaaa ttcaggacca tctatcaagg taaagcatcg tgctgtgcag 540
 atgagaaaca cttctaaact caaaaggaa gagtcaagag gaaatgccta taatctattt 600
 gctttcccct cggagtgcaa tttttctggc ctgaggttta atctagatct ggtgaagttg 660
 atgaaagaaa atactgagac cgtgctacaa ggctcccct ttagcaagag caagcgggtg 720
 atggtcttga ttgatgctgc aaagggttgt gctacactac cacctgattt atcggagtat 780
 cctgcagatt ttgttgttct gtcattctac aagttatttg gttatcctac tgggcttggc 840
 gctctccttg tacggaatga tgcagccaaa ttgctcaaaa agacttattt tagtggaggc 900
 actgttgctg cttcaattgc tgacatcgac tttgtaaaaa gaaggaaag ggtggaggag 960
 ttttttgagg atggttctgc ttcattcctg agcatagcag ccatccgtca tggcttcaaa 1020
 ttactcaagt cgcttacacc ttctgcaatt tggatgcaca caacgtcact ttccatatat 1080
 gtgaaaaaga agcttcaggc tttacgacat ggaaacgggg ctgctgtatg tgttctgtat 1140
 ggcagtgaaa atctggagtt atcttcacat aaatcaggcc caacggttac attcaacttg 1200
 aaaagacctg atggctcttg gtttggtctac ttggaggtgg agaagcttgc ttctttatct 1260

ES 2 418 362 T3

ggaattcagt tacggacagg atgtttttgc aatcctggcg catgtgcaaa gtatctcgag 1320
 ttatcccatt ctgagctacg gtctaatagta gaggctgggc atatttgctg ggatgacaat 1380
 gatgtgataa atggaaaacc aacaggggct gttagggttt cgtttggtta tatgtcaacc 1440
 tttgaagatg ccaagaaatt tattgatttc atcataagtt catttgcttc acctocaaag 1500
 aagactggga atggaaccgt cgtcagtgga aggtttcctc aacttcctag tgaagacctt 1560
 gaaagtaaag aatcctttcc aagccactac cttaagtcaa ttactgtata cccgatcaag 1620
 tcatgtgctg gattttctgt gatacgttgg ccactttgca gaacaggcct gctgcatgat 1680
 cgagaatgga tggttcaggg tctgaccggt gaaattctta cccaaaagaa ggtgcctgag 1740
 atgtctctta taaaaacctt tatcgacctt gaggaaggac tactgtctgt agaattctct 1800
 cgctgcgaag acaagttgca catcagaatc aagtctgatt catataacc gaggaacgat 1860
 gagtttgatt cacatgcca cataactgaa aaccgtaatg aggaaactag aatcaatcgt 1920
 tggttcacca atgccattgg tcgacaatgc aagttgctac ggtattctag ctctacttcc 1980
 aaagactgct tgaacagaaa caagagtcct ggtttgctgca gagatttgga aagcaatate 2040
 aactttgcta atgaagctca gttcttgta atctccgagg agagtgttgc tgacctaaac 2100
 agaagattag aagcaaaaaga cgaggattac aaacgggctc atgaaaaact caatccacat 2160
 aggttcagac caaatctggt tatatctgga ggtgaacat acggggaaga taaatggaaa 2220
 actgtcaaga taggagacaa tcatttcaca tcattgggcg gttgtaaccg gtgccagatg 2280
 ataaacataa gtaatgaagc tggactagtg aagaaatcca atgagccctt aacaacttta 2340
 gcttcatata ggagagtaaa gggaaagatc ttgtttggaa cgcttttgag atacgagatt 2400
 gatgagaaaa gacaatggtg gattggagtt ggggaagaag ttaatccaga tattgaataa 2460

<210> 2
 <211> 819
 <212> PRT
 5 <213> Arabidopsis sp.

<400> 2

Met Glu Ala Phe Leu Lys Glu Phe Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Pro Asp
 1 5 10 15

Gly Pro Lys Asn Ile Gln Glu Ile Arg Asp Thr Glu Phe Lys Arg Leu
 20 25 30

Asp Lys Gly Val Val Tyr Leu Asp His Ala Gly Ser Thr Leu Tyr Ser
 35 40 45

Glu Leu Gln Met Glu Tyr Ile Phe Lys Asp Phe Thr Ser Asn Val Phe

ES 2 418 362 T3

50						55											60	
Gly	Asn	Pro	His	Ser	Gln	Ser	Asp	Ile	Ser	Ser	Ala	Thr	Ser	Asp	Leu			
65					70					75					80			
Ile	Ala	Asp	Ala	Arg	His	Gln	Val	Leu	Glu	Tyr	Phe	Asn	Ala	Ser	Pro			
				85					90					95				
Glu	Asp	Tyr	Ser	Cys	Leu	Phe	Thr	Ser	Gly	Ala	Thr	Ala	Ala	Leu	Lys			
			100					105					110					
Leu	Val	Gly	Glu	Thr	Phe	Pro	Trp	Thr	Gln	Asp	Ser	Asn	Phe	Leu	Tyr			
		115					120					125						
Thr	Met	Glu	Asn	His	Asn	Ser	Val	Leu	Gly	Ile	Arg	Glu	Tyr	Ala	Leu			
	130					135					140							
Ala	Gln	Gly	Ala	Ser	Ala	Cys	Ala	Val	Asp	Ile	Glu	Glu	Ala	Ala	Asn			
145					150					155					160			
Gln	Pro	Gly	Gln	Leu	Thr	Asn	Ser	Gly	Pro	Ser	Ile	Lys	Val	Lys	His			
				165					170					175				
Arg	Ala	Val	Gln	Met	Arg	Asn	Thr	Ser	Lys	Leu	Gln	Lys	Glu	Glu	Ser			
			180					185					190					
Arg	Gly	Asn	Ala	Tyr	Asn	Leu	Phe	Ala	Phe	Pro	Ser	Glu	Cys	Asn	Phe			
		195					200					205						
Ser	Gly	Leu	Arg	Phe	Asn	Leu	Asp	Leu	Val	Lys	Leu	Met	Lys	Glu	Asn			
	210					215					220							
Thr	Glu	Thr	Val	Leu	Gln	Gly	Ser	Pro	Phe	Ser	Lys	Ser	Lys	Arg	Trp			
225					230					235					240			
Met	Val	Leu	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	Gly	Cys	Ala	Thr	Leu	Pro	Pro	Asp			
				245					250					255				
Leu	Ser	Glu	Tyr	Pro	Ala	Asp	Phe	Val	Val	Leu	Ser	Phe	Tyr	Lys	Leu			
			260					265					270					
Phe	Gly	Tyr	Pro	Thr	Gly	Leu	Gly	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Asn	Asp	Ala			
		275					280					285						
Ala	Lys	Leu	Leu	Lys	Lys	Thr	Tyr	Phe	Ser	Gly	Gly	Thr	Val	Ala	Ala			
	290					295					300							

ES 2 418 362 T3

Ser Ile Ala Asp Ile Asp Phe Val Lys Arg Arg Glu Arg Val Glu Glu
 305 310 315 320

Phe Phe Glu Asp Gly Ser Ala Ser Phe Leu Ser Ile Ala Ala Ile Arg
 325 330 335

His Gly Phe Lys Leu Leu Lys Ser Leu Thr Pro Ser Ala Ile Trp Met
 340 345 350

His Thr Thr Ser Leu Ser Ile Tyr Val Lys Lys Lys Leu Gln Ala Leu
 355 360 365

Arg His Gly Asn Gly Ala Ala Val Cys Val Leu Tyr Gly Ser Glu Asn
 370 375 380

Leu Glu Leu Ser Ser His Lys Ser Gly Pro Thr Val Thr Phe Asn Leu
 385 390 395 400

Lys Arg Pro Asp Gly Ser Trp Phe Gly Tyr Leu Glu Val Glu Lys Leu
 405 410 415

Ala Ser Leu Ser Gly Ile Gln Leu Arg Thr Gly Cys Phe Cys Asn Pro
 420 425 430

Gly Ala Cys Ala Lys Tyr Leu Glu Leu Ser His Ser Glu Leu Arg Ser
 435 440 445

Asn Val Glu Ala Gly His Ile Cys Trp Asp Asp Asn Asp Val Ile Asn
 450 455 460

Gly Lys Pro Thr Gly Ala Val Arg Val Ser Phe Gly Tyr Met Ser Thr
 465 470 475 480

Phe Glu Asp Ala Lys Lys Phe Ile Asp Phe Ile Ile Ser Ser Phe Ala
 485 490 495

Ser Pro Pro Lys Lys Thr Gly Asn Gly Thr Val Val Ser Gly Arg Phe
 500 505 510

Pro Gln Leu Pro Ser Glu Asp Leu Glu Ser Lys Glu Ser Phe Pro Ser
 515 520 525

His Tyr Leu Lys Ser Ile Thr Val Tyr Pro Ile Lys Ser Cys Ala Gly
 530 535 540

ES 2 418 362 T3

Phe Ser Val Ile Arg Trp Pro Leu Cys Arg Thr Gly Leu Leu His Asp
545 550 555 560

Arg Glu Trp Met Val Gln Gly Leu Thr Gly Glu Ile Leu Thr Gln Lys
565 570 575

Lys Val Pro Glu Met Ser Leu Ile Lys Thr Phe Ile Asp Leu Glu Glu
580 585 590

Gly Leu Leu Ser Val Glu Ser Ser Arg Cys Glu Asp Lys Leu His Ile
595 600 605

Arg Ile Lys Ser Asp Ser Tyr Asn Pro Arg Asn Asp Glu Phe Asp Ser
610 615 620

His Ala Asn Ile Leu Glu Asn Arg Asn Glu Glu Thr Arg Ile Asn Arg
625 630 635 640

Trp Phe Thr Asn Ala Ile Gly Arg Gln Cys Lys Leu Leu Arg Tyr Ser
645 650 655

Ser Ser Thr Ser Lys Asp Cys Leu Asn Arg Asn Lys Ser Pro Gly Leu
660 665 670

Cys Arg Asp Leu Glu Ser Asn Ile Asn Phe Ala Asn Glu Ala Gln Phe
675 680 685

Leu Leu Ile Ser Glu Glu Ser Val Ala Asp Leu Asn Arg Arg Leu Glu
690 695 700

Ala Lys Asp Glu Asp Tyr Lys Arg Ala His Glu Lys Leu Asn Pro His
705 710 715 720

Arg Phe Arg Pro Asn Leu Val Ile Ser Gly Gly Glu Pro Tyr Gly Glu
725 730 735

Asp Lys Trp Lys Thr Val Lys Ile Gly Asp Asn His Phe Thr Ser Leu
740 745 750

Gly Gly Cys Asn Arg Cys Gln Met Ile Asn Ile Ser Asn Glu Ala Gly
755 760 765

Leu Val Lys Lys Ser Asn Glu Pro Leu Thr Thr Leu Ala Ser Tyr Arg
770 775 780

ES 2 418 362 T3

Arg Val Lys Gly Lys Ile Leu Phe Gly Thr Leu Leu Arg Tyr Glu Ile
785 790 795 800

Asp Glu Lys Arg Gln Cys Trp Ile Gly Val Gly Glu Glu Val Asn Pro
805 810 815

Asp Ile Glu

<210> 3

<211> 888

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ala Gly Ala Ala Ala Glu Ser Gly Arg Glu Leu Trp Thr Phe Ala
1 5 10 15

Gly Ser Arg Asp Pro Ser Ala Pro Arg Leu Ala Tyr Gly Tyr Gly Pro
20 25 30

Gly Ser Leu Arg Glu Leu Arg Ala Arg Glu Phe Ser Arg Leu Ala Gly
35 40 45

Thr Val Tyr Leu Asp His Ala Gly Ala Thr Leu Phe Ser Gln Ser Gln
50 55 60

Leu Glu Ser Phe Thr Ser Asp Leu Met Glu Asn Thr Tyr Gly Asn Pro
65 70 75 80

His Ser Gln Asn Ile Ser Ser Lys Leu Thr His Asp Thr Val Glu Gln
85 90 95

Val Arg Tyr Arg Ile Leu Ala His Phe His Thr Thr Ala Glu Asp Tyr
100 105 110

Thr Val Ile Phe Thr Ala Gly Ser Thr Ala Ala Leu Lys Leu Val Ala
115 120 125

Glu Ala Phe Pro Trp Val Ser Gln Gly Pro Glu Ser Ser Gly Ser Arg
130 135 140

Phe Cys Tyr Leu Thr Asp Ser His Thr Ser Val Val Gly Met Arg Asn
145 150 155 160

Val Thr Met Ala Ile Asn Val Ile Ser Ile Pro Val Arg Pro Glu Asp
165 170 175

ES 2 418 362 T3

Leu Trp Ser Ala Glu Glu Arg Gly Ala Ser Ala Ser Asn Pro Asp Cys
 180 185 190

Gln Leu Pro His Leu Phe Cys Tyr Pro Ala Gln Ser Asn Phe Ser Gly
 195 200 205

Val Arg Tyr Pro Leu Ser Trp Ile Glu Glu Val Lys Ser Gly Arg Leu
 210 215 220

Arg Pro Val Ser Thr Pro Gly Lys Trp Phe Val Leu Leu Asp Ala Ala
 225 230 235 240

Ser Tyr Val Ser Thr Ser Pro Leu Asp Leu Ser Ala His Gln Ala Asp
 245 250 255

Phe Val Pro Ile Ser Phe Tyr Lys Ile Phe Gly Phe Pro Thr Gly Leu
 260 265 270

Gly Ala Leu Leu Val His Asn Arg Ala Ala Pro Leu Leu Arg Lys Thr
 275 280 285

Tyr Phe Gly Gly Gly Thr Ala Ser Ala Tyr Leu Ala Gly Glu Asp Phe
 290 295 300

Tyr Ile Pro Arg Gln Ser Val Ala Gln Arg Phe Glu Asp Gly Thr Ile
 305 310 315 320

Ser Phe Leu Asp Val Ile Ala Leu Lys His Gly Phe Asp Thr Leu Glu
 325 330 335

Arg Leu Thr Gly Gly Met Glu Asn Ile Lys Gln His Thr Phe Thr Leu
 340 345 350

Ala Gln Tyr Thr Tyr Met Ala Leu Ser Ser Leu Gln Tyr Pro Asn Gly
 355 360 365

Ala Pro Val Val Arg Ile Tyr Ser Asp Ser Glu Phe Ser Ser Pro Glu
 370 375 380

Val Gln Gly Pro Ile Ile Asn Phe Asn Val Leu Asp Asp Lys Gly Asn
 385 390 395 400

Ile Ile Gly Tyr Ser Gln Val Asp Lys Met Ala Ser Leu Tyr Asn Ile
 405 410 415

ES 2 418 362 T3

His Leu Arg Thr Gly Cys Phe Cys Asn Thr Gly Ala Cys Gln Arg His
 420 425 430

Leu Gly Ile Ser Asn Glu Met Val Arg Lys His Phe Gln Ala Gly His
 435 440 445

Val Cys Gly Asp Asn Met Asp Leu Ile Asp Gly Gln Pro Thr Gly Ser
 450 455 460

Val Arg Ile Ser Phe Gly Tyr Met Ser Thr Leu Asp Asp Val Gln Ala
 465 470 475 480

Phe Leu Arg Phe Ile Ile Asp Thr Arg Leu His Ser Ser Gly Asp Trp
 485 490 495

Pro Val Pro Gln Ala His Ala Asp Thr Gly Glu Thr Gly Ala Pro Ser
 500 505 510

Ala Asp Ser Gln Ala Asp Val Ile Pro Ala Val Met Gly Arg Arg Ser
 515 520 525

Leu Ser Pro Gln Glu Asp Ala Leu Thr Gly Ser Arg Val Trp Asn Asn
 530 535 540

Ser Ser Thr Val Asn Ala Val Pro Val Ala Pro Pro Val Cys Asp Val
 545 550 555 560

Ala Arg Thr Gln Pro Thr Pro Ser Glu Lys Ala Ala Gly Val Leu Glu
 565 570 575

Gly Ala Leu Gly Pro His Val Val Thr Asn Leu Tyr Leu Tyr Pro Ile
 580 585 590

Lys Ser Cys Ala Ala Phe Glu Val Thr Arg Trp Pro Val Gly Asn Gln
 595 600 605

Gly Leu Leu Tyr Asp Arg Ser Trp Met Val Val Asn His Asn Gly Val
 610 615 620

Cys Leu Ser Gln Lys Gln Glu Pro Arg Leu Cys Leu Ile Gln Pro Phe
 625 630 635 640

Ile Asp Leu Arg Gln Arg Ile Met Val Ile Lys Ala Lys Gly Met Glu
 645 650 655

ES 2 418 362 T3

Pro Ile Glu Val Pro Leu Glu Glu Asn Ser Glu Arg Thr Gln Ile Arg
660 665 670

Gln Ser Arg Val Cys Ala Asp Arg Val Ser Thr Tyr Asp Cys Gly Glu
675 680 685

Lys Ile Ser Ser Trp Leu Ser Thr Phe Phe Gly Arg Pro Cys Asn Leu
690 695 700

Ile Lys Gln Ser Ser Asn Ser Gln Arg Asn Ala Lys Lys Lys His Gly
705 710 715 720

Lys Asp Gln Leu Pro Gly Thr Met Ala Thr Leu Ser Leu Val Asn Glu
725 730 735

Ala Gln Tyr Leu Leu Ile Asn Thr Ser Ser Ile Leu Glu Leu His Arg
740 745 750

Gln Leu Asn Thr Ser Asp Glu Asn Gly Lys Glu Glu Leu Phe Ser Leu
755 760 765

Lys Asp Leu Ser Leu Arg Phe Arg Ala Asn Ile Ile Ile Asn Gly Lys
770 775 780

Arg Ala Phe Glu Glu Glu Lys Trp Asp Glu Ile Ser Ile Gly Ser Leu
785 790 795 800

Arg Phe Gln Val Leu Gly Pro Cys His Arg Cys Gln Met Ile Cys Ile
805 810 815

Asp Gln Gln Thr Gly Gln Arg Asn Gln His Val Phe Gln Lys Leu Ser
820 825 830

Glu Ser Arg Glu Thr Lys Val Asn Phe Gly Met Tyr Leu Met His Ala
835 840 845

Ser Leu Asp Leu Ser Ser Pro Cys Phe Leu Ser Val Gly Ser Gln Val
850 855 860

Leu Pro Val Leu Lys Glu Asn Val Glu Gly His Asp Leu Pro Ala Ser
865 870 875 880

Glu Lys His Gln Asp Val Thr Ser
885

- <210> 4
- <211> 849
- <212> PRT
- <213> Bos Taurus

ES 2 418 362 T3

<400> 4

Met Gln Ser Arg Gln Pro Arg Ala Leu Leu Pro Arg Ser Pro Gly Thr
 1 5 10 15

Val Tyr Leu Asp His Ala Gly Thr Thr Leu Phe Pro Gln Ser Gln Ile
 20 25 30

Thr Ser Phe Met Lys Asp Leu Met Glu Asn Val Tyr Gly Asn Pro His
 35 40 45

Ser Gln Asn Ile Ser Ser Lys Leu Thr His Asp Thr Val Glu Gln Val
 50 55 60

Arg Phe Arg Ile Leu Ala His Phe His Thr Ser Pro Glu Asp Tyr Thr
 65 70 75 80

Val Ile Phe Thr Ser Gly Ser Thr Ala Ala Leu Lys Leu Val Ala Glu
 85 90 95

Ala Phe Pro Trp Val Ser Pro Gly Pro Glu Gly Ser Gly Ser Cys Phe
 100 105 110

Cys Tyr Leu Thr Asp Ser His Thr Ser Val Val Gly Met Arg Lys Ile
 115 120 125

Thr Ala Ala Met Asn Val Ser Ser Ile Pro Val Arg Pro Glu Asp Met
 130 135 140

Trp Ser Ala Glu Arg Gln Asp Ala Ala Ala Ala Gly Asp Pro Ala Gly
 145 150 155 160

Gln Pro Pro His Leu Phe Cys Tyr Pro Ala Gln Ser Asn Phe Ser Gly
 165 170 175

Thr Arg Tyr Pro Leu Ser Trp Ile Gly Glu Val Lys Ser Gly Arg Arg
 180 185 190

Arg Pro Ala Ser Arg Pro Gly Lys Trp Phe Val Leu Leu Asp Ala Ala
 195 200 205

Ala Phe Val Gly Thr Ser Pro Leu Asp Leu Ser Val His Gln Ala Asp
 210 215 220

ES 2 418 362 T3

Phe Val Pro Ile Ser Phe Tyr Lys Ile Phe Gly Phe Pro Thr Gly Leu
 225 230 235 240
 Gly Ala Leu Leu Val Asn Asn Arg Leu Ala Ala Leu Leu Arg Lys Thr
 245 250 255
 Tyr Phe Gly Gly Gly Thr Ala Ala Ala Tyr Leu Ala Gly Asp Asp Phe
 260 265 270
 Tyr Val Pro Arg Glu Ser Val Ala Glu Arg Phe Glu Asp Gly Thr Ile
 275 280 285
 Ser Phe Leu Asp Val Ile Ala Leu Lys His Gly Phe Asp Ala Leu Glu
 290 295 300
 Arg Leu Thr Gly Gly Met Glu Ser Ile Arg Gln His Thr Phe Thr Leu
 305 310 315 320
 Ala Gln Tyr Thr Tyr Thr Ala Leu Ser Ser Leu Arg Tyr Pro Asn Gly
 325 330 335
 Ala Pro Val Val Gln Ile Tyr Ser Asp Ser Asp Phe Ser Ser Pro Glu
 340 345 350
 Val Gln Gly Pro Val Ile Ser Phe Asn Val Leu Asp Asp His Gly Asn
 355 360 365
 Val Val Gly Tyr Ser Gln Val Asp Lys Met Ala Ser Leu His Asn Ile
 370 375 380
 His Val Arg Thr Gly Cys Phe Cys Asn Thr Gly Ala Cys Gln Arg His
 385 390 395 400
 Leu Gly Ile Ser Asp Glu Met Val Lys Lys His Leu Gln Ala Gly His
 405 410 415
 Val Cys Gly Asp Asp Val Asp Leu Ile Asp Gly Gln Pro Thr Gly Ser
 420 425 430
 Val Arg Ile Ser Phe Gly Tyr Met Ser Thr Leu Glu Asp Ala Gln Ala
 435 440 445
 Phe Leu Arg Phe Ile Ile Ala Thr Arg Leu His Ser Ser His Gly Gln
 450 455 460

ES 2 418 362 T3

Pro Leu Pro Leu Ala Thr Pro Gly Glu Ala Gly Ala Pro Pro Glu Asp
 465 470 475 480
 Ser Glu Ala Gln Asn Ala Met Pro Ala Ala Arg Ala Arg Gly Ser Ser
 485 490 495
 Ser Pro Gln Glu Asp Thr Ser Pro His Ser Gly Val Trp Asn Asn Ser
 500 505 510
 Pro Thr Ala Val Asp Ala Glu Gly Leu Cys Pro Pro Leu Leu Glu Ala
 515 520 525
 Thr Gly Thr Gln Gln Thr Thr Ser Glu Lys Ala Ala Asp Val Pro Asp
 530 535 540
 Gly Asp Leu Arg Ser His Val Ile Thr Asn Leu Phe Leu Tyr Pro Ile
 545 550 555 560
 Lys Ser Cys Ala Ala Phe Glu Val Ile Arg Trp Pro Leu Gly Ser Gln
 565 570 575
 Gly Leu Leu Tyr Asp Arg Ser Trp Met Val Val Asn His Asn Gly Ile
 580 585 590
 Cys Leu Ser Gln Lys Gln Glu Pro Arg Leu Cys Leu Ile Gln Pro Phe
 595 600 605
 Ile Asp Leu Gln Arg Arg Ile Met Val Ile Lys Ala Gln Gly Met Glu
 610 615 620
 Pro Ile Glu Val Pro Leu Glu Glu Asn Ser Glu Gln Val Gln Ile Cys
 625 630 635 640
 Gln Ser Lys Val Cys Ala Asp Arg Val Asn Thr Tyr Asp Cys Gly Glu
 645 650 655
 Lys Ile Ser Asn Trp Leu Ser Lys Phe Phe Gly Arg Pro Tyr His Leu
 660 665 670
 Ile Lys Gln Ser Ser Asp Phe Gln Arg Asn Ala Lys Lys Lys His Gly
 675 680 685
 Lys Asp Gln Ser Ala His Thr Thr Ala Thr Leu Ser Leu Val Asn Glu
 690 695 700
 Ala Gln Tyr Leu Leu Ile Asn Arg Ser Ser Ile Leu Glu Leu Gln Gln

ES 2 418 362 T3

Thr Gly Asp Phe Val Asp Gln Val Arg Phe Lys Ile Leu Glu Phe Phe
 65 70 75 80
 Asn Thr Thr Ala Glu Asp Tyr His Val Ile Phe Thr Ala Asn Ala Thr
 85 90 95
 Ala Ala Leu Ser Leu Val Ala Glu Asn Phe Asp Phe Gly Ser Ser Gly
 100 105 110
 Glu Phe His Phe Cys Gln Glu Asn His Thr Ser Val Leu Gly Met Arg
 115 120 125
 Glu Arg Val Arg Glu Asn Gly Ile Tyr Met Leu Arg Glu Asn Glu Ile
 130 135 140
 Ser Gly Gly Lys His Lys Ala Asn Gly Lys Val His Glu Val Ser Gly
 145 150 155 160
 Lys Thr Gly Asn Ser Leu Leu Thr Phe Ser Ala Gln Cys Asn Phe Ser
 165 170 175
 Gly Tyr Lys Ile Pro Leu Glu Val Ile Glu Gln Ile Gln Ile Asp Gly
 180 185 190
 Leu Ala Lys Pro Gly Lys Glu Leu Trp Ser Ser Leu Gly Glu Lys Lys
 195 200 205
 Lys Asn Met His Asn Asp Tyr Tyr Ile Cys Leu Asp Ala Ala Ser Phe
 210 215 220
 Val Ala Thr Ser Pro Leu Asp Leu Gln Lys Tyr Arg Pro Asp Tyr Val
 225 230 235 240
 Cys Leu Ser Phe Tyr Lys Ile Phe Gly Tyr Pro Thr Gly Val Gly Ala
 245 250 255
 Leu Leu Val Ser Arg Arg Gly Ala Glu Val Phe Gln Lys Arg Arg Phe
 260 265 270
 Phe Gly Gly Gly Thr Ile Asn Tyr Ala Tyr Pro His Ala Met Asp Tyr
 275 280 285
 Gln Leu Arg Glu Thr Phe His Gln Arg Tyr Glu Asp Gly Thr Leu Pro
 290 295 300

ES 2 418 362 T3

Phe Leu Ser Ile Val Gly Leu Leu Glu Gly Phe Arg Thr Leu Glu Arg
 305 310 315 320
 Leu Val Pro Arg Thr Asp Glu Phe Ser Thr Met Glu Arg Ile Ser Arg
 325 330 335
 His Val Phe Gly Leu Ala Lys Tyr Leu Glu Asp Gln Leu Arg Gln Leu
 340 345 350
 His His Pro Asn Gly Glu Pro Leu Val Lys Leu Tyr Asn Lys Val Gly
 355 360 365
 Tyr Gln Asp Lys Ser Arg Gln Gly Gly Ile Val Ala Phe Asn Val Arg
 370 375 380
 Thr Glu Ser Gly Ser Phe Val Gly Phe Gly Glu Ile Ala Cys Val Ala
 385 390 395 400
 Ala Leu His Gly Ile Leu Leu Arg Thr Gly Cys Phe Cys Asn Ile Gly
 405 410 415
 Ala Cys Gln Tyr Tyr Leu Gly Leu Asp Glu Asp Ala Leu Asp Ala Ile
 420 425 430
 Tyr Lys Arg Ala Gly Arg Ile Cys Gly Asp Tyr Phe Asp Leu Ile Asp
 435 440 445
 Gly Gln Pro Thr Gly Ala Val Arg Val Ser Phe Gly Tyr Met Thr Thr
 450 455 460
 Ile Gln Asp Val Asp Lys Leu Leu Gln Met Leu Arg Ser Ser Tyr Leu
 465 470 475 480
 Ala Thr Lys Pro Leu Gln Arg Ile Gln Phe Ile Glu Glu Gln Ala Glu
 485 490 495
 Gln Leu Pro Pro Leu Leu Lys Glu Arg Val Gln Leu Leu Arg Pro Lys
 500 505 510
 Leu Leu Gln Met Ala Ile Tyr Pro Val Lys Ser Cys Ala Ala Phe Lys
 515 520 525
 Ile Glu Leu Pro Gly Ser Trp Pro Leu Thr Asp Gln Gly Leu Lys Tyr
 530 535 540
 Asp Arg Glu Trp Met Ile Val Asp Met Asn Gly Met Ala Leu Thr Gln

ES 2 418 362 T3

Met Asn Leu Ser Lys Gly Thr Ala Ala Ala Tyr Cys Ser Gly Tyr Ser
1 5 10 15

Glu Asp Val Asp Val Ile Arg Glu Arg Glu Tyr Pro Leu Leu Lys Asp
20 25 30

Thr Thr Tyr Leu Asp His Ala Gly Thr Thr Leu Tyr Ala Asn Ser Leu
35 40 45

Ile His Ser Phe Gly Arg Asp Leu Thr Gly Asn Leu Tyr Gly Asn Pro
50 55 60

His Ser Met Ser Ala Ser Ser Gln Leu Ser Ala Gln Arg Ala Gly Arg
65 70 75 80

Tyr Ser Leu Arg Ala Leu Arg Phe Phe Asn Ala Asp Pro Asp Glu Phe
85 90 95

Asp Leu Val Phe Val Ala Asn Ala Thr Ala Gly Ile Lys Leu Val Ala
100 105 110

Asp Ala Leu Gln Asn Ser Pro Gln Gly Phe Trp Tyr Gly Tyr Tyr Val
115 120 125

Asp Ala His Thr Ser Leu Val Gly Val Arg Glu Leu Ala Lys Met Gly
130 135 140

Ser Arg Cys Phe Val Asn Glu Asp Glu Val Asp Ser Trp Ile Ser Gly
145 150 155 160

Leu Gly Ser Arg Arg Glu Glu Ser Leu Gly Leu Phe Ala Tyr Pro Ala
165 170 175

Gln Ser Asn Met Asn Gly Arg Arg Val Pro Met Arg Trp Cys Glu Gln
180 185 190

Ile Arg Ala Gln Lys Glu Asn Ala Asp Asn Met Ile Tyr Thr Leu Leu
195 200 205

Asp Ala Ala Ser Phe Val Ser Thr Ser Pro Leu Asp Leu Ser Lys Ile
210 215 220

ES 2 418 362 T3

Ala Ala Ala Pro Asp Phe Thr Val Leu Ser Phe Tyr Lys Ile Phe Gly
 225 230 235 240

Phe Pro Asp Leu Gly Ala Leu Ile Val Arg Lys Ser Ser Gly Asp Val
 245 250 255

Phe Lys His Arg Lys Phe Phe Gly Gly Gly Thr Val Asp Met Val Leu
 260 265 270

Thr Asp Gly Asn Pro Trp His Ala Lys Lys Gln Ser Ser Ile His Gln
 275 280 285

Ser Leu Glu Asp Gly Thr Leu Pro Phe His Ser Ile Ile Ala Leu Asp
 290 295 300

Ser Ala Phe Glu Thr His Gly Arg Leu Phe Arg Ser Met Glu Asn Val
 305 310 315 320

Ala Ser His Thr Arg Phe Leu Ala Lys Arg Leu Arg Asp Arg Met Asn
 325 330 335

Ala Leu Lys His Tyr Asn Gly Ser Lys Val Cys Gln Leu Tyr Met Ser
 340 345 350

Pro Asn Ser Ser Tyr Asp Asp Ala Ser Ser Gln Gly Pro Ile Leu Ala
 355 360 365

Phe Asn Leu Arg Asn Ser Arg Gly Met Trp Ile Gly Lys Ser Glu Val
 370 375 380

Glu Arg Leu Ala Ser Ile Lys Asn Ile Gln Ile Arg Ser Gly Thr Leu
 385 390 395 400

Cys Asn Pro Gly Gly Thr Ala Leu Ser Leu Gly Trp Thr Gly Ala Asp
 405 410 415

Met Leu Arg His Phe Ser Ala Gly Met Arg Cys Gly Asp Asp His Asp
 420 425 430

Ile Met Asp Glu Arg Pro Thr Gly Ile Leu Arg Ile Ser Leu Gly Ala
 435 440 445

Met Ser Ser Leu Thr Asp Val Asp Thr Phe Ile Ala Phe Leu Glu Glu
 450 455 460

Phe Tyr Val Asp Lys Pro Pro Glu Gly Leu Pro Val Pro Leu Thr Gly

ES 2 418 362 T3

Ala Val Ala Ala Asp Val Phe Arg Ala Asn Val Val Val Ala Glu Asn
 725 730 735

Ile Ser Thr Ala Glu Arg Pro Tyr Ile Glu Asp Thr Trp Ala Ser Leu
 740 745 750

Ser Ile Gly Ser Gly Pro Glu Gln Leu Arg Phe Asp Val Leu Gly Ser
 755 760 765

Cys Glu Arg Cys Gln Met Val Cys Val Asp Gln Tyr Thr Gly Gln Arg
 770 775 780

Gly Asp Glu Pro Tyr Ala Thr Leu Ala Lys Thr Arg Lys Ile Asp Arg
 785 790 795 800

Lys Ile Leu Phe Gly Arg His Ile Ser Pro Val Gly Arg Pro Lys Asp
 805 810 815

Ala Glu Asn Gly Cys Leu Gly Thr Ile Met Val Gly Asp Ala Val Thr
 820 825 830

Pro Ser Tyr Asp Asn Glu Ser
 835

REIVINDICACIONES

1. Un método para aumentar la tolerancia a la sequía o la tolerancia a la sal en una planta, que comprende hacer que se sobreexpresen un cofactor de molibdeno sulfurasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 en la planta.
- 5 2. El método de la Reivindicación 1, en donde el cofactor de molibdeno sulfurasa es codificado por un ácido nucleico que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1.

Figura 1

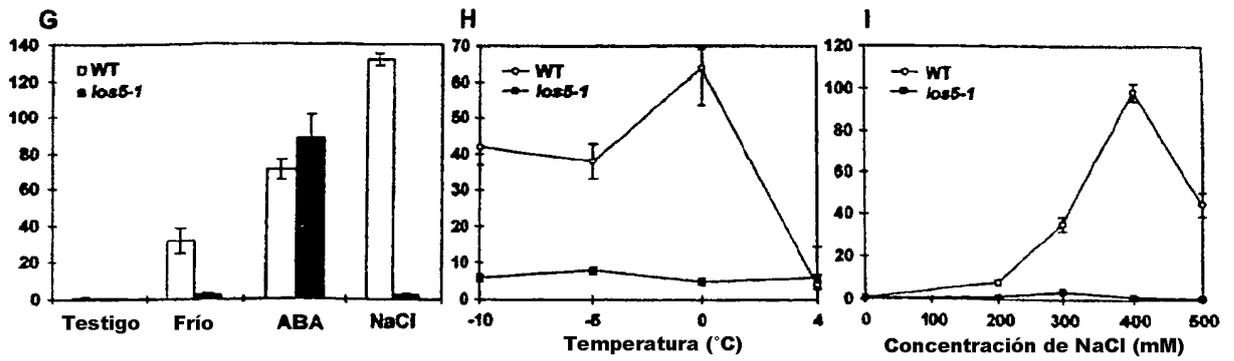
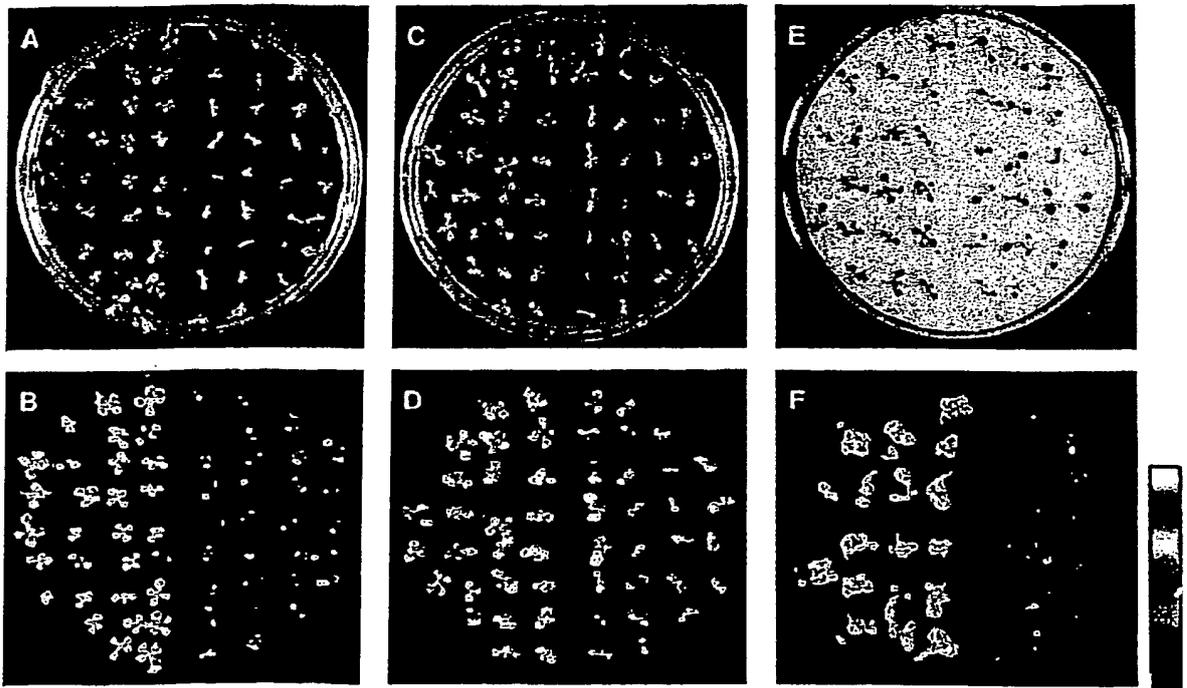


Figura 2

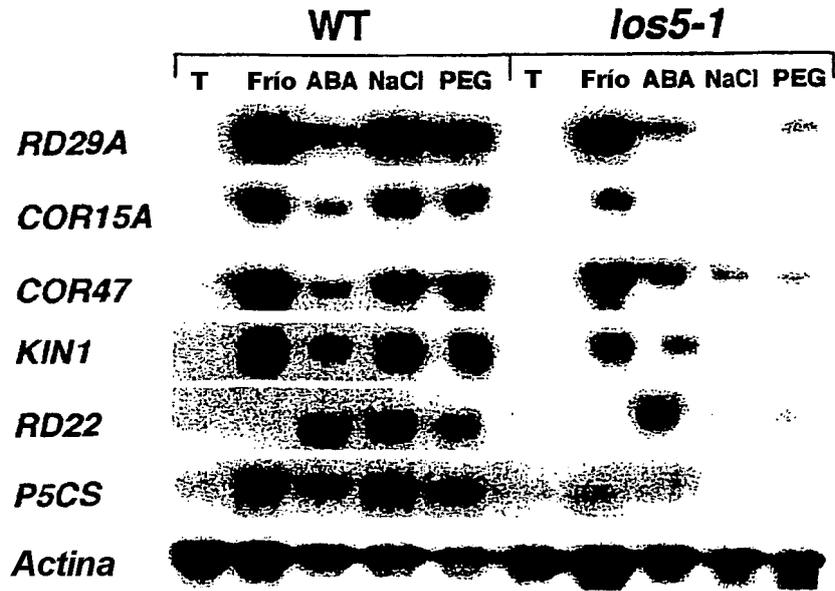


Figura 3

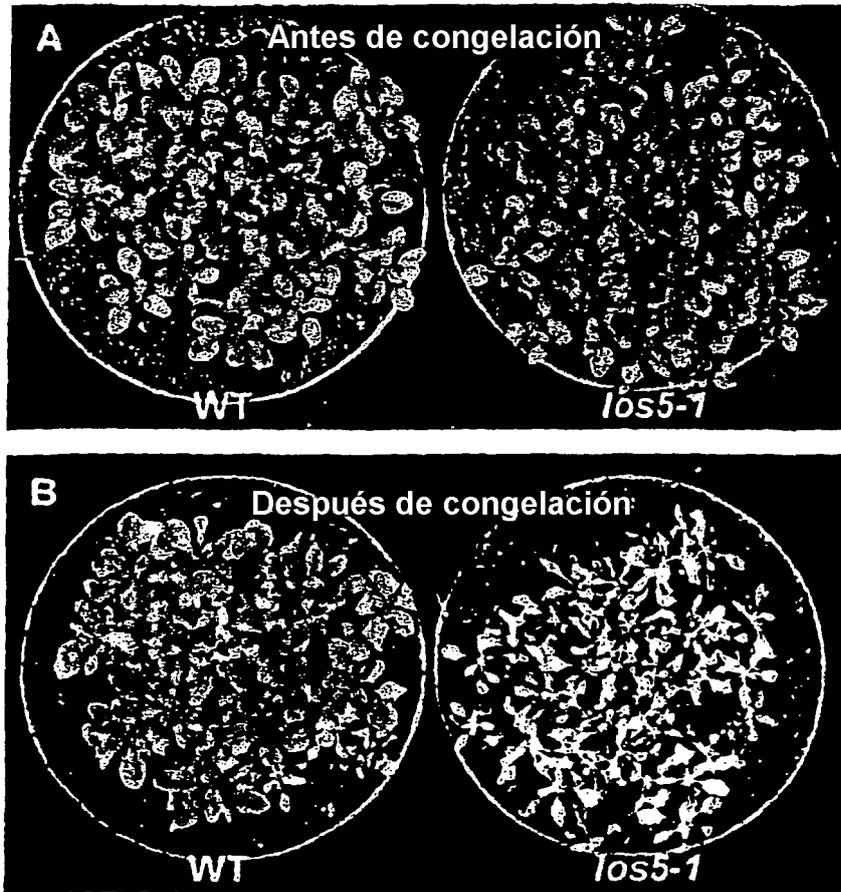


Figura 4

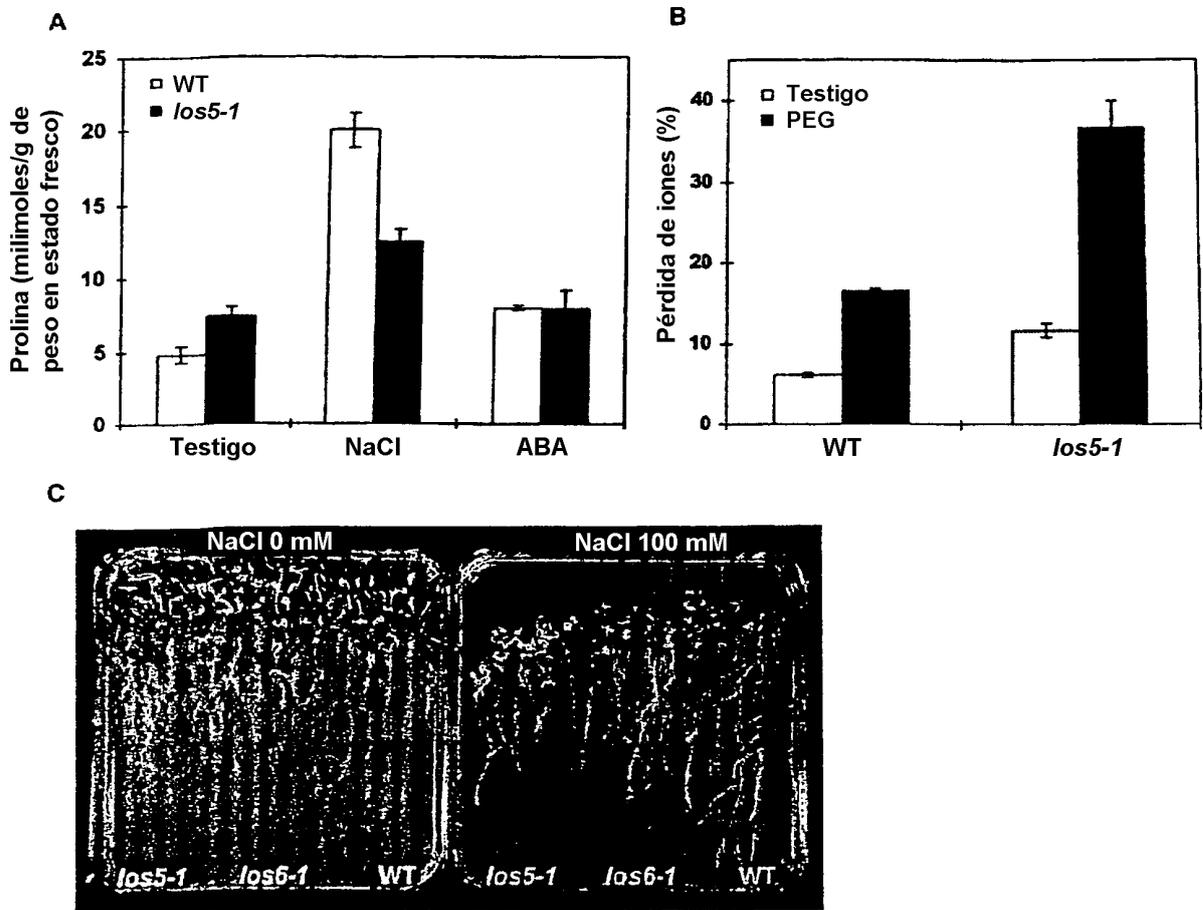


Figura 5

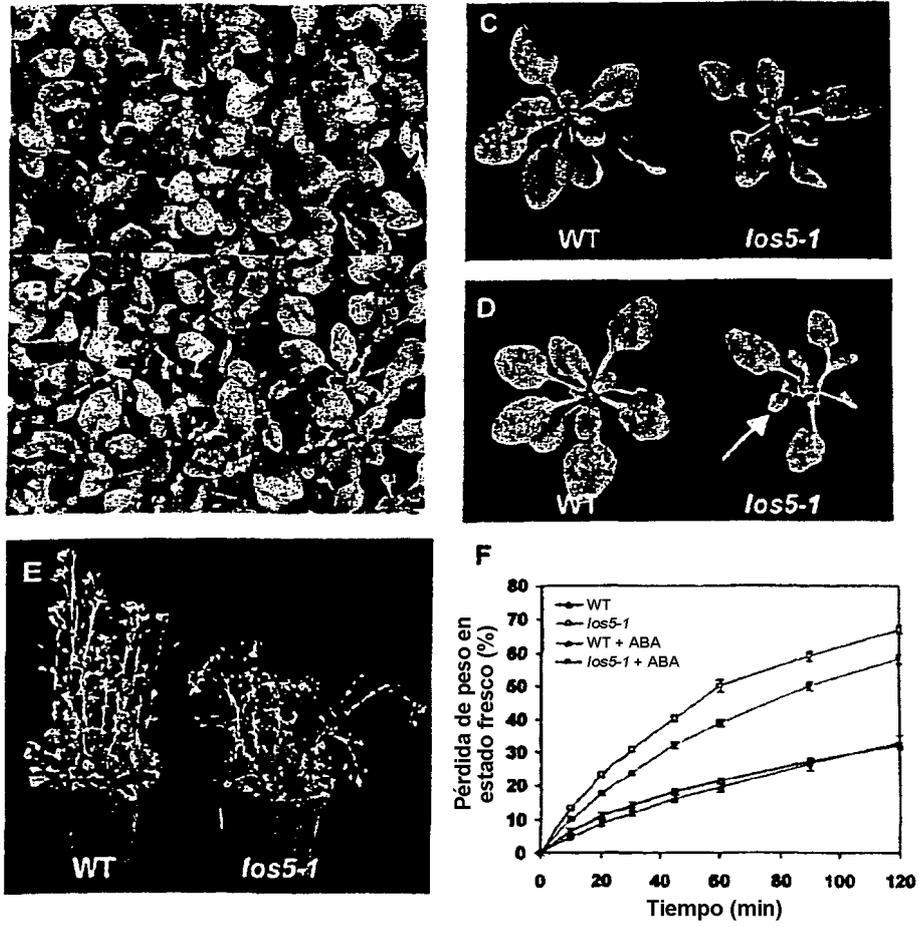


Figura 6

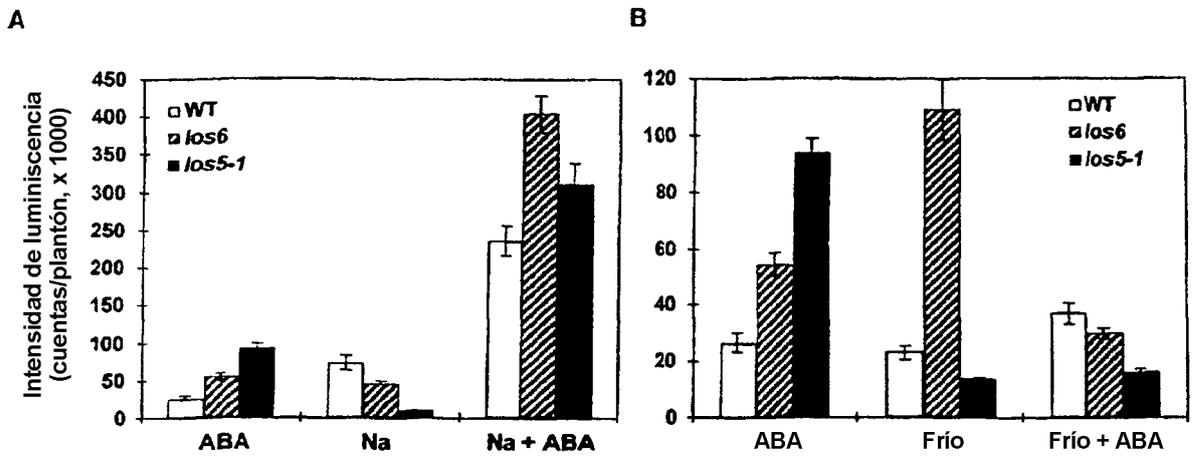


Figura 7

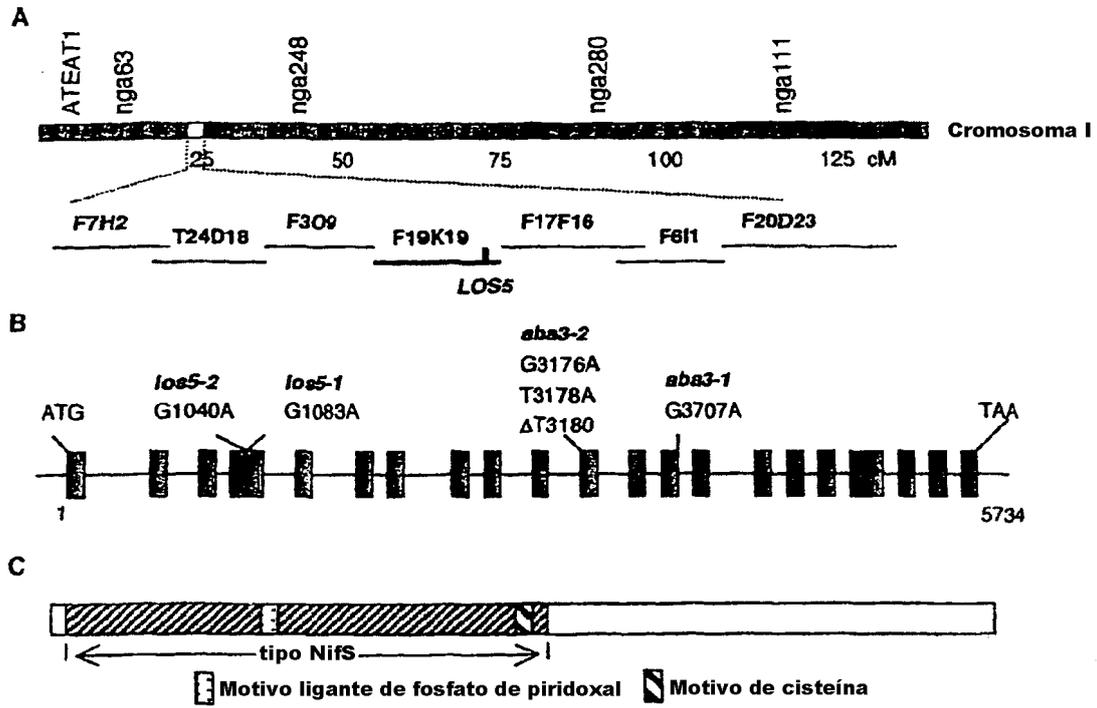


Figura 8

```

1 atggaagcat ttcttaagga attcggagat tattatggat acccagatgg tccaagaac
61 attcaagaga tccgcgacac cgaattcaag agattagata aagggtgtgt atacttggat
121 catgctgggt ctactttgta ttctgagttg cagatggaat atatTTTTaa ggacttcaca
181 agcaatgttt ttggaaatcc acatagtcaa agtgatatca gttcggccac cagtgcctt
241 atagcggatg ctcgacatca ggtgcttgaa tactttaatg catctcctga agattacagt
301 tgcttattca cctccggagc cacagcagcg ctgaagcttg tcggagagac ttttccgtgg
361 acccaagaca gtaatttttt gtataccatg gagaatcaca acagtgtact tggattagg
421 gaatatgcat tagctcaagg tgcttcagca tgtgcagtgg atattgaaga ggcagctaac
481 caaccaggcc agcttacaaa ttcaggacca tctatcaagg taaagcatcg tgctgtgcag
541 atgagaaaca cttctaaact caaaaggaa gagtcaagag gaaatgccta taatctattt
601 gctttccctt cggagtgcga ttttctggc ctgaggttta atctagatct ggtgaagttg
661 atgaaagaaa atactgagac cgtgctacaa ggctccccct ttagcaagag caagcgggtg
721 atggtcttga ttgatgctgc aaagggttgt gctacactac cacctgattt atcggagtat
781 cctgcagatt ttggttctt gtcatctac aagtattttg gttatcctac ttctttatct
841 gctctccttg tacggaatga tgcagccaaa ttgctcaaaa agacttattt tagtggaggc
901 actgttgctg cttcaattgc tgacatcgac tttgtaaaaa gaagggaag ggtggaggag
961 ttttttgagg atggttctgc ttcattcctg agcatagcag ccatccgtca tggcttcaaa
1021 ttactcaagt cgttacacc ttctgcaatt tggatgcaca caacgtcact tccatataat
1081 gtgaaaaaga agcttcaggc ttacgacat ggaaacgggg ctgctgtatg tgttctgtat
1141 ggcagtgaaa atctggagtt atcttcacat aaatcaggcc caacggttac attcaacttg
1201 aaaagacctg atggtcctg gttgcttac ttggaggtgg agaagcttgc ttctttatct
1261 ggaattcagt tacggacagg atgtttttgc aatcctggcg catgtgcaaa gtatctcgag
1321 ttatcccatt ctgagctacg gtctaattga gaggctgggc atatttgctg ggatgacaat
1381 gatgtgataa atggaaaacc aacaggggct gttagggttt cgtttggtta tatgtcaacc
1441 tttgaagatg ccaagaaatt tattgatttc atcataagtt catttgcttc acctccaaag
1501 aagactggga atggaacegt cgtcagtgga aggtttctct aacttcttag tgaagacctt
1561 gaaagttaaag aatcttttcc aagccactac cttaaagtcaa ttactgtata cccgatcaag
1621 tcatgtgctg gattttctgt gatacgttgg ccactttgca gaacaggcct gctgcatgat
1681 cgagaatgga tggttcaggg tctgaccggt gaaattctta cccaaaagaa ggtgcctgag
1741 atgtctctta taaaaacctt tatcgacctt gaggaaggac tactgtctgt agaactctct
1801 cgctgcgaag acaagttgca catcagaatc aagtctgatt catataacc gaggaacgat
1861 gagtttgatt cacatgceaa catacttgaa aaccgtaatg aggaaactag aatcaatcgt
1921 tggttcacca atgccattgg tcgacaatgc aagttgctac ggtattctag ctctacttcc
1981 aaagactgct tgaacagaaa caagagtctt ggtttgtgca gagatttggg aagcaataatc
2041 aactttgcta atgaagctca gttcttgta atctccgagg agagtgttgc tgacctaaac
2101 agaagattag aagcaaaaaga cgaggattac aaacgggctc atgaaaaact caatccacat
2161 aggttcagac caaatctggt tatacttgga ggtgaaccat acggggaaga taaatggaaa
2221 actgtcaaga taggagacaa tcatttcaca tcattgggcg gttgtaaccg gtgccagatg
2281 ataaacataa gtaatgaagc tggactagtg aagaaatcca atgagccctt aacaacttta
2341 gcttcatata ggagagtaaa gggaaagatc ttgtttggaa cgcttttgag atacgagatt
2401 gatgagaaaa gacaatggtg gattggagtt ggggaagaag ttaatccaga tattgaataa

```

Figura 9

LOS5/ABA3	1	-----MFAFLKQDQYTGDPGPKQIQLSDSEKSD--KQVHLNHSSTLYALRSTTTKQTSVWCF
Humano	1	MAQAAASGRZLWITAGSRDYSAPFLAYOTGPGS--KQVHLNHSSTLYALRSTTTKQTSVWCF
Vacuno	1	-----KQVHLNHSSTLYALRSTTTKQTSVWCF
Mosca fruta	1	-----KQVHLNHSSTLYALRSTTTKQTSVWCF
Aspergillus	1	-----MFLSKGTAAAYCSGYSQDQVIRSRVFLK--DQVLDHAGTTLVAFNLPDQFQSLTQALIC
X (Los5-2) * (Los5-1)		
LOS5/ABA3	66	NPHECSDYSSAIVSOLFADARQVQVAYENASFEEDYSCLPTGGTAALKKIVGCFPRADQ-----SGLVITMDFRNSVLTGI
Humano	79	NPHECSDYSSAIVSOLFADARQVQVAYENASFEEDYSCLPTGGTAALKKIVGCFPRADQ-----SGLVITMDFRNSVLTGI
Vacuno	46	NPHECSDYSSAIVSOLFADARQVQVAYENASFEEDYSCLPTGGTAALKKIVGCFPRADQ-----SGLVITMDFRNSVLTGI
Mosca fruta	58	NPHECSDYSSAIVSOLFADARQVQVAYENASFEEDYSCLPTGGTAALKKIVGCFPRADQ-----SGLVITMDFRNSVLTGI
Aspergillus	63	NPHECSDYSSAIVSOLFADARQVQVAYENASFEEDYSCLPTGGTAALKKIVGCFPRADQ-----SGLVITMDFRNSVLTGI
LOS5/ABA3	140	RYVALKOGACACAVQTESSANQPGGLNSGPSIKVQHRAVQKRYTSKIQNLLSRQYALHLENDPSCHEFEQFEDDQVLR
Humano	159	RYVALKOGACACAVQTESSANQPGGLNSGPSIKVQHRAVQKRYTSKIQNLLSRQYALHLENDPSCHEFEQFEDDQVLR
Vacuno	126	RYVALKOGACACAVQTESSANQPGGLNSGPSIKVQHRAVQKRYTSKIQNLLSRQYALHLENDPSCHEFEQFEDDQVLR
Mosca fruta	128	RYVALKOGACACAVQTESSANQPGGLNSGPSIKVQHRAVQKRYTSKIQNLLSRQYALHLENDPSCHEFEQFEDDQVLR
Aspergillus	138	RYVALKOGACACAVQTESSANQPGGLNSGPSIKVQHRAVQKRYTSKIQNLLSRQYALHLENDPSCHEFEQFEDDQVLR
LOS5/ABA3	220	LYLQK-----LTLVLOGSPYKSRVYVLDARKKCAALPSDLS--LTPADVWVLSFYKIEGFTGLGALVHPDAA
Humano	218	LYLQK-----LTLVLOGSPYKSRVYVLDARKKCAALPSDLS--LTPADVWVLSFYKIEGFTGLGALVHPDAA
Vacuno	186	LYLQK-----LTLVLOGSPYKSRVYVLDARKKCAALPSDLS--LTPADVWVLSFYKIEGFTGLGALVHPDAA
Mosca fruta	187	LYLQK-----LTLVLOGSPYKSRVYVLDARKKCAALPSDLS--LTPADVWVLSFYKIEGFTGLGALVHPDAA
Aspergillus	192	LYLQK-----LTLVLOGSPYKSRVYVLDARKKCAALPSDLS--LTPADVWVLSFYKIEGFTGLGALVHPDAA
LOS5/ABA3	290	KRLRKA--YEGGGTAAFLGQDFVWPEE--SVARFEDGTTSEFLVALKHGFDTLERLTGG-----MESHKQHTFELA
Humano	283	KRLRKA--YEGGGTAAFLGQDFVWPEE--SVARFEDGTTSEFLVALKHGFDTLERLTGG-----MESHKQHTFELA
Vacuno	251	KRLRKA--YEGGGTAAFLGQDFVWPEE--SVARFEDGTTSEFLVALKHGFDTLERLTGG-----MESHKQHTFELA
Mosca fruta	265	KRLRKA--YEGGGTAAFLGQDFVWPEE--SVARFEDGTTSEFLVALKHGFDTLERLTGG-----MESHKQHTFELA
Aspergillus	255	KRLRKA--YEGGGTAAFLGQDFVWPEE--SVARFEDGTTSEFLVALKHGFDTLERLTGG-----MESHKQHTFELA
* (aba3-2)		
LOS5/ABA3	359	LYLQK-----LTLVLOGSPYKSRVYVLDARKKCAALPSDLS--LTPADVWVLSFYKIEGFTGLGALVHPDAA
Humano	354	LYLQK-----LTLVLOGSPYKSRVYVLDARKKCAALPSDLS--LTPADVWVLSFYKIEGFTGLGALVHPDAA
Vacuno	322	LYLQK-----LTLVLOGSPYKSRVYVLDARKKCAALPSDLS--LTPADVWVLSFYKIEGFTGLGALVHPDAA
Mosca fruta	343	LYLQK-----LTLVLOGSPYKSRVYVLDARKKCAALPSDLS--LTPADVWVLSFYKIEGFTGLGALVHPDAA
Aspergillus	329	LYLQK-----LTLVLOGSPYKSRVYVLDARKKCAALPSDLS--LTPADVWVLSFYKIEGFTGLGALVHPDAA
* (aba3-1)		
LOS5/ABA3	438	YDQVSSDYSIAVSVAG--HICMEDAVVINGKPTGAVRVSFGVRIETELAKSTDSIISSEAS-----SPKATKQCT--
Humano	432	YDQVSSDYSIAVSVAG--HICMEDAVVINGKPTGAVRVSFGVRIETELAKSTDSIISSEAS-----SPKATKQCT--
Vacuno	400	YDQVSSDYSIAVSVAG--HICMEDAVVINGKPTGAVRVSFGVRIETELAKSTDSIISSEAS-----SPKATKQCT--
Mosca fruta	421	YDQVSSDYSIAVSVAG--HICMEDAVVINGKPTGAVRVSFGVRIETELAKSTDSIISSEAS-----SPKATKQCT--
Aspergillus	409	YDQVSSDYSIAVSVAG--HICMEDAVVINGKPTGAVRVSFGVRIETELAKSTDSIISSEAS-----SPKATKQCT--
LOS5/ABA3	507	-----VVSERFPLLSSEDE-----KISTPRKQVASTVY
Humano	511	-----VVSERFPLLSSEDE-----KISTPRKQVASTVY
Vacuno	478	-----VVSERFPLLSSEDE-----KISTPRKQVASTVY
Mosca fruta	483	-----VVSERFPLLSSEDE-----KISTPRKQVASTVY
Aspergillus	469	-----VVSERFPLLSSEDE-----KISTPRKQVASTVY
LOS5/ABA3	537	YPIKSCAGFQVLR--NPLCRGLIDREEMVQCLT--SILTLQKVEVLEGLIKSFDLQZGHSVYSRCSHK-----
Humano	590	YPIKSCAGFQVLR--NPLCRGLIDREEMVQCLT--SILTLQKVEVLEGLIKSFDLQZGHSVYSRCSHK-----
Vacuno	558	YPIKSCAGFQVLR--NPLCRGLIDREEMVQCLT--SILTLQKVEVLEGLIKSFDLQZGHSVYSRCSHK-----
Mosca fruta	519	YPIKSCAGFQVLR--NPLCRGLIDREEMVQCLT--SILTLQKVEVLEGLIKSFDLQZGHSVYSRCSHK-----
Aspergillus	497	YPIKSCAGFQVLR--NPLCRGLIDREEMVQCLT--SILTLQKVEVLEGLIKSFDLQZGHSVYSRCSHK-----
LOS5/ABA3	606	-----DPRFLKSDSIPRDLDFEENITDQRKELSTRINPTDIAAFAC--GLRHSSTKQCLKAPKSPG-----
Humano	658	-----DPRFLKSDSIPRDLDFEENITDQRKELSTRINPTDIAAFAC--GLRHSSTKQCLKAPKSPG-----
Vacuno	626	-----DPRFLKSDSIPRDLDFEENITDQRKELSTRINPTDIAAFAC--GLRHSSTKQCLKAPKSPG-----
Mosca fruta	590	-----DPRFLKSDSIPRDLDFEENITDQRKELSTRINPTDIAAFAC--GLRHSSTKQCLKAPKSPG-----
Aspergillus	577	-----DPRFLKSDSIPRDLDFEENITDQRKELSTRINPTDIAAFAC--GLRHSSTKQCLKAPKSPG-----
LOS5/ABA3	672	-----LCRDLSNVTYAEACFLLSLTPSVADLNAPSEANGDQFA--AHLKRN--PREFPDLVLSF-----
Humano	724	-----LCRDLSNVTYAEACFLLSLTPSVADLNAPSEANGDQFA--AHLKRN--PREFPDLVLSF-----
Vacuno	692	-----LCRDLSNVTYAEACFLLSLTPSVADLNAPSEANGDQFA--AHLKRN--PREFPDLVLSF-----
Mosca fruta	653	-----LCRDLSNVTYAEACFLLSLTPSVADLNAPSEANGDQFA--AHLKRN--PREFPDLVLSF-----
Aspergillus	657	-----LCRDLSNVTYAEACFLLSLTPSVADLNAPSEANGDQFA--AHLKRN--PREFPDLVLSF-----
LOS5/ABA3	731	-----GLPVGDRNRYVTE-----DNHETSLECCSRCCQMLISAEALVVKSNLPTTLASRREKAKLLQZELRINIFZ
Humano	784	-----GLPVGDRNRYVTE-----DNHETSLECCSRCCQMLISAEALVVKSNLPTTLASRREKAKLLQZELRINIFZ
Vacuno	752	-----GLPVGDRNRYVTE-----DNHETSLECCSRCCQMLISAEALVVKSNLPTTLASRREKAKLLQZELRINIFZ
Mosca fruta	694	-----GLPVGDRNRYVTE-----DNHETSLECCSRCCQMLISAEALVVKSNLPTTLASRREKAKLLQZELRINIFZ
Aspergillus	737	-----GLPVGDRNRYVTE-----DNHETSLECCSRCCQMLISAEALVVKSNLPTTLASRREKAKLLQZELRINIFZ
LOS5/ABA3	803	KRCSTVQVCELDQDQ-----
Humano	853	SSPFTVNSGQVLEVRQENVGHDLPASRKBQVTS-----
Vacuno	821	SSPFTVNSGQVLEVRQENVGHDLPASRKBQVTS-----
Mosca fruta	763	KELEPKLQEMTCGQVLEVR-----
Aspergillus	816	DAZNGCLGTDVQDQVTPFSYDMS-----

Figura 10

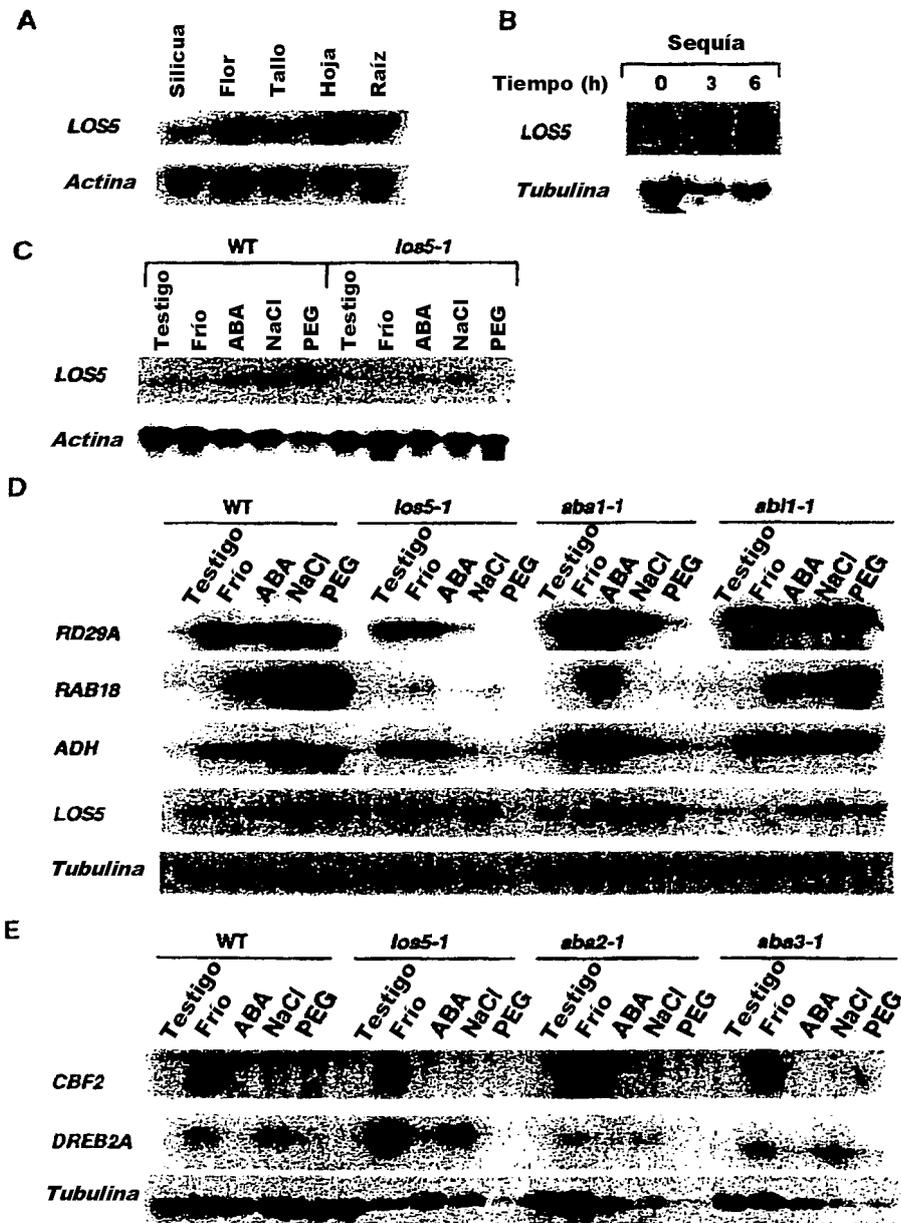


Figura 11



Figura 12

