

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 447 847**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2010 E 10703455 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2393928**

54 Título: **Uso de trehalasa para obtener resistencia a la sequía en plantas**

30 Prioridad:

**09.02.2009 US 207188 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.03.2014**

73 Titular/es:

**VIB VZW (50.0%)  
Rijvisschestraat 120  
9052 Gent, BE y  
KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN, K.U.  
LEUVEN R&D (50.0%)**

72 Inventor/es:

**VAN DIJCK, PATRICK;  
VANDESTEENE, LIES y  
AVONCE, NELSON**

74 Agente/Representante:

**PÉREZ BARQUÍN, Eliana**

**ES 2 447 847 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

Uso de trehalasa para obtener resistencia a la sequía en plantas

5 La presente invención se refiere al uso de trehalasa para obtener resistencia a la sequía y/o sal en plantas. Más específicamente, se refiere a constructos modificados genéticamente, transformados en plantas y que tienen como consecuencia la sobreexpresión de trehalasa, con lo que las plantas transformadas muestran una resistencia a la sequía significativamente mejor durante periodos de sequía, y una mejor recuperación cuando se suministra agua después del periodo de sequía.

10 El disacárido trehalosa ( $\alpha$ -D-glucopiranosil-1,1- $\alpha$ -D-glucopiranosido) es un azúcar no reductor que se encuentra en una diversidad de organismos, incluidas plantas. El papel de la trehalosa se ha asociado a menudo con resistencia al estrés, particularmente resistencia a la desecación. Jang y col. (2003) describen la construcción de plantas de arroz transgénicas con tolerancia al estrés abiótico aumentada, mediante la expresión de una fusión de los genes de  
15 *Escherichia coli* por la trehalosa-6-fosfato sintasa y la trehalosa-6-fosfato fosfatasa. Suarez y col. (2008) obtuvieron una mejora de la tolerancia a la sequía en alubias comunes mediante la sobreexpresión de trehalosa-6-fosfato sintasa. En esos estudios, la acumulación de trehalosa se promueve aumentando la biosíntesis.

20 No obstante, además de por la ruta biosintética, el nivel de trehalosa puede estar influenciado por la degradación de trehalosa. La trehalasa es la única enzima conocida en *Arabidopsis* capaz de degradar la trehalosa en dos unidades de glucosa. La expresión de su gen, *AtTRE1*, está significativamente regulada al alza durante etapas de desarrollo de la planta específicas tales como floración y senescencia y durante condiciones de estrés. Debido a la conexión estrecha entre el metabolismo de la trehalosa y procesos vitales de la planta, el control de nivel restrictivo de trehalosa, o indirectamente de T6P, mediante la actividad de trehalasa puede ser crucial en la regulación fina de  
25 estos metabolitos/estas señales y, subsiguientemente, en el control del crecimiento y el desarrollo de la planta. La trehalasa también puede movilizar niveles de trehalosa inducidos por estrés para permitir la reparación celular subsiguiente, como en el caso de organismos inferiores. Además, una actividad de trehalasa alta también puede evitar perturbaciones del metabolismo del carbono mediante trehalosa externa, liberada por microbios patógenos o simbióticos. No obstante, a pesar de su implicación en múltiples procesos, se sabe poco sobre el papel exacto de la  
30 trehalasa en plantas superiores.

El documento EP 0784095 divulga la acumulación de trehalosa en patata después de la inhibición de trehalasa, bien por adición del inhibidor de trehalasa validamicina A o bien mediante la expresión de ARN antisentido de trehalasa. No obstante, estos experimentos de inhibición se llevaron a cabo en plantas que sobreexpresan trehalosa-6-fosfato  
35 sintasa, dificultando hacer una distinción entre el efecto de la sobreexpresión de la sintasa y el de la inhibición de la trehalasa. El documento WO 2008095919 divulga el uso de la sobreexpresión de un gen de trehalasa para conferir resistencia a nematodos a plantas. No obstante, no se hacía referencia a tolerancia a la sequía o a la sal. Por el contrario, se indicaba que concentraciones de trehalosa superiores tienen como consecuencia una tolerancia aumentada a la sequía y al estrés.

40 Sorprendentemente, encontramos que la sobreexpresión de trehalasa tiene como consecuencia una mejor tolerancia a la sequía y un mejor crecimiento después de volver a regar después de un periodo de sequía. La inactivación del gen de trehalasa provoca una disminución de la tolerancia a la sequía.

45 Un primer aspecto de la invención es el uso de la sobreexpresión de trehalasa recombinante para obtener tolerancia a la sequía y/o sal en plantas.

La trehalasa, tal como se usa en la presente memoria, significa una glicósido hidrolasa que convierte trehalosa en glucosa. Las trehalasas son conocidas por el experto en la técnica e incluyen, pero sin limitación, trehalasas bacterianas, fúngicas y vegetales. Preferentemente, dicha trehalasa es una *Arabidopsis trehalasa*, incluso más preferente es la *Arabidopsis trehalasa TRE1* (número de acceso de Genbank NM\_118536). Una trehalasa recombinante, tal como se usa en la presente memoria, significa que el ácido nucleico que codifica la trehalasa se ha aislado, ha sido opcionalmente modificado y se ha introducido en una planta, dando como resultado una tolerancia a la sequía y/o al estrés modificada. Dicho ácido nucleico puede tener una secuencia codificante optimizada. Secuencias codificantes optimizadas, tal como se usa en la presente memoria, incluye, como ejemplo no limitante, optimización de codón para una mejor traducción, así como mutaciones que pueden aumentar la actividad específica de la proteína. No obstante, la modificación del ácido nucleico es opcional. Como ejemplo no limitante del uso de una trehalasa sin modificación, puede introducirse en la planta el gen de una especie, incluso una especie que no sea vegetal. Dicha introducción puede ser una única copia o pueden introducirse varias copias. Como  
50 alternativa, la planta puede transformarse con el gen endógeno para obtener un número de copias superior del gen y, de este modo, una expresión superior de la proteína trehalasa. Tolerancia a la sequía, tal como se usa en la presente memoria, comprende tolerancia a la sequía durante el cultivo, así como tolerancia a la sequía después de la cosecha, dando como resultado una mayor duración en almacenamiento de la planta cosechada. Como ejemplo no limitante, la tolerancia a la sequía después de la cosecha puede tener como consecuencia una duración en almacenamiento superior de flores ornamentales, o una duración en almacenamiento superior de hortalizas, preferentemente hortalizas tales como, pero sin limitación, lechuga o espinaca.  
55  
60  
65

Preferentemente, dicha sobreexpresión de dicha trehalasa se encuentra específicamente en las células de guarda del estoma. Expresión específica en las células de guarda del estoma, tal como se usa en la presente memoria, significa que la expresión está principalmente influenciada por las células de guarda del estoma, preferentemente  
 5 existe expresión en las células de guarda del estoma y no hay expresión en las células mesófilas o epidérmicas de las hojas de la planta o del tallo de la planta, pero puede existir expresión en partes de la raíz o de las flores. Dicha sobreexpresión específica puede realizarse mediante el promotor endógeno de *Arabidopsis thaliana* *TRE1*.

Los métodos para obtener la sobreexpresión de trehalasa recombinante son conocidos por el experto en la técnica, e incluyen, pero sin limitación, aumentar del número de copias de genes de trehalasa, disponer la secuencia codificante de trehalasa bajo el control de un promotor fuerte o eliminar elementos represores del promotor. Preferentemente, la sobreexpresión de trehalasa se obtiene mediante el aislamiento de un gen de trehalasa, adaptándolo para la sobreexpresión y transformándolo en el interior de una planta. Preferentemente, dicha sobreexpresión tiene como consecuencia una tolerancia aumentada a la sequía. Preferentemente, dicha trehalasa se dispone después de un promotor específico de los estomas y dicha sobreexpresión se produce específicamente  
 10 en las células de guarda del estoma. Otro aspecto más de la invención es el uso de la sobreexpresión de trehalasa para obtener un crecimiento mejorado después de volver a regar después de un periodo de sequía. Volver a regar, tal como se usa en la presente memoria, significa que después de un periodo de sequía, la planta se expone de nuevo al agua. Crecimiento mejorado, tal como se usa en la presente memoria, incluye, entre otras cosas, un periodo de adaptación más reducido después de empezar a volver a regar y un mejor crecimiento después de la adaptación.

Otro aspecto de la invención es el uso de una sobreexpresión de trehalasa recombinante según la invención para limitar la apertura de células del estoma y/o el número de células del estoma por unidad de superficie foliar y/o el índice estomático. Preferentemente, la modulación de la función estomática se realiza mediante la modulación de la apertura del estoma. Preferentemente, dicho uso de trehalasa es la sobreexpresión y dicha modulación de la función estomática es una limitación de la apertura del estoma. Es evidente para el experto en la técnica que una limitación de la apertura del estoma o y/o una disminución del número de células de guarda del estoma por superficie foliar o y/o una disminución del índice estomático puede limitar la pérdida de agua y tener como consecuencia una  
 25 resistencia a la sequía, al menos mientras no se compense la disminución de un factor mediante el aumento de otro factor.

### Breve descripción de las figuras

35 Figura 1: Líneas mutantes de *Arabidopsis AtTRE1*. A) Dibujo de los sitios de inserción de líneas GT *tre* KO y SA *TRE OX* en ADN<sub>g</sub> de *Arabidopsis*. Se muestran los sitios de inserción exactos (líneas continuas) y predichos (líneas punteadas) de SA *TRE OX*. Para GT *tre* KO, se confirmó el sitio de inserción predicho. También se muestran las posiciones de series de cebadores; las cajas negras son exones. B) Expresión de trehalasa relativa de líneas GT *tre* KO en comparación con el ecotipo *Landsberg erecta (Ler)* de *Arabidopsis thaliana* de tipo silvestre (wt) C) Expresión de trehalasa relativa de líneas SA *TRE OX* en comparación con el ecotipo *Colombia (Col)* de *Arabidopsis thaliana* wt. Se muestran los resultados para B) y C) de PCR en tiempo real normalizados por actina a partir de una línea representativa. Las plántulas homocigóticas se cultivaron durante 10 días en 1 x MS (1 % de sacarosa, 12 h-12 h de ciclo día/noche). Los datos son medias  $\pm$  SE, n=2, con  $\pm$  100 plántulas por experimento.

45 Figura 2: Actividad de trehalasa de líneas mutantes *AtTRE1* de *Arabidopsis*. Las actividades de trehalasa (nkat/g de proteína) se determinaron A) en hojas adultas de plantas wt *Col* y SA *TRE OX*, cultivadas en suelo; B) en mezclas de material de silícula joven y maduro de wt *Ler* y GT *tre* KO, cultivadas en suelo (los datos son valores medios de material de planta mezclado de diferentes plantas por línea).

50 Figura 3: Fenotipos de crecimiento de mutantes *AtTRE1* en trehalosa. A) Líneas GT *tre* KO y wt *Ler* con Val A. B) líneas SA *TRE OX* y wt *Col* con Val A. C) líneas GT *tre* KO y wt *Ler* sin Val A. D) Líneas SA *TRE OX* y wt *Col* sin Val A. Aproximadamente 30 plántulas/tratamiento se cultivaron en placas verticales, 1 x MS sin sacarosa, en un ciclo de 12 h-12 h de día/noche, durante 10 días con trehalosa 0, 0,5, 1, 5, 10 o 25 mM. Los datos son medias  $\pm$  SE.

55 Figura 4: Fenotipos de crecimiento de mutantes *AtTRE1* en concentraciones elevadas de trehalosa. Las plántulas se cultivaron en las mismas condiciones que se describen en la Fig. 3, sin Val A y con una concentración superior de trehalosa: 50, 100, 150 y 200 mM. Se muestran plántulas representativas.

60 Figura 5: Uso de carbohidrato de plántulas de mutante *AtTRE1*. A) Plantas SA *TRE OX* y plantas wt *Col* se cultivaron en placas orientadas de forma horizontal con 1 x MS, 0 %, 3 %, 6 % de sacarosa o glucosa, 16 h-8 h, 10 días. B) Plantas GT *tre* KO y plantas wt *Ler* (mismas condiciones que en A). C) Plantas SA *TRE OX* y plantas wt *Col* cultivadas en placas orientadas de forma vertical con luz continua con el 1 % de sacarosa, 0,5 x MS, 6 días. B) Plantas GT *tre* KO y plantas wt *Ler* (mismas condiciones que en C). Se muestran plántulas representativas.

65 Figura 6: Crecimiento de hojas de mutantes *AtTRE1* en ritmos diurnos diferentes. A) Hojas de wt *Ler* (primera línea) y plantas GT *tre* KO (dos líneas diferentes), ciclo de 12 h-12 h de día/noche. A) Hojas de wt *Ler* (primera línea) y

plantas GT *tre* KO (dos líneas diferentes), ciclo de 16 h–8 h de día/noche. A) Hojas de wt Col (primera línea) y plantas SA TRE OX (dos líneas diferentes), ciclo de 12 h–12 h de día/noche. A) Hojas de wt Col (primera línea) y plantas SA TRE OX (dos líneas diferentes), ciclo de 16 h–8 h de día/noche. Los cotiledones y hojas en roseta se disponen en orden de aparición. Plantas de 4 semanas de edad, cultivadas en suelo. Se muestran plántulas representativas.

**Figura 7:** Reproducción de mutantes *AtTRE1*. A) Floración temprana de plantas GT *tre* KO en comparación con plantas wt Ler, cultivadas en suelo, 4 semanas de edad (16 h-8 h). B) Vista del desarrollo vegetal de plantas wt Ler y GT *tre* KO y C) plantas wt Col y SA TRE OX, cultivadas en suelo durante 7 semanas (16 h-8 h). D) Detalle de flores y silículas de plantas wt Ler y GT *tre* KO. Se observaron fenotipos varias veces y se muestran plantas representativas.

**Figura 8:** Desarrollo de plántulas de mutantes *AtTRE1* a temperatura elevada. Germinación y crecimiento de plántulas SA TRE OX y GT *tre* KO y tipos silvestres respectivamente en 33 °C (luz continua baja, 1 x MS, 1 % de sacarosa, 10 días). Se muestran plántulas representativas.

**Figura 9:** Respuestas a la sequía de plantas *AtTRE1* OX y KO de Arabidopsis. Respuestas al estrés por sequía de plantas, cultivadas en suelo, en condiciones de riego normales durante 4 semanas, se detiene el riego durante 2 semanas (A, B) y un par de días después se vuelve a regar (C, D). Se muestran plantas representativas.

**Figura 10:** Localización de AtTRE1 en protoplastos mesófilos. A) Imagen de microscopía de luz de protoplastos usando contraste de interferencia oscuro. B) Localización de AtTRE1 con fluorescencia GFP principalmente en la membrana plasmática. C) La autofluorescencia de cloroplastos.

**Figura 11:** Patrones de expresión de *AtTRE1* en plántulas de 10 D de edad (cultivo en 1 x MS), usando líneas de inserción únicas de promotor-GUS/GFP después de tinción con GUS. A: expresión en hoja A, hoja 2 y primordio foliar; B: expresión en células de guarda del estoma.

**Figura 12:** Ensayo de cierre y apertura de los estomas de líneas AtTRE1 OX y KO. Diferencias en apertura de los estomas en líneas de sobreexpresión (OX) de trehalasa en comparación con las de inactivación de trehalasa (KO) y las plantas de tipos silvestre.

**Figura 13:** Ensayo de recuento de células pavimentosas y de los estomas de líneas AtTRE1 OX y KO. Número de estomas (A) y células pavimentosas (B) contadas en una muestra de 0,142 mm<sup>2</sup> para plantas que sobreexpresan (OX) trehalasa en comparación con la línea de inactivación (KO) y las plantas de tipo silvestre.

**Figura 14:** Índice estomático de líneas *AtTRE1* OX y KO. El índice estomático corresponde a la relación de los estomas por número total de células en la epidermis ( $N^{\circ}$  de estomas / (2 x  $N^{\circ}$  de estomas +  $N^{\circ}$  de células pavimentosas)).

## Ejemplos

### MATERIALES Y MÉTODOS PARA LOS EJEMPLOS

*Plantas de Arabidopsis usadas en este estudio*

Tabla I: líneas vegetales

Nombre	Ecotipo	Fuente
SA TRE OX (SALK_151791)	Colombia	ABRC*
GT <i>tre</i> KO (GT_16843)	Landsberg erecta	CSHL*

\* A partir de las líneas encargadas, se obtuvieron plantas homocigóticas en este estudio

*Cebadores usados en este estudio*

Tabla II: Clonación y cebadores de mutagénesis dirigida al sitio

Cebador	Secuencia	RE
AtTRE1fw	GGAAGATCTATGAAATCATACAACTTAATAACC	BglII
AtTRE1rv	TCCCCGGGGGCTTCAATGCTAAGATGAGAG	SmaI
AtTRE1717sdmfw	AACTATCTTGCTACAAGAAAAGTGGGACTA	
AtTRE1717sdmrv	TAGTCCCACTTTTCTTGATAGACAAGATAGTT	

Abreviaturas: fw (sentido directo), rv (sentido inverso); RE (enzima de restricción).

Tabla III: Cebadores de PCR en tiempo real y cebadores de RT-PCR semicuantitativa

Nombre del cebador	Secuencia
AtTREP1fw	ACATGGAAGGCTGAGAACC
AtTREP1rv	CCAAGAAATAATCCACTACG
AtTREP2fw	CCTCTCATCTTAGCATTGAAG
AtTREP2rv	CCAAGAAATAATCCACTACGAT
AtTREP3fw	AGCGAGAGAGAAAGCGTTTC
AtTREP3rv	CCTTCCATGTCTCAGATTCC
ACTIN2fw	GAAGAGCACCTGTTCTTCT
ACTIN2rv	TGGCGTACAAGGAGAGAACA

Tabla IV: Cebadores para controlar la inserción en mutantes de Arabidopsis

Cebador	Secuencia	Línea mutante
Lba1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	SALK
Ds3	CCGTCCC GCAAGTTAAATATG	GT
AtTREL P1	GCCTTTTTCAA ACTCAAGTTGCAC	SA TRE OX
AtTRER P1	GAGTTTATTATGTGTGTGCGTGGA	SA TRE OX
AtTREL P2	ACTCATCTCCACGCACACAC	GT tre KO
AtTRER P2	AATCTCGAACCGGGAATGAT	GT tre KO

5 Abreviaturas: SA (líneas SALK); GT (línea Genetrap), LP (cebador izquierdo) y RP (cebador derecho)

#### Plásmidos usados en este estudio

10 Se clonó trehalase CDS (material fuente: silículas y flores de *Arabidopsis thaliana* de tipo silvestre ecotipo *Colombia*) en el vector vegetal pGFP (Kovtun y col., 1998; 2000; Hwang y Sheen, 2001). pGFP= pUC18 modificado para fusión con GFP. La secuencia CDS se sometió a blast frente a series de datos de secuencias codificantes iniciativa del genoma de Arabidopsis TAIR ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) y las mutaciones, que causaron cambios de aminoácidos, se corrigieron mediante mutagénesis dirigidos al sitio (sdm).

15 *Medios de cultivo y condiciones de cultivo*

#### Esterilización en fase vapor de semillas de Arabidopsis

20 Se esterilizaron semillas de Arabidopsis transgénica y de tipo silvestre, ecotipo *Col* y ecotipo *Ler* en fase vapor según un protocolo adaptado a partir de Ye y col. (1999). Las semillas se colocaron en tubos de microcentrifugación abiertos y se dispusieron dentro de un recipiente desecador, en el que humos de lejía-cloro esterilizan las semillas de un periodo de 3-9 h (lejía + HCl concentrado). Después de esto se añade agua estéril operando en flujo laminar, seguido por un tratamiento en frío de 48 h con luz constante por imbibición y estratificación.

25 Cultivo en suelo

Se sembraron semillas esterilizadas al vapor, después de un periodo de estratificación de 48 h, en suelo húmedo y se hicieron germinar durante dos días con humedad elevada. En general, se cultivaron en ciclos de 12 h-12 h, 16 h-8 h de día/noche o luz continua (21 °C, 60 % de humedad, 100  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ).

30 Cultivo in vitro

Las semillas esterilizadas en vapor se sembraron después de un periodo de estratificación en placas de Petri orientadas de forma vertical u horizontal en un medio de mezcla de sales de Murashige y Skoog (MS) de fuerza total (o si se menciona, de otra manera) que incluye vitaminas (4,3 g/l) con MES (0,5 g/l) y se solidificó con Phytagar (8 g/l) (Duchefa, Haarlem, Países Bajos). Los medios se enriquecieron con sacarosa/glucosa (0-6 %) o trehalosa, dependiendo de las condiciones de ensayo que se especifican. Se añadió Val A en una concentración 10  $\mu\text{M}$ .

40 Selección de transformantes de plantas y líneas de plantas homocigóticas

Para la selección de plantas homocigóticas, se seleccionaron líneas SALK y líneas GT (con el gen del marcador *NTPII* como marcador de selección) 1 x MS + Kanamicina (50 µg/ml, Sigma-Aldrich). Para el cultivo en medios MS con medios selectivos, las semillas se hicieron germinar durante 7 días en MS y antibióticos, los positivos se transfirieron a suelo para que florecieran y recoger semillas.

5

*Técnicas moleculares, fisiológicas y bioquímicas*

Extracción de ARN de plantas y preparación de ADNc

10 Las muestras de plantas (plántulas) se recogieron e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido. La extracción de ARN de material vegetal se realizó con reactivo Trizol (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Para cada muestra, se realizó una transcripción inversa (RT) usando 1 µg de ARN total (Sistema de transcripción inversa, Promega).

15 Aislamiento de ADN de plásmido a partir de células bacterianas

Mini preparación – método CTAB (Del Sal y col., 1988)

Mini preparación – kit Miniprep de plásmido GenElute™ (Sigma-Aldrich)

20

Maxi preparación – Sistema Maxiprep de plásmido de rendimiento puro (Promega)

Aislamiento de ADN genómico rápido de plantas de Arabidopsis

25 Después de triturar una hoja de tamaño medio con destornillador-mortero en 100 µl de tampón TPS (Tris-HCl 100 mM, pH 9,5, KCl 1 M, EDTA 10 mM), las muestras se incubaron a 70 °C durante 20-30 min. Los desechos se sedimentaron mediante centrifugación a velocidad máxima durante 10 min a TA y los sobrenadantes se transfirieron a un tubo de eppendorf nuevo. Para reacciones PCR posteriores, se usaron de 0,5 a 1 µl de sobrenadantes en una reacción de 20-50 µl.

30

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Reacciones PCR estándar

35 Las reacciones PCR se realizaron usando diferentes kits de la polimerasa, según las recomendaciones del fabricante; Taq Polimerasas de alta fidelidad (Roche), ADN polimerasa de alta fidelidad de fusión (FINNZYMES) y ADN polimerasa HF Ultra Pfu (Stratagene) para clonación y ExTaq (TAKARA) para PCR diagnóstica.

Purificación de productos PCR

40

Se añadió una cantidad igual de PCI al producto PCR (45 µl-45 µl), vórtice, y se centrifugó a velocidad máxima durante 5 min. A los sobrenadantes transferidos se añadió NaAc 3 M (3,6 µl) y etanol puro enfriado con hielo (109 µl), vórtice, y se centrifugó durante 1 min a velocidad máxima. Después de lavado adicional con etanol al 80 % enfriado con hielo, el sedimento se secó y se disolvió en 12,5 µl de H<sub>2</sub>O. Los productos PCR también podrían purificarse usando el sistema Wizard SV Gel y PCR Clean-UP (Promega, USA), según las instrucciones del fabricante.

45

RT-PCR semicuantitativa

50 Se realizó una PCR en muestras de ADNc diluidas igualmente a 250 ng/µl y se usó como control un gen de control. El producto PCR se aplicó sobre un gel de agarosa al 1 % y se visualizó con tinción de gel de ADN SYBR Safe (Invitrogen)

PCR en tiempo real

55

La reacción de 25 µl en PCR en tiempo real estaba compuesta por 12,5 µl de Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), 0,5µl de tinte de referencia ROX, 1,25 µl de cada cebador de una solución madre 500 nM y 5 µl de mezcla de ADNc (100 ng/µl). El programa de PCR comprendía una desnaturalización de 2 min a 95 °C, amplificación mediante 50 ciclos de 15 s a 95 °C, 1 min a 58 °C. Los niveles de expresión se analizaron con el prisma ABI y se normalizaron todos para la expresión de *ACTIN2*.

60

*Mutagénesis dirigida al sitio (sdm)*

65 La mutagenesis dirigida al sitio (sdm) se realizó según el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange de Stratagene. Como tales, se crearon mutaciones, inserciones y deleciones puntuales en un plásmido con ADN

polimerasa HF Ultra Pfu (Stratagene).

#### *Expresión transitoria en protoplastos mesófilos de Arabidopsis*

5 Se usaron plantas de Arabidopsis de tres a cuatro semanas de edad (en suelo, ciclo de 12 h-12 h de día/noche, con luz baja, 50-75  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) con hojas verdaderas sanas, no estresadas y bien expandidas. Esta técnica se describe en detalle por Yoo y col., (2007) (<http://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb/protocolsreg.html>). Brevemente, después de la eliminación de la pared celular, se liberaron, se lavaron y se recogieron protoplastos. Se realizó la transfección por DNA-PEG4000 (plaquetas, Fluka)-Calcio de  $2 \times 10^4$  protoplastos por 10-20  $\mu\text{g}$  de ADN de plásmido exento de endotoxina (maxiprep). Los protoplastos transfectados se incubaron durante 6 h con luz antes de recogerlos.

La localización subcelular en células de protoplastos mesófilas de la proteína de interés puede determinarse mediante análisis por microscopía de fluorescencia usando los vectores marcados con GFP.

#### *Mediciones de trehalasa en material vegetal*

Se homogeneizó material de hojas bruto (300 mg, mezcla de material de planta/plantas diferentes) y se espolvoreó sobre hielo, se suspendió en 2 ml de tampón de extracción enfriado con hielo (0,1 M MES/ $\text{K}^+$ , pH 6; PMSF 1 mM, EDTA 2 mM, 10 mg/g de PVP insoluble FW, polivinilpirrolidona). La suspensión se agitó en vórtice y se centrifugó (13000 rpm, frío, 10 min). Los sobrenadantes se sometieron a diálisis (sistema de microdiálisis BRL) ON a 4 °C frente a tampón MES pH 7 con 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$ . La actividad de trehalasa se determina mediante un método descrito por Pemambuco y col. (1996) adaptado a placas de microvaloración. Se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de muestra sometida a diálisis a 50  $\mu\text{l}$  de tampón de trehalosa (trehalosa 250 mM, MES 25 mM, pH 7, 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$ ). La placa de microvaloración se incubó durante 30 min a 30 °C y la reacción se detuvo hirviendo durante 5 min a 95 °C en un baño de agua caliente. Se determinó la glucosa usando el método de glucosa oxidasa-peroxidasa añadiendo 200  $\mu\text{l}$  de GOD-PAP (Dialab) (blancos: contenido de glucosa residual en cada muestra determinada hirviendo muestras antes de la adición de trehalosa). Se midió A505 después de 15 min de incubación a 30 °C. La cantidad de proteína se determinó usando el método de Lowry con BSA como patrón (Lowry y col., 1951).

#### EJEMPLO 1: Aislamiento de mutantes de AtTRE1 de Arabidopsis

La línea Genetrapp (GT) de inserción de transposones 'GT\_16843' (*A. thaliana*, ecotipo Ler) se produjo originalmente en el Laboratorio Cold Spring Harbor de Martienssen (Sundaresan y col., 1995; Martienssen, 1998). En base a las secuencias flanqueantes del sitio de inserción obtenidas por TAIL-PCR (Liu y col., 1995), se predijo que la línea 'GT\_16843' portaba una única inserción de un elemento Ds trasladable GT, 395 pb posteriormente al codón de inicio ATG, en el medio del primer exón del gen *AtTRE1* (Fig. 1A). Los descendientes T3 mostraron segregación 3:1 (susceptible a resistencia) en medio de selección KAN, consistente en una única inserción. Las líneas homocigóticas se obtuvieron y confirmaron por PCR (serie de cebadores Ds3, AtTRELP2-RP2) y se confirmó el sitio de inserción predicho CSHL. La RT-PCR semicuantitativa (serie de cebadores AtTREP1fw-rv) y PCR en tiempo real (serie de cebadores AtTREP2fw-rv, Fig. 1 B) revelaron una regulación a la baja fuerte de *AtTRE1* en las plantas 'GT\_16843' homocigóticas, designadas en adelante en la presente memoria plantas 'GT *tre* KO'.

La línea 'SALK\_151791' (*A. thaliana*, ecotipo *Col*) (Fig. 1A), originado por el Instituto SALK (Alonso y col., 2003) estaba disponible en el Centro de Investigación Biológica de Arabidopsis (ABRC) y se pidió mediante NASC. A partir de las semillas pedidas, seleccionamos plantas, homocigóticas para una inserción única de ADN-T en el ADNg de *AtTRE1*. Después de la selección KAN, las plantas se analizaron homocigóticamente con cebadores Lba1 y series de cebadores AtTRELP1-RP1 (diseñados con SIGnAL). Se obtuvieron secuencias de inserción de ADN-T flanqueantes de 304 pb anteriormente al codón de inicio (TAIR predicho de 211 pb en frente del codón de inicio ATG). Sorprendentemente, la RT-PCR semicuantitativa (AtTREP1fw-rv) reveló una expresión de *AtTRE1* superior en los mutantes, lo que sugiere OX en vez de KO. Esto se confirmó mediante PCR en tiempo real (Fig. 1C, las plantas SALK\_151791 homocigóticas se designaron en adelante SA *TRE* OX). La inspección minuciosa del extremo izquierdo del ADN-T revelaron un promotor 35S CaMV, que podría ser responsable de esta sobreexpresión. También es posible la inserción del ADN-T en una región importante para la regulación de la transcripción (por ejemplo un sitio de unión al represor).

Las mediciones de la actividad de trehalasa en diferentes tejidos vegetales demostraron que plantas SA *TRE* OX mostraban una actividad de trehalasa muy superior a la de las plantas de tipo silvestre de control. Por ejemplo, se observó hasta 25 veces más actividad de trehalasa en hojas adultas de *TRE* OX en comparación con las hojas de *Col* de tipo silvestre (Fig. 2A). Por el contrario, se midió una actividad de trehalasa de muy baja a no detectable en las hojas y silículas (Fig. 2B) de las plantas GT *tre* KO en comparación con las plantas de control.

#### EJEMPLO 2: Caracterización fenotípica de mutantes AtTRE1

65 La trehalasa causa efectos dramáticos en el metabolismo, el crecimiento y el desarrollo de plantas. La validamicina

A (Val A) inhibe específicamente la actividad de trehalasa e impide el uso de trehalosa como una fuente adicional de glucosa. Debe indicarse que, aunque el tratamiento con Val A altera las respuestas al estrés y la reproducción de plantas adultas e incluso causa fitotoxicidad, no se observan irregularidades fenotípicas en plántulas (Wingler y col., 2000; Müller y col., 2001; Ishikawa y col., 2005; 2007; Ramon y col., 2007).

5 En nuestro ensayo de cultivo, no se añadió azúcar adicional a los medios. Como se sabe por la literatura, los niveles aumentados gradualmente de trehalosa en presencia de Val A, provocan la inhibición del crecimiento radicular y el desarrollo de plántulas de tipo silvestre (Fig. 3A, B). La sensibilidad a la trehalosa difiere entre los ecotipos Ler y *Col*, con un efecto inhibitor más bien gradual en plantas de tipo silvestre Ler y una disminución más pronunciada en la longitud de la raíz de plantas de tipo silvestre *Col* a una concentración 10 mM de trehalosa. Las líneas GT *tre* KO mostraron una inhibición del crecimiento similar en trehalosa que las plántulas Ler de tipo silvestre en presencia de Val A (Fig. 3A), consecuente con la falta de actividad de trehalasa en ambas plantas. Por el contrario, las plantas SA *TRE* OX fueron significativamente más resistentes a niveles altos de trehalosa que los controles de tipos silvestre en presencia de Val A (Fig. 3B), sugiriendo que la cantidad de Val A (10 µM) no es suficiente para inhibir la actividad de trehalasa aumentada en las líneas OX.

En ausencia de Val A, puede usarse trehalosa suministrada de forma externa como una fuente de glucosa adicional para el crecimiento. En concentraciones altas de trehalosa, plántulas de tipo silvestre con el desarrollo detenido poco después de la germinación, muestran una extensión de cotiledones alterada y el desarrollo únicamente de raíces primarias cortas (Wingler y col., 2000).

De forma interesante, a contenidos bajos de trehalosa, las plántulas GT *tre* KO no parecen ser capaces de usar la fuente de glucosa adicional para el crecimiento (Fig. 3C), debido a la falta total de actividad de trehalasa. Además, con concentraciones de trehalosa crecientes, los mutantes KO se ven significativamente más afectados en su desarrollo, en comparación con controles Ler de tipo silvestre (Fig. 3C, Fig. 4). Por el contrario, las plantas SA *TRE* OX parecen ser insensibles a concentraciones altas de trehalosa en comparación con plántulas de tipo silvestre (Fig. 3D, Fig. 4).

Se ha informado que los mutantes en el metabolismo de trehalosa muestran sensibilidad a azúcares complementarios y T6P se ha destacado como un regulador importante para el uso de carbohidratos (Schluepmann y col., 2003; Avonce y col., 2004).

Cuando se cultivan en concentraciones de azúcar gradualmente crecientes, las plántulas SA *TRE* OX muestran un desarrollo de la hoja y el hipocótilo similar a las semillas control (placas orientadas de forma horizontal, ciclo de 16 h-8 h de día/noche (Fig. 5A). No obstante, el crecimiento de raíces de plántulas SA *TRE* OX se vio significativamente afectado, con longitud reducida y ramificación de raíz aumentada. Este fenotipo aberrante también se observó en placas orientadas de forma vertical en luz continua con el 1 % de sacarosa (Fig. 5C). No obstante, los mutantes mostraron un crecimiento de raíz algo acelerado en medios sin azúcares. Conjuntamente, parece que la sobreexpresión de trehalasa permite que las plántulas usen eficazmente suministros de carbono en condiciones de baja energía, pero los hace incapaces de hacerlo en condiciones de alta energía. Por el contrario, pudo observarse un crecimiento radicular ligeramente mayor de GT *tre* KO cuando había más energía disponible (Fig. 5B, D), y de forma interesante, las plantas GT *tre* KO parecieron germinar más lentamente en medios sin sacarosa.

Las plantas con el metabolismo de trehalosa manipulado genéticamente muestran típicamente irregularidades fenotípicas significativas, con fisiología y morfología alterada. También el tratamiento con Val A puede alterar la reproducción y puede incluso causar fitotoxicidad (Müller y col., 1995; Müller y col., 2001; Ishikawa y col., 2005; 2007).

A pesar de nuestra sorpresa, al alteración de las actividades de trehalasa endógena no parecía causar irregularidades fenotípicas graves en *Arabidopsis*. Notamos una velocidad de germinación más lenta de semillas GT *tre* KO en suelo en un ciclo de 12 h-12 h de día/noche y este fenotipo se anuló cuando se aumentó el periodo de luz a 16 h. Además, en un ciclo de 12 h-12 h de día/noche, las hojas de las plantas GT *tre* KO fueron más pequeñas (Fig. 6A) y cuando se aumentó la duración del día, la velocidad de crecimiento de estas plantas KO aumentó (Fig. 6B, etapas de crecimiento según Boyes y col. (2001), 1.10 para wt y 1.11 para KO).

Esta observación sugiere de nuevo que el crecimiento de plantas con la actividad de trehalasa alterada, depende fuertemente de la energía disponible. Las plantas GT *tre* KO parecen tener problemas para afrontar condiciones de energía baja, mientras que se logran velocidades de crecimiento superiores cuando está disponible más energía, por ejemplo mediante fotosíntesis más prolongada o azúcares suministrados. Por el contrario, las plantas SA *TRE* OX crecieron ligeramente mejor que los controles en condiciones de carbohidrato (Fig. VI.6C, por ejemplo, hoja en roseta N° 9), aunque en un ciclo de 16 h-8 h de día/noche, no se observó un fenotipo de crecimiento obvio (Fig. 6D).

De forma interesante, las plantas GT *tre* KO que comenzaron a florecer más pronto que las de tipos silvestre (ciclo de 16 h-8 h de día/noche) (Fig. 7A), mostraron tallos de inflorescencia más largos y orientación de silículas alterada (Fig. 7B;D). Los tallos de plantas SA *TRE* OX (Fig. 7C) parecían alto más pequeños, pero no se pudieron observar otros fenotipos obvios.

**EJEMPLO 3:** Trehalasa y respuestas al estrés

5 Dado que las plantas modificadas con trehalasa se comportaron mejor en múltiples tratamientos de estrés, analizadas plantas OX y KO con trehalasa en condiciones de estrés variables.

10 Cuando se realizó el estrés al calor durante la germinación (33 °C, luz baja continua, 1 x MS, 1 % de sacarosa), notamos un mejor desarrollo de plántulas tempranas de semillas SA *TRE* OX en comparación con semillas de tipos silvestre, al contrario que en líneas GT *tre* KO (Fig. 8).

15 Estos resultados, junto con amplias pruebas circunstancial de papeles clave del metabolismo de trehalasa en respuestas al estrés abiótico, nos da incentivos para examinar con detenimiento más estreses medioambientales como los estreses por sequía y deshidratación en la etapa vegetativa. Plantas KO y OX de cuatro semanas de edad cultivadas en un ciclo de 16 h-8 h de día/noche (en suelo con régimen de riego controlado), se sometieron a estrés por sequía durante 2 semanas y después se volvió a regar. Al contrario que las operaciones con líneas GT *tre* KO, las plantas SA *TRE* OX resistieron y se recuperaron mucho mejor el estrés por deshidratación (Fig. 9).

**EJEMPLO 4:** Análisis la expresión génica de AtTRE1 y localización subcelular

20 Dado que la trehalasa controla los niveles de trehalasa extracelular, pero parece también regular el metabolismo de trehalosa (azúcar) en plantas, analizamos la fluorescencia de constructos AtTRE1-GFP en protoplastos mesófilos de Arabidopsis, para obtener más conocimientos sobre la localización exacta de la trehalasa. AtTRE1 parece estar principalmente localizado en la membrana plasmática (Fig. 10). Este resultado se confirmó recientemente y se publicó por Frison y colaboradores (2007).

25 La expresión se analizó adicionalmente fusionando el promotor de trehalasa a un constructo de GUS/GFP y analizando las plantas después de la tinción con GUS. En hojas y primordios de hojas, se observa una especificidad clara de la expresión en las células de guarda del estoma (Figura 11); podría también detectarse la expresión en las flores (en estomas en sépalos de inflorescencia, estomas en pedículos de inflorescencia, venas de los pétalos y chalaza en silículas) y en las puntas de las raíces.

**EJEMPLO 5:** La expresión de trehalasa controla el número y la apertura del estoma

35 Para analizar adicionalmente el efecto de modulación de la expresión de trehalasa en estomas, se cultivaron mutantes AtTRE1 en suelo en condiciones de humedad normales en una cabina de cultivo, 21 días después de sembrar. La Hoja 1 o la Hoja 2 se cortaron de la planta y se sumergieron por su lado abaxial en tampón de apertura (MES 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, KCl 10 mM, pH 6,1) en condiciones de luz, o tampón de cierre (MES 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 6,1) en condiciones de oscuridad, después de 2 horas las hojas se sumergieron en tampón de apertura que contenía ABA 20 uM en condiciones de luz durante 2 horas, la epidermis abaxial se montó en un portaobjetos con cinta de doble cara y se registraron medidas de apertura de los estomas (anchura) en el microscopio, n=50. Las plantas con sobreexpresión de trehalasa mostraron una disminución en la apertura de los estomas en tampón de apertura, aunque en el tampón de cierre no se pudieron detectar diferencias significativas entre los tipos silvestres, sobreexpresión de plantas KO (Figura 12).

45 Para analizar el efecto de la expresión de trehalasa sobre el número de estomas, se cultivaron mutantes *AtTRE1* en placas horizontales de 1/2 MS, 1 % de sacarosa, en régimen de 16 h de luz/8 h de oscuridad durante 21 días. La Hoja 1 o la Hoja 2 se cortaron y se aclararon en ácido láctico durante 2 días con agitación constante, las hojas se dispusieron en un portaobjetos y se tomaron fotos (0,142 mm<sup>2</sup>) de 2 áreas (punta y base) de cada hora para contar los estomas y células pavimentosas, n=10 y calcular el índice estomático. El índice estomático corresponde a la relación de los estomas por el número total de células en la epidermis (N° de estomas/(2 x N° de estomas+N° células pavimentosas)). En comparación con sus tipos silvestres respectivos, existe una ligera disminución en el número de estomas (Figura 13, A) y en el índice estomático (Figura 14). Aunque para las plantas con sobreexpresión no se observó ninguna influencia en el número de células pavimentosas, la KO mostró un aumento pequeño en el número de células pavimentosas (Figura 13 B). Los resultados indican que la trehalasa modula la resistencia a la sequía modulando la apertura de las células de guarda de estoma y/o el número de células de guarda de estoma por unidad de superficie y/o el índice estomático.

**Referencias**

60 Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadriab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseeuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C. y Ecker, J.R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. Science 301, 653-657.

- Avonce, N., Leyman, B., Mascorro-Gallardo, J.O., Van Dijck, P., Thevelein, J.M. y Iturriaga, G. (2004). The Arabidopsis trehalose-6-P synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. *Plant Physiol* 136, 3649-3659.
- 5 Boyes, D.C., Zayed, A.M., Ascenzi, R., McCaskill, A.J., Hoffman, N.E., Davis, K.R. y Gortlach, J. (2001). Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* 13, 1499-1510.
- 10 Del Sal, G., Manfioletti, G. y Schneider, C. (1988). The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Biotechniques* 7, 514-520.
- 15 Frison, M., Parrou, J.L., Guillaumot, D., Masquelier, D., Francois, J., Chaumont, F. y Batoko, H. (2007). The Arabidopsis thaliana trehalase is a plasma membrane-bound enzyme with extracellular activity. *FEBS Lett* 581, 4010-4016.
- Hauser, M.T., Morikami, A. y Benfey, P.N. (1995). Conditional root expansion mutants of Arabidopsis. *Development* 121, 1237-1252.
- 20 Hwang, I. y Sheen, J. (2001). Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. *Nature* 413, 383-389. Ishikawa, R., Shirouzu, K., nakashita, H., Teraoka, T. y Arie, T. (2007). Control efficacy of validamycin A against Fusarium wilt correlated with the severity of phytotoxic necrosis formed on tomato tissues. *J. Pestic. Sci.* 32.
- 25 Ishikawa, R., Shirouzu, K., Nakashita, H., Lee, H.Y., Motoyama, T., Yamaguchi, I., Teraoka, T. y Arie, T. (2005). Foliar Spray of Validamycin A or Validoxylamine A Controls Tomato Fusarium Wilt. *Phytopathology* 95, 1209-1216.
- 30 Jang, I.C., Oh, S.J., Seo, J.S., Choi, W.B., Song, S.I., Kim, C.H., Kim, Y.S., Seo, H.S., Choi, Y.D., Nahm, B.H. y Kim, J.K. (2003). Expression of bifunctional fusion of Escherichia coli gene for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiology* 131, 516-524.
- Kovtun, Y., Chiu, W.L., Tena, G. y Sheen, J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2940-2945.
- 35 Kovtun, Y., Chiu, W.L., Zeng, W. y Sheen, J. (1998). Suppression of auxin signal transduction by a MAPK cascade in higher plants. *Nature* 395, 716-720.
- 40 Liu, Y.G., Mitsukawa, N., Oosumi, T. y Whittier, R.F. (1995). Efficient isolation and mapping of Arabidopsis thaliana T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J* 8, 457-463.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- 45 Martienssen, R. (1998). Functional genomics: probing plant gene function and expression with transposons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 2021-2026.
- Müller, J., Aeschbacher, R.A., Wingler, A., Boller, T. y Wiemken, A. (2001 a). Trehalose and trehalase in Arabidopsis. *Plant Physiol* 125, 1086-1093.
- 50 Müller, J., Boller, T. y Wiemken, A. (1995b). Effects of validamycin A, a potent trehalase inhibitor y phytohormones on trehalose metabolism in roots and nodules of soybean and cowpea. *Planta* 197, 362-368.
- Ramon, M., Rolland, F., Thevelein, J.M., Van Dijck, P. y Leyman, B. (2007). ABI4 mediates the effects of exogenous trehalose on Arabidopsis growth and starch breakdown. *Plant Mol Biol* 63, 195-206.
- 55 Schluepmann, H., Pellny, T., van Dijken, A., Smekens, S. y Paul, M. (2003). Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6849-6854.
- 60 Suarez, R., Wong, A., Ramirez, M., Barraza, A., Orozco Mdel, C., Cevallos, M.A., Lara, M., Hernandez, G y Iturriaga, G. (2008). Improvement of drought resistance and grain yield in common bean by overexpressing trehalose- 6-phosphate synthase in rhizobia. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21, 958-966.
- 65 Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J.D., Dean, C., Ma, H. y Martienssen, R. (1995). Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes Dev* 9, 1797-1810.

Wingler, A., Fritzius, T., Wiemken, A., Boller, T. y Aeschbacher, R.A. (2000). Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, ApL3 y starch synthesis in Arabidopsis. Plant Physiol 124, 105-114.

5 Ye, G.N., Stone, D., Pang, S.Z., Creely, W., Gonzalez, K. y Hinchee, M. (1999). Arabidopsis ovule is the target for Agrobacterium in planta vacuum infiltration transformation. Plant J 19, 249-257.

Yoo, S.D., Cho, Y. y Sheen, J. (2007). Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. Nature protocols 2, 1565-1572.

10

**Listado de secuencias**

<110> VIB VZW KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN, K.U.LEUVEN R&D  
<120> USO DE TREHALASA PARA OBTENER RESISTENCIA A LA SEQUÍA EN PLANTAS

15

<130> PVD/TRE/V308  
<150> US 61/207,188  
<151> 2009-02-09  
<160> 18  
<170> PatentIn versión 3.5

20

<210> 1  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>

25

<223> Cebador  
<400> 1  
ggaagatcta tgaaatcata caaacttaac aacc 34  
<210> 2

30

<211> 31  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador  
<400> 2

35

tccccgggg gcttcaatgc taagatgaga g 31  
<210> 3  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40

<220>  
<223> Cebador  
<400> 3  
aactatcttg tctacaagaa aagtgggact a 31  
<210> 4

45

<211> 31  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador  
<400> 4

50

tagtcccact ttctgttag acaagatagt t 31  
<210> 5  
<211> 19  
<212> ADN

55

<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador  
<400> 5  
acatggaagg ctgagaacc 19

60

<210> 6  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>

65

<223> Cebador  
<400> 6

ccaagaaata atccactacg 20  
 <210> 7  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 7  
 cctctcatct tagcattgaa g 21  
 10 <210> 8  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Cebador  
 <400> 8  
 ccaagaaata atccactacg at 22  
 <210> 9  
 <211> 20  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Primer  
 <400> 9  
 25 agcgagagag aaagcgtttc 20  
 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 30 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 10  
 ccttccatgt ctgagattcc 20  
 <210> 11  
 35 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 40 <400> 11  
 gaagagcacc ctgttctct 20  
 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 12  
 tggcgtacaa ggagagaaca 20  
 50 <210> 13  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 55 <223> Cebador  
 <400> 13  
 tggttcacgt agtgggcat cg 22  
 <210> 14  
 <211> 21  
 60 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 14  
 65 ccgtccgca agttaaataat g 21  
 <210> 15

# ES 2 447 847 T3

<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
5 <223> Cebador  
<400> 15  
gccttttca aactcaagtt gcac 24  
<210> 16  
<211> 24  
10 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador  
<400> 16  
15 gagtttatta tgtgtgtgcg tgga 24  
<210> 17  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
20 <220>  
<223> Cebador  
<400> 17  
actcatctcc acgcacacac 20  
<210> 18  
25 <211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador  
30 <400> 18  
aatctcgaac cgggaatgat 20

**REIVINDICACIONES**

1. El uso de la sobreexpresión de trehalasa recombinante para obtener tolerancia a la sequía y/o a la sal en plantas.
- 5 2. El uso de la sobreexpresión de trehalasa recombinante según la reivindicación 1 para obtener un crecimiento mejorado tras volver a regar después de un periodo de sequía.
3. El uso de la sobreexpresión de trehalasa recombinante según la reivindicación 1 o 2, en el que dicha sobreexpresión es específica para las células de guarda de los estomas.
- 10 4. El uso de la sobreexpresión de trehalasa recombinante para modular la función de las células de guarda de los estomas.
- 15 5. El uso de la sobreexpresión de trehalasa recombinante según la reivindicación 4, con lo que dicha modulación de la función de los estomas es una limitación de la apertura de los estomas.

Figura 1

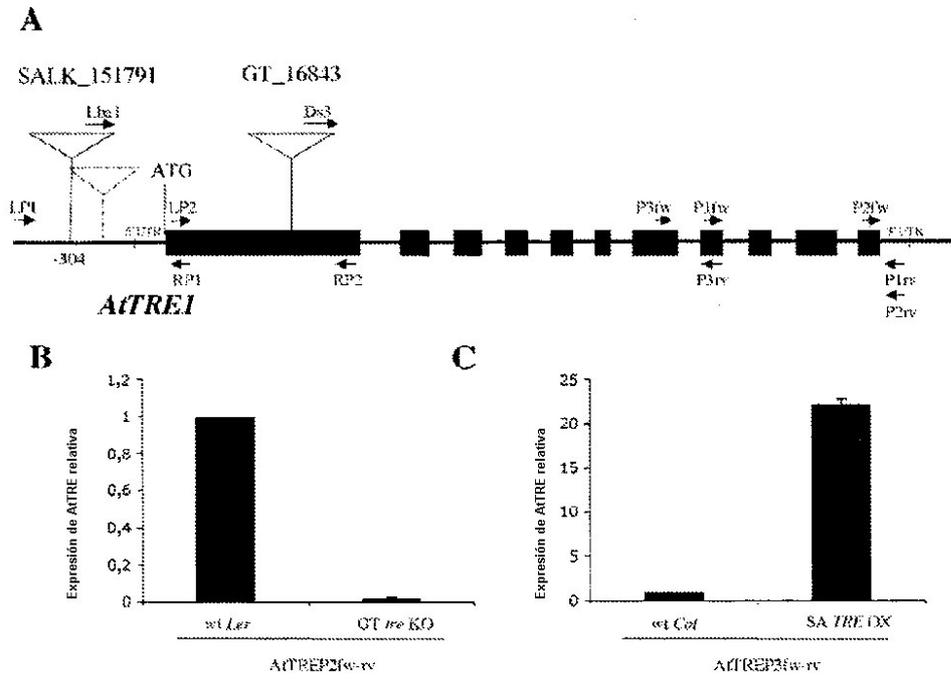


Figura 2

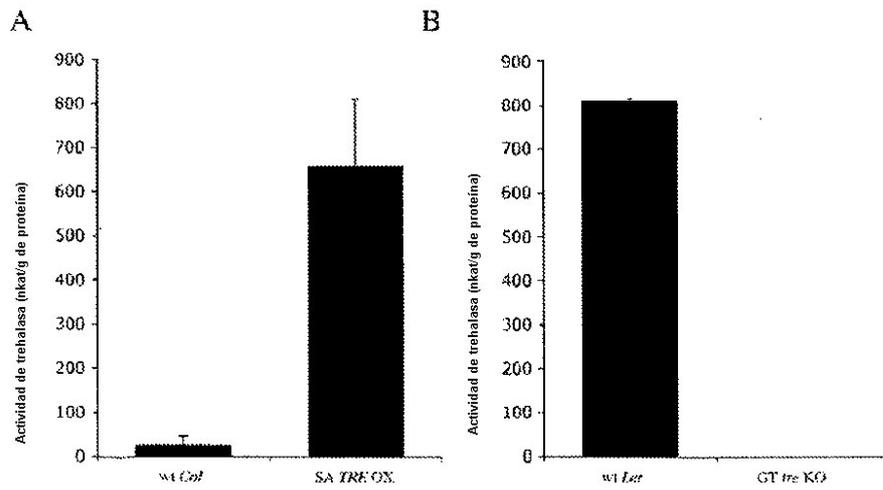


Figura 3

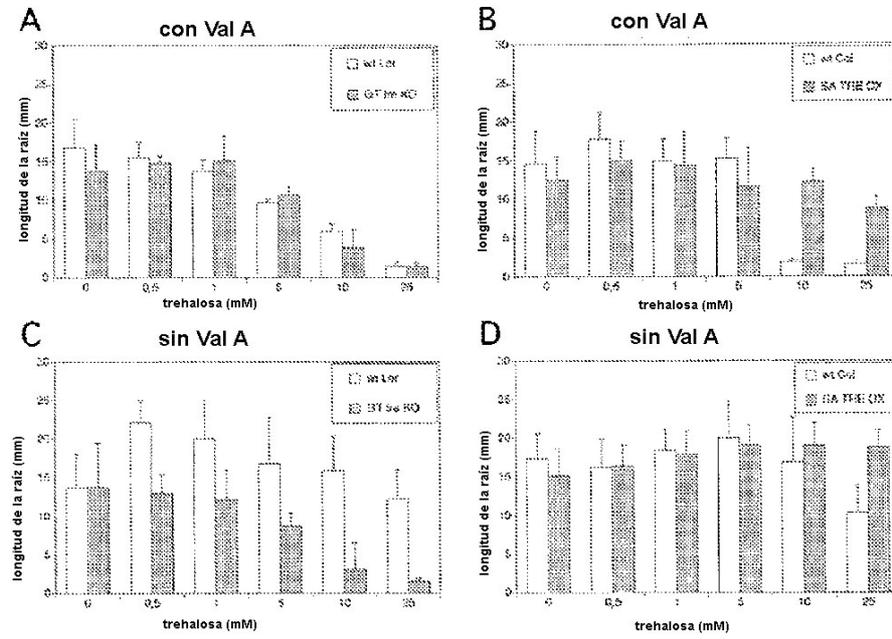


Figura 4

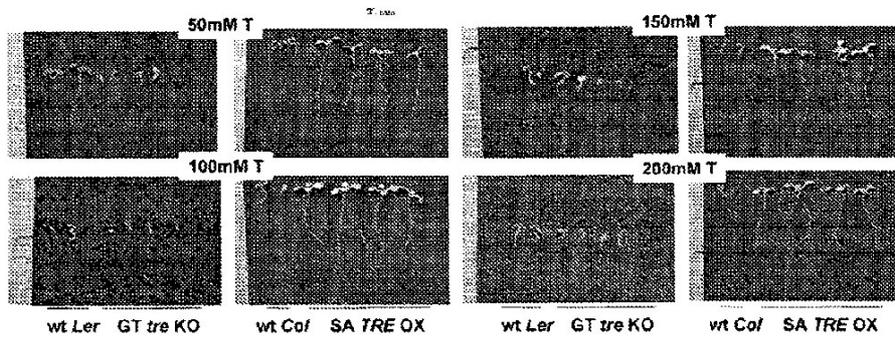


Figura 5

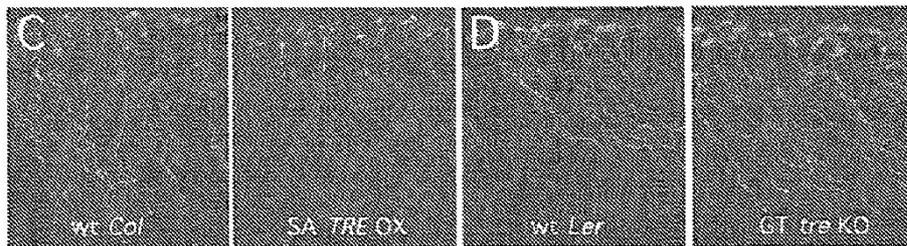
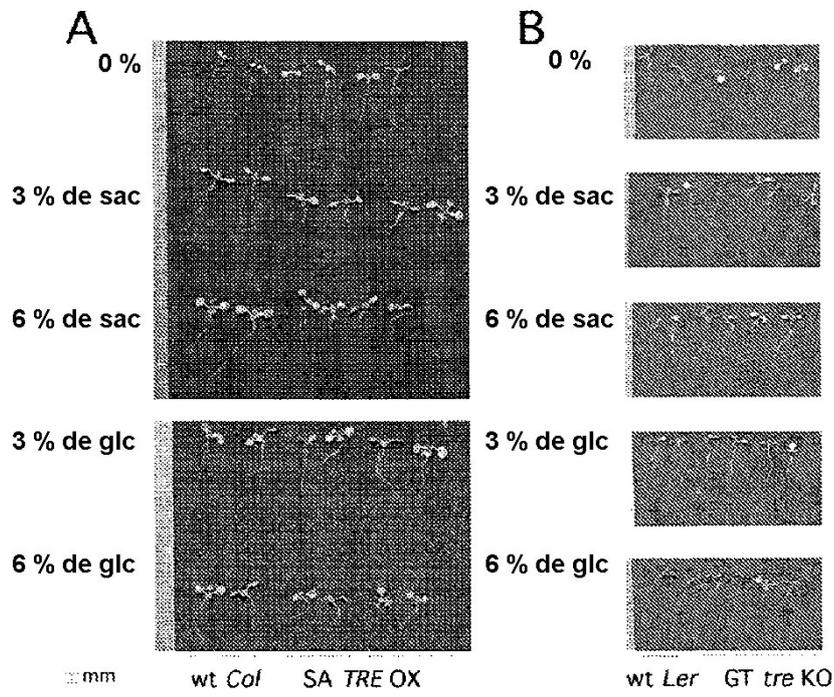


Figura 6

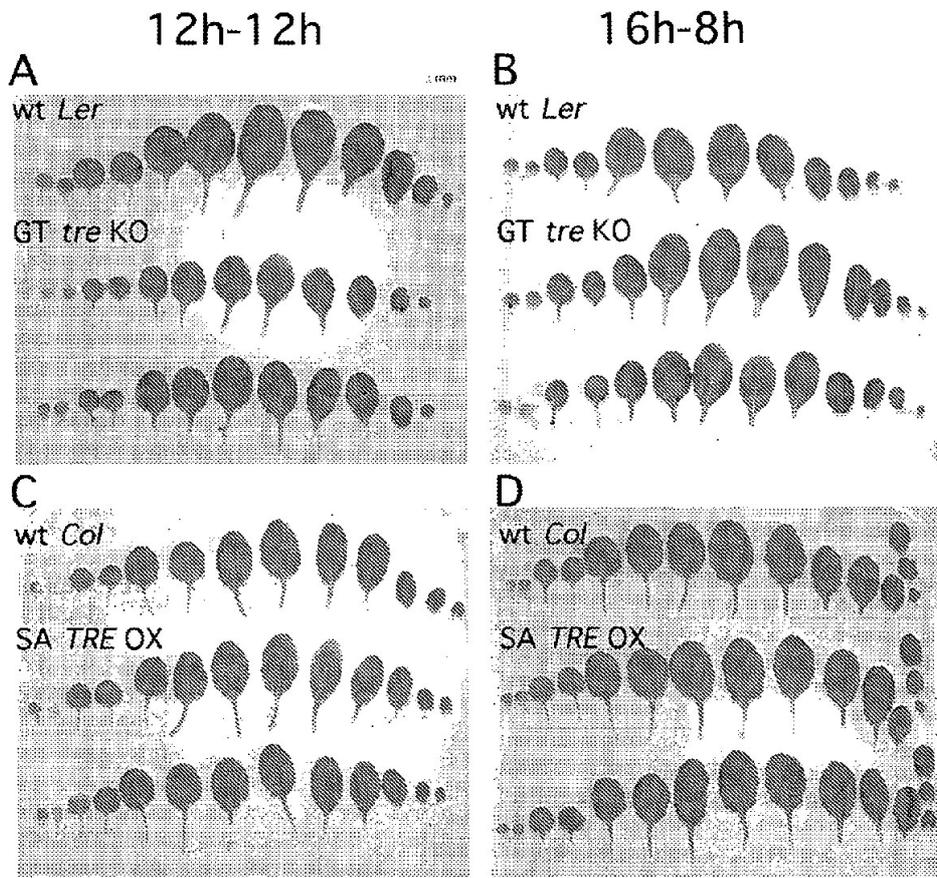


Figura 7

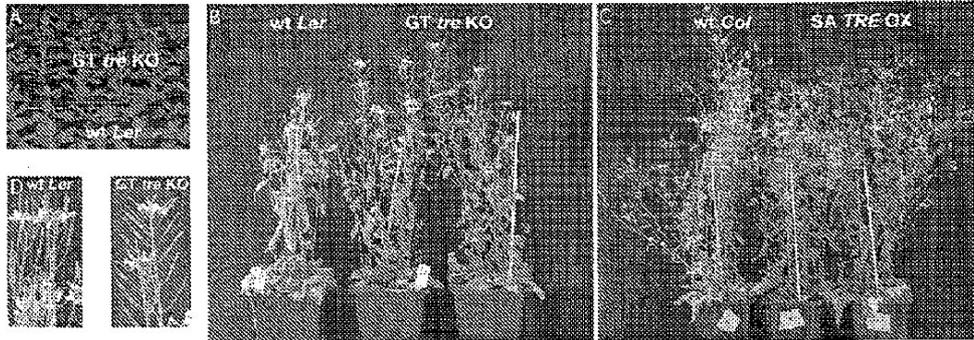


Figura 8

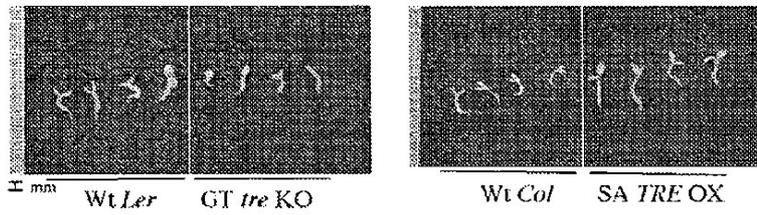
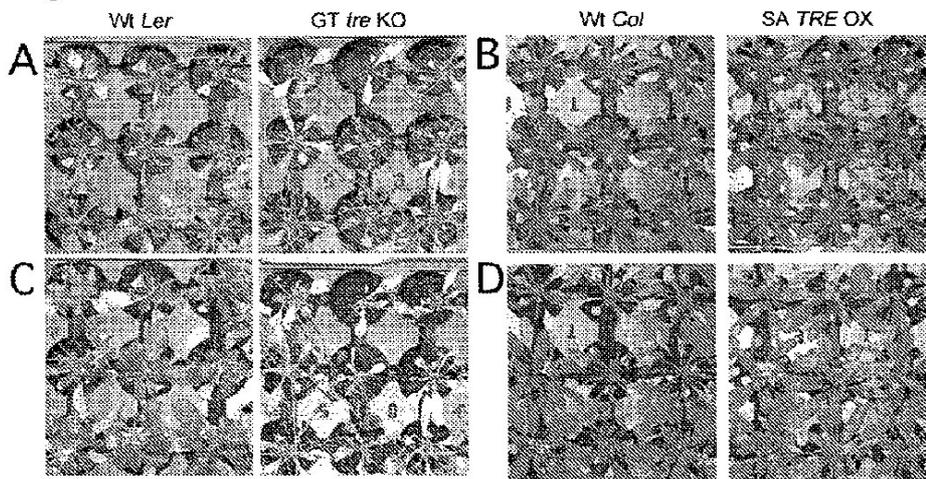
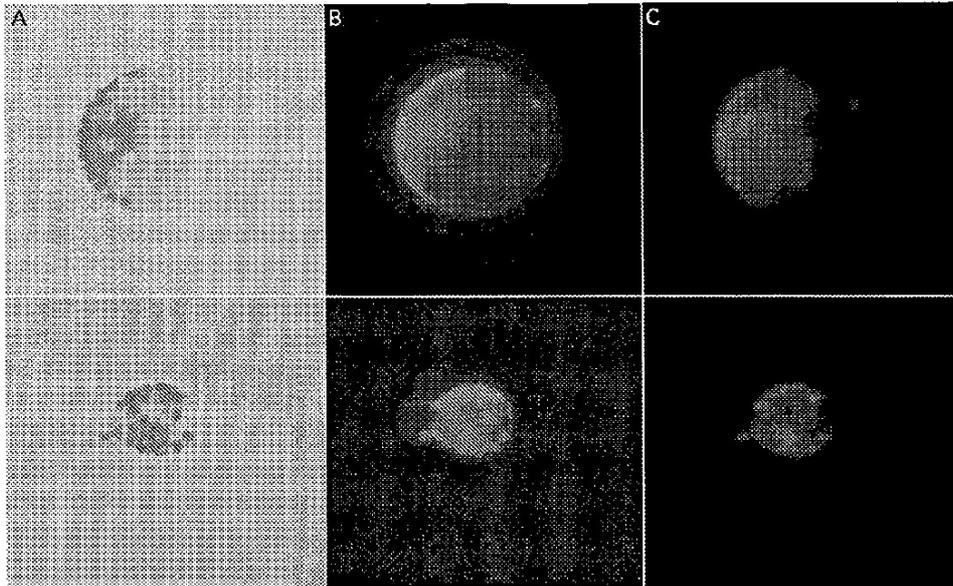


Figura 9



**Figura 10**



**Figura 11A**



Figure 11B

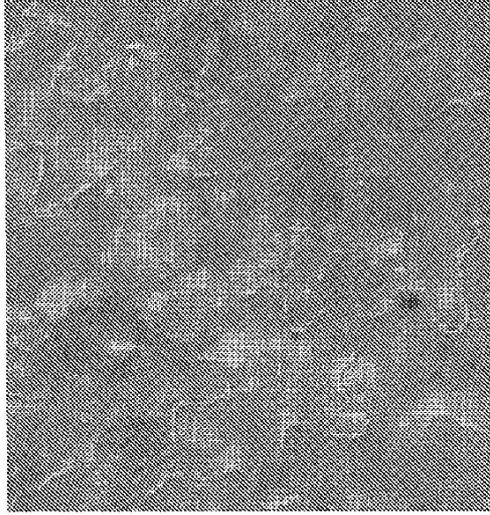


Figura 12

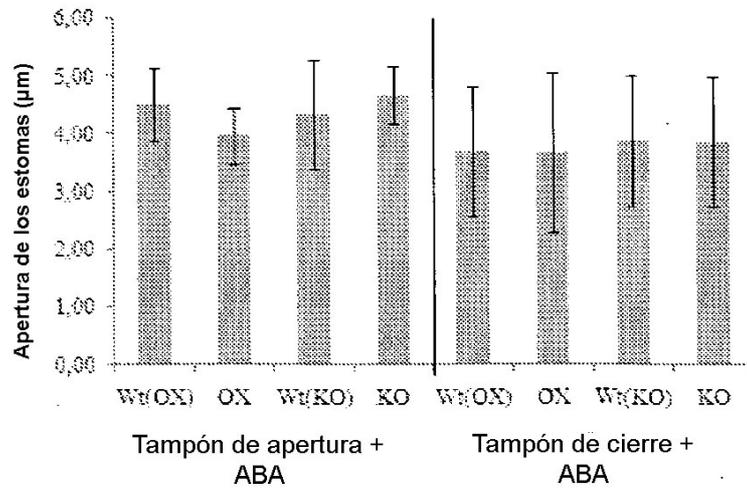


Figura 13A

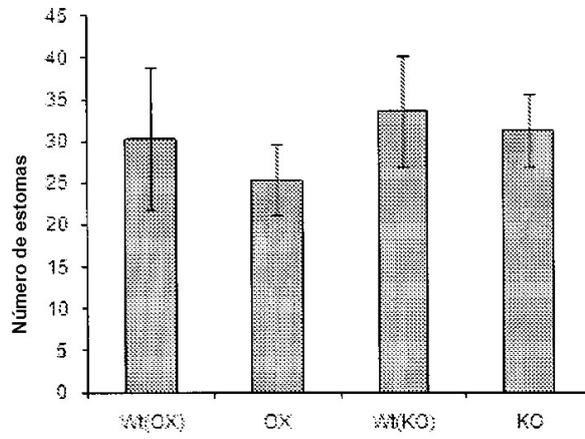


Figura 13B

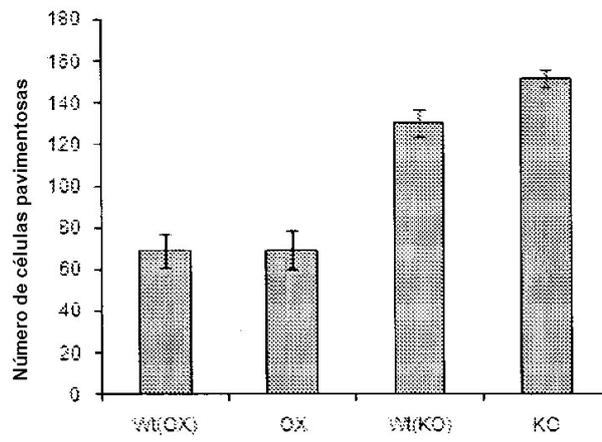


Figura 14

