

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 294**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2010 E 10723281 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 2438176**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para la tolerancia al estrés en plantas**

30 Prioridad:

01.06.2009 GB 0909318

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.03.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL (50.0%)
Bv. Pellegrini No 2750
Santa Fe, AR y
CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS Y TECNICAS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CABELLO, JULIETA VIRGINIA;
ARCE, AGUSTIN LUCAS y
CHAN, RAQUEL LIA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 531 294 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

Procedimientos y composiciones para la tolerancia al estrés en plantas

5 **Campo de la invención**

La divulgación se refiere a plantas transgénicas con tolerancia potenciada al estrés biótico y abiótico y a procedimientos de producción de tales plantas. También se desvelan secuencias de ácidos nucleicos y de péptidos aisladas.

10

Antecedentes de la invención

Las condiciones climáticas adversas y la actividad humana, además de agentes biológicos, son efectores del estrés para las plantas y afectan gravemente su productividad y supervivencia. La pérdida en la productividad debida a este tipo de estrés alcanza algunas veces más del 50 %. Los productores de plantas se han dedicado y se dedican a desarrollar estrategias con el fin de evitar o disminuir el impacto negativo de estas situaciones.

15

Entre los factores que causan estrés abiótico, la sequía, salinidad de la tierra y temperaturas extremas son algunos de los más perjudiciales. Con respecto a las temperaturas extremas, los estreses se clasifican en tres tipos: estrés por congelación (producido por temperaturas por debajo de 0 °C), por frío (producido por temperaturas bajas superiores a 0 °C) y por calor (producido por altas temperaturas). Las temperaturas frías producen daño a los tejidos fotosintéticos, inhiben el proceso fotosintético entero y el transporte de hidratos de carbono, además de la biosíntesis de proteínas y las tasas de respiración. Simultáneamente, se acelera la degradación de proteínas. Todos estos efectos se producen bastante lentamente e implican pérdida parcial o total de la funcionalidad de membranas. A diferencia, las temperaturas de congelación producen un daño rápido, matando las plantas. Se ha observado, sin embargo, que las plantas sometidas al frío durante varios días toleran las temperaturas de congelación mejor que las plantas sometidas a congelación sin haberse expuesto por primera vez a un periodo de frío; este procedimiento se llama "aclimatación".

20

25

30

Especies tales como los cereales de invierno están adaptadas al clima frío o de frío moderado y pueden tolerar temperaturas que oscilan de 0 °C a 15 °C, además de temperaturas de congelación, bastante bien si se han aclimatado previamente a temperaturas reducidas (Levitt, 1980, Thomashow, 1999). Por el contrario, las especies tropicales y subtropicales, que incluyen cultivos importantes tales como maíz, arroz o tomate, son sensibles a bajas temperaturas y parecen carecer de mecanismos de aclimatación eficaces.

35

La tolerancia al frío y a la congelación se produce mediante diferentes mecanismos. La respuesta al frío implica la activación de unsaturasas que pueden cambiar la composición lipídica de las membranas generando una elevada fluidez de la membrana a bajas temperaturas. Por otra parte, la tolerancia a la congelación requiere un periodo de aclimatación previo. Durante este periodo de aclimatación, se sintetizan ciertas proteínas específicas y se acumulan.

40

Las proteínas "anticongelantes" se encuentran en una amplia variedad de plantas que sobreviven al invierno; inhiben el crecimiento y la recristalización de hielo producida en espacios intercelulares a las temperaturas de congelación. Estas proteínas presentan un alto nivel de homología con proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) y, en algunos casos, también protegen contra patógenos psicrófilos (Griffith & Yaish, 2004; Chinnusamy y col., 2007). Otras especies presentan tolerancia a la congelación mediante un mecanismo que implica el aumento en sacarosa (Guy, 1992) o concentraciones de prolina libre (Nanjo y col., 1999).

45

Una de las estrategias para reducir la pérdida en la productividad de las plantas es aumentar la tolerancia al estrés natural, fortaleciendo los sistemas endógenos. Los factores de transcripción (FT) desempeñan una función crucial en la respuesta de las plantas a factores medioambientales, además de en el programa morfológico. Son proteínas que actúan en *trans*, pueden reconocer y unirse a secuencias de ADN específicas (elementos que actúan en *cis*) localizadas en las regiones reguladoras de sus genes diana. Cuando estas proteínas se unen a sus dianas, activan o reprimen rutas de señales de la transducción.

50

Se han identificado aproximadamente 1500 FT en plantas usando bioinformática, y los FT comprenden numerosas familias de genes. Sin embargo, aunque podrían participar en la respuesta, pueden no conferir necesariamente una tolerancia. Esto se ilustra, por ejemplo, por los FT de *Arabidopsis* ATHB7 y ATHB12 (Lee y Chun, 1998). Estos presentan una alta homología con HAHB4 de girasol, especialmente en el dominio HD-Zip. Ambos genes están regulados por incremento por la sequía y ABA. Sin embargo, también se mostró que las plantas transgénicas que expresan en exceso estos genes no son más tolerantes al estrés por sequía que las de TS. HAHB4 se describe en el documento WO 2004/099365. Otro ejemplo es DREB2, un gen que se induce por temperaturas frías, pero no confiere tolerancia al frío en su forma no mutada. Por tanto, sigue siendo necesario empezar una serie de experimentos genómicos funcionales con el fin de probar y demostrar los efectos de los FT sobre la tolerancia al estrés, ya que tales efectos no pueden predecirse (Arce y col., 2008).

60

65

Las proteínas HD-Zip caracterizadas por la presencia de un homeodominio asociado a una cremallera de leucina constituyen una familia de factores de transcripción de plantas. La asociación del dominio de unión a ADN (HD) con un motivo de dimerización adyacente (cremallera de leucina abreviada ZipLZ o LZ) es una combinación encontrada solo en el reino de las plantas, aunque los dominios se encuentran independientemente entre sí en un gran número de factores de transcripción eucariotas (Schena & Davis, 1992). Esta gran familia de FT de plantas se ha dividido en cuatro subfamilias (I a IV) según la similitud de secuencias dentro y fuera de los dominios conservados y por los patrones de intrones/exones de los genes correspondientes (Schena & Davis, 1994, Sessa y col., 1994, Chan y col., 1998; Ariel y col., 2007). Los miembros de la subfamilia I interactúan con la secuencia pseudopalindrómica CAAT(A/T)ATTG; las proteínas de la subfamilia II reconocen un motivo CAAT(C/G)ATTG (Sessa y col., 1993; Palena y col., 1999). En todos los casos, la formación de homo- o hetero-dímeros de proteína es un requisito previo para la unión del ADN (Sessa y col., 1993; Gonzalez y col., 1997).

Varios autores han informado que la expresión de miembros de la familia HD-Zip de factores de transcripción está regulada por diversos factores externos tales como estreses por iluminación, ABA, sal o agua (Schena & Davis, 1992; Carabelli y col., 1993; Schena y col., 1993; Söderman y col., 1994; Söderman y col., 1996, Chan y col., 1998; Lee & Chun, 1998; Söderman y col., 1999a y 1999b; Gago y col., 2002; Henriksson y col., 2005). Estudios en los que los genes HD-Zip I y II se expresaron en exceso en plantas transgénicas soportan adicionalmente la función propuesta de esta familia de proteínas como reguladores del desarrollo que son sensibles a condiciones medioambientales (Schena y col., 1993; Manavella y col., 2006; Manavella y col., 2008; Ariel y col., 2007; Cabello y col., 2007, Dezar y col., 2005a). Sigue existiendo la necesidad de identificar y caracterizar tales proteínas de forma que puedan conferirse rasgos beneficiosos a las plantas que utilizan miembros específicos de esta clase de moléculas.

Se aisló ADNc de HAHB1 en 1992 de una biblioteca de tallo de girasol de ADNc y su secuencia se depositó en Genbank (número de acceso L22847, véase la SEC ID N°: 2: en el presente documento para la secuencia de ácidos nucleicos y SEC ID N°: 5 en el presente documento para la secuencia de proteínas traducida) y se describió la clonación del ADNc (Chan RL, González DH, 1994). La proteína codificada por este gen se ha citado en la bibliografía como un gen homólogo a proteínas HD-Zip de otras especies, pero esta conclusión se basa solo en la comparación de la secuencia en árboles filogenéticos (Gonzalez y col. 1997, Chan y col., 1998 y Ariel y col., 2007).

La presente invención demuestra sorprendentemente la utilidad de HAHB1 (*homeocaja 1 de Helianthus annuus*, de *Helianthus Annuus Homeobox 1*) en la producción de plantas transgénicas con tolerancia potenciada a condiciones de estrés.

Resumen de la invención

En la presente divulgación de patente, los presentes inventores describen el uso de HAHB1, un factor de transcripción que es un miembro de la subfamilia I del girasol de proteínas HD-Zip y variantes de las mismas, tales como ATHB13, para modificar las respuestas de las plantas a condiciones de estrés, que incluyen estrés por congelación, sequía, salinidad y biótico. Así, la divulgación describe plantas y procedimiento que confieren o aumentan tal tolerancia al estrés. El gen se aisló de una biblioteca genómica y se caracterizó su patrón de expresión. Los presentes inventores demuestran que produciendo plantas transgénicas que llevan el ADNc de HAHB1 de girasol bajo el control de tanto el promotor 35S constitutivo como el promotor HAHB1 nativo, se producen plantas transgénicas que presentan un claro aumento en la tolerancia a condiciones de baja temperatura en las etapas vegetativas y reproductivas. Además, las plantas transgénicas presentan mejor tolerancia que las plantas no transformadas en respuesta a condiciones de sequía o salinidad. Se observan efectos similares si se usa el homólogo de HAHB1 ATHB13. Se realizaron análisis de micromatrices para evaluar patrones de expresión en plantas de *Arabidopsis* transgénicas. Los datos indican que la tolerancia observada se produce mediante el aumento de proteínas anticongelantes localizadas en el apoplasto celular que inhibe el crecimiento de grandes cristales de hielo extracelulares. Además, los inventores también han mostrado que la expresión en exceso transitoria del gen HAHB1 en girasol induce la expresión de varios genes relacionados con la tolerancia al estrés.

HAHB1 es un miembro la subfamilia I de HD-Zip (HD-Zip I). Todos los miembros de la familia I de HD-Zip muestran alta similitud de secuencias en el homeodominio (HD) del extremo N y el dominio de cremallera de leucina (LZ), pero son en particular mucho más diversos en la región del extremo C. Por ejemplo, HAHB1 y HAHB4 son ambos miembros de HD-Zip I, pero comparten muy poca similitud de secuencias en sus regiones del extremo C. Aunque HD-Zip I se agrupan en una única familia, diferentes miembros de la familia I de HD-Zip presentan patrones de expresión diferenciales y participan en diferentes procedimientos de desarrollo y fisiológicos como se ha detallado más adelante. Los inventores han caracterizado HAHB1 y comparado su estructura con secuencias homólogas. Usando construcciones quiméricas, los inventores también han encontrado que es el extremo C de la proteína HAHB1 el que es importante en conferir función de HAHB1. Se predice que genes homólogos a HAHB1 que muestran alta homología no solo en los dominios HD y LZ, sino también en los dominios del extremo C, tienen un efecto similar a HAHB1 cuando se expresan en plantas transgénicas, como se muestra en el presente documento para ATHB13.

De la información proporcionada en el presente documento, aquellos expertos en la materia apreciarán que *HAB1*, una parte o un homólogo del mismo, confiere tolerancia potenciada, por ejemplo, tolerancia a la congelación a plantas transgénicas si se expresa, tanto bajo el control de su propio promotor como bajo el control de un promotor constitutivo tal como el promotor 35S del CaMV, o bajo el control de otro tipo de promotor, tal como, por ejemplo, un promotor inducible por frío o un promotor inducible por estrés abiótico.

Esta tolerancia a la congelación va acompañada de tolerancia potenciada a la sequía y altas condiciones de sal. Los presentes inventores también muestran que no solo puede expresarse *HAB1* bajo el control del promotor de *HAB1* para lograr expresión sensible al estrés, sino que cualquier secuencia de genes puede asociarse operativamente al promotor de *HAB1* con el fin de lograr la expresión bajo condiciones frías o de congelación, alta sal o baja agua o invasión de patógenos.

Como se ha establecido anteriormente, sin desear ceñirse a teoría particular alguna, la tolerancia a las condiciones de congelación conferidas por la expresión de *HAB1* es evidentemente debida a la síntesis y acción de proteínas anticongelantes en el apoplasto celular que inhibe la formación de cristales de hielo con sus posteriores efectos de la deshidratación. También es posible que otras proteínas fuera del apoplasto (dentro la célula) sean también traducidas por incremento.

En vista de la información general proporcionada en el presente documento, aquellos expertos en la materia apreciarán que la presente divulgación describe y permite a aquellos expertos en la materia obtener y aislar una secuencia de genes de girasol que puede usarse para conferir tolerancia potenciada a las condiciones de estrés que incluyen tolerancia potenciada al frío y a la congelación, tolerancia potenciada a la sequía, tolerancia potenciada a las condiciones de alta salinidad y/o estrés biótico. Además, usando procedimientos conocidos en la técnica, la secuencia de genes aislada de girasol desvelada en el presente documento o partes de la misma o puede usarse para aislar secuencias relacionadas de otras plantas que pueden usarse para conferir tolerancia potenciada a condiciones de estrés abiótico y biótico como se describe en el presente documento.

La invención se refiere a un procedimiento de aumento de la tolerancia a todos de sequía, alta salinidad y congelación que comprende transformar una planta con un ácido nucleico que comprende una secuencia de SEC ID N° 6 o 7 o una secuencia con al menos el 90 % o al menos el 95 % de homología con una secuencia que comprende SEC ID N° 6 o 7. La invención también se refiere a una construcción de ácidos nucleicos quimérica aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia del extremo N de otra proteína HD Zip de la subfamilia I operativamente asociada a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia que comprende el extremo C de *HAB1* como se define en SEC ID N° 8. La invención también se refiere a un polipéptido codificado por una construcción génica codificada por una construcción tal. La invención también se refiere a un procedimiento para conferir tolerancia en una planta a todos de sequía, alta salinidad y congelación que comprende introducir y expresar en una planta una construcción génica de un polipéptido como se ha definido anteriormente. La invención se refiere además al uso de una secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N° 6 o 7, o una secuencia con al menos el 90 % o al menos el 95 % de homología con SEC ID N° 6 o 7 o uso de un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N° 6 o 7 o una secuencia con al menos el 90 % o al menos el 95 % de homología con SEC ID N° 6 o 7 en conferir elevada tolerancia a todos de sequía, alta salinidad y congelación. Por consiguiente, los presentes inventores describen una proteína aislada o secuencia de genes de girasol, *HAB1*, una parte o variante de la misma, que puede usarse para conferir tolerancia potenciada a condiciones de estrés abiótico y biótico como se describe en el presente documento, incluso en especies de plantas distintas de girasol.

También se describe una secuencia de genes aislada de girasol, *HAB1*, una parte o variante de la misma, que puede usarse para aislar secuencias relacionadas de otras plantas, que incluye especies de plantas no relacionadas con girasol, secuencias que pueden usarse para conferir tolerancia potenciada a condiciones de estrés abiótico y biótico como se describen en el presente documento.

Adicionalmente, se describe una secuencia de genes promotora aislada que puede usarse para regular la expresión de secuencias operativamente asociadas a la secuencia promotora para conferir a las secuencias así asociadas la propiedad de expresión en respuesta a condiciones de estrés abiótico y biótico como se describen en el presente documento.

Los presentes inventores también describen construcciones o vectores de expresión que comprenden secuencias de ácidos nucleicos descritas en el presente documento que confieren, a las plantas en las que tales construcciones o vectores de expresión se introducen, tolerancia potenciada a condiciones de estrés abiótico y biótico como se describe en el presente documento.

La divulgación también se refiere a plantas transgénicas que tienen tolerancia potenciada o elevada a condiciones de estrés abiótico y biótico como se describe en el presente documento.

La divulgación también se refiere a composiciones y procedimientos de inducción de la producción de proteínas anticongelantes (PAC) en una planta para así evitar o minimizar el daño de otro modo causado en plantas con

exposición a condiciones de baja temperatura como resultado de la formación de cristales de hielo.

La divulgación se refiere además a novedosos procedimientos de identificación y uso de novedosas composiciones desveladas en el presente documento para conferir tolerancia potenciada a condiciones de estrés abiótico y biótico como se describen en el presente documento.

Así, basándose en la información proporcionada en el presente documento, aquellos expertos en la materia podrán preparar construcciones o vectores de expresión que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que confieren a las plantas en las que tales construcciones o vectores de expresión se introducen tolerancia potenciada a condiciones de estrés abiótico y biótico como se describe en el presente documento. Esto permitirá a aquellos expertos en la materia producir plantas que tienen tolerancia potenciada a condiciones de estrés abiótico y biótico como se describe en el presente documento.

Sin desear ceñirse a teoría alguna, aquellos expertos en la materia apreciarán que las composiciones y procedimientos proporcionados en el presente documento permitirán la inducción de la producción de proteínas anticongelantes (PAC) en una planta para así evitar o minimizar el daño de otro modo causado en plantas con exposición a condiciones de baja temperatura como resultado de la formación de cristales de hielo.

Otros objetivos, ventajas y beneficios de la presente invención serán evidentes para aquellos expertos en la materia de una revisión de la divulgación completa proporcionada en el presente documento y las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Patrón de expresión de *HAHB1* en plantas de semillero y plantas maduras

a: Niveles de transcrito de *HAHB1* en diferentes tejidos y órganos de plantas de semillero de 7 días de edad de girasol (de izquierda a derecha: raíz, hipocótilo, cotiledón, meristemo apical); b: Niveles de transcrito de *HAHB1* cuantificados en diferentes tejidos y órganos de plantas de 21 días de edad de girasol (de izquierda a derecha: raíz, hipocótilo, cotiledón, tallo, hoja, peciolo); los niveles de transcrito se determinaron por RT-PCR cuantitativa y las desviaciones estándar se calcularon a partir de tres muestras independientes en las que se usaron transcritos de actina (*ACTINA2* más *ACTINA8*) como controles internos; todos los valores se normalizaron con respecto al valor medido en raíces, arbitrariamente asignado un valor de uno. El eje y indica el cambio (x veces) observado.

Figura 2. *HAHB1* de girasol está regulado por incremento por citocinas en plantas de semillero y por ABA en plantas maduras

a: Niveles de transcrito de *HAHB1* en plantas de semillero de 7 días de edad dos horas después de los tratamientos con diferentes hormonas (de izquierda a derecha: control, ABA, BAP, GA, IAA, JA, SA); b: Niveles de transcrito de *HAHB1* en discos de hojas de 21 días de edad dos horas después de los tratamientos con diferentes hormonas (de izquierda a derecha: control, IAA, ACC, SA, JA, ABA, GA, BAP); los niveles de transcrito se determinaron por RT-PCR cuantitativa y las desviaciones estándar se calcularon a partir de tres muestras independientes en las que se usaron transcritos de actina (*ACTINA2* más *ACTINA8*) como controles internos; todos los valores se normalizaron con respecto al valor medido en raíces, arbitrariamente asignado un valor de uno. El eje y indica el cambio (x veces) observado.

Figura 3. *HAHB1* de girasol está regulado por incremento por factores de estrés abiótico

a: Niveles de transcrito de *HAHB1* en plantas de semillero de 7 días de edad dos horas después del tratamiento con factores de estrés abiótico como se ha establecido en la figura y se detalla en la sección de Procedimientos experimentales (de izquierda a derecha: control, sequía, NaCl, oscuridad, sacarosa, H₂O₂); b: Cinética de inducción de *HAHB1* en plantas de semillero de 7 días de edad puestas a 4 °C (de izquierda a derecha: control, 3, 4, 5, 6, 7, 8 h); c: Niveles de transcrito de *HAHB1* en discos de hojas de 21 días de edad dos horas después de los tratamientos con factores de estrés abiótico como se ha establecido en la figura (de izquierda a derecha: control, 4 °C, UV-B, NaCl, oscuridad, sequía); los niveles de transcrito se determinaron por RT-PCR cuantitativa y las desviaciones estándar se calcularon a partir de tres muestras independientes en las que se usaron transcritos de actina (*ACTINA2* más *ACTINA8*) como controles internos; todos los valores se normalizaron con respecto al valor medido en raíces, arbitrariamente asignado un valor de uno. El eje y indica el cambio (x veces) observado.

Figura 4. Características morfológicas y de desarrollo de plantas transgénicas que llevan la construcción *35S:HAHH1*

a: Hojas de 21 días de edad de plantas transgénicas y de TS. Las plantas transgénicas presentan hojas dentadas pero no las plantas de TS. Las flechas designan los bordes serrados de las plantas transgénicas. b: Altura del tallo durante el ciclo de vida de plantas transgénicas y de TS; c: Plantas de 30 días de edad cultivadas en condiciones de crecimiento normales. La Figura 4a muestra la diferencia en la morfología de las hojas entre plantas transgénicas y no mutadas. Las plantas transgénicas muestran bordes dentados y una forma diferenciada en comparación con sus

homólogos no transformados (Figura 4a y 4c). En 4c, plantas transgénicas (35S:HAHB1; tres líneas independientes A, B y C) y de TS muestran características de desarrollo similares. Las plantas están sanas en condiciones de crecimiento normales.

5 **Figura 5. Las plantas transgénicas que expresan ectópicamente y constitutivamente 35S:HAHB1 son más tolerantes a condiciones de congelación**

10 a: Estabilidad de la membrana de plantas transgénicas y no transformadas medida como la conductividad de la solución de sobrenadante (véase Procedimientos experimentales, inversa a la estabilidad) después de tratamientos de congelación; b: Fotografía tomada 6 días después de poner las plantas para recuperarlas en condiciones de crecimiento normales después de un tratamiento de 8 horas en condiciones de congelación: las plantas de TS mueren después de un tratamiento de congelación mientras que las plantas transgénicas (35S:HAHB1; tres líneas independientes TG (transgénicas) A, TG-B y TG-C) muestran un menor grado de daño. Aproximadamente, el 25 % de las hojas (genotipos TG) son senescentes mientras que las otras son verdes y sanas. El eje x muestra el periodo de tiempo a -8 °C y el eje y muestra la relación de lixiviación (L). Porcentaje de supervivientes de todos los genotipos (transgénicos y no transformados) sometidos a condiciones de congelación como en b:

Genotipo	% de supervivientes
Ts	22+-3
TG-A	85+-2
TG-B	74+-4
TG-C	70+-3
TG-D	65+-2
TG-E	60+-5

20 **Figura 6. Contenido de clorofila en plantas sometidas a condiciones frías**

Se midió el contenido de clorofila como se describe en Procedimientos experimentales en plantas transgénicas que expresan *HARB1* y plantas no mutadas sometidas a temperaturas frías durante los periodos indicados. Los valores sobre el eje y se expresan como µg de clorofila por g de hojas frescas. El eje x muestra los días a 4 °C.

25 **Figura 7. Las plantas transgénicas que expresan HAHB1 son más tolerantes al estrés por sales**

30 a: Estabilidad de la membrana de plantas transgénicas (TG-A y TG-B) que expresan *HAHB1* y plantas no transgénicas (ts, de tipo silvestre) medida como la conductividad de la solución de sobrenadante (véase Procedimientos experimentales, inversa a la estabilidad) después de tratamientos por estrés a sales; las concentraciones de NaCl se expresan en mM sobre el eje x; b: Fotografía ilustrativa tomada 2 días después de regar con NaCl 200 mM. Plantas TS muestran aproximadamente el 50 % de hojas muertas (hojas de color más claro) mientras que plantas transgénicas presentan más del 80 % y el 100 % de hojas verdes sanas para la línea A y B, respectivamente. Algunas (pero no todas) las hojas muertas están marcadas con una flecha.

35 **Figura 8. Las plantas transgénicas que expresan HAHB1 son más tolerantes a la sequía**

40 Fotografía ilustrativa tomada 2 días después de regar plantas transgénicas y no mutadas sometidas a sequía como se describe en la sección de Procedimientos experimentales. Aproximadamente el 75 % de las plantas de TS mueren como puede apreciarse por las hojas senescentes (color más claro); mientras que el 25 % están dañadas, pero presentan menos hojas verdes. Las plantas transgénicas presentan un número diferente de hojas muertas (20 % para la línea A, 50 % para las líneas B y C) y hojas más jóvenes son verdes y sanas.

Figura 9. Patrón de expresión del gen indicador GUS dirigido por la región promotora de HAHB1.

45 Detección histoquímica de la actividad enzimática de GUS en plantas transgénicas de *Arabidopsis* transformadas con *prHAHB1:GUS*. a, b, c y d: plantas de semillero de 14 días de edad; e, plantas de 30 días de edad y f, planta de 45 días de edad; vista de meristemos (a y b); cotiledones (c), hipocótilos (d), meristemo apical (e) y silicuas (f). La actividad de GUS debida a la expresión del gen dirigido por el promotor de HAHB1 (áreas más oscuras) se visualiza claramente en el sistema vascular de hipocótilos, cotiledones y hojas (A-D), además de en la región meristemática (E) y en la base de silicuas (F).

Figura 10. Patrón de expresión del gen indicador GUS dirigido por la región promotora de HAHB1 en plantas sometidas a condiciones frías.

55 Detección histoquímica de la actividad enzimática de GUS en plantas transgénicas de *Arabidopsis* transformadas con *prHAHB1:GUS* después de condiciones frías; a y b, meristemos apicales; c y d, raíces; las plantas usadas tienen 30 días de edad. La actividad de GUS debida a la expresión del gen dirigido por el promotor de HAHB1 (áreas más oscuras) se visualiza claramente en la región meristemática (A y B) y el sistema de raíces vascular (C y D).

Figura 11. Características morfológicas y de desarrollo de plantas transgénicas que llevan la construcción *promXAHB1:XAHB1*

5 a: Plantas de 25 días de edad (plantas de ts y transgénicas que expresan *HAHB1*) cultivadas en condiciones de crecimiento normales. Las plantas (de TS y de tres genotipos transgénicos independientes) presentan fenotipos indistinguibles en condiciones de crecimiento normales. b: Altura del tallo (eje y) durante el ciclo de vida de plantas transgénicas y de TS.

10 **Figura 12. Plantas transgénicas que expresan *HAHB1* bajo el control de su propio promotor son más tolerantes a las condiciones de congelación**

15 a: Fotografía tomada 6 días después de poner las plantas (plantas ts y transgénicas que expresan *HARB1*, previamente cultivadas durante 8 horas a -8 °C) a recuperar en condiciones de crecimiento normales; TG-A, TG-B y TG-C representan plantas de tres genotipos transgénicos independientes (construcción *promHAHB1:HAHB1*). Las plantas de TS son senescentes y están casi muertas (algunas, pero no todas, las hojas muertas están marcadas con una flecha) mientras que las plantas transgénicas presentan cierto daño en hojas viejas, pero un aspecto sano en las más jóvenes. b: Niveles de transcrito de *HAHB1* en plantas transgénicas que llevan la construcción *promHAHB1:HAHB1* en función del tiempo de incubación a 4 °C representando el eje y las x veces de cambio; los niveles de transcrito se determinaron por RT-PCR cuantitativa y las desviaciones estándar se calcularon a partir de tres muestras independientes en las que transcritos de actina (*ACTINA2* más *ACTINA8*) se usaron como controles internos; todos los valores se normalizaron con el valor medido en plantas no tratadas (tiempo 0), arbitrariamente asignado un valor de uno. Porcentaje de supervivientes de los cuatro genotipos después del tratamiento de congelación/recuperación:

Genotipo	% de supervivientes
Ts	38+-5
TG-A	90+-8
TG-B	88+-6
TG-C	75+-10

25

Figura 13. Proteínas apoplásticas de plantas transgénicas (*35S:HAHB1*) y no mutadas

30 SDS-PAGE que muestra las proteínas presentes en el apoplasto celular, obtenidas de plantas no aclimatadas (A), plantas aclimatadas durante 16 horas a 4 °C (B), plantas aclimatadas durante 10 días a 4 °C (C) y plantas puestas durante 3 horas a -8 °C (D, tratamiento de congelación). Todas las muestras se aislaron de plantas de TS o transgénicas de 25 días de edad (tres líneas independientes de *35S:HAHB1* (A, B y C) o una mezcla de ellas (D)). Las muestras cargadas en A, B y C se obtuvieron de 7 g de tejido de hoja y se cargó un extracto de volumen igual en el gel. Las muestras cargadas en D se obtuvieron de 3 g de tejido de hoja y volúmenes iguales cargados en el gel. La flecha indica la banda diferencialmente expresada.

35

Figura 14. Cromatograma de proteínas apoplásticas aisladas de plantas transgénicas aclimatadas y no mutadas

40 Cromatograma de elución en columna Sephadex G-200 (véase Procedimientos experimentales) de proteínas apoplásticas purificadas de ambos genotipos (transgénicos, dos líneas independientes que expresan *HAHB1*: TG-A y TG-B, o no mutadas); el segundo pico en las proteínas apoplásticas transgénicas aumentó a una DO de 0,8-0,9 en comparación con el extracto de TS en el que este pico alcanza una DO de 0,5-0,6.

45 **Figura 15. Niveles de expresión de proteínas anticongelantes en plantas transgénicas y no mutadas sometidos a diferentes tratamientos de estrés**

50 Niveles de expresión de PR2 (15c y f), PR3 (15b y e) y PR4 (15a y d) en plantas (líneas de control y dos transgénicas independientes que expresan *HAHB1*: TG-A y TG-B) sometidas a sequía (EH), 4 °C o tratadas con ACC (precursor de etileno), ácido salicílico (SA) o ácido abscísico (ABA).

55

Figura 16. *HAHB1* previene la formación de grandes cristales de hielo

60 Se extrajeron proteínas apoplásticas y se mezclaron con 26 % de sacarosa y la mezcla se congeló a -80 °C durante un periodo de algunos minutos; después de eso, las muestras se calentaron gradualmente a 0 °C y a continuación se pusieron durante una hora a -8 °C; finalmente, las muestras se observaron y se fotografiaron con un microscopio óptico (x4); A, B, C, cristales formados en presencia de proteínas transgénicas apoplásticas (tres líneas independientes del genotipo *35S:HAHB1*); D, cristales formados en presencia de proteínas de TS apoplásticas; E, cristales formados en presencia de 26 % de sacarosa sin proteínas.

Figura 17. Las plantas transgénicas que llevan la construcción 35S:GLUC son más tolerantes a las condiciones de congelación.

5 a: Características morfológicas de plantas transgénicas que expresan 35S:GLUC y plantas de TS en condiciones de crecimiento normales; se detectaron diferencias no significativas en las características morfológicas de cinco líneas F2 independientes de plantas transgénicas (que llevan el gen *GLUC*, AT4g16260) en comparación con plantas de control; b: altura del tallo de plantas transgénicas y de TS en etapas de desarrollo posteriores; c: plantas sometidas a condiciones de congelación (7 h a -8 °C) y dejadas en condiciones normales (22-24 °C) durante seis días para la recuperación antes tomar la fotografía; se usaron tres líneas independientes en el experimento, cuatro plantas por maceta de 100 g de tierra (7 x 8 cm). En 17a, genotipos TS y tres transgénicos independientes presentan fenotipos indistinguibles en condiciones de crecimiento normales mientras que cuando se sometieron a estrés, todas las plantas de TS mostradas están marchitas (17c, las hojas muertas son de un color más claro) y las plantas transgénicas muestran tasas de supervivencia muy mejoradas. Porcentaje de supervivientes de cada genotipo después del tratamiento de congelación:

Genotipo	% de supervivientes
101.3	8
35S:GLUC	50

Figura 18. Las plantas transgénicas que llevan la construcción 35S:PR2 presentan comportamiento diferencial en condiciones de congelación en comparación con sus homólogos se TS

20 a: Características morfológicas de plantas transgénicas y de TS en condiciones de crecimiento normales; se detectaron diferencias no significativas en las características morfológicas de cinco líneas F2 independientes de plantas transgénicas (que llevan el gen PR2/glucanasa/BGL2, AT3g57260) en comparación con plantas de control; b: altura del tallo de plantas transgénicas y de TS en etapas de desarrollo posteriores; c: plantas sometidas a condiciones de congelación (7 horas a -8 °C) y a condiciones normales (22-24 °C) durante seis días de recuperación antes tomar la fotografía; se usaron tres líneas independientes en el experimento, cuatro plantas por maceta de 100 g de tierra (7 x 8 cm). En 18a, genotipos TS y tres transgénicos independientes presentan fenotipos indistinguibles en condiciones de crecimiento normales mientras que cuando se sometieron a estrés las plantas de TS se marchitaron (18c) y las plantas transgénicas también se dañaron bastante como se muestra en c, pero algunas están todavía verdes y sanas. Porcentaje de supervivientes de cada genotipo después del tratamiento de congelación:

Genotipo	% de supervivientes
101.3	8
35S:PR2	17

Figura 19. Las proteínas apoplásticas de girasol se expresan diferencialmente durante la aclimatación al frío

35 SDS-PAGE que muestra el patrón de expresión de proteínas apoplásticas obtenidas de plantas aclimatadas durante a 4 °C en plantas de girasol de 2 semanas de edad; NA: plantas no aclimatadas; A12, A25 y A42 representan muestras tomadas 12, 25 y 42 días después de poner las plantas a 4 °C.

Figura 20. Discos de hojas de girasol transformados con 35S:HAHB1 expresan en exceso genes putativamente relacionados con la respuesta al frío

40 Se transformaron hojas de girasol con un vector vacío (121) o 35S:HAHB1 (HAHB1); se midieron niveles de transcrito de diferentes respuesta genes por qRT-PCR; se usaron genes *ACTINA* (*ACTINA2* más *ACTIN8*) como controles internos y las desviaciones estándar se calcularon a partir de al menos tres experimentos independientes; 45 los genes medidos son quitinasa (A), SAG21 (B), ZAT10 (D) y DREB (C) la función de cada uno se describe en la sección de resultados.

Figura 21. Comparación de miembros de la clase de proteínas HD-Zip

50 Se comparó la secuencia del extremo carboxi de HAHB1 con los extremos carboxi de la mayoría de las proteínas homólogas de otras especies de plantas encontradas usando el algoritmo blast. a) a d) muestran la secuencia del extremo C del extremo N al C del extremo C. a) muestra el motivo CI, d) el motivo CII. Las secuencias se alinearon usando el algoritmo clustal (Waterhouse y col., 2009). Para proteínas que no se espera que tengan funciones similares a HAHb1 o ATHB13, a pesar de la alta homología en las regiones HD-Zip, hay una divergencia significativa 55 en el extremo C. Sin embargo, esta comparación de cada miembro de HD-Zip también muestra algún grado de conservación en los motivos CI y CII del extremo carboxi. La mayoría de las proteínas homólogas no están funcionalmente caracterizadas, pero la alta homología en el dominio HD-Zip permite clasificarlas como proteínas HD-Zip o genes que codifican proteínas HD-Zip. Basándose en el alineamiento, fue posible deducir una secuencia consenso como se muestra en el presente documento.

60

Figura 22. Esquema de proteínas quiméricas que fusionan diferentes dominios HD-Zip

Se usaron proteínas quiméricas que fusionan el dominio HD-Zip de una proteína con el dominio del extremo carboxi de otra para transformar plantas de *Arabidopsis*, obtener líneas homocigóticas y analizar fenotipos, especialmente con respecto a características conocidas conferidas por proteínas HAHB1ts, en comparación, por ejemplo, con las características conocidas y efectos de HAHB4. Lado izquierdo: nombres de las construcciones. CI y CII representan los dos motivos del extremo carboxi conservados de HAHB1. Ext C indica el extremo carboxi de HAHB4 que es diferente de HAHB1 o sus homólogos.

Figura 23. Alineamiento de diferentes regiones de HAHB1 frente a la proteína DB no redundante (algoritmo Blastp)

Las barras en la gráfica representan el % de identidad (ID) o similitud (SIM) entre ciertas regiones de HAHB1 y la proteína más similar en esa región (blanca), ATHB13 (estampada) y ATHB23 (negra) como se ha calculado por el algoritmo Blastp. Los diferentes segmentos comparados son: secuencia de HAHB1 completa, los dominios HD-Zip, el extremo COO completo (CICII), el primer motivo aislado (CI) y el segundo motivo aislado (CII). El algoritmo Blastp calcula estos porcentajes tomando la región con la mayor homología. Esto se muestra en la tabla a continuación.

Resumen de alineamientos						
REGIÓN HAHB1						
Completa			HDZip		CICII	
313			100		122	
Identidad		Similitud	Identidad	Similitud	Identidad	Similitud
Más similar	224/314 (71 %)	47/314 (78 %)	92/100 (92 %)	97/100 (97 %)	79/121 (65 %)	84/121 (69 %)
ATHB13	192/322 (59 %)	222/322 (68 %)	86/100 (86 %)	91/100 (91 %)	56/124 (45 %)	68/124 (54 %)
ATHB23	162/316 (51 %)	199/316 (62 %)	76/100 (76 %)	91/100 (91 %)	50/121 (41 %)	59/121 (48 %)

Figura 24. Proteínas apoplásticas de plantas transgénicas (35S:PR2) y no mutadas

SDS-PAGE que muestra las proteínas apoplásticas obtenidas de plantas de TS y transgénicas (35S:PR2) no aclimatadas. Las muestras se aislaron de plantas de 25 días de edad cultivadas en condiciones normales. La flecha indica la banda diferencialmente expresada. Se aislaron proteínas apoplásticas de las plantas de TS y transgénicas cultivadas en condiciones normales y se analizaron por SDS-PAGE. Como puede observarse, aunque las plantas no se sometieron a estrés al frío, PR2 expresado está presente en el apoplasto celular en el genotipo transgénico. El peso molecular de esta banda coincide con el esperado para PR2, pero todavía no se levó a cabo la determinación de secuencias.

Figura 25. PR2, PR4 y glucanasa putativas están reguladas por incremento en discos de hojas de soja y *Nicotiana tabacum* transitoriamente transformadas con las construcciones 35S:HAHB1 y 35S:ATHB13.

Se midieron niveles de transcrito de genes de diferente respuesta por qRT-PCR; se usaron genes *ACTINA* (*ACTINA2* más *ACTIN8*) como controles internos y las desviaciones estándar se calcularon a partir de al menos tres experimentos independientes; los genes medidos para girasol son quitinasa (tc18434), HASAG21 (tc19654), HAZAT10 (tc16546) y HADREB (tc23839) mientras que para soja fueron GMPR2 (AK285952.1), GMPR4 (AK246040.1) y GM-glucanasa (AY461847.1) y para tabaco NTPR2 (EU867448.1) y NTPR4 (S72452.1)

Figura 26. Plantas homocigóticas que expresan el factor de transcripción HAHB1 son más tolerantes a infección por *Pseudomonas*.

26a: Plantas infectadas con *Pseudomonas* están muriendo (el área marchitada se muestra con una flecha) mientras plantas transgénicas son sanas y verdes. 26b es una fotografía de las plantas dos días después de la infección. En esta fotografía puede verse que las plantas transgénicas no presentan necrosis, visualizada por áreas coloreadas más brillantes, pero sí plantas de TS. 26c es una fotografía tomada después de la tinción con azul de Evans (que colorea el tejido de necrosis). En esta figura también puede apreciarse una diferencia entre genotipos: las plantas de TS se tiñen (áreas con manchas marcadas con flechas), pero las transgénicas no se tiñen.

Figura 27. Plantas de *Arabidopsis* homocigóticas que expresan 35S-β glucanasa y PR2.

La 35S-β glucanasa (AT4g16260) es uno de los genes diana de HAHB1 identificados en los experimentos de micromatrices y las plantas que expresan 35S-PR2 son más resistentes a condiciones de congelación. 121 designa no mutado (14 % de supervivientes en condiciones de congelación), 35S-β glucanasa (62 %), 35S-PR2 (42 %). Las plantas de control presentan daño grave visualizado como un marcado marchitamiento de la planta completa después de un tratamiento de congelación mientras que las transgénicas presentan un mayor porcentaje de tejido sano, siendo mayor en 35S:glucanasa que en el genotipo 35S:PR2.

Figura 28. PR4 (se muestran tres de cinco líneas independientes) confiere tolerancia a la congelación cuando se expresa en exceso y ectópicamente en plantas de *Arabidopsis* transgénicas.

Se cultivaron plantas en condiciones de control durante 25 días y a continuación se trataron 2 horas a -8 °C en vermiculita/perlita. A continuación, las plantas se pusieron en condiciones normales durante 6 días para la recuperación antes fotografiarse. Las plantas de control presentan grave daño visualizado como una marchitamiento marcado de la planta entera después de un tratamiento de congelación mientras que las transgénicas (35S:PR4) presentan un mayor porcentaje de tejido sano. Las plantas transgénicas fueron F2 (heterocigóticas). Porcentaje de supervivientes de cada genotipo después del tratamiento:

Genotipo	% de supervivientes
TS	31
PR4-17	75
PR4-19	75
PR4-6	92
PR4-10	75
PR4-23	50

Figura 29. Estabilidad de la membrana en plantas de ts y transgénicas que expresan PR2 (línea 8, 16 y 18) medida como conductividad de solución salina liberada.

La menor conductancia relativa indica mayor estabilidad de la membrana en plantas 35S:PR2 en comparación con plantas TS después de un tratamiento de congelación. El eje x muestra un tratamiento de "1 hora a -8 °C".

Figura 30. Estabilidad de la membrana en plantas de ts y transgénicas que expresan glucanasa medida como conductividad de solución salina liberada.

Se llevó a cabo la técnica de lixiviación esencialmente como se describe por Sukumaran y Waiser (1972). Se cultivaron plantas durante 20 días en condiciones estándar y a continuación se regaron con NaCl 50 mM (1 l en una bandeja de 45 x 45 cm). Una semana después de esto, las plantas se regaron con NaCl 150 y una semana más tarde con NaCl 200 mM. Un día después de cada riego con solución salina, se cortaron seis hojas de cada planta y se lavaron exhaustivamente con agua destilada. Después de esto, las hojas se pusieron en 15 ml de agua desionizada doblemente destilada con agitación continua en un baño de agua a 25 °C durante 3 h. Después de la decantación se midió la conductancia del extracto acuoso (C1). A continuación, las hojas se pusieron en un baño de agua a 65 °C durante 16 horas con agitación continua y una hora adicional a 25 °C antes de la medición de la conductancia de la solución (C2). La conductancia real se calculó como la relación entre C2/C1 ($L = C2/C1$) y se usó como índice de lesión. Valores de L superiores a 0,5 indican una grave lesión. El eje y indica "conductancia relativa". La menor conductancia relativa en plantas 35S:H1 indica mayor estabilidad de la membrana que en plantas PrH1:H1 y TS después de un tratamiento de congelación de una hora. En condiciones de control o después de dos horas de tratamiento de congelación, no hay diferencia entre genotipos.

Figura 31. Las plantas transgénicas para glucanasa son más tolerantes al estrés por sequía

Plantas de 25 días de edad se sometieron a estrés por sequía no regando las plantas durante 7 días. Se tomaron fotografías cinco días después de volver a regar. 5b, 14a y 27a son líneas que llevan el transgén glucanasa. Las plantas de TS (primera columna de plantas a mano izquierda) están más gravemente dañadas que las plantas 35S:glucanasa (segunda a tercera columnas), como demuestra el marchitamiento en sus hojas. Porcentaje de supervivientes de cada genotipo después del tratamiento:

Genotipo	% de supervivientes
TS	20
5B	46
14A	62
27A	69

Figura 32. Las plantas homocigóticas que expresan en exceso PR2 son más tolerantes al estrés por sequía

Este ensayo se realizó esencialmente como el descrito en la Figura 31, pero con las plantas de genotipo 35S:PR2 frente al TS. El marchitamiento en la parte aérea de las plantas de TS (primera columna de plantas a mano izquierda) muestra que están significativamente más afectadas por la sequía que las plantas 35S:PR2 (segunda a terceras columnas: líneas 8C, 16B, 18B), que muestran tejidos más sanos. Porcentaje de supervivientes de cada genotipo después del tratamiento:

Genotipo	% de supervivientes
Ts	23
8C	62

16B
18B44
50**Figura 33. Plantas de semillero tratadas con ACC, precursor de etileno, se evaluaron para el desarrollo de la triple respuesta.**

5 Se cuantificó la presencia o ausencia del gancho apical y las proporciones resultantes usadas para comparar el grado de respuesta en cada línea. Las líneas de *Arabidopsis* 35SCaMV:HAHB4 fueron casi insensibles a etileno. H4WCT, H1WCT y H4H1 mostraron una respuesta intermedia. Finalmente, HAHB1 y TS fueron altamente sensibles. Eje X: líneas, eje Y: plantas sin un gancho apical (proporción).

10 Figura 34. Expresión cinética de ATHB13 en plantas sometidas a -8 °C

15 Cinética de inducción de *ATHB13* en plantas de semillero de 21 días de edad puestas a -8 °C durante 3 horas. Se tomaron muestras a 0, 30, 60, 120 y 180 minutos. Los niveles de transcrito de *ATHB13* en hojas de 21 días de edad puestas a -8 °C se determinaron por RT-PCR cuantitativa y las desviaciones estándar se calcularon a partir de tres muestras independientes en las que se usaron transcritos de actina (*ACTINA2* más *ACTINA8*) como controles internos; todos los valores se normalizaron con respecto al valor medido a tiempo 0, arbitrariamente asignado un valor de uno. El eje y muestra veces de inducción.

20 Descripción detallada

20 La presente invención se describirá ahora adicionalmente. En los siguientes fragmentos, diferentes aspectos de la invención se definen en más detalle. Cada aspecto así definido puede combinarse con cualquier otro aspecto o aspectos a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas.

25 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de botánica, microbiología, cultivo de tejidos, biología molecular, química, bioquímica y tecnología de ADN recombinante, que están dentro de la experiencia de la materia. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía.

30 El término estrés/tolerancia al estrés como se usa en el presente documento incluye estrés abiótico y biótico. Dicho estrés/tolerancia al estrés está seleccionado preferentemente de congelación, baja temperatura, frío, sequía, alta salinidad y/o invasión de patógenos. Como se muestra en el presente documento, las plantas transgénicas muestran tolerancia elevada/potenciada a estos tipos de estreses. La tolerancia puede medirse como se muestra en los ejemplos. La tolerancia es elevada en comparación con plantas no mutadas (ts, tipo silvestre). El aumento puede ser al menos dos veces hasta 10 veces o más.

40 Los presentes inventores describen una secuencia de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N° 1, un fragmento funcional, parte o una variante funcional de la misma. En una realización, la secuencia de ácidos nucleicos aislada comprende o consiste en una secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N° 1.

45 El término "parte funcional o variante funcional de *HAHB1*" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de genes de variante o parte de la secuencia de genes que retiene la función biológica de la secuencia no de variante completa, es decir, confiere tolerancia al estrés cuando se expresa en una planta transgénica. Específicamente, la variante puede ser una secuencia química que codifica el extremo C de *HAHB1* como se describe en el presente documento (o para CI y/o CII de *HAHB1* o la secuencia consenso), por ejemplo, acoplada al extremo N de otro miembro de la familia I de HD-Zip. El término "variante" puede también referirse a una secuencia
50 que codifica una secuencia de péptidos/proteínas que es homóloga a *HAHB1* y que muestra homología en los dominios HD y LZ y también en los dominios del extremo C (en particular con CI y CII como se explica más adelante). Una variante funcional también comprende una variante de *HAHB1* que es sustancialmente idéntica, es decir, solo tiene ligeras variaciones de secuencia, por ejemplo, en residuos no conservados, a las secuencias de *HAHB1* y *HAHB1* como se muestra en el presente documento y confiere tolerancia al estrés. Una parte funcional
55 puede ser la secuencia que codifica el motivo CI y/o CII.

60 Los inventores también han mostrado que el promotor de *HARB1* como se define en SEC ID N° 1 es eficaz en detectar condiciones estresantes y puede usarse para conferir expresión génica inducida por estrés a un transgén, por ejemplo, bajo condiciones de frío, congelación, baja salinidad o sequía. Así, los presentes inventores también desvelan un promotor inducible del estrés que comprende o que consiste en una secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N° 1, un fragmento funcional o una variante funcional del mismo. Un promotor es útil para controlar la expresión transgénica de transgenes en plantas transgénicas transformadas con un gen bajo el control de dicho promotor. Por consiguiente, los presentes inventores desvelan adicionalmente un vector que comprende una construcción génica que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N° 1, un fragmento funcional o

una variante funcional del mismo y para el uso de una secuencia como se define en SEC ID N° 1, un fragmento funcional o una variante funcional de la misma como promotor inducible del estrés. Además, los presentes inventores desvelan un procedimiento para conferir expresión génica inducida por el estrés en una planta en la que dicho procedimiento comprende transformar una planta con un casete de expresión que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N° 1, un fragmento funcional o una variante funcional de la misma, operativamente ligada a una secuencia del gen de interés para la expresión.

Cualquier secuencia del gen de interés puede estar operativamente asociada de este modo para lograr tal expresión inducida sobre la exposición de plantas que llevan la construcción a condiciones de estrés apropiadas seleccionadas de condiciones de congelación, baja temperatura, sequía por frío y/o de alta salinidad.

Los presentes inventores describen adicionalmente una secuencia de ácidos nucleicos aislada que comprende o que consiste en una secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N° 7. En otro aspecto, los presentes inventores también desvelan una secuencia de ácidos nucleicos aislada que comprende o que consiste en una secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N° 2. En el presente documento se describe una secuencia de polipéptidos aislada que comprende o que consiste en una secuencia de SEC ID N° 5.

También se describen vectores que comprenden construcciones de genes que codifican una proteína que confiere tolerancia al estrés en plantas. Específicamente, se describe un vector que comprende una construcción génica que codifica la proteína HAHB1 que comprende o que consiste en SEC ID N° 5, una parte funcional o variante de la misma. En una realización, el vector comprende una construcción génica que codifica la proteína HAHB1 que comprende o que consiste en SEC ID N° 5.

También se describe un vector que comprende una construcción génica que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N° 2, 6 o 7, una parte funcional o variante funcional de la misma. En particular, la secuencia comprende o consiste en ácido nucleico SEC ID N° 6 o 7. En una realización, una secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N° 2, 6 o 7, una parte funcional o variante funcional de la misma está operativamente ligada a una secuencia promotora. Por ejemplo, el vector comprende un casete de expresión en el que una secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID 6 está operativamente ligada a un promotor. En otra realización, una secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID 7 está operativamente ligada a un promotor.

Un promotor usado en las construcciones génicas de los vectores descritos anteriormente puede ser el promotor de HAHB1 endógeno que comprende SEC ID N° 1, una parte funcional o variante funcional del mismo. Por ejemplo, el vector comprende un casete de expresión en el que una secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID 6 o 7 está operativamente ligada al promotor de HAHB1 que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N° 1. En otra realización, un promotor puede ser un promotor que acciona una expresión en exceso constitutiva de un gen. La expresión en exceso según la invención significa que el transgén se expresa a un nivel que es superior a la expresión accionada por su promotor endógeno. Por ejemplo, la expresión en exceso puede llevarse a cabo usando un promotor fuerte, tal como el promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S), el promotor de actina de arroz o el promotor de ubiquitina de maíz o cualquier promotor que da expresión potenciada. También puede usarse un promotor inducible por estrés, tal como el promotor de la subunidad pequeña de RubisCO. Esta lista no se considera limitante ya que el experto podrá seleccionar un promotor adecuado.

Por ejemplo, el vector comprende un casete de expresión en el que una secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID 6 o 7 está operativamente ligada al promotor de CaMV35S. Alternativamente, puede lograrse expresión potenciada o elevada usando potenciadores o activadores de la transcripción o traducción y pueden incorporarse potenciadores en el gen para aumentar adicionalmente la expresión. Además, puede usarse un sistema de expresión inducible, tal como un sistema de expresión inducible por esteroide o etanol. También se prevé expresión ectópica, es decir, expresión génica en un tejido en el que normalmente no se expresa.

También se describe una célula huésped transformada con un vector o una secuencia de gen como se describe en el presente documento. Específicamente se describe una célula huésped que expresa una proteína de SEC ID N° 5, una parte funcional o variante funcional de la misma. En una realización preferida, la célula es una célula de planta. La célula de planta puede ser una célula de una planta monocotiledónea o dicotiledónea como se ha definido adicionalmente en el presente documento.

Los presentes inventores demuestran en el presente documento que *HAHB1* confiere tolerancia al estrés, por ejemplo, tolerancia a la congelación, a plantas transgénicas mediante la inducción de la biosíntesis de proteína anticongelante (PAC), que inhibe la formación de cristales de hielo.

Por tanto, los presentes inventores describen una planta transgénica transformada con un vector como se describe en el presente documento o transformada con una secuencia de gen como se describe en el presente documento. Así, los presentes inventores describen una planta transgénica que expresa o que expresa en exceso un gen que codifica la proteína HAHB1 de girasol o una variante o parte funcional de la misma. Preferentemente, la proteína HAHB1 comprende o consiste sustancialmente en una secuencia como se define en SEC ID N° 5, una parte funcional o variante funcional de la misma. Así, en una realización, la planta transgénica expresa o expresa en

exceso un gen que codifica la proteína HAHB1 como se define en SEC ID N° 5. Por ejemplo, la planta puede transformarse con una construcción génica que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N° 6 o 7, una parte funcional o variante funcional de la misma. El ácido nucleico que comprende una secuencia de SEC ID N° 6 o 7 puede estar bajo el control de un promotor como se ha definido anteriormente. En una realización, el ácido nucleico que comprende una secuencia de SEC ID N° 6 o 7 está bajo el control del promotor de HAHB1 que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N° 1, una parte funcional o variante funcional de la misma. En otra realización, el ácido nucleico que comprende una secuencia de SEC ID N° 6 o 7 está bajo el control del promotor 35S del CaMV. Como se explica más adelante, la secuencia del gen también puede ser una secuencia de gen que codifica un homólogo de HAHB1 (con alta homología en los dominios HD, LZ y CICII), tal como ATHB13, o una construcción quimérica que comprende el dominio del extremo C de HAHB1. La planta se caracteriza porque es más tolerante a condiciones de estrés en comparación con su homólogo no mutado, específicamente a un estrés seleccionado de congelación, baja temperatura, frío, sequía, alta salinidad y/o invasión de patógenos. En una realización, el estrés es congelación.

Los presentes inventores también describen un procedimiento de producción de una planta tolerante al estrés o que potencia la tolerancia al estrés de una planta que comprende transformar una planta con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica *ATHB13* que comprende una secuencia como se muestra en SEC ID N° 64 o una variante funcional o parte de la misma. Así, los usos y procedimientos como se describen con respecto a la SEC ID N° 2, 6 y 7 también se aplican a SEC ID N° 64. Otro ejemplo que puede usarse es *ATHB23*, un gen que comparte alta homología con *HAHB1*.

La planta transgénica así obtenida se caracteriza porque muestra tolerancia potenciada al estrés en comparación con una planta de control. La planta de control es preferentemente una planta no mutada.

En otro aspecto, los presentes inventores describen un procedimiento de producción de una planta tolerante al estrés que comprende transformar una planta con una secuencia de ácidos nucleicos como se describe en el presente documento o un vector como se describe en el presente documento. Los presentes inventores también desvelan un procedimiento para aumentar la tolerancia al estrés en una planta que comprende transformar una planta con una secuencia de ácidos nucleicos como se describe en el presente documento o un vector como se describe en el presente documento.

En una realización de estos procedimientos, el transgén dirige la expresión de la proteína HAHB1 que comprende una secuencia de SEC ID N° 5. Por ejemplo, la transformación puede ser usando un ácido nucleico que comprende una secuencia de SEC ID N° 6 o 7. Esta secuencia puede estar bajo el control del promotor del gen *HAHB1* que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N° 1, una parte funcional o variante funcional de la misma o bajo el control del promotor 35S del CaMV. El transgén también puede dirigir la expresión de una parte de la proteína HAHB1 (por ejemplo, el extremo C fusionado con el extremo N de otra proteína HD-Zip) o de un homólogo de *HAHB1*, por ejemplo, *ATHB13*.

A propósito de los aspectos anteriores, la tolerancia al estrés está seleccionada de tolerancia al estrés abiótico o biótico. El estrés abiótico está seleccionado de congelación, baja temperatura, frío, sequía y/o condiciones de alta salinidad. El estrés biótico es estrés producido por organismos patógenos, tales como patógenos bacterianos o fúngicos (véase el Ejemplo 16 y la Figura 26).

En otro aspecto, los presentes inventores desvelan una planta obtenible u obtenida mediante un procedimiento como se describe en el presente documento.

En otro aspecto, los presentes inventores desvelan el uso de una secuencia de ácidos nucleicos o uso de un vector como se define en el presente documento en conferir elevada tolerancia al estrés en una planta. En una realización, la secuencia usada es un ácido nucleico que comprende una secuencia de SEC ID N° 6 o 7. Esta secuencia puede estar bajo el control del promotor de HAHB1 que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N° 1, una parte funcional o variante funcional de la misma, o bajo el control del promotor 35S del CaMV. Dicha tolerancia al estrés está seleccionada de tolerancia al estrés abiótico o biótico. El estrés abiótico está seleccionado de congelación, baja temperatura, tolerancia al frío, sequía y/o condiciones de alta salinidad. El estrés biótico es invasión por un patógeno, por ejemplo, *Pseudomonas*.

Como se muestra en el presente documento, la planta en la que un vector o secuencia como se define en el presente documento se introduce puede ser *Arabidopsis*. Los inventores han mostrado que la secuencia del gen *HAHB1* de girasol puede dirigir la expresión de la proteína HAHB1 en *Arabidopsis*. Además, los inventores han mostrado que la expresión transgénica de 35S:HABH1 y la expresión de 35S:ATHB13, respectivamente, en otras plantas o tejido de planta produce la regulación por incremento de los genes diana esperados, proporcionando así evidencia de que tanto HABH1 como ATHB13 son eficaces en huéspedes de plantas exógenas y que la expresión transgénica de HABH1 y ATHB13 tiene aplicación universal en plantas genéticamente manipuladas. El experto así sabría que la invención no se limita a *Arabidopsis*, soja o tabaco que se usan como ejemplos no limitantes en los experimentos en el presente documento. El experto sabría que puede usarse cualquier planta monocotiledónea o dicotiledónea. Una planta dicotiledónea puede seleccionarse de las familias que incluyen, pero no se limitan a,

Asteraceae, *Brassicaceae* (por ejemplo, *Brassica napus*), *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Leguminosae* (*Caesalpiniaceae*, *Aesalpiniaceae*, *Mimosaceae*, *Papilionaceae* o *Fabaceae*), *Malvaceae*, *Rosaceae* o *Solanaceae*. Por ejemplo, la planta puede seleccionarse de lechuga, girasol, *Arabidopsis*, brócoli, espinaca, sandía, calabacín, col, tomate, patata, pimiento, tabaco, algodón, oca, manzana, rosa, fresa, alfalfa, judía, soja, haba panosa (fava),
 5 guisante, lenteja, cacahuete, garbanzo, albaricoque, peras, melocotón, vid o especies cítricas. En una realización, la planta es colza oleaginosa.

También se incluyen cultivos de biocombustible y bioenergía tales como caña de azúcar, colza oleaginosa/canola, linaza y sauce, chopo, híbridos de chopo, césped de pradera, *Miscanthus* o gimnospermas, tales como pino taeda.
 10 También se incluyen cultivos para forraje (por ejemplo, maíz forrajero), pastoreo o pienso (céspedes, trébol, esparceta, alfalfa), fibras (por ejemplo, algodón, lino), materiales de construcción (por ejemplo, pino, roble), reducción a pulpa (por ejemplo, chopo), materias primas para la industria química (por ejemplo, colza oleaginosa con alto ácido erúxico, linaza) y para fines de servicios (por ejemplo, hierbas de césped para campos de golf), ornamentales para jardines públicos y privados (por ejemplo, boca de dragón, petunia, rosas, geranio, *Nicotiana sp.*)
 15 y plantas y flores cortadas para el hogar (violetas africanas, begonias, crisantemos, geranios, plantas de *Coleus spider*, *Dracaena*, planta de caucho).

Una planta monocotiledónea puede, por ejemplo, seleccionarse de las familias *Arecaceae*, *Amaryllidaceae* o *Poaceae*. Por ejemplo, la planta puede ser un cultivo de cereal, tal como trigo, arroz, cebada, maíz, avena, sorgo, centeno, cebolla, ajo puerro, mijo, trigo sarraceno, hierba de césped, hierba de centeno italiano, césped de pradera, *Miscanthus*, caña de azúcar o especie *Festuca*.

Preferentemente, la planta en la que una secuencia o vector de la invención se introduce es una planta de cultivo. Por planta de cultivo se indica cualquier planta que se cultiva a escala comercial para consumo o uso humano o animal u otro uso no de alimento/pienso.
 25

Plantas preferidas son maíz, tabaco, trigo, arroz, colza oleaginosa, sorgo, soja, patata, tomate, cebada, guisante, judía, haba panosa, algodón, lechuga, brócoli u otras brásicas vegetales o chopo.

Una secuencia o vector descrito en el presente documento que codifica la proteína HAHB1 se introduce como transgén en la planta. Esto puede llevarse a cabo por diversos procedimientos como se conocen en el campo de la ingeniería genética de plantas, por ejemplo, usando transformación con *Agrobacterium* o bombardeo con partículas.
 30

El gen puede ser un gen exógeno, tal como *HAHB1* de girasol, expresado en una especie de planta diferente. Alternativamente, la invención también se refiere a usar un gen endógeno que expresa un homólogo de *HAHB1*, es decir, un gen que codifica un homólogo de *HAHB1* que es endógeno para la planta en la que se introduce y expresa o expresa en exceso. Como se explica en cualquier parte en el presente documento, el gen homólogo muestra alta similitud de secuencias en los dominios HD y LZ, pero también en los dominios del extremo C (CI y CII) ya que los dominios del extremo C parecen cruciales en conferir función de HAHB1.
 35

Los presentes inventores describen la medición de varios parámetros seleccionados en plantas transformadas con una construcción que lleva el gen *HAHB1* bajo el control de un promotor constitutivo, tal como el promotor 35S, operativamente ligado a la secuencia codificante de la proteína HAHB1, o una variante, análogo, homólogo u ortólogo adecuado de la misma, denominado generalmente en el presente documento HAHB1, para producir una construcción titulada *35S:HAHB1*, o bajo el control de un promotor del gen *HAHB1*, una variante, análogo, homólogo u ortólogo adecuado de la misma, generalmente denominada en el presente documento *promHAHB1:HAHB1*. La comparación, usando aquellos parámetros, de estas plantas con plantas transformadas con una construcción de control, por ejemplo, pBI 121, se describe en más detalle en la sección experimental más adelante, y se denomina en el presente documento "TS". La comparación confirma que el aumento en la tolerancia a la congelación observado en las plantas que comprenden la construcción de HAHB1, bajo el control de cualquier promotor, es debido a la acción de la PAC inducida, y que esto ayuda por último lugar a conservar la estabilidad de la membrana y el contenido de clorofila, además de a inhibir la formación de cristales de hielo y el daño en las plantas recombinantes.
 40
 45
 50

Se ha informado previamente que es común observar las penalizaciones del desarrollo y morfológicas en las plantas transgénicas que llevan factores de transcripción controlados por promotores constitutivos tales como 35S del CaMV como transgenes (Arce y col., 2008 y referencias en su interior). Estas penalizaciones se producen probablemente por los costes metabólicos generados por la activación de la biosíntesis de proteínas específicas, innecesaria en condiciones de crecimiento normales. En este sentido, *HAHB1* parece retardar muy ligeramente la tasa de desarrollo en las etapas de desarrollo tempranas de plantas transformadas con la construcción *35S:HAHB1*, pero esta característica desaparece casi completamente después en el ciclo de vida de la planta transformada. No se observaron características negativas morfológicas o de desarrollo en plantas transgénicas transformadas con la construcción *promHAHB1:HAHB1*, que indica que en estas plantas el gen se expresa a un nivel muy bajo en ausencia de estrés medioambiental. Aparentemente, estos niveles de transcrito no son suficientes para producir los altos costes metabólicos, pero suficientes para lograr la respuesta de tolerancia a la congelación deseada.
 55
 60
 65

Es importante distinguir la diferencia entre condiciones frías y de congelación debido a que las consecuencias y las respuestas desencadenadas por las plantas no son las mismas en estos dos estreses distintos. La congelación prolongada produce muerte tisular y, por último lugar, la muerte de la planta, mientras que el frío prolongado produce aclimatación de la planta y detención del desarrollo. En plantas de *Arabidopsis*, tanto de TS como transgénicas según la presente invención, incubadas durante varios meses a 4 °C, las plantas sobreviven cuando se ponen en condiciones normales. La posterior exposición de estas plantas aclimatadas a condiciones de congelación demuestra la potenciada supervivencia de las plantas aclimatadas en comparación con plantas no aclimatadas. A pesar de no ser capaz de detectar una diferencia en la supervivencia en condiciones frías entre las plantas de TS aclimatadas y transformadas con *HAHB1* aclimatadas, los presentes inventores podrían medir una diferencia significativa, tanto en contenido de clorofila como en estabilidad de la membrana entre genotipos, indicando así una tolerancia mejor conseguida por el genotipo transgénico.

Por otra parte, los tratamientos de congelación detectaron un mayor porcentaje de supervivencia, tanto en etapas vegetativas como reproductivas, para las plantas transformadas con *HAHB1* en comparación con plantas de TS, reforzando los resultados obtenidos durante el frío. En su conjunto, las observaciones confirman que la transformación con *HAHB1* confiere a las plantas tanto tolerancia a la congelación como tolerancia al frío.

Además de la congelación, o frío, la sequía o altas concentraciones de sales, por ejemplo, también producen estrés a las plantas. Sin embargo, la tolerancia de las plantas a diferentes tipos de estreses abióticos no se confiere necesariamente mediante mecanismos relacionados y de hecho se produce mediante diferentes rutas de transducción de señales. Así, no puede esperarse que un gen que confiere, cuando se expresa, un tipo de estrés, pueda también conferir un tipo diferente de estrés. En particular e inesperadamente, los presentes inventores demuestran en el presente documento que *HAHB1* actúa potenciando las respuestas de tolerancia en plantas a tres de estos factores de estrés diferentes - congelación, sequía y alta sal. Las plantas transgénicas *HAHB1* son más tolerantes a la sequía y alta salinidad que los controles no transformados, que indica que la proteína HD-Zip está actuando algo concomitantemente en varias respuestas de estrés abiótico, al menos cuando se expresa constitutivamente. Los datos de micromatrices confirman esto, ya que varios genes previamente descritos como que participan en tolerancia al estrés abiótico, tales como DREB, están fuertemente inducidos en plantas ectópicamente transgénicas y que expresan constitutivamente *HAHB1*.

Además, como se muestra en los ejemplos, las plantas transgénicas *HAHB1* son más tolerantes a la invasión por patógenos, por ejemplo, *Pseudomonas*.

Las respuestas de tolerancia están conservadas entre especies. En centeno de invierno, una de las especies más caracterizadas con respecto a la respuesta a la congelación, proteínas anticongelantes homólogas a aquellas detectadas en la micromatriz de *Arabidopsis*, son por último lugar responsables de esta tolerancia. Por otra parte, aunque hay datos genómicos limitados disponibles para girasol, los presentes inventores fueron capaces de identificar algunos genes (homólogos a aquellos detectados en la micromatriz) que muestran mayores niveles de expresión en hojas de girasol transitoriamente transformadas. Los ensayos de aclimatación indican un resultado coherente porque los patrones de proteínas de apoplasto cambian tanto en *Arabidopsis* como en girasol cuando las plantas se ponen a 4 °C. En la sección de Procedimientos experimentales en el presente documento, los presentes inventores proporcionan datos de experimentos de recristalización que muestran que extractos de apoplastos de plantas transgénicas son más eficaces en prevenir la formación de cristales de hielo que los extractos de apoplastos de plantas de control.

Los presentes inventores también muestran que las proteínas PR de *Arabidopsis*, aunque funcionan en respuestas antipatógenas, actúan en la respuesta anticongelante. Las plantas que expresan en exceso *HAHB1* y, por separado, PR2, PR3 y glucanasa se probaron en condiciones de congelación y estos genotipos fueron más tolerantes a la congelación que las plantas de control (ts). Sin desear ceñirse a teoría alguna, es posible, por una parte, que un grupo de proteínas anticongelantes pueda actuar cooperativamente para lograr una tolerancia óptima y solo si *HAHB1* está presente se expresan todos ellos. Por otra parte, basándose en los datos presentados en el presente documento, algunas de estas proteínas PR pueden ser capaces de conferir tolerancia a la congelación por sí mismas si se expresan altamente. Como se muestra en el Ejemplo 10 y las Figuras 27 a 32, la expresión en exceso de PR2, PR4 y β -glucanasa confiere tolerancia a condiciones de congelación en comparación con la no mutada. Además, también se observó tolerancia a la salinidad elevada. Así, el expresar PR2, PR4 y β -glucanasa en una planta transgénica puede conducir a aumentar la resistencia al estrés. La expresión puede ser del promotor endógeno o cualquier otro promotor definido en el presente documento, por ejemplo, un promotor adecuado para la expresión en exceso.

Así, en otro aspecto, los presentes inventores desvelan un procedimiento para producir una planta tolerante al estrés o que potencia la tolerancia al estrés de una planta que comprende transformar una planta con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica PR2. La secuencia puede comprender SEC ID N° 66, un homólogo o variante de la misma. Dicha tolerancia es preferentemente tolerancia a la congelación o tolerancia a la sequía. También se desvela una planta obtenida por este procedimiento. También se desvela el uso de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica PR2 aumentando/confiriendo tolerancia al estrés.

En otro aspecto, los presentes inventores describen un procedimiento de producción de una planta tolerante al estrés o que potencia la tolerancia al estrés de una planta que comprende transformar una planta con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica glucanasa. La secuencia puede comprender SEC ID N° 65, un homólogo o variante de la misma. Dicha tolerancia es preferentemente tolerancia a la congelación o tolerancia a la sequía. También se describe una planta obtenida por este procedimiento. También se describe el uso de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica glucanasa aumentando/confiriendo tolerancia al estrés.

En otro aspecto, los presentes inventores describen un procedimiento de producción de una planta tolerante al estrés o que potencia la tolerancia al estrés de una planta que comprende transformar una planta con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica PR4. La secuencia puede comprender SEC ID N° 67, un homólogo o variante de la misma. Dicha tolerancia es preferentemente tolerancia a la congelación o tolerancia a la sequía. También se describe una planta obtenida por este procedimiento. También se describe el uso de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica PR4 aumentando/confiriendo tolerancia al estrés.

En otro aspecto, los presentes inventores describen un procedimiento de identificación de una secuencia de ácidos nucleicos que confiere tolerancia al estrés cuando se introduce en una planta, que comprende usar una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de SEC ID N°: 1, 2, 6, 7, o una parte de la misma o una secuencia que codifica una secuencia que tiene homología con la secuencia de SEC ID N° 11, 12 o 14, o un ácido nucleico que codifica toda o una parte seleccionada de SEC ID N°: 8 o 13 o un ácido nucleico que codifica toda o una parte seleccionada de SEC ID N°: 5, para sondear un genoma de la planta o clones genómicos de plantas en una biblioteca. Las secuencias también pueden usarse para sondear una biblioteca electrónica, identificando así secuencias con homología usando bioinformática.

La divulgación también se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos aislada obtenida u obtenible mediante el procedimiento descrito anteriormente.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a la secuencia de ácidos nucleicos homóloga a la secuencia de *HAHB1* como se define en SEC ID N° 6 o 7 en la que dichas secuencias de genes pueden conferir tolerancia al estrés cuando se introducen y expresan en una planta.

Preferentemente, dicha secuencia de ácidos nucleicos homóloga muestra al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 % de homología con la secuencia de *HAHB1* que comprende SEC ID N° 6 o 7.

La secuencia de ácidos nucleicos homóloga se caracteriza porque codifica una proteína que tiene en su región del extremo N un homeodominio con homología con el consenso como se muestra en SEC ID N° 14.

La secuencia también comprende una cremallera de leucina. La cremallera de leucina ya se ha definido, es decir, en la base de datos de CDD, en la que se identifica con este nombre: PSSM Id: 121415.

Además, la secuencia de ácidos nucleicos homóloga se caracteriza porque codifica una proteína que tiene una secuencia del extremo C con homología con la secuencia del extremo C de *HAHB1* como se muestra en SEC ID N° 8. Además, la secuencia de ácidos nucleicos homóloga se caracteriza porque codifica una proteína que tiene una secuencia del extremo C que comprende una secuencia con homología con la secuencia consenso como se muestra en SEC ID N° 11 y/o 12. Preferentemente, dicha homología es al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 % de homología con la secuencia de *HAHB1* que comprende SEC ID N° 11.

A partir de la información proporcionada en el presente documento, un experto apreciará la presencia de dominios conservados y sabrá que basándose en la información de secuencias proporcionada, también pueden diseñarse cebadores para ayudar en la identificación de homólogo.

Además de la homología de secuencias de proteínas y la función biológica de conferir tolerancia al estrés cuando se expresa en una planta por tecnología de transgén, una secuencia homóloga también puede identificarse debido a que muestra similitud con *HAHB1* con respecto al patrón de expresión dirigido por sus promotores y el comportamiento en sacarosa.

Debido a la información de secuencias detallada disponible, también es posible identificar secuencias homólogas de bases de datos existentes usando bioinformática. Una vez se han identificado así las secuencias homólogas, es posible diseñar oligonucleótidos para amplificar los ADNc respectivos usando ARN aislado de la planta elegida en una condición en la que el gen se expresa. Después de la amplificación, el segmento de ADN puede clonarse en un vector adecuado que va a comprobarse por determinación de secuencias (multicopia) y subclonarse en un vector adecuado para la transformación de plantas dirigida por un promotor seleccionado. Si se quiere un promotor del homólogo, es necesario amplificarlo por PCR o alternativamente aislar el gen completo de una biblioteca genómica. El aislamiento de una biblioteca genómica es obligado cuando la secuencia completa es desconocida y solo se conoce un segmento parcial para construir una sonda. De la misma forma, el ADNc puede aislarse de una biblioteca

de ADNc si tal biblioteca y una sonda adecuada están disponibles. El gen así identificado puede entonces usarse en el procedimiento descrito más adelante.

5 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un procedimiento de producción de una planta tolerante al estrés o que potencia la tolerancia al estrés de una planta que comprende transformar una planta con una secuencia de ácidos nucleicos homóloga como se ha descrito anteriormente.

10 La clasificación de proteínas HD-Zip en cuatro subfamilias está soportada por las cuatro siguientes características distintivas: conservación del dominio HD-Zip que determina las especificidades de unión de ADN, estructuras génicas, motivos conservados adicionales y funciones.

15 Los miembros de la familia de HD-Zip presentan un motivo LZ justo en la dirección 3' desde el motivo HD. Los dos motivos están presentes en factores de transcripción que pertenecen a otros reinos eucariotas, pero su asociación entre sí en una única proteína es única para las plantas. El HD es responsable de la unión específica a ADN mientras que LZ actúa de motivo de dimerización. Las proteínas HD-Zip se unen a ADN como dímeros, y la ausencia de LZ abole absolutamente su capacidad de unión, que indica que la orientación relativa de los monómeros, accionada por este motivo, es crucial para un reconocimiento eficaz de ADN.

20 En *Arabidopsis*, la subfamilia I está compuesta por diecisiete miembros (*ATHB1/HAT5*, *3/HAT7*, *5*, *6*, *7*, *12*, *13*, *16*, *20*, *21*, *22*, *23*, *40*, *51*, *52*, *53*, *54*). Los subconjuntos I de HD-Zip de genes (en *Arabidopsis*) comparten su distribución de intrones/exones según sus relaciones filogenéticas. El peso molecular de las proteínas codificadas es aproximadamente 35 kDa y presentan un HD altamente conservado y un LZ menos conservado. No se ha descrito otra similitud o la presencia de motivos conservados adicionales, a nuestro conocimiento.

25 Una descripción *in vitro* completa, que consiste en ensayos de selección de sitios de unión ayudada por PCR y de huella genética, determinó que todas las proteínas codificadas por los genes de I de HD-Zip y probados, reconocen, como dímeros, la secuencia pseudopalindrómica CAAT(A/T)ATTG (Ariel y col., 2007).

30 Alineando las 15 proteínas de la subfamilia I de HD-ZIP de *Arabidopsis* homólogas es posible obtener un consenso relativamente bueno para el homeodominio, pero no para la cremallera de leucina. La definición de la última depende de una conservación de leucinas y ciertos otros residuos con atención especial a la posición relativa, por lo que los porcentajes de homología tienden a ser muy bajos (la conservación se define principalmente estructuralmente por las posiciones de las leucinas).

35 En un alineamiento de 15 proteínas de clase I de HD-Zip de *Arabidopsis thaliana*, los porcentajes son mucho mayores para el homeodominio que para el dominio de cremallera de leucina.

40 La expresión de los genes de la clase I de HD-Zip que se han caracterizado indica que su expresión está regulada por factores externos como sequía, temperaturas extremas, estreses osmóticos y condiciones de iluminación, y es específica para diferentes tejidos y órganos de la planta. Su función como factores de transcripción está relacionada con los acontecimientos de desarrollo en respuesta a tales condiciones medioambientales, particularmente aquellos en los que factores abióticos generan estrés pero no necesariamente confieren tolerancia a tales estreses. Ni, para aquellos factores que confieren tolerancia, puede predecirse, a priori, a qué estrés conferirán resistencia.

45 Diferentes subconjuntos de genes I de HD-Zip de *Arabidopsis* que poseen un estrecho parecido filogenético presentan patrones de expresión de órganos comunes y son sensibles a los mismos factores medioambientales.

50 *ATHB1*, el primer miembro aislado, actúa de mediador en la determinación del destino de células de la hoja, mientras que *ATHB16* participa en la señalización de la percepción de luz azul. Se propuso otro grupo de genes que participaba en respuestas al estrés relacionado con ABA y abiótico. Se obtuvieron muestras de estudios de expresión y plantas transgénicas, que indican que *ATHB7*, *12*, *5* y *6* están regulados por incremento o por disminución por condiciones de déficit de agua y/o ABA externamente aplicado. Bajo el efecto de estos estímulos, los genes I de HD-Zip se comportan como reguladores del desarrollo y del crecimiento. El gen *HAHB4* de girasol, por su parte, confiere tolerancia a la sequía a plantas de *Arabidopsis* transgénicas cuando se expresa bajo el control de promotores constitutivos o inducibles de sequía, pero no *ATHB7* y *ATHB12*, aún cuando son los genes más relacionados en *Arabidopsis*, excepto por el extremo C. Como la secuencia del genoma de girasol no está disponible, y considerando que *HAHB4* no se comporta como lo hace *ATHB7* o *12*, es lo más probable que no sean genes ortólogos, aunque presenten una alta homología de secuencias y estén regulados por los mismos factores externos.

60 La expresión en exceso de *ATHB3*, *13*, *20* o *23* sugiere que estos genes participan en la regulación del desarrollo de cotiledones y hojas, aún cuando *ATHB13* y *ATHB23* son los genes de *Arabidopsis* que presentan la mayor homología con *HAHB1*.

65 Los genes I de HD-Zip han evolucionado por una serie de duplicaciones de genes a una complejidad considerable, produciendo subconjuntos de genes parálogos que comparten distribución de intrones/exones, secuencias de

aminoácidos y patrones de expresión. La expresión ectópica de cada subconjunto I de HD-Zip de genes provoca diferentes efectos fenotípicos.

5 Los inventores investigaron por qué las proteínas I de HD-Zip, que todas se unen a las mismas secuencias de ADN (una característica determinada por la hélice III del dominio HD) y tienen patrones de expresión similares, participan sin embargo en diferentes rutas de transducción de señales e incluso ejercen diversas funciones.

10 Los presentes inventores han mostrado en el presente documento que una comparación de cada miembro HD-Zip muestra un alto grado de conservación en la región del extremo carboxi de proteínas que pertenecen a diferentes especies (véase el alineamiento proporcionado como Figura 21 en el presente documento).

15 La subfamilia I puede dividirse en varios grupos según la conservación en el dominio del extremo carboxi. Todos los miembros comparten homología en el dominio HD-Zip, pero cuando se realiza el alineamiento con las proteínas completas codificadas, pueden visualizarse varios grupos (árbol filogenético) que se diferencian entre ellos en el extremo carboxi.

20 A pesar del alto grado de conservación presentado en esta región, no se ha detectado similitud con ningún otro motivo conocido, a pesar de un profundo análisis bioinformático. HAHB1 comparte esta similitud con proteínas de especies variadas y distantes. Sin desear ceñirse a teoría alguna, los inventores creen que la región del extremo C proporciona un dominio de interacción proteína-proteína desordenado, y la interacción de este dominio con otras proteínas diversas determina la función de la proteína.

25 Los inventores han mostrado en el presente documento que sin el dominio HD-Zip, el extremo COO de HAHB1 no funciona autónomamente. También han mostrado que HD-Zip de HAHB4 (con su extremo COO deletado) fusionado con el extremo COO de HAHB1, parece comportarse como HAHB1. Todos los miembros I de HD-Zip caracterizados hasta ahora se unen a la misma secuencia de ADN. Por tanto, se cree que el extremo COO de HAHB1 fusionado con la región HD-Zip de cualquier dominio HD-Zip de la subfamilia I actúa de HAHB1 funcional.

30 De los experimentos mostrados en el presente documento, puede observarse que es la región del extremo C (CICII) la que confiere función de proteína. La diversidad en el extremo C de los miembros de la familia I de HD-Zip parece así explicar las diferentes funciones y efectos del desarrollo de estas proteínas. Por tanto, también pueden usarse construcciones quiméricas que comprenden el extremo COO de HAHB1 fusionado con la región HD-Zip de cualquier dominio HD-Zip de la subfamilia I que actúa de HAHB1 funcional en los procedimientos para conferir elevada tolerancia al estrés abiótico y biótico como se describe en el presente documento.

35 En tal construcción quimérica, la región del extremo N se caracteriza porque comprende un homeodominio con homología con la consensu como se muestra en SEC ID N° 14 (que se obtuvo de la subfamilia I), asociada en su extremo C a una cremallera de leucina. Además, este homeodominio conservado puede unirse a la secuencia palindrómica CAAT(A/T)ATTG que es característica para esta subfamilia y se diferencia de las secuencias unidas por miembros de otras subfamilias.

40 Por tanto, en otro aspecto, los presentes inventores desvelan una secuencia de ácidos nucleicos aislada que comprende o que consiste en una secuencia como se define en SEC ID N° 8, 9, 10, 11, 12 o 13. También se desvelan vectores que comprenden tales secuencias.

45 En otro aspecto, los presentes inventores desvelan una construcción de genes quimérica que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia del extremo N de una proteína HD Zip, una parte de la misma o una secuencia que comprende un motivo consenso del extremo N de la subfamilia I, operativamente asociado a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia que comprende el extremo C de HAHB1, parte de la misma o una secuencia que comprende el motivo consenso del extremo C de HAHB1.

50 La divulgación también se refiere a un polipéptido codificado por esta construcción de genes. El polipéptido puede conferir tolerancia al estrés en una planta en la que se introduce un gen que expresa tal polipéptido.

55 En una realización de este aspecto de la divulgación, la secuencia del extremo C de dicho polipéptido comprende o consiste en SEC ID N° 8, 9 y/o 10. En otra realización, la secuencia del extremo N de dicho polipéptido comprende o consiste en SEC ID N° 14 o una secuencia con homología con la secuencia consenso de SEC ID N° 14. Dicha homología es al menos del 80 %, preferentemente al menos del 90 %, más preferentemente al menos del 95 % o del 98 %. En otra realización, el polipéptido tiene la secuencia del extremo N de una proteína HD-Zip de la subfamilia I o el motivo consenso del extremo N operativamente asociado a una secuencia que comprende o que consiste en una secuencia como se define en SEC ID N° 11 y/o SEC ID N° 12 o una secuencia con homología con el motivo consenso del extremo C como se define en SEC ID N° 11 y/o el motivo consenso del extremo C como se define en SEC ID N° 12. Dicha homología es al menos del 80 %, preferentemente al menos del 90 %, más preferentemente al menos del 95 % o del 98 %.

65

En otra realización, el extremo N de dicho polipéptido es el extremo N de HAHB4.

La divulgación también se refiere a un procedimiento para conferir tolerancia al estrés como se define en el presente documento en una planta que comprende introducir y expresar en una planta una construcción de genes química anterior que codifica un polipéptido o proteína como se ha definido anteriormente.

5

Ejemplos

Habiendo descrito generalmente la invención desvelada en el presente documento, que incluye procedimientos por los que aquellos expertos en la materia podrían hacer y usar la invención, los siguientes ejemplos se proporcionan para extender adicionalmente esta descripción, para permitir a aquellos expertos en la materia poner en práctica la presente invención, que incluye su mejor modo. Sin embargo, los detalles específicos de los ejemplos que siguen no son limitantes. Más bien, para una apreciación del alcance de la invención contemplado en el presente documento, debe hacerse referencia a las reivindicaciones adjuntas y los equivalentes de las mismas.

10

15 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTAL

A menos que se establezca expresamente de otro modo, los siguientes materiales y procedimientos se utilizaron en los ejemplos no limitantes que siguen:

20

A. Construcciones

35SCaMV:HAHB1: El ADNc se aisló de una biblioteca construida en lambda gt10 como se ha descrito previamente (Chan & Gonzalez, 1992, y la secuencia se proporcionó a GenBank, véase el nº de acceso L22847, y SEC ID Nº: 2: en el presente documento para la secuencia de ácidos nucleicos y SEC ID Nº: 5: en el presente documento para la secuencia de proteínas traducida). Este fragmento se clonó en el sitio EcoRI del vector pMTL22 y se limitó con *BamHI/SacI* con el fin de clonarlo en el vector pBI 121 previamente tratado con las mismas enzimas. De esta forma, la expresión de ADNc está controlada por el promotor 35S del CaMV.

25

HAHB1:GUS: La región promotora (SEC ID Nº: 1: en el presente documento) se aisló de una biblioteca genómica de BAC usando como sonda el primer intrón (SEC ID Nº: 3: en el presente documento) del gen previamente aislado por PCR usando dos oligonucleótidos específicos. El inserto de BAC de aproximadamente 125 kbp se limitó con varias enzimas, se sometió a electroforesis y se hibridó en una transferencia Southern con la misma sonda. Se subclonó un fragmento *HindIII* de 2000 pb positivo en el vector pUC119 y se secuenció. El inserto presentó una secuencia codificante parcial más la región promotora. La región promotora se amplificó por PCR con los oligonucleótidos PromHAHB1 (Tabla a) y PR (Tabla a) y se clonó en el vector TOPO (Invitrogen). A continuación, este plásmido se limitó con *XbaI* y *BamHI* y finalmente se clonó en el vector pBI101.3. De esta forma, un promotor de *HAHB1* dirige la expresión del gen indicador *GUS*. Esta construcción se llamó *RAHB1:GUS*.

30

35

promHAHB1:HAHB1:HAHB1:GUS se limitó con *BamHI/SacI* y el ADNc de *HARB1* se clonó en el vector, reponiendo el gen *GUS*. De esta forma, la expresión de *HAHB1* está controlada por su propio promotor.

40

Estas tres construcciones, además de pBI121 y pBI101.3 (usadas como controles), se usaron para transformar células DH5α de *Escherichia coli* y luego *Agrobacterium tumefaciens*.

45

Ambos, glucanasa y PR2 de *Arabidopsis*, se clonaron del siguiente modo: se amplificó ADN genómico de *Arabidopsis* (Col 0) con los oligonucleótidos glucanasa CDS-R/glucanasa CDS-F y PR2 CDS-R/PR2 CDS-F. La secuencia de los oligonucleótidos usada para la glucanasa se muestra en el listado de secuencias en el presente documento como SEC ID Nº 23 y 24. La secuencia de los oligonucleótidos usada para PR2 se muestra en el listado de secuencias en el presente documento como SEC ID Nº 21 y 22.

50

Una vez se obtuvieron los segmentos de ADN, se clonaron en el vector pBI121 previamente limitado con *BamHI/SacI* reponiendo el gen que codifica *GUS*. Al igual que con las otras construcciones, la clonación se realizó en células de *E. coli* y a continuación se transformaron células de *Agrobacterium*. A continuación, las plantas de *Arabidopsis* se transformaron siguiendo el procedimiento de inmersión floral.

55

B. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se compró *Arabidopsis thaliana* Heyhn. ecotipo Columbia (Col-0) de Lehle Seeds (Tucson, AZ). Las plantas se cultivaron directamente en tierra en una cámara de crecimiento a 22-24 °C bajo fotoperiodos de día largo (16 h de iluminación con una mezcla de lámparas fluorescentes blancas frías y GroLux) a una intensidad de aproximadamente 150 μE m⁻² s⁻¹ en macetas de 8 cm de diámetro x 7 cm de altura durante los periodos indicados en las figuras.

60

Se cultivaron semillas de *Helianthus annuus* L. (girasol cv. contiflor 15, de Zeneca) en tierra en un cuarto de cultivo a 28 °C durante periodos de tiempo variables dependiendo del fin del experimento como se detalla en las leyendas de las figuras.

65

C. Estrés abiótico y tratamientos con hormona

Plantas de girasol de semillero (7 días de edad) cultivadas sobre papel húmedo se pusieron en medio líquido que contenía las diferentes hormonas (en las concentraciones indicadas en las leyendas de las figuras) y se incubaron durante dos horas. A continuación, las plantas se congelaron en nitrógeno líquido; se extrajo ARN total de cada muestra y se analizó por PCR en tiempo real (RT-PCR) como se describe más adelante.

Se siguió un procedimiento similar con plantas de 21 días de edad, pero en este caso, en lugar de plantas de semillero enteras, se pusieron discos de hojas de 1 cm de diámetro (tres discos para cada tratamiento) en el medio que contenía las hormonas. Para los ensayos de sequía en plantas de semillero, las plantas de semillero se pusieron durante 30 minutos sobre un papel seco.

D. Transformación de *Arabidopsis*

Se usó la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* transformada para obtener plantas transgénicas de *Arabidopsis* por el procedimiento de inmersión floral (Clough & Bent, 1998). Las plantas transgénicas se seleccionaron basándose en resistencia a kanamicina y PCR positiva que se llevó a cabo en ADN genómico con oligonucleótidos específicos. Para evaluar la expresión de *HAHB1*, se realizó RT-PCR en transformantes T2, como se describe más adelante. Se usaron cinco líneas positivas independientes para cada construcción (que se producen a partir de al menos dos experimentos de transformación diferentes) para seleccionar T3 y T4 homocigóticos con el fin de analizar los fenotipos y los niveles de expresión de *HAHB1*. Se usaron plantas transformadas con pBI101.3 como controles negativos. Para las otras construcciones, la selección se llevó a cabo similarmente y se eligieron de tres a cinco líneas independientes para el análisis.

E. Transformación transitoria de hojas de girasol

Se infiltraron hojas de girasol (en la etapa de desarrollo R1; Schneiter & Miller, 1981) con 5 ml de la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* y a continuación se transformaron con *35S:HAHB1* o *35S:GUS*, usados como control. Después de la infiltración, las plantas se pusieron en una cámara de crecimiento durante 48 h adicionales; se sacaron discos de 1 cm de diámetro (50 mg cada uno) de las hojas infiltradas y a continuación se extrajo el ARN con Trizol (véase más adelante). Para cada medición de transcrito de gen, se analizaron dos discos procedentes de diferentes plantas y el experimento se repitió al menos dos veces. Con el fin de probar la eficiencia de infiltración en estos experimentos, la expresión del gen indicador *GUS* se midió por ensayos histoquímicos como se ha descrito previamente (Dezar y col., 2005b).

F. Tratamientos del estrés por agua

El tratamiento del estrés por agua temprano en tierra se llevó a cabo del siguiente modo: dieciséis macetas de 8 x 7 cm, cada una con 120 g de tierra y 4 semillas, saturadas con agua, se pusieron en una bandeja cuadrada de plástico de 35 cm y se cultivaron como se ha descrito anteriormente, excepto que no se añadió agua adicional hasta que se observó daño grave.

El tratamiento del estrés por agua se hizo en plantas maduras de 4 semanas de edad cultivadas en las mismas condiciones de cultivo. A esta edad, no se añadió agua de nuevo hasta que el estrés fue evidente (aproximadamente 17 días adicionales). En ambos casos, se tomaron fotografías dos días después del riego.

G. Ensayos de frío

Se cultivaron plantas de *Arabidopsis* a la misma temperatura y fotoperiodo que para los tratamientos del estrés por agua durante 14 días (para la etapa vegetativa) o 25 días (etapa reproductiva). Entonces, se pusieron en una cámara de cultivo especial con el mismo fotoperiodo y condiciones de iluminación a 4 °C y se mantuvieron durante los periodos indicados en las figuras correspondientes.

H. Ensayos de congelación

Se realizaron dos tipos de ensayo diferentes. El primero usó incubaciones de 6-8 horas a -8 °C de plantas no aclimatadas cultivadas en condiciones normales. Después del tratamiento de congelación, las plantas se pusieron de nuevo en condiciones normales y se midieron todos los parámetros después de 6 días de recuperación.

El tratamiento alternativo usó incubación de plantas de 14 días de edad durante 7 o 14 días a 4 °C y solo después de este tratamiento de aclimatación, se sometieron a -8 °C durante 6-8 h. Después de eso, las plantas se pusieron a 4 °C durante 24 h y a continuación en condiciones de crecimiento normales durante 6 días.

I. Tratamientos por estrés a sales

A plantas de 14 días de edad cultivadas en condiciones normales se añadieron 1,5 l de NaCl 50 mM a la bandeja entera. Siete días después de eso, se usó un litro adicional de NaCl 150 mM para regar las plantas y finalmente siete días después se añadió otro litro de NaCl 200 mM. De esta forma, el estrés por sales se produce durante la etapa reproductiva. El estrés por sales durante la etapa vegetativa se generó añadiendo concentraciones crecientes de NaCl de 50 a 200 mM para el riego de plantas de 10 días de edad cada 4 días.

J. Cuantificación de clorofila

Se prepararon extractos de 100 mg de hojas después de la congelación con nitrógeno líquido. A cada muestra se añadieron 1,5 ml de acetona al 80 % y los tubos se pusieron en la oscuridad durante 30 min. Durante esta incubación, los sólidos de muestra se decantaron y la absorbancia a 645 y 663 nm se midió en los sobrenadantes con un espectrofotómetro. Se cuantificó la concentración de clorofila según Whatley y col., (1963).

K. Estabilidad de la membrana

La estabilidad de la membrana se determinó por la técnica de fuga de iones. Se lavaron hojas de cada genotipo con agua destilada antes de tratarlas con estrés por sales o bajas temperaturas según el experimento. Después del tratamiento correspondiente, se pusieron en 15 ml de agua destilada y se agitaron durante 1 h a 25 °C. Después de esto, la conductividad (C_1 , proporcionalmente inversa a la estabilidad) se midió en el medio que rodea el líquido. La conductancia final (C_2) se determinó en los sobrenadantes después de 4 h a 65 °C y una hora adicional a 25 °C con agitación continua. El índice de daño (L) se calculó como la relación C_1/C_2 . La base para esta técnica es que los tejidos dañados pierden electrolitos y estos electrolitos difunden en el medio de alrededor y aumentan la conductividad. Valores superiores a 0,5 indican daño grave (Sukumaran & Weiser, 1972).

L. Tratamientos con hormonas y de estrés para plantas transgénicas

Se pusieron plantas transgénicas (21 días de edad) del genotipo *promHAHB1:HAHB1* en SA 200 μ M, ABA 200 μ M o ACC 20 μ M durante 2 h. Después de las incubaciones, se congelaron y se extrajo el ARN total de cada muestra. Se llevaron a cabo tratamientos fríos y de sequía durante 8 y 2 h, respectivamente, poniendo las plantas en una cámara cultivada a 4 °C o sobre papel seco. Las plantas transformadas con el plásmido pBI101.3 se usaron como controles.

M. Mediciones de RT-PCR

Se preparó ARN para RT-PCR en tiempo real con el reactivo Trizol® (Invitrogen™) según las instrucciones del fabricante. Se usó ARN (1 μ g) para las reacciones de RT-PCR usando transcriptasa inversa M-MLV (Promega). Se llevaron a cabo PCR cuantitativas usando un aparato MJ-Cromos 4 en un volumen final de 25 μ l que contiene 1 μ l de SyBr verde (10 x), 10 pmoles de cada cebador, $MgCl_2$ 3 mM, 5 μ l de la reacción de RT y 0,20 μ l de platino Taq (Invitrogen Inc.). La fluorescencia se midió a 80-84 °C durante 40 ciclos. También se preparó ARN de girasol con la técnica de Trizol (Invitrogen Inc.). Para cada gen se diseñaron oligonucleótidos específicos usando secuencias públicamente disponibles (www.arabidopsis.org). Las secuencias diseñadas son como se especifican en la Tabla a.

N. Extracción de proteína de apoplasto y purificación cromatográfica

Se llevó a cabo la extracción de proteína apoplástica esencialmente como se ha descrito por Mauch y Staehelin (1989). Se cultivaron hojas de plantas (7 g) durante 25 días en condiciones normales y a continuación se aclimataron alternativamente durante 10 días a 4 °C o se pusieron durante 3 h a 8 °C como se indica en la leyenda de la figura y se trataron del siguiente modo. Después del periodo de aclimatación, se infiltraron a vacío durante 20 min en una solución que contiene EDTA 5 mM, ácido ascórbico 10 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, PMSF 1 mM, ácido caproico 2 mM y benzamidina 2 mM. Después de la infiltración, las hojas se secaron sobre papel y se pusieron en una jeringa de 20 ml. La jeringa con las hojas secadas dentro se colocó en un tubo de 50 ml y se centrifugó durante 20 min a 830 g. Después de la centrifugación, los extractos apoplásticos se recuperan del fondo de los tubos cuando no están contaminados con clorofila. En tales casos (contaminación con clorofila), los extractos se desecharon. La concentración de proteína se determinó por la técnica de Bradford. Después de eso, los extractos se concentraron a través de columnas Centricon Ultracel YM-10 de Millipore equilibradas con NH_4HCO_3 50 mM. Se purificaron alícuotas de cada muestra (1 mg de proteína cada una) a través de columnas Sephadex G-200 previamente equilibradas con NH_4HCO_3 50 mM y la elución se realizó con el mismo tampón y se siguió espectrofotométricamente a 280 nm.

Las proteínas se analizaron en 12 % de SDS-PAGE llevado a cabo según la técnica de Laemmli y se visualizaron con azul de Coomassie brillante R-250 (Sigma). Se usó un kit de calibración de LMW de Amersham Biosciences como marcador de peso molecular. Este kit permite la visualización de las siguientes bandas: 97, 66, 45, 30, 20 y 14,4 kDa.

O. Recristalización de hielo

Se llevaron a cabo ensayos de recristalización esencialmente como se describe por Griffith (2005). A los extractos apoplásticos (10 µl) obtenidos como se ha descrito anteriormente de plantas previamente aclimatadas, se añadieron 10 µl de sacarosa al 26 % (peso/peso). Cada mezcla, correspondiente a los diferentes genotipos, se trató del siguiente modo: 3 minutos a -80 °C, 10 minutos a -20 °C, 15 minutos a -8 °C, 30 segundos a 4 °C y finalmente 1 hora a -8 °C. Se realizó un control usando tampón (10 µl) en lugar de extracto de apoplasto. Las muestras se observaron y se fotografiaron con un microscopio óptico NIKON.

EJEMPLO 1 Patrón de expresión de *HAHB1*

Se aisló ADNc de *HAHB1* de una biblioteca de tallos de girasol (Chan & Gonzalez, 1994), pero su función no se caracterizó. Este ADNc codifica una proteína de 365 aminoácidos y parece ser un miembro no divergente de la subfamilia I de HD-Zip. Con el fin de caracterizar la expresión de este gen, se aislaron ARN totales de órganos de 7 días de edad y éstos se analizaron por qRT-PCR como se ha descrito en la sección experimental. La Figura 1a muestra que en esta etapa de desarrollo el FT se expresa principalmente en hipocótilos y meristemos apicales mientras que la expresión en cotiledones y raíces es menor, pero detectable. Este patrón de expresión cambia en plantas de 21 días de edad (Figura 1b), que muestran expresión primaria en peciolo y hojas y menores niveles de expresión en raíces, cotiledones, hipocótilos y tallos.

EJEMPLO 2 La expresión de *HAHB1* está regulada por incremento por ABA, citocinas y efectores del estrés abiótico

Los presentes inventores investigaron el efecto de algunas fitohormonas en la expresión de este gen en plantas de 7 y 21 días de edad. Los resultados, mostrados en la Figura 2a y 2b, indican que en plantas de semillero BAP presenta el mayor efecto sobre la expresión de *HAHB1* mientras que ABA presenta el mayor efecto en hojas de plantas más desarrolladas. Otras fitohormonas probadas (IAA; etileno (ACC), SA, JA y GA) tanto inhiben, inducen ligeramente como no producen efectos en absoluto sobre la expresión de este FT. Se sometieron plantas de semillero de girasol (7 días de edad) o plantas en desarrollo (21 días de edad) a diferentes tratamientos de estrés abiótico con el fin de investigar la función de este gen en la respuesta a condiciones medioambientales.

La sequía, salinidad, estrés oxidativo producido por H₂O₂ y estrés osmótico producido por sacarosa muestran todos baja inducción de la expresión de este gen en plantas de semillero. Las plantas etioladas presentan niveles de transcrito dos veces superiores a aquellos observados en condiciones de crecimiento normales (Figura 3a). Por otra parte, bajas temperaturas (4 °C) inducen la expresión de *HAHB1* más de cinco veces, que indica una regulación por incremento significativa de este gen bajo esta condición. Un transcurso de tiempo muestra una máxima expresión de *HAHB1* después de 7 horas de tratamiento con frío (Figura 3b). Por el contrario, en plantas más desarrolladas (21 días de edad), se muestra un comportamiento diferente. Varios efectores del estrés abiótico tales como sequía, altas concentraciones de NaCl, oscuridad y temperaturas frías inducen la expresión del gen *HAHB1* (Figura 3c).

Juntos, los resultados indican que *HAHB1* se induce en hojas maduras por diversas condiciones de estrés abiótico diferentes.

EJEMPLO 3 Obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan ectópicamente *HAHB1*

Para confirmar la función de *HAHB1*, los presentes inventores han usado un enfoque de expresión ectópica. Se fusionó la región codificante de *HAHB1* con el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, y la construcción se usó para transformar plantas de *Arabidopsis*. Se recuperaron varias líneas homocigóticas. Se seleccionaron cinco líneas transgénicas independientes, llamadas 35S:*HAHB1*-A, -B, -C, -D y -E, para análisis más detallado.

La Figura 4a muestra la diferencia en la morfología de las hojas entre plantas transgénicas y no mutadas. Las plantas transgénicas muestran bordes dentados y una forma diferenciada en comparación con sus homólogos no transformados (Figura 4a y 4c). Con respecto a la tasa de desarrollo, las plantas transgénicas presentan alargamiento del tallo retardado en fases tempranas, pero alcanzan una altura similar al final del ciclo de vida (Figura 4b). Se observó la máxima diferencia en la altura del tallo entre genotipos cuando las plantas pasan de la etapa vegetativa a la reproductiva. El número de hojas en roseta y silicuas, además de la productividad de semillas, no mostró diferencias significativas entre genotipos.

EJEMPLO 4 Las plantas transgénicas que expresan *HAHB1* son más tolerantes a bajas temperaturas que sus homólogos no mutados

En vista de la función conocida de algunas proteínas HD-Zip en respuestas de estrés abiótico, y el hallazgo de los presentes inventores de que *HAHB1* está regulado por incremento al nivel transcripcional por bajas temperaturas, los presentes inventores investigaron el comportamiento de plantas transgénicas que llevan la construcción 35S:*HAHB1* cuando se someten a temperaturas frías o de congelación en diferentes etapas de desarrollo.

Con el fin de probar el comportamiento bajo temperaturas de congelación, las plantas en la etapa vegetativa se pusieron a -8 °C durante 7 horas y a continuación en una cámara de cultivo en condiciones normales para permitir que se recuperaran. La Figura 5 muestra los resultados obtenidos. Entre el 57 y el 85 % (dependiendo de la línea) de las plantas transgénicas que expresan *HAHB1* sobrevivieron al tratamiento en comparación con solo el 20 % de las plantas no transformadas. El grave estrés afectó las hojas de todos los genotipos, pero las plantas transgénicas se volvieron sanas después de algunos días de recuperación, pero no las plantas TS (de tipo silvestre).

Como se ha mencionado anteriormente, bajas temperaturas producen la inhibición de la fotosíntesis y la respiración, además de una represión en la biosíntesis de proteínas e inducción de la degradación de proteínas. También se inhibe el transporte de hidratos de carbono. Todos estos efectos comparten, como característica común, la pérdida de funcionalidad de la membrana.

Con el fin de determinar la salud de la membrana después del tratamiento de congelación, los presentes inventores usaron la técnica de fuga de iones (véase Procedimientos experimentales) que permite la cuantificación del daño causado. La liberación de electrolitos al medio es un indicador de la gravedad del daño de la membrana y la conductividad en la solución de alrededor proporciona una medición cuantitativa de este daño. Después de la centrifugación, los extractos apoplásticos se recuperan del fondo de los tubos, a menos que estén contaminados con clorofila. En tales casos (contaminación con clorofila), los extractos se desecharon. Las plantas sometidas a un intervalo de tiempos diferentes a la temperatura de congelación (-8 °C) se trataron como se ha descrito en la sección de Procedimientos experimentales anterior, y se midió la conductividad. La Figura 5a muestra que, después de dos horas de incubación a -8 °C, la estabilidad de membranas de plantas de TS es menor que la de las plantas transgénicas. Al menos en parte, esto explica las diferencias observadas entre genotipos en su supervivencia bajo estas condiciones.

Con respecto a la composición de lípidos de la membrana, no se detectaron diferencias en la relación de ácidos grasos insaturados y saturados entre genotipos en plantas sometidas a temperaturas frías (datos no mostrados) que indica que la tolerancia a la congelación observada no es una consecuencia de un cambio en los lípidos de la membrana. El frío también produce la inhibición de la fotosíntesis. Se midió la concentración de clorofila en plantas sometidas a estas condiciones, tanto en etapas vegetativas como reproductivas. La Figura 6 muestra que el contenido de clorofila siguió estable en plantas transgénicas en ambas etapas, mientras que las plantas no transformadas perdieron progresivamente este contenido de pigmento que indica que las plantas transgénicas toleran mejor las temperaturas adversas. Es importante observar que en condiciones frías prolongadas, las plantas de *Arabidopsis* casi detienen su desarrollo y es imposible contar los supervivientes frente a plantas muertas como parámetro de tolerancia.

EJEMPLO 5 Las plantas transgénicas que expresan *HAHB1* son más tolerantes al estrés por sequía y sales que sus homólogos no mutados

Los niveles de transcrito de *HAHB1* aumentan cuando las plantas de girasol se riegan con altas concentraciones de sales como se ha descrito anteriormente. Con el fin de probar si este gen participa en la respuesta de las plantas a esta condición adversa, los presentes inventores regaron las plantas con concentraciones crecientes de NaCl y observaron su comportamiento.

La estabilidad de la membrana bajo estas condiciones fue uno de los parámetros elegidos con el fin de probar el comportamiento de las plantas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7a. La conductividad de las membranas de genotipo no mutado aumentó en particular durante el tratamiento en comparación con la de las transformadas, que indica que la estabilidad de la membrana disminuyó en consecuencia. La diferencia entre genotipos está más marcada cuanto mayor sea la concentración de NaCl.

El daño causado a las plantas es observable en una fotografía dos días después de regarlas con NaCl 400 mM (Figura 7b).

De la misma forma, la tolerancia a la sequía también se probó en plantas transformadas y no transformadas (Figura 8). El tratamiento fue intenso, como se describe en la Sección experimental. Plantas transgénicas *HARB1* toleraron mejor las condiciones de sequía y esta tolerancia se correlacionó con el nivel de expresión del transgén *HAHB1* en las diferentes líneas independientes.

EJEMPLO 6 Aislamiento y caracterización de la región promotora de *HAHB1*

Se aisló un segmento de 1060 pb correspondiente a la región promotora de *HAHB1* de una biblioteca genómica de BAC usando como sonda el intrón en 5' del ADNc, previamente aislado por PCR en ADN genómico con dos oligonucleótidos basados en la secuencia codificante. Dentro de esta región promotora se identificaron dos recuadros como elementos sensibles al frío por PLACE.

Este segmento se clonó de manera que se asociara operativamente al gen indicador *GUS* (es decir, la expresión del gen *GUS* fue bajo el control transcripcional del promotor de *HAHB1*) y, en una construcción separada, con el ADNc

de *HAHB1*, como se describe en la sección de Procedimientos experimentales anterior. Ambas construcciones se usaron para transformar plantas de *Arabidopsis* y una vez se identificaron las líneas homocigóticas de cada una, se analizaron como se muestra en las Figuras 9 y 10, que demuestra el patrón de expresión de *GUS* dirigido por el promotor de *HAHB1*. Como puede apreciarse, *GUS* se expresa en el sistema vascular de plantas de semillero de *Arabidopsis* y en las regiones meristemáticas de plantas adultas (25 días de edad y 40 días de edad) en condiciones de crecimiento normales.

EJEMPLO 7 Características fenotípicas de plantas que llevan la construcción *promHAHB1:HAHB1*

Se produjeron plantas transgénicas que llevan la construcción *promHAHB1:HAHB1*, se seleccionaron y se cultivaron en condiciones normales y se observaron. No fueron detectables diferencias significativas en tipo, forma o color en comparación con sus homólogos no mutados (es decir, estas plantas transgénicas son morfológicamente indistinguibles de los homólogos no mutados), véase la Figura (11a). Con respecto a la curva de crecimiento, medida como la altura del tallo durante el ciclo de vida, no se detectaron diferencias significativas, que indica que bajo el control de su propio promotor inducible, el gen no produce un retraso del desarrollo en las etapas tempranas del desarrollo de las plantas, como se observó con las plantas que llevan la construcción 35S:*HAHB1* constitutiva (Figura 11b).

EJEMPLO 8 Las plantas transformadas con la construcción *promHAHB1:HAHB1* son más tolerantes a las condiciones de congelación

Con el fin de probar si las plantas transgénicas que expresan *HAHB1* bajo el control de su propio promotor toleran condiciones de congelación mejor que las plantas no mutadas, las plantas se sometieron después de la aclimatación de 10 días a 4 °C a 6 horas a -8 °C y a continuación durante 2 días a 4 °C, y a continuación a temperatura normal, para permitir que se recuperaran durante un periodo de 6 días. El % de supervivientes del genotipo transgénico varió del 67 al 86 %, mientras que la tasa promedio de supervivencia de las plantas no transformadas fue del 40 % en este ensayo. El ensayo se realizó con 16 plantas de cada genotipo. La Figura 12 ilustra los resultados conseguidos en este tipo de experimento.

EJEMPLO 9 *HAHB1* confiere tolerancia al frío a plantas transgénicas mediante la inducción de genes que codifican proteínas anticongelantes

Los resultados presentados en el presente documento anteriormente indican que *HAHB1* confiere tolerancia a varios factores de estrés abiótico. Para esclarecer los mecanismos moleculares y fisiológicos que participan en esta respuesta, como este gen codifica un factor de transcripción y podría, por tanto, estar regulando diferentes rutas de señalización por transducción, los presentes inventores realizaron un análisis de micromatrices comparando el transcriptoma de plantas transgénicas y no mutadas usando ARN extraídos de ambos genotipos.

Un simple análisis de los datos obtenidos permite la visualización de la regulación por incremento de varios genes previamente asociados a estrés abiótico en las plantas transgénicas que expresan *HAHB1*. Entre estos genes, los más relevantes son aquellos relacionados con la síntesis de pared celular, con los genes de respuesta a patógenos (es decir, genes que codifican PR) y un gen β -1,3-glucanasa. Se ha descrito que las glucanasas, quitinasas y proteínas similares a taumatina funcionan como proteínas anticongelantes cuando las plantas se someten a bajas temperaturas. Las temperaturas de congelación conducen a la formación de cristales de hielo en crecimiento dentro y fuera de la célula, y los cristales son responsables del daño mecánico (cristales internos) y la deshidratación (cristales externos) de las plantas, respectivamente, y pueden producir la muerte de la planta. Se han encontrado y caracterizado proteínas anticongelantes (PAC) en organismos de varios reinos, que incluyen en peces, algunos insectos, artrópodos de la tierra, bacterias, hongos y plantas. Se han purificado de la región de apoplasto de plantas y funcionan localizándose sobre los cristales de hielo en formación. De esta forma, los cristales de hielo adoptan una forma bipiramidal que es incapaz de crecer. Una segunda forma en que estas proteínas realizan una función anticongelante es prevenir la recristalización (formación de grandes cristales a partir de pequeños). Adicionalmente, Tomczak y col. (2003) demostraron que las proteínas anticongelantes pueden interactuar directamente con membranas, inhibiendo así la fuga. Por consiguiente, y sin desear ligarse por consideraciones mecánicas, la elevada estabilidad de la membrana observada en plantas transgénicas *HAHB1* podría, al menos en parte, explicarse por la acción de estas proteínas.

Por consiguiente, los presentes inventores aislaron las proteínas de apoplasto con el objetivo de analizar las posibles diferencias entre genotipos. Los presentes inventores no observaron diferencias muy grandes entre plantas transgénicas y no mutadas cultivadas en condiciones normales (Figura 13A) o aclimatadas durante 16 horas (Figura 13B) o 10 días (Figura 12C), en SDS-PAGE, pero los presentes inventores pudieron identificar al menos cinco bandas secretadas al apoplasto celular en *Arabidopsis*. Téngase en cuenta que, a nuestro leal saber, no se han descrito previamente (Figura 13C). Se secuenciaron estos polipéptidos y tres de ellos coinciden con las secuencias de PR2, PR5 y una proteína desconocida, respectivamente. Desafortunadamente, las otras dos no dieron claras secuencias y parecen estar menos concentradas en plantas transgénicas que en las no mutadas. Los presentes inventores pueden especular que estas bandas no identificadas pueden ser proteína nucleantes del hielo, cuya expresión es reprimida en plantas transgénicas *HAHB1*. Sorprendentemente, cuando las plantas, tanto transgénicas

como no mutadas, se sometieron a condiciones de congelación a -8 °C, el patrón de proteína observado fue claramente diferente entre genotipos. Plantas transgénicas que llevan la construcción 35S:*HAHB1* presentan una mayor concentración de proteína de apoplasto (25 µg de proteína/g de tejido en extractos TS frente a 50 µg de proteína/g de tejido en plantas transgénicas), además de una banda adicional con un peso molecular aproximado de 23 kDa, que indica una respuesta más rápida frente a la condición adversa en comparación con sus homólogos no transformados (Figura 13 D). Tal respuesta más rápida podría ser, al menos en parte, responsable de la tolerancia observada en este genotipo.

Los eluatos cromatográficos se midieron espectrofotométricamente a 230 y 280 nm, ya que se sabe que la actividad anticongelante en apoplasto de centeno de invierno puede medirse en eluatos a 230 nm (Griffith y col., 1992; DeVries y col., 1986). Como puede apreciarse de la Figura 14, los perfiles correspondientes a los genotipos transgénicos se diferencian de aquellos de los perfiles no mutados.

Según Griffith y Yaish (2004), bajas temperaturas y sequía desencadenan una ruta de señalización por transducción dependiente de etileno, produciendo la expresión de proteínas con actividad anticongelante, mientras que, si la inducción en lugar de por exposición a frío o sequía se produce por SA, ABA o patógenos psicrófilos como moho de la nieve, la ruta de transducción de señales inducida produce la expresión de proteínas con actividad antipatógena. Teniendo en cuenta estos informes en la bibliografía, los presentes inventores analizaron los niveles de transcrito de tres genes que codifican proteínas anticongelantes putativas de la familia de PR tratadas o no tratadas con SA, ABA, sequía, baja temperatura o etileno en plantas transgénicas que llevan la construcción *promHAHB1:HAHB1* en comparación con plantas no transformadas.

La Figura 15 ilustra este experimento en el que los niveles de transcrito de los genes que codifican PR4 de *Arabidopsis* (AT3g04720), quitinasa (PR3, AT3g12500) y PR2 se cuantificaron bajo diversas condiciones de estrés o no estresadas. Como puede apreciarse de la figura, PR4 se expresa en plantas transgénicas en condiciones de control entre 4 y 15 veces superiores a en plantas no mutadas. Después de la exposición a sequía, bajas temperaturas o ACC, estos niveles aumentaron en todos los genotipos, mientras que cuando las plantas se trataron con SA o ABA, los niveles basales disminuyeron ligeramente (Figura 15).

PR3, también llamada quitinasa-B, se expresa más altamente en los genotipos transgénicos que en controles, y se induce significativamente en presencia de SA. Cuando se aplica ABA, no se observaron cambios en comparación con condiciones de control, mientras que los otros tratamientos (sequía, ACC y 4 °C) producen una disminución en los niveles de transcrito de este gen. Por otra parte, PR2 no se induce en plantas transgénicas en comparación con plantas no mutadas bajo condiciones normales, pero se induce en presencia de ABA o SA o a bajas temperaturas, mientras que se reprime mediante tratamientos con ACC o exposición a sequía. Juntos, estos resultados podrían indicar que este gen puede tener una doble función, tanto en la tolerancia al frío como en respuesta a patógenos.

EJEMPLO 10 Las proteínas anticongelantes de apoplasto presentes en plantas transgénicas que expresan *HAHB1* son responsables de la tolerancia a la congelación observada

Los mecanismos anticongelantes no están bien estudiados tanto en *Arabidopsis* como en girasol. En vista de los resultados obtenidos en el presente documento que indican que los niveles de transcrito de algunas proteínas anticongelantes putativas aumentaron en plantas transgénicas que expresan *HAHB1* y que el patrón de proteína de apoplasto es diferente en plantas aclimatadas en comparación con plantas no aclimatadas, los presentes inventores investigaron la actividad anticongelante de estas proteínas en plantas transgénicas y no mutadas. Se realizó un ensayo de recristalización con proteína de apoplasto siguiendo la técnica descrita en la sección experimental. Como puede apreciarse de la Figura 16, las proteínas de apoplasto de plantas aclimatadas transgénicas inhiben la disposición de pequeños cristales de hielo en mayores, mientras que los extractos no mutados no presentaron este efecto inhibitorio. Entre las líneas transgénicas, la línea A parece ser la más eficaz en conseguir esta función.

Por otra parte, se eligieron algunos de los genes identificados en la micromatriz como que presentan una actividad anticongelante putativa con el fin de obtener plantas transgénicas y posteriormente evaluar su comportamiento bajo condiciones de congelación. Se analizaron dos de estos genes seleccionados, que codifican PR2 y una β-1,3-glucanasa. Los genes se aislaron por PCR con oligonucleótidos específicos usando ADN genómico de *Arabidopsis*. Se clonaron en pBI 121.3 y se usaron para transformar *Arabidopsis*. Se seleccionaron plantas transgénicas por resistencia a kanamicina y por la inserción de los genes después de comprobarse por PCR. Se analizaron cinco líneas F2 independientes (no homocigóticas) en condiciones de crecimiento normales, además de cuando las plantas se sometieron a congelación. Las Figuras 17 y 18 muestran que ni PR2 ni glucanasa que expresan plantas presentan un fenotipo diferencial en condiciones de crecimiento normales, mientras que ambos genes parecen conferir tolerancia a la congelación a plantas transgénicas. Sin embargo, mientras que la glucanasa que expresa plantas presenta una tasa de supervivencia del 50 % bajo condiciones intensas de congelación (como en comparación con solo el 8 % de supervivencia para plantas TS; Figura 17), las plantas PR2 muestran un menor grado (17 % frente al 8 %, Figura 18) que indica que es probable que ambos genes desempeñen una función en la tolerancia a la congelación conferida por *HAHB1*, pero no en la misma proporción. Además de experimentos con líneas heterocigóticas, los presentes inventores también llevaron a cabo experimentos con líneas homocigóticas.

Con el fin de corroborar la hipótesis que establece que las proteínas similares a PR inducidas son responsables de la actividad anticongelante presentada por plantas que expresan *HAHB1*, los presentes inventores obtuvieron plantas transgénicas que expresan cada uno de estos genes independientemente. Los tres genes seleccionados, que codifican PR2, PR4 y una β -1,3-glucanasa, se aislaron por PCR con oligonucleótidos específicos usando ADN genómico de *Arabidopsis* y se clonaron en pBI 121.3. Las construcciones se usaron para transformar *Arabidopsis* y la correcta inserción de los genes se confirmó por PCR. Se analizaron cinco líneas homocigóticas independientes en condiciones de crecimiento normales, además de cuando las plantas se sometieron a temperaturas de congelación. Los presentes inventores muestran que ni plantas que expresan PR2 ni *GLUC* ni PR4 presentan un fenotipo diferencial en condiciones de crecimiento normales, pero todos estos genes parecen conferir tolerancia a la congelación a plantas transgénicas en condiciones de congelación. Sin embargo, mientras que las plantas que expresan *GLUC* presentan un 62 % de la tasa de supervivencia bajo condiciones intensas de congelación (como en comparación con solo el 14 % de supervivencia para plantas TS), plantas PR2 muestran un menor grado (42 % frente al 14 %), que indica que es probable que ambos genes participen en la tolerancia a la congelación conferida por *HAHB1*, pero no en la misma proporción (véanse las Figuras 32). Las plantas transgénicas también mostraron elevada resistencia a la sequía (véanse las Figuras 31 a 32). La estabilidad de la membrana, medida como la conductividad de los extractos tratados, fue mayor en los genotipos transgénicos que en controles, así que indican que este mecanismo fisiológico es al menos en parte responsable de la tolerancia conferida.

EJEMPLO 11 Arabidopsis y girasol presentan mecanismos conservados

En vista de tanto los datos de micromatrices como de la tolerancia a la congelación conferida por *HAHB1*, los presentes inventores se preguntaron si acontecimientos similares a aquellos descritos para centeno de invierno que implican PAC se producirían en estas plantas. Con el objetivo de responder a esta cuestión, los presentes inventores aislaron proteína de apoplasto de plantas aclimatadas y no aclimatadas de girasol y las analizaron por SDS-PAGE. La Figura 19 muestra un transcurso de tiempo del patrón de proteína en función de los días de aclimatación. Como puede apreciarse, bajo condiciones normales (tiempo 0 del experimento de aclimatación), algunas bandas aparecen en el apoplasto de girasol. Esto fue un resultado sorprendente, ya que no se detectaron proteínas bajo las mismas condiciones en *Arabidopsis*. Durante el procedimiento de aclimatación, aparecen nuevas bandas de proteína, mientras que algunas de las originales disminuyen o desaparecen. Los presentes inventores no confirmaron a qué proteína se correspondía cada banda, y esto no es trivial en vista del hecho de que la secuencia del genoma de girasol no está todavía disponible. Sin embargo, el experimento indica que se produce un mecanismo de inducción de PAC y represión de proteínas nucleantes del hielo.

Por otra parte, usando EST y secuencias de genes conocidas, los presentes inventores han sido capaces de identificar algunas secuencias que podrían ser homólogas a aquellas identificadas en la micromatriz de *Arabidopsis* inducida por *HAHB1*. Según esta identificación, los presentes inventores diseñaron oligonucleótidos específicos con el fin de cuantificar estos genes en hojas de girasol transitoriamente transformadas (véase la Sección experimental). Se analizaron cuatro genes que codifican una quitinasa putativa (nº de acceso TC18434), dos factores de transcripción putativos homólogos a ZAT10 y SAG21 de *Arabidopsis* (nº de acceso de los genes de girasol TC16546 y TC19654, respectivamente) y un factor de transcripción similar a DREB (nº de acceso TC23839). Todos estos genes presentaron mayores niveles de transcrito en discos de girasol que expresan en exceso *HAHB1* que en controles. Como los genes homólogos de *Arabidopsis* también se indujeron en plantas transgénicas, este resultado indica que hay un mecanismo de acción conservado en ambas especies controlado por el factor de transcripción de HD-Zip, *HAHB1*.

EJEMPLO 12 Funciones de los dominios de proteína de miembros de la subfamilia I de HD-Zip

Los presentes inventores analizaron la estructura del extremo C y N de miembros de la familia I de HD-Zip usando técnicas y algoritmos convencionales y encontraron motivos consenso.

Por ejemplo, los presentes inventores analizaron el logotipo de la secuencia del extremo N para encontrar secuencias consenso en los dominios HD-Zip y LZ. Los ID de las secuencias de *Arabidopsis thaliana* usados para el alineamiento fueron: AT5g53980.1, AT3g01470.1, AT4g40060.1, AT2g22430.1, AT5g65310.1, AT1g69780.1, AT1g26960.1, AT5g15150.1, AT3g01220.1, AT4g36740.1, AT2g18550.1, AT5g66700.1, AT5g03790.1, AT3g61890.1, AT2g46680.1. Así se identificaron las secuencias consenso.

Los presentes inventores también analizaron la secuencia del extremo C para encontrar secuencias consenso usando técnicas convencionales y bioinformática. Los ID de las proteínas usadas para producir el logotipo de la secuencia son: BAA05625.1, BAA05623.1, XP_002276889.1, CAN62385.1, CAO48425.1, EEF42166.1, XP_002311597.1, XP_002315797.1, AAT40488.1, AAT40518.2, AF011556_1, ABL63116.1, AAD14502.1 (todos los previos por ID de gen), *HAHB-1* (de girasol) y *ATHB13*, *ATHB23* (de *Arabidopsis thaliana*).

Se usó el alineamiento del extremo C de estas 15 proteínas (la más homóloga al extremo C de *HAHB1*) que pertenecen a diferentes especies más *HAHB1* para obtener 2 secuencias consenso para las 2 regiones mejor conservadas, una al principio (extremo N) y la otra localizada en el extremo C. En la región del extremo carboxi entera, hay dos dominios conservados, uno localizado 5' y el otro en 3' de la región. Los aminoácidos entre estos

dos motivos no están conservados.

Los presentes inventores también construyeron proteínas quiméricas fusionando el dominio HD-Zip de una proteína con el dominio del extremo carboxi de la otra. Las construcciones producidas por los presentes inventores se muestran esquemáticamente en la Figura 22. Con estas construcciones, los presentes inventores transformaron plantas de *Arabidopsis*, obtuvieron líneas homocigóticas y analizaron los fenotipos, especialmente con respecto a las características conferidas por proteínas ts y HAHB1, en comparación, por ejemplo, con las características conocidas y los efectos de HAHB4 (véase Dezar y col., 2005a y b, Manavella y col. 2006, Manavella y col. 2008a, b y c. Cabello y col. 2007; y el documento WO2004/099365).

Las plantas transformadas con la construcción H4CI (que comprende HD-Zip de HAHB4 más CI de HAHB1) presentan el fenotipo morfológico de hoja y de inflorescencia conferido por HAHB4 (compacto), mientras que las plantas transformadas con H4CICII (que comprende HD-Zip de HAHB4 más el extremo carboxi entero de HAHB1) presentan el fenotipo morfológico de hoja conferido por HAHB1 (hojas dentadas y número de hojas en roseta igual).

Con respecto a la sensibilidad al etileno en plantas de semillero etioladas, plantas H1WCT (HAHB1 sin su extremo carboxi entero) y H1C1 (HAHB1 sin CII) se comportaron como plantas HAHB4 (no presentaron la triple respuesta, Manavella y col., 2006). El ensayo de sensibilidad al etileno en plantas adultas mostraron que H4CII (que comprende HD-Zip de HAHB4 más CII de HAHB1) y plantas HAHB4 se comportaron similarmente (baja inducción de senescencia) mientras que HAHB1, TS y H4-H1 (H4CICII) entraron rápidamente en la etapa de senescencia (véase la Figura 33).

Los transformantes de HAHB1, como transformantes ATHB13 de *Arabidopsis*, muestran cotiledones redondeados cuando se cultivan en 4 % de sacarosa. En este tipo de ensayo H4CI, HAHB4 y TS no cambiaron su morfología mientras que H4-H1 (H4CICII) y HAHB1 presentaron el fenotipo descrito.

Las plantas transformadas con H4-H1 (H4CICII) presentan la misma morfología que las plantas HAHB1. Tanto HAHB4 como HAHB1 parecen más tolerantes a la sequía que las plantas de TS. Las plantas HAHB4 son más tolerantes que las transgénicas HAHB1.

En ensayos con frío, el genotipo H4CI parece comportarse como el genotipo HAHB1 (tolerante) usando plantas HAHB4 (no tolerantes) como controles internos.

Estos resultados confirman que el extremo carboxi es responsable de las diferentes funciones ejercidas por HAHB1 en comparación con aquellas inducidas por HAHB4, que pertenece a la misma subfamilia.

EJEMPLO 14 Expresión en exceso de ATHB13 en *Arabidopsis*

Se amplificó el ADNc usando ARN aislado de plantas de 21 días de edad por RT-PCR. Se llevó a cabo PCR con dos oligonucleótidos específicamente diseñados y se clonaron en el vector pBI 121.3 previamente limitado con BamH1 y XbaI. Una vez se identificó un clon positivo, se transformaron células de *Agrobacterium* con la construcción y esta *Agrobacterium* se usó para transformar plantas por el procedimiento de inmersión floral. Se seleccionaron plantas transgénicas por resistencia a kanamicina y a continuación se comprobó la inserción del gen con dos oligonucleótidos, uno que coincide con 35S (para diferenciar la inserción del gen endógeno) y uno que coincide con el ADNc. Una vez se identificaron las líneas homocigóticas, las plantas transgénicas se sometieron a los mismos tratamientos que las plantas HAHB1 con los controles apropiados.

EJEMPLO 15 Discos de hojas de girasol, soja y tabaco transformadas con 35S:HAHB1 expresan en exceso genes putativamente relacionados con la respuesta al frío

En vista de tanto los datos de micromatrices como de la tolerancia a la congelación conferida por HAHB1, los presentes inventores se preguntaron si acontecimientos similares a aquellos descritos para centeno de invierno que implican PAC se producirían en otras especies de plantas. Con el objetivo de responder a esta cuestión, usando EST y secuencias de genes conocidas, los presentes inventores han sido capaces de identificar algunas secuencias en girasol, tabaco y soja, homólogas a aquellas identificadas en la micromatriz de *Arabidopsis* como se induce por HAHB1. Según esta identificación, los presentes inventores diseñaron oligonucleótidos específicos con el fin de cuantificar estos genes en hojas de girasol, tabaco y soja transitoriamente transformadas tanto con 35S:HAHB1 y 35S:ATHB13. La transformación transitoria de discos de hojas de girasol, soja y tabaco se llevó a cabo como se describe para el tejido de girasol (Manavella y Chan, 2009). Para cada construcción, se analizaron seis discos originados a partir de diferentes plantas y el experimento se repitió al menos dos veces. Como control de la prueba de infiltración, se midió la expresión del gen indicador *GUS* en estos experimentos por ensayos histoquímicos.

En girasol, se analizaron cuatro genes que codifican una quitinasa putativa (nº de acceso TC18434), dos factores de transcripción putativos homólogos a la *Arabidopsis* ZAT10 y SAG21 (nº de acceso de los genes de girasol TC16546 y TC19654, respectivamente) y un factor de transcripción similar a DREB (nº de acceso TC23839).

Se cuantificó la expresión de tres genes homólogos a glucanasa, PR2 y PR4 de *Arabidopsis* en discos de hojas de soja transitoriamente transformadas. Todas ellas mostraron un aumento significativo en sus niveles cuando la transformación se realizó con *35S:HAHB1* o *35:ATHB13*; sin embargo, con la segunda construcción los niveles de PR2 aumentaron a un menor grado. El experimento realizado en discos de hojas de tabaco mostró resultados similares, pero las inducciones en los discos transformados fueron menores.

Como los genes homólogos de *Arabidopsis* también se indujeron en plantas transgénicas, este resultado indica que hay un mecanismo de acción conservado en estas especies controlado por factores de transcripción HD-Zip, HAHB1 y sus homólogos.

El mecanismo anticongelante mediado por *HAHB1/ATHB13* parece estar conservado entre otras especies de plantas como tabaco y soja. La transformación transitoria de hojas de estas plantas indujo la expresión de homólogos diana para *HAHB1*, que indica que un gen homólogo en estas especies está ejerciendo el mismo tipo de regulación, probablemente confiriendo un fenotipo tolerante similar.

Ejemplo 16 La expresión de HAHB1 en Arabidopsis confiere elevada tolerancia a la infección por Pseudomonas

Infección con *Pseudomonas*

Se inoculó una colonia aislada de *Pseudomonas syringae* spp. en medio LB complementado con rifampicina y se cultivó durante la noche a 28 °C. El cultivo (2 ml) se centrifugó durante 5 min a 4500 rpm y el sedimento celular se lavó tres veces con agua estéril y finalmente se suspendió (1/50) en MgCl₂ 10 mM, 15 µl/l de Triton X-100. La suspensión bacteriana diluida se pulverizó sobre plantas de *Arabidopsis* de 4 semanas de edad de diferentes genotipos como se indica en la leyenda de la figura. La bandeja se cubrió con nailon y las plantas se fotografiaron 2 días después de la infección.

Se llevó a cabo tinción con azul de Evans esencialmente como se describe por Kato y col., 2007. Las hojas sacadas se infiltraron a vacío con 0,1 % de azul de Evans dos veces durante 5 min. Después de eso, las hojas se lavaron tres veces con agua destilada aplicando vacío (10 min cada vez) hasta que se decoloraron completamente y a continuación se visualizaron sobre un microscopio y se fotografiaron.

Referencias

- Arce A.L., Cabello J.V., Chan R.L. 2008. Patents on Plant Transcription Factors. *Recent Patents on Biotechnology*, 2: 209-217
- Ariel F.D., Manavella P.A., Dezar C.A., Chan R.L. 2007. The true story of the HD-Zip family. *Trends Plant Sci.* 12, 419-426.
- Cabello J.V., Dezar C.A., Manavella P.A., Chan R.L. 2007. The intron of the *Arabidopsis thaliana* COX5c gene is able to improve the drought tolerance conferred by the sunflower Hahb-4 transcription factor. *Planta* 226, 1143-1154.
- Carabelli M., Sessa G., Baima S., Morelli G., Ruberti I. 1993. The *Arabidopsis* Athb-2 and -4 genes are strongly induced by far-red-rich light. *Plant J.* 4: 469-479.
- Chan R.L., Gago G.M., Palena C.M., Gonzalez D.H. 1998. Homeoboxes in plant development. *Biochim. Biophys. Acta* 1442: 1-19.
- Chan R.L., Gonzalez D.H. 1994. A cDNA encoding an HD-Zip protein from sunflower. *Plant Physiol.* 106: 1687-1688.
- Chinnusamy V., Zhu J., Zhu J.K. 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci.* 12: 444-451.
- Clough S.J., Bent A.F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735-743.
- DeVries A.L. 1986. Antifreeze Glycopeptides and Peptides: Interactions with Ice and Water, *Methods In Enzymology*, vol. 127, 293-303
- Dezar C.A., Gago G.M., González D.H., Chan R.L. 2005. Hahb-4, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, confers drought tolerance to *Arabidopsis thaliana* plants. *Transgenic Res.*, 14, 429-440.
- Dezar C.A., Fedrigo G.V., Chan R.L. 2005. The promoter of the sunflower HD-Zip protein gene Hahb4 directs tissue-specific expression and is inducible by water stress, high salt concentrations and ABA. *Plant Sci.* 169: 447-459.
- Gago G.M., Almoguera C., Jordano J., González D.H., Chan R.L. 2002. Hahb-4, a homeobox-leucine zipper gene potentially involved in ABA-dependent responses to water stress in sunflower. *Plant Cell Environ.* 25: 633-640.
- Gonzalez D.H., Valle E.M., Gago G.M., Chan R.L. 1997. Interaction between proteins containing homeodomains associated to leucine zippers from sunflower. *Biochim. Biophys. Acta* 1351: 137-149.
- Griffith M., Yaish M.W.F. 2004. Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities *Trends Plant Sci.* 9: 399-405.
- Griffith M., Ala P., Yang D.S., Hon W.C., Moffatt B.A. 1992. Antifreeze Protein Produced Endogenously in

- Winter Rye Leaves. *Plant Physiol.* 100: 593-596.
- Griffith, 2005. Antifreeze proteins modify the freezing process in planta. *Plant Physiol.* 138:330-340
- Guy C.L., Huber J.L.A., Huber S.C. 1992. Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant Physiol.* 100: 502-508
- 5 Henriksson E., Olsson A.S., Johannesson H., Johannesson H., Hanson J., Engstrom P., Soderman E. 2005. Homeodomain leucine zipper class I genes in *Arabidopsis*. Expression patterns and phylogenetic relationships. *Plant Physiol.* 139: 509-518.
- Lee Y.H., Chun J.Y. 1998. A new homeodomain-leucine zipper gene from *Arabidopsis thaliana* induced by water stress and abscisic acid treatment. *Plant Mol. Biol.* 37: 377-384. Levitt J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Academic Press. Vol I and II.
- 10 Manavella P.A., Arce A.L., Dezar C.A., Bitton F., Renou J.P., Crespi M., Chan R.L. 2006. Cross-talk between ethylene and drought signaling pathways is mediated by the sunflower Hahb-4 transcription factor. *Plant J.* 48: 125-137.
- Manavella P.A., Dezar C.A., Bonaventure G., Baldwin I.T., Chan R.L. 2008 HAHB4, a sunflower HD-Zip protein, integrates signals from the jasmonic acid and ethylene pathways during wounding and biotic stress responses, *Plant J.* 56:376-388.
- 15 Mauch F., Staehelin L.A. 1989. Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and [beta]-1,3-glucanase in bean leaves. *Plant Cell.* 1: 447-457.
- Nanjo T., Kobayashi M., Yoshiba Y., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 1999. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 461:205-10.
- Palena C.M., Gonzalez D.H., Chan R.L. 1999. A monomer-dimer equilibrium modulates the interaction of the sunflower homeodomain leucine-zipper protein Hahb-4 with DNA. *Biochem. J.* 341: 81-87.
- Schena M., Davis R.W. 1992. HD-Zip protein members of *Arabidopsis* homeodomain protein superfamily. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89: 3894-3898.
- 25 Schena M., Davis R.W. 1994. Structure of homeobox-leucine zipper genes suggests a model for the evolution of gene families. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8393-8397.
- Schena M., Lloyd A.M., Davis R.W. 1993. The HAT4 gene of *Arabidopsis* encodes a developmental regulator. *Genes Dev.* 7: 367-379.
- 30 Schneiter A.A., Miller J.F. 1981. Description of sunflower growth stages. *Crop Science* 21: 901-903.
- Sessa G., Ruberti I., Morelli G. 1997. DNA-binding specificity of the homeodomain-leucine zipper domain. *J. Mol. Biol.* 5:303-309.
- Sessa G., Carbelli M., Ruberti, I. 1994. Identification of distinct families of HD-Zip proteins in *Arabidopsis thaliana*. In: *Molecular-Genetic Analysis of Plant Development and Metabolism*. G. Coruzzi and P. Puigdomenech (Eds.). Springer Verlag, Berlin.
- 35 Sessa G., Morelli G., Ruberti I. 1993. The Athb-1 and -2 HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities. *EMBO J.* 12: 3507-3517.
- Söderman E., Hjellstrom M., Fahleson J., Engstrom P. 1999. The HD-Zip gene ATHB6 in *Arabidopsis* is expressed in developing leaves, roots and carpels and up-regulated by water deficit conditions. *Plant Mol. Biol.* 40: 1073-1083.
- 40 Söderman E., Hjellström M., Fahleson J., Engström P. 1999. The HD-Zip gene ATHB6 in *Arabidopsis* is expressed in developing leaves, roots and carpels and up-regulated by water deficit conditions. *Plant Mol. Biol.* 40: 1073-1083.
- Söderman E., Mattsson J., Engström P. 1996. The *Arabidopsis* homeobox gene ATHB-7 is induced by water deficit and by abscisic acid. *Plant J.* 10: 375-381.
- 45 Söderman E., Mattsson J., Svenson M., Borkird C., Engström P. 1994. Expression patterns of novel genes encoding homeodomain leucine-zipper proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* 26: 145-154.
- Sukumaran N.P., Weiser C.J. 1972. Freezing Injury in Potato Leaves, *Plant Physiol.* 50: 564-567
- Thomashow M.E. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 50: 571-599.
- 50 Tomczak M.M., Marshall C.B., Gilbert J.A., Davies P.L. 2003. A facile method for determining ice recrystallization inhibition by antifreeze proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 311: 1041-1046.
- Waterhouse A.M., Procter J.B., Martin D.M.A Clamp M., Barton G. J. 2009. Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics.* 25:1189-1191
- 55 Whatley F.R., Tagawa K., Arnon D.I. 1963. Separation of the Light and Dark Reactions in Electron Transfer during Photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 49: 266-270.

Intrón 2 - SEC ID 4

gtaatattagtttgattgtttattgcatctatcaatcatttagattctactctttacttg
 atcacacagaaaagtaactaaaccttttttccctaatgataacaatatttggtttgcaaat
 ctaatggcaatcaaaataaaagtttctggtaagcagccatgatctatatttttacta
 ttgagtaagtttaaaagttgcatttatcctcactaattatatacaaacactaaaataat
 cattaactgactgttataaattactttccgtaaacggtatgccccaaacttaaaatgatt
 aacaattttataagaatggaaagtaaaatcattacactatttcccatattagtcatgac
 caaagtttgtttctttctgaagggcaaaagggccaatagcttatatgcagcatgggca
 aaagaagtagagtgtatatcaaaattcatatctttattttcttttcaaagtttaggtaa
 caaaaagaagaattataaacgagttgttacaattccacaagtacatgaagaacaaa
 attgttagtatttttattttccatgtttttagtaacttccatatacaatttagcactag
 aagataacttttttaggactcggtaaaccatacaagtaggggcatactttatcgttta
 tccattaatgtatataccataaattcactgattatgcggtatttcccttggttacactgtc
 ttgaacaagtagtagtacatgtagtttcttaagattgtttaatcaacccaaaagattg
 aaactttgcag

5 Proteína HAHB1 - SEC ID 5

MTCTGMAFFSSNFMLQSSQEDDHHAPISLSPILPPCSTTTQDFSGAAFLGKRSMSSYSG
 LNNNNMDGCDQEGNMNGEDELSDDGSQLLAGKRRRLNMEQVKTLERNFELGNKLEPER
 KMQLARALGLQPRQIAIWFQNRARRWTKQLEKDYDALKRQFEAVKAENDSLQSQNHKL
 HAEIMALKNREPAELINLNKIKETEGSCSNRSENSSEIKLDISRTPATDSPLSSHQHQH
 QPIPNLFPSSNIDRPNNSNIVAHQLFHNSRRPADHQLHCHKLDQSNAIKEECFSTMFV
 GMDDQSGFVWLEQPQFN

ADNc de HAHB1 SEC ID 6

10

ttgaaattctgagaaaagccacataatcaaagctaaagaggtggtttaaacagctgATG
 ACTTGCACIGGAATGGCTTTCTTCTCCTCCAATTTTCATGTTACAATCCTCCCAAGAAGA
 TGACCATCATGCCCTACATCTCTCTCCAATCCTCCACCTTGCACATCCACCACCTC
 AAGATTTTCAGTGGT**TG**CTGCTTTCTTGGGAAAAAGATCTATGCTTCTTACTCAGGTTTG
 AACAAACAACAACATGGATGGATGTGATCAAGAAGGGAACATGAATGGAGAAGATGAGTT
 ATCAGATGATGGATCACAGCTTCTTGCAGGAGAGAAAAAGAGGAGATTAACATGGAAC
 AAGTGAAGACACTTGAGAGAACTTTGAGTTAGGAAATAAGCTTGAACCTGAGAGGAAA
 ATGCAACTTGCAAGAGCACTTGGACTACAACCAAGACAGATTGCTATATGGTTTCAAAA
 CAGAAGAGCTAGATGGAAAACATAACAGTTGGAAAAGACTATGATGCCCTCAAGAGAC
 AGTTTGAAGCTGTAAAGCTGAGAATGATTCACCTCCAATCTCAAAATCATAAATTCAT
 GCT**G**AATAATGGCACTAAAAAATAGGGAGCCAGCAGAATAATCAACCTCAACATAAA
 AGAAAAGAGGATCTTGCAGCAACCGAAGCGAAAACAGCTCTGAAATCAAACATAGACA
 TCTCAAGAACACCGGCTACCGATAGCCCTTTATCATCACACCATCAACACCAACACCAG
 CCAATACCTAATCTTTTTCCATCGTCGAATATCGATAGGCCTAATTCGAATAACATTGT
 GGCGCATCAACTTTCCACAATTGTCATCAAGCCGGCAGATCATCAACTTCATTGCC
 ACAACCTCGATCAATCGAATGCCATTAAGAAGAATGTTTTAGCACAAATGTTTGTGGT
 ATGGATGATCAATCAGGGTTTTGGCCATGGTTGGAACAACCACAATTCATTGAtggaa
 tcaagaagcaaaaaagcaaaagaaaacggatcccgattcgccttcttggctttggttg
 attatattaaagatggagatcatcaatctgtttgttctcaagctttaaattcttggttt
 tttggtacttaaatatagagtaaaaattagaagaaaaaacgtattattatttttaaat
 tcaagattagtgttt

- 15 Secuencia codificante: en mayúsculas
- Regiones sin traducir de 5' y 3': en minúsculas
- Nucleótidos flanqueantes del primer y segundo intrones: en negrita y subrayados

Extremo C de HAHB1 SEC ID Nº 8

LINLNKETEKGSCSNRSENSSEIKLDIRTPATDSPLSSHQHQHQPIPNLFPSSNIDR
 PNSNNIVAHQLFHNSSSRPADHQLHCHKLDQSNAIKEECFSTMFVGMDDQSGFWPWLEQ
 PQFN

5 **Motivo I (CI) del extremo C de HAHB1 SEC ID Nº 9**

LINLNKETEKGSCSNRSENSSEIKLDIRTPATDS

Motivo II (CII) del extremo C de HAHB1 SEC ID Nº 10

10 IKEECFSTMFVGMDDQSGFWPWLEQPQFN

Secuencia consenso para la región adyacente conservada a la cremallera de leucina (CI, 34 aminoácidos) SEC ID Nº 11

15 SINLNKETEKGSCSNRSENSSEIKLDIRTPAIDS

Secuencia consenso para la segunda región conservada localizada en el extremo C (CII, 29 aminoácidos) SEC ID Nº 12

20 VKEESLSNMFCGIDDQSGFWPWLEQQHFN

Extremo N de HAHB1 SEC ID Nº 13

25 MTCTGMAFFSSNFMLQSSQEDDHHAPTSLSPIPPCSTTTQDFSGAAFLGKRSMSSYSG
 LNNNNMDGCDQEGNMNGEDELSDDGSQLLAG

Secuencia consenso del homeodominio del extremo N SEC ID Nº 14

30 KKRRLTDEQVKALEKSFLENKLEPERKVQLARELGLQPRQVAVWFQNRARRWTKKQ

Nombre del cebador	Secuencia de cebador	SEC ID Nº	Información de secuencia	Usada para
PrH1R	5' CGGGGATCCCCTCITTAGCTT TGATTA'GTGGC 3'	15	2	Clonar el promotor de HAHB1
PR-TOPO	5' AACAGCTATGACCATG 3'	16		Clonar el promotor de HAHB1
H1qF	5' GGCCGGCAGATCATCAACTTC 3'	17	2	PCR en tiempo real
H1qR	5' CCAACCATGGCCAAAACCCT G 3'	18	2	PCR en tiempo real
PR4 CDS-F	5' GGCGGATCCCCACCAAGAAA ACAAAAGACTTAT 3'	19		Clonar AT3g04720
PR4 CDS-R	5' GGGGAGCTCCCGATCGATATT GACCTC 3'	20		Clonar AT3g04720
PR2 CDS-F	5' GGCGGATCCAAGAAAATGTC TGAATCAAGG 3'	21		Clonar AT3g57260
PR2 CDS-R	5' GGGGAGCTCGCCACAAGTC TCTAAGG 3'	22		Clonar AT3g57260
Glucanasa CDS-F	5' CGCGGATCCC'TAAGGAGCTA AGAACAAACCC 3'	23		Clonar AT4g16260

ES 2 531 294 T3

Glucanasa CDS-R	5' CCCGAGCTCATCACTCAACCG CCGTACCG 3'	24		Clonar AT4g16260
tc23839-F	5'AAAAGTGGTTTATTGGAT GAGGA 3'	25	Gen de girasol similar a DREB 1A y 1B de <i>Arabidopsis</i>	PCR en tiempo real
tc23839-R	5'GACACGTCAGAACAATAA CCA 3'	26		PCR en tiempo real
tc19654-F	5'GATCTTCGTGACCTGCTTCT AAAAC 3'	27	Gen de girasol similar a SAG21 de <i>Arabidopsis</i>	PCR en tiempo real
tc19654-R	5'CAAACCACTTCTAAATCATC CCATAG 3'	28		PCR en tiempo real
tc16546-F	5'CAAACAACCTTCTCCACC AATAGTC 3'	29	Gen de girasol similar a ZAT10 de <i>Arabidopsis</i>	PCR en tiempo real
tc16546-R	5'AATAAACCGTTGACTTTTCT TCACC 3'	30		PCR en tiempo real
tc18434-F	5'ACATCATCAACGGTGGTTT AGAAT 3'	31	Gen de girasol similar a quitinasa de <i>Arabidopsis</i>	PCR en tiempo real
tc18434-R	5'ACATGGTGCAATACCTTCTG TAAAA 3'	32		PCR en tiempo real
AT3g12500 -F	5'GGGTTATGGAGTGATTACG AACAT 3'	33	PR3 de <i>Arabidopsis</i>	PCR en tiempo real
AT3g12500 -R	5'TACCACCAGGATTAACACC AAATA 3'	34		PCR en tiempo real
AT3g57260 -F	5'TAAGAAGGAACCAACGTAT GAGAA 3'	35	β -1,3-Glucanasa de <i>Arabidopsis</i>	PCR en tiempo real
AT3g57260 -R	5'CATAAAAAGCCCACAAGTC TCTAA 3'	36		PCR en tiempo real
AT3g04720 -F	5'ATTGAACATTGCTACATCCA AATC 3'	37	PR4 de <i>Arabidopsis</i>	PCR en tiempo real
AT3g04720 -R	5'ATTGAACATTGCTACATCCA AATC 3'	38		PCR en tiempo real

Usado para la validación de micromatrices

Nombre del cebador	Secuencia del cebador	SEC ID Nº	ID de secuencia	Usado para
At1g62440-F	5'ACCAACACCACCTTCTCTGC 3'	39	LRX1	PCR en tiempo real
At1g62440-R	5'TTGATGGTGGAGGAGGAGAC 3'	40	LRX1	PCR en tiempo real
At2g43050-F	5'GGTTAAATGGAGTGGGTGTCA 3'	41	Modificador de la pared celular	PCR en tiempo real
At2g43050-R	5'CAAGTCCTGGGTCGAACTAAC 3'	42		PCR en tiempo real
AT4g16260-F	5'GAGACCTGGAAGAGGAGTGGAAAC 3'	43	Glucanasa	PCR en tiempo real
AT4g16260-R	5'AATGTGATCGGAAATTTGGTTGT 3'	44	Glucanasa	PCR en tiempo real
At4g25480-F	5'GACGTTGGTGGAGGCTATTTACAC 3'	45	DREB1b	PCR en tiempo real
At4g25480-R	5'TATTAGCCAACAACACTCGGCATCT 3'	46	DREB1b	PCR en tiempo real
At4g02380-F	5'ATGCTATCTCCGACGTGGTTATG 3'	47	SAG21	PCR en tiempo real
At4g02380-R	5'CTTCCACTCCCTTCTrCTrCATCA 3'	48	SAG21	PCR en tiempo real
At4g25490-F	5'CGTTGGCTTTTCAAGATGAGAC 3'	49	DREB1a	PCR en tiempo real
At4g25490-R	5'CGCTCTGTTCCGGTGTATAAATAG 3'	50	DREB1a	PCR en tiempo real
At1g27730-F	5'GTCCACTAGCCACGTTAGCAGTA 3'	51	ZAT10	PCR en tiempo real
At1g27730-R	5'AGTTGAAGTTTGACCGGAAAGTC 3'	52	ZAT10	PCR en tiempo real

AT3g04720-F	5'ATTGAACATTGCTACATCCAAATC 3'	53	PR4	PCR en tiempo real
AT3g12500-F	5'GGGTTATGGAGTGATTACGAACAT 3'	54	PR3	PCR en tiempo real
AT3g12500-R	5'TACCACCAGGATTAACACCAAATA 3'	55	PR3	PCR en tiempo real
AT3g52130-F	5'TTTCTCTTTAATAACCTTGCTGCTT 3'	56	LBP	PCR en tiempo real
AT3g52130-R	5'GCTAATGACTGAGATTTTGATTCTG 3'	57	LBP	PCR en tiempo real
AT3g07450-F	5'GACACTTGGTCAACCTTGTTTATG 3'	58	LTP	PCR en tiempo real
AT3g07450-R	5'TACATGGAAGAAAATTGGCAGAAC 3'	59	LTP	PCR en tiempo real
At5g44420-F	5'CTTGTTCCTTTGCTGCTTTTCGACG 3'	60	PDF1.2	PCR en tiempo real
At5g44420-R	5'CTTCAAGGTTAATGCACTGATTCT 3'	61	PDF1.2	PCR en tiempo real
AT3g57260-F	5'TAAGAAGGAACCAACGTATGAGAA 3'	62	PR2	PCR en tiempo real
AT3g57260-R	5'CATAAAAAGCCCACAAGTCTCTAA 3'	63	PR2	PCR en tiempo real

SEC ID N° 64: ATHB13

ACCAGAAGTGGTATAGTCTAGGCCGATACATTTCACTATCTCTCTCTCTTTTGTTTTTT
 CTCTTCTTCTTTTTTCCATTTGATTTCAACTCTCACACAAAGAGCTTCAGATTTATA
 AGACCAIGATAATGGCTTTAAGACAAAGATTGGCAAGAAGAAAAAACTAAAGAGAAACG
 ACCAAAATCTCAAGCAAACAGTACTAACTTCTGTTCGCAAAACAGAAGAAGATGCTTGT
 AATAATGGAATGCTTTTTTCCCTTCAAATTTCAATGATCCAAACCTCTTACGAAGATGA
 TCATCCCATCAATCTCCATCTCTTGCTCCTCTTCTTCTTCTTGCTCTCTACCTCAAG
 ATCTCCATGGTATATATACATAAACTCCACACACATCTCCTCTGTTTTCTCTCTATCT
 CTTTCTAATGCTCTGTTCTGTTCTGTTTTCAGGATTTGCTTCGTTTCTAGGTAAGAGATC
 TCCAATGGAAGGGTGTGTGATTTAGAAAACAGGGAACAATATGAATGGAGAAGAGGATT
 ATTCAGATGATGGGTACAAAATGGGAGAGAAGAAGAGGAGATTGAACATGGAACAAGTG
 AAGACACTAGAGAAGAACCTTTGAGCTTGGAAACAAACTTGAACCAGAGAGGAAAATGCA
 GCTAGCTCGTGCCTTAGGTTTGCAACCAAGACAGATCGCGATTGGTTTTCAAAATCGAA
 GAGCTCGTTGAAAACAAAGCAGCTAGAGAAAGATTATGATACTCTTAAACGACAGTTT
 GATACACTTAAAGCTGAAAATGATCTTCTTCAAACCTCATAATCAGAAACTCCAAGCTGA
 GGTAATTAATCTCATAAATTAACAAAAAAATCAATATGTGTTATTTTTTTTTGGGTTA
 ATGATCAATAATTACAGTTATTTCCATCTAAAGGATGATTTTTTCTTTTTAAAAAAG
 GTTAAAAAATATATTTCTGGTTTTATAAATTTTGGATCAGGAGTTGCTTTTCAGGTAGGG
 TAAAAAACTGGACATGATTCATGACTTTTCAGACATCATTATCTCTTTTTTTCTTCAC
 TCTTGCTGGAAAAGAGATCTGAAAACAATAGTTTCTTTATGCTTATCACATTGTACAGT
 AACTCTGTTTATGTTTAAAAATTTGTCTTTAATTACGCAGATAATGGGATTAAAAAACA
 GAGAACAAACAGAATCAATAAATCTAAACAAAGAACTGAAGGATCTTGCAGTAACAGA
 AGTGATAACAGTTTACAGATAATCTCAGACTAGATATCTCAACTGCGCCGCCATCAAACGA
 CAGTACATTAACCGGTGGCCACCCACCGCCACCACAGACAGTTGGTTCGACACTTCTTCC
 CACCGTCGCCAGCCACCGCAACGACAACCTACTACAACAATGCAGTTCTTTCAAACCTCA
 TCTTCAGGACAGAGTATGGTTAAAGAAGAGAATAGTATCAGTAACATGTTCTGTGCAAT
 GGATGACCATCTGGTTTTTTGGCCATGGCTTGATCAGCAACAGTACAATTGAAATGGT
 CTACCTGTTTTTTTTGTTTTTTTAAAAAATTTATATTTTTTTTTTTGATTTG
 GAATTTTGATCAGAAGAACCCATGCATGTTTTTCAAACCTGGAATCTATATCATTAGCT
 CACTTTGAAATCTGCAACCAACACCCTGAGGTTTTTTGTTTACTTTTTGAGTAAATG
 AGATGTAAAAAATGGGTAATATCCATTATATTATATAAAAAATAATATCATTATGGCC
 CAACATTTTTCTGTATGGAGAAAAATAAAATAAATGTATATT

5

Esta secuencia se corresponde con el ARNm inmaduro (incluyendo los intrones y 3' y 5' sin traducir) como se define en la base de datos TAIR (www.Arabidopsis.org).

10

SEC ID Nº 65 glucanasa

ctactaaaaaaattgtaagtagacatacatatcaatgtaatttgtatataaggagctaaag
aacaaacccaattaggcaactagcaattgctaaaacacgtaagatctcaaat**ATG**acca
 cgttattcctccttattgctctattcatcacaaccatcctcaacccaacaagt**ctctct**
ctctctctctttaatctcacatgatttattctcattttcaattttatagatatataaa
cttaatacataattaaccttaattatggtatatagataaaactaggtggagaatcagtaggt
 gtatgctatggaatgatggggaacaaccttctctcaatcagacacaatcgctctctt
 tagacaaaacaacatccgacgtggttagactctacgatccaaaccaagcgcgtttaaagc
 ctcttagaaaacacgggtatcgaagtcacatcggcgttccaaacaacgatcttcggtca
 ctactaaccttcttccgctagatcatggctccaaacaacgctcctcaactattacc
 cgccttagcttcaagtagatcgcgcgttaggtaacgaagtatctcgcgcgaacggcgggtg
 atgttgctcctgccatgctgaacggttacgatgctctaagaggtgcaaatcttcaa
 gatcgtataaagtttctaccgccattgatagctttgattggaaactcttccctcc
 tctcctcggagagtttctggtgacggttagatggtatatacgatcccgctcatcgggt**aat**
tttccaaccaaaccaaataaaccaaaattcattagatttagttatttccaatatttttc
atttctggttacttgtggaatgatttatttcttctctatgtggctaataggtttc
 ttacgtagcgaactcagcgttactagccaacatctatccttactcagctacggtgac
 aatccacgtgacatatactctctcttaccgctctcttcaactctccttccgctcgtcgtatg
 ggacggctctcgtggctacaaaaacctcttgaogcttacttgaogtggttactctg
 ccgttgaaogctcaggoggtggatctctccagtggttggttccgagagcggatggcct
 tctaacggtggaaacgcgcgagtttgcataacgcgogaagctttttacacgaatcttg
 cgtcgcgtgtgagagagaacagaggaacaccgaagagacctggaagaggagtggaaacg
 tattgttctgctatggttgatgagaatcaaaagagtcctgagatcgagaagaattttg
 ttgtttttcttaataaacaacaaaatttccgatcacattctctgcgcgagagagc
gtagcggcgttgagtgatgattttatagctgagatttatgtgaataattgggagatta
 tccataaaaaggttccaaataaagacaaatttcaaataaaacctgttagtccaagttaa
 attaaatactcggcttgggttgggtccacggttagacttggtaaagtcagcaatattt
 tatttgat

- 5 ATG señalados en negrita y mayúsculas
- Intrones en negrita
- Oligonucleótidos usados para la clonación, subrayados

10 SEC ID Nº 66 PR2

atatcattttcacagaatcatagaaaaatcaagaaa**ATG**tctgaatcaaggagcttag
 cctcaccaccaatggtgatgattctctcagccttgaatagcttctcttcaaccac
 acag**gttcaagtcatctt**taagctattgtaacatctattaatcatctccatctcaca
atttattcaatttaattgattcttattttggaaaatgaagctggacaaatcggagtagc
 tacgggatgctaggcgataccttgccaagctccatcggacggttgggctctttcaaaaca
 acaaaacatccagcgaatgcccgtctacggccctgaccagggcgtcttgcgcctctcc
 gtggctctgacatcgagctcactcctcgacgttccagttcagatcttgaacgctctcgc
 tccagtcaaaacggagccgacaagtggttcaagaaaacgctcagagctacagagatgg
 tgtcagattccggtagatcaacggttggaaatgaggtgaaacctcagttggggggttct
 tcttacaagcaatgcagaacatcgagaacgcggttctggagcagggcttgaagtcaag
 gtctcaacagctatagccactgacaccactgatacgtctcctccgctctcaaggag
 gttcagggatgagtataagagcttctcgaaccagtgataggtttcttggcaagcaagc
 aatctcccttgctcgtgaatctctacccttactcagctacatgggagacacggccaac
 atccatctagactacgctctgttaccgcccagctccactgttgataacgatccagggt
 ctcatacaaaacctattcgacgcaaatctcgactcggtttatgcagcattgggagaaat
 caggggcccgatcgttggaaatcgtggtgctcggagaccggttggcccacagagggagca
 gtcgggacgagtggtgaaaacgcgaagacttatgttaacaatttgatacaacatgtgaa
 gaatggatcaccgagaagccagggaaagctatagagacttatattcgcctatgttcg
 atgagaataagaaggaaccaacgtagagaagtttggggactgttccatccagatcga
 cagctcaagtagaagtttaatttcaactaatccttagagacttgtgggctttttatgta
 agcgtatttaaaaattgggaacttgtttagtaataaggaataattaatgcgctttcag
 cgtgtagtatgttgtatttttaaggtataaatgagctgcaagcataaataaggaaaa
 aaaatagcatgggcctataggcccaataataaaaacaagcttgctt

- 15 ATG señalados en negrita y mayúsculas
- Intrones en negrita
- Oligonucleótidos usados para la clonación, subrayados

SEC ID Nº 67

Secuencia genómica del gen que codifica PR4 (AT3g04720). Están subrayadas las secuencias de los oligonucleótidos usados para amplificar este gen a partir de ADN genómico

5
 agaccaccaagaaaacaagacttatcgatcatgaagatcagacttagcataaccatca
 tacttttatcatatacacagtggctacggtagccggacaacaatgcggtcgtcaaggcgg
 ggtcgaacttgtcccggtaacatctgctgcagtcagtcaggttactgtggtagccaccg
 ggactactgttctccgaccaacaactgtcagagcaattgttggggaagtgggcctagcg
 gaccaggggagagcgcgtcgaacgtacgcgccacctaccatttctataatccggcgcag
 aataattgggatttgagagccgtgagtgcttatgctccacgtgggatgctgataagcc
 gtacgcatggcggagcaagtatggctggaccgccttctgcgggcccggcaggacctcgtg
 gtcaagcttcttgcggcaagtggttaagggttaagtttaattatctttttctcaaat
 ctttataaagtatgtttgtgcaaaaggagatcatatagaaagtgttggaaattaagacg
 aatacaagataaaattgttaccatttaccacgtcaacgtgttagtgaaatatttcaa
 aagatgtatagccggtaaaaaattgtgattaaccgggtgggtataaatggattcaggtgaa
 gaacacaagaacaaatgctgcagtaactgtgagaatagtgaccatgcagcaacggag
 gcttggatttggatgtagcaatgttcaatcaaatagacaccgatggttttggctatcaa
 caaggccatctcattgttgactaccaatttgcgactgtggcaatgagctcattgggca
 gcctgatccagaaacatgcttgtttcggccattgatcgcgtttgatattatgtaatga
 ttttgaggtcaatcgcgcggctacataaaaaataaagaccgctatataatgtatt
 gtcgagggatataatgtttcgtatcaataaggaaattttaaatattattatcatt

Oligonucleótidos usados para cuantificar dianas putativas en Nicotiana y soja

- 10
 GMPR2 gi|210143170|dbj|AK285952.1| ADNc de Glycine max, clon:
 GMFL01-19-B17
 GmPR2qF
 5' CCTTCTTCTGGTGGAACTGC 3' SEC ID Nº 68
- 15
 GmPR2qR
 5' ATAGGAGAAAAGAGCCCCCA 3' SEC ID Nº 69
- NTPR2 gi|194719370|gb|EU867448.1| gen de beta-1,3-glucanasa básico de Nicotiana tabacum, cds completa
 NtPR2qF
 20 5' CTGGTTTGGGAAACAACATCAA 3' SEC ID Nº 70
 NtPR2qR
 5' AATCTGGCCTGGATTACCAGAA 3' SEC ID Nº 71
 GMPR4 gi|210142121|dbj|AK246040.1| ADNc de Glycine max, clon: GMFL01-49-117
 GmPR4qF
 25 5' ACAGGAACAGGAGCAAACACAA 3' SEC ID Nº 72
 GmPR4qR
 5' CATTCCCACAATCCACAAACTG 3' SEC ID Nº 73
 NTPR4 gi|632733|gb|S72452.1| ARNm de la proteína CBP20 patógena para Nicotiana tabacum y antifúngico
 inducible por herida (CBP20), cds completa
 30 NtPR4qF
 5' TTTGGCATGGAGGAGGAAGTA 3' SEC ID Nº 74
 NtPR4qR
 5' TCCACGATTCTCACTGTGGTCT 3' SEC ID Nº 75
 GM-glucanasa gi|38640794|gb|AY461847.1| ARNm de endo-1,3-beta-glucanasa de Glycine max, cds completa
 35 GmGlucqF
 5' GAGAAAGTAGGGCACCAAATG 3' SEC ID Nº 76
 GmGlucqR
 5' TTCTGGTTTCCATCAAACATGG 3' SEC ID Nº 77
 factor de elongación de GM (usado como control interno)
- 40 GmEFlaqF
 5' TGAACAGATGATTTGCTGCTGTA 3' SEC ID Nº 78
 GmEFlaqR
 5' CAATCATGTTGTCTCCCTCAAAAC 3' SEC ID Nº 79
 ACTINA de Nt (usado como control interno)
- 45 NtActqF
 5' CTGATGGACAGGTTATCACCATTG 3' SEC ID Nº 80
 NtActqR
 5' TAATGCGGTAATTCCTTGCTCA 3' SEC ID Nº 81

50

uugaaaauucu gagaaaagcc acauaaaucaa agcuaaaagag gugguuuaaa cagcugauga 60
 cuugcacugg aauggcuuuc uucuccucca auuucauguu acaauccucc caagaagaug 120
 accaucaugc cccuacaucu cucucuccaa uccucccacc uugcaguacc accacucaag 180
 auuucagugg ugcugcuuuc uugggaaaaa gaucuauguc uucuuacuca gguuugaaca 240
 acaacaacau ggauggaugu gaucaagaag ggaacaugaa uggagaagau gaguuaucaag 300
 augauggauc acagcuucuu gcaggagaga aaaagaggag auuaaacaug gaacaaguga 360
 agacacuuga gagaaacuuu gaguuaggaa auaagcuuga accugagagg aaaaugcaac 420
 uugcaagagc acuuggacua caaccaagac agauugcuau augguuucua aacagaagag 480
 cuagauggaa aacuaaacag uuggaaaaag acuaugaugc ccucaagaga caguuuugaag 540
 cuguuaaagc ugagaaugau ucacuccaa cucaaaaauca uaaacuucan gcugagauaa 600
 uggcacuaaa aaauagggag ccagcagaac uaaucacccu caacauaaaa gaaacagaag 660
 gaucuuugcag caaccgaagc gaaaacagcu cugaaaauca acuagacauc ucaagaacac 720
 cggcuaccga uagcccuuuu ucaucacacc aucaacacca acaccagcca auaccuaauc 780
 uuuuuccauc gucgaauauc gauaggccua auucgaauaa cauuguggcg caucaacuuu 840
 uccacaauuc gucaucaagg ccggcagauc aucaacuuc uugccacaaa cucgaucaau 900
 cgaaugccau uaaagaagaa uguuuuagca caauguuugu ugguauggau gaucaaucag 960
 gguuuuggcc augguuggaa caaccacaau ucaauugaug gaaucaagaa gcaaaaaagc 1020
 aaaagaaaac gguaccgcu ucgcuucuu ggcuuugguu ugaauauuu aaagauggag 1080
 aucaucaauc uguuuguucu cuaagcuua auuucuuugu uuuugguacu uaaauuaaua 1140
 gaguaaaaau uagaagaaa aacguauuu uauuuuaau ucaagaauag uguuu 1195

<210> 3
 <211> 315
 <212> ADN
 <213> *Helianthus annuus*

5

<400> 3

aattaactca ccttaactaa gttacttatg acaacatctc tctcatagat cttgatgcag 60
 cttgcattca tgagttgtga tgtacaactc attcatgcat tagggtttca gttttttcaa 120
 agtttttttt ttattttttc ttctgtttca agatcatgat gatgagttgt gctgaacact 180
 tgaacagctc attgatgcat tagggtttgt tttagtttca agttctttct tttctttcat 240
 tttcatgcac taaatccata tgggcttgaa gaaagtttga atctttatat gttagttgat 300
 gatcttgatg caggt 315

10

<210> 4
 <211> 778
 <212> ADN

ES 2 531 294 T3

<213> *Helianthus annuus*

<400> 4

gtaatattag	tttgattggt	tattgcatct	atcaatcatt	agattctact	ctttacttga	60
tcacacagaa	agtaactaaa	ccttttttcc	taatgataac	aatatttggt	ttgcaaactc	120
aatggcaatc	aaataaaagt	ttctggtaag	cagccatgat	ctatttattt	ttcactattt	180
gagtaagttt	aaaagttgca	tttatcctca	ctaattatat	acaacactaa	aataatcatt	240
aaactgactg	ttataattac	tttccgtaaa	cggtatgcca	aaacttaaaa	tgattaacaa	300
ttttataaga	atggaaagta	aatcattac	actatttccc	atattagtca	tgaccaaagt	360
ttgtttcttt	ctgaagggca	aaagggtaa	tatgcttata	tgacagcatgg	gcaaaagaag	420
tagagtgtat	atcaaaattc	atatctttat	tttcttttca	aagtttaggt	aacaaaaaga	480
agaaattata	aacgagtttg	ttacaattcc	acaagtacat	gaagaaacaa	aatttgtag	540
tatttttatt	ttccatggtt	ttagtaactt	ccatatcaat	ttagcactag	aagataactt	600
tttttaggac	tcggtaaacc	atacaagtag	ggtcataactt	tatcgtttat	ccattaatgt	660
atatccataa	attcactgat	tatgcggtat	ttcctttggt	acactgtcct	gaacaagtat	720
tagtacatgt	agtttcttaa	agattgttta	atcaacccaaa	aagattgaaa	ctttgcag	778

5

<210> 5

<211> 313

<212> PRT

10

<213> *Helianthus annuus*

<400> 5

ES 2 531 294 T3

Met Thr Cys Thr Gly Met Ala Phe Phe Ser Ser Asn Phe Met Leu Gln
 1 5 10 15

Ser Ser Gln Glu Asp Asp His His Ala Pro Thr Ser Leu Ser Pro Ile
 20 25 30

Leu Pro Pro Cys Ser Thr Thr Thr Gln Asp Phe Ser Gly Ala Ala Phe
 35 40 45

Leu Gly Lys Arg Ser Met Ser Ser Tyr Ser Gly Leu Asn Asn Asn Asn
 50 55 60

Met Asp Gly Cys Asp Gln Glu Gly Asn Met Asn Gly Glu Asp Glu Leu
 65 70 75 80

Ser Asp Asp Gly Ser Gln Leu Leu Ala Gly Glu Lys Lys Arg Arg Leu
 85 90 95

Asn Met Glu Gln Val Lys Thr Leu Glu Arg Asn Phe Glu Leu Gly Asn
 100 105 110

Lys Leu Glu Pro Glu Arg Lys Met Gln Leu Ala Arg Ala Leu Gly Leu
 115 120 125

ES 2 531 294 T3

Gln Pro Arg Gln Ile Ala Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Ala Arg Trp
 130 135 140

Lys Thr Lys Gln Leu Glu Lys Asp Tyr Asp Ala Leu Lys Arg Gln Phe
 145 150 155 160

Glu Ala Val Lys Ala Glu Asn Asp Ser Leu Gln Ser Gln Asn His Lys
 165 170 175

Leu His Ala Glu Ile Met Ala Leu Lys Asn Arg Glu Pro Ala Glu Leu
 180 185 190

Ile Asn Leu Asn Ile Lys Glu Thr Glu Gly Ser Cys Ser Asn Arg Ser
 195 200 205

Glu Asn Ser Ser Glu Ile Lys Leu Asp Ile Ser Arg Thr Pro Ala Thr
 210 215 220

Asp Ser Pro Leu Ser Ser His His Gln His Gln His Gln Pro Ile Pro
 225 230 235 240

Asn Leu Phe Pro Ser Ser Asn Ile Asp Arg Pro Asn Ser Asn Asn Ile
 245 250 255

Val Ala His Gln Leu Phe His Asn Ser Ser Ser Arg Pro Ala Asp His
 260 265 270

Gln Leu His Cys His Lys Leu Asp Gln Ser Asn Ala Ile Lys Glu Glu
 275 280 285

Cys Phe Ser Thr Met Phe Val Gly Met Asp Asp Gln Ser Gly Phe Trp
 290 295 300

Pro Trp Leu Glu Gln Pro Gln Phe Asn
 305 310

<210> 6
 <211> 1195
 <212> ADN
 <213> *Helianthus annuus*

<400> 6

5

ES 2 531 294 T3

ttgaaattct gagaaaagcc acataatcaa agctaaagag gtggtttaa cagctgatga	60
cttgcaactgg aatggctttc ttctcctcca atttcatggt acaatcctcc caagaagatg	120
accatcatgc ccctacatct ctctctccaa tcctcccacc ttgcagtacc accactcaag	180
atctcagtgg tgctgctttc ttgggaaaaa gatctatgtc ttcttactca ggtttgaaca	240
acaacaacat ggatggatgt gatcaagaag ggaacatgaa tggagaagat gagttatcag	300
atgatggatc acagcttctt gcaggagaga aaaagaggag attaaacatg gaacaagtga	360
agacacttga gagaaacttt gagttaggaa ataagcttga acctgagagg aaaatgcaac	420
ttgcaagagc acttggacta caaccaagac agattgctat atggtttcaa aacagaagag	480
ctagatggaa aactaaacag ttggaaaaag actatgatgc cctcaagaga cagtttgaag	540
ctgttaaagc tgagaatgat tcaactccaat ctcaaatca taaacttcat gctgagataa	600
tggcactaaa aatagggag ccagcagaac taatcaacct caacataaaa gaaacagaag	660
gatcttgagc caaccgaagc gaaaacagct ctgaaatcaa actagacatc tcaagaacac	720
cggtaccga tagcccttta tcatcacacc atcaacacca acaccagcca atacctaac	780
tttttccatc gtcgaatatc gataggccta attcgaataa cattgtggcg catcaacttt	840
tccacaattc gtcacaaagg ccggcagatc atcaacttca ttgccacaaa ctgatcaat	900
cgaatgccat taagaagaa tgtttttagca caatgtttgt tggatggat gatcaatcag	960
ggttttggcc atggttggaa caaccacaat tcaattgatg gaatcaagaa gcaaaaaagc	1020
aaaagaaaac ggtaccgatc tcgccttctt ggctttggtt tgattatatt aaagatggag	1080
atcatcaatc tgtttgttct ctaagcttta aattcttgtt ttttggtagt taaattaata	1140
gagtaaaaat tagaagaaaa aacgtattat tattttaaat tcaagattag tgttt	1195

<210> 7
 <211> 3299
 <212> ADN
 <213> *Helianthus annuus*

 <400> 7

5

ES 2 531 294 T3

gtcgagctcg tctcgtaaaa tgttcgagtc agctccaatt aatcatgtc ggcttgttat	60
atTTTTTTta atttatTTTT gatatTTTT acatatattt ataacataaa aaacaaaata	120
aaaataaaaa ttacacatat atctatatgt attatTTTTc taaaatttta aatagcgaaa	180
gacatattaa aagtattata tgtataaatt tgtttagctt cccatatttt tatatgttat	240
taattaatta aacttaaaat gttaacactt taacacctct tacatacttt ttagttcaat	300
acatttaaaa ttaaaattaa tctatatgca ataaaataat tcaagcaggc ttgcaagctc	360
acgagtcgag ccatgcctgg ctcgagctcg actcatttac aatcgagcc accaagccga	420
ctcgtttata accgagtttt ttttagccga gtttttttca agcgaacttc aaacaagtca	480
cgcgctttta attaacacat tctagtctaa agaagataat tgaaagagaa agtagatata	540
agtaaaagga gtagccaaag atataaattt agggctctaa caaccttaata ttgtttaatt	600
ttttttaaat aaactagttt tttttaccg attatctgtg ttatatgtct tagtttgaca	660
tgataagtta tcataattac ttgtagtatt tttatatcag aatatatcgt tggagaatta	720
aatTTTatcc tgatcgtcaa ttgacaagaa caaaaatcaa catctcatgg ttttttacta	780
atTTtatga ttaaagatat atggttgtaa gaaaaagaac aatgtacatc aaatggtgaa	840

atttgaatat ttgatagtaa cgtaatccat tgtgtatttc ttattatfff atcattttcc 900
 caaggtgtgt catatatagt gtctccatc tttctatage acaatatoct tcacctcoct 960
 ctctctctct ctctctctaa aaatgatgat gagacgacaa agatcgaatt cttgaaatc 1020
 tgagaaaagc cacataatca aagctaaaga ggtggtttaa acagctgatg acttgcactg 1080
 gaatggcttt cttctcctcc aatttcatgt tacaatcctc ccaagaagat gaccatcatg 1140
 cocctacatc tctctctcca atcctcccac cttgcagtac caccactcaa gatttcagtg 1200
 gtaattaact caccttaact aagttactta tgacaacatc tctctcatag atcttgatgc 1260
 agcttgcatt catgagttgt gatgtacaac tcattcatgc attagggttt cagttttttc 1320
 aaagtttttt ttttattttt tcttctgttt caagatcatg atgatgagtt gtgctgaaca 1380
 cttgaacagc tcattgatgc attagggttt gtttagttt caagttcttt cttttctttc 1440
 attttcatgc actaaatcca tatgggettg aagaaagttt gaatctttat atgttagttg 1500
 atgatcttga tgcagggtct gcttcttgg gaaaaagatc tatgtcttct tactcaggtt 1560
 tgaacaacaa caacatggat ggatgtgatc aagaagggaa catgaatgga gaagatgagt 1620
 tatcagatga tggatcacag cttcttgcag gagagaaaaa gaggagatta aacatggaac 1680
 aagtgaagac acttgagaga aactttgagt taggaaataa gcttgaacct gagaggaaaa 1740
 tgcaacttgc aagagcactt ggactacaac caagacagat tgctatatgg tttcaaaaca 1800
 gaagagctag atggaaaact aaacagttgg aaaaagacta tgatgcctc aagagacagt 1860
 ttgaagctgt taaagctgag aatgattcac tccaatctca aaatcataa cttcatgctg 1920
 gtaatattag tttgattgtt tattgcatct atcaatcatt agattotact ctttacttga 1980
 tcacacagaa agtaactaaa cttttttcc taatgataac aatattgtt ttgcaaatct 2040
 aatggcaatc aaataaaaagt ttctggtgag cagccatgat ctatttattt ttcactattt 2100
 gagtaagttt aaaagttgca tttatcctca ctaattatat acaacactaa aataatcatt 2160
 aaactgactg ttataattac tttctgtaaa cggatgcca aaacttaaaa tgattaacaa 2220
 ttttataaga atggaaagta aaatcattac actatttccc atattagtca tgaccaaaagt 2280
 ttgtttcttt ctgaagggca aaagggtcaa tatgcttata tgcagcatgg gcaaaagaag 2340
 tagagtgtat atcaaaatc atatctttat tttcttttca aagtttaggt aacaaaaaga 2400
 agaaattata aacgagttg ttacaattcc acaagtacat gaagaaacaa aatttgtag 2460
 tatttttatt ttccatgttt ttagtaactt ccatatcaat ttagcactag aagataactt 2520
 ttttaggac tggtaaac atacaagtag ggtcactact tategtttat ccattaatgt 2580
 atatccataa attcactgat tatgcggtat ttcctttggt acactgtctt gaacaagtat 2640
 tagtacatgt agtttcttaa agattgttta atcaaccaa aagattgaa ctttgcagag 2700
 ataatggcac taaaaaatag ggagccagca gaactaatca acctcaacat aaagaaaca 2760
 gaaggatctt gcagcaaccg aagcgaaac agctctgaaa tcaaactaga catctcaaga 2820

ES 2 531 294 T3

acaccggcta ccgatagccc tttatcatca caccatcaac accaacacca gccaatacct 2880
aatctttttc catcgtcgaa tatcgatagg cctaattcga ataacattgt ggcgcatcaa 2940
cttttccaca attcgtcatc aaggccggca gatcatcaac ttcattgccca caaactcgat 3000
caatcgaatg ccattaaaga agaatgtttt agcacaatgt ttgttggtat ggatgatcaa 3060
tcagggtttt ggccatggtt ggaacaacca caattcaatt gatggaatca agaagcaaaa 3120
aagcaaaaaga aaacgggtacc cgattcgctt tcttggcttt ggtttgatta tattaagat 3180
ggagatcatc aatctgtttg ttctctaagc tttaaattct tgttttttgg tacttaaat 3240
aatagagtaa aaattagaag aaaaaacgta ttattatttt aaattcaaga ttagtgttt 3299

<210> 8

<211> 122

5 <212> PRT

<213> *Helianthus annuus*

<400> 8

Leu Ile Asn Leu Asn Ile Lys Glu Thr Glu Gly Ser Cys Ser Asn Arg
1 5 10 15

Ser Glu Asn Ser Ser Glu Ile Lys Leu Asp Ile Ser Arg Thr Pro Ala
20 25 30

Thr Asp Ser Pro Leu Ser Ser His His Gln His Gln His Gln Pro Ile
35 40 45

Pro Asn Leu Phe Pro Ser Ser Asn Ile Asp Arg Pro Asn Ser Asn Asn
50 55 60

Ile Val Ala His Gln Leu Phe His Asn Ser Ser Ser Arg Pro Ala Asp
65 70 75 80

His Gln Leu His Cys His Lys Leu Asp Gln Ser Asn Ala Ile Lys Glu
85 90 95

Glu Cys Phe Ser Thr Met Phe Val Gly Met Asp Asp Gln Ser Gly Phe
100 105 110

Trp Pro Trp Leu Glu Gln Pro Gln Phe Asn
115 120

10

<210> 9

<211> 35

<212> PRT

15 <213> *Helianthus annuus*

<400> 9

ES 2 531 294 T3

Leu Ile Asn Leu Asn Ile Lys Glu Thr Glu Gly Ser Cys Ser Asn Arg

1 5 10 15

Ser Glu Asn Ser Ser Glu Ile Lys Leu Asp Ile Ser Arg Thr Pro Ala
20 25 30

Thr Asp Ser
35

5 <210> 10
<211> 29
<212> PRT
<213> *Helianthus annuus*

<400> 10

Ile Lys Glu Glu Cys Phe Ser Thr Met Phe Val Gly Met Asp Asp Gln
1 5 10 15

10 Ser Gly Phe Trp Pro Trp Leu Glu Gln Pro Gln Phe Asn
20 25

15 <210> 11
<211> 34
<212> PRT
<213> *Helianthus annuus*

<400> 11

Ser Ile Asn Leu Asn Lys Glu Thr Glu Gly Ser Cys Ser Asn Arg Ser
1 5 10 15

Glu Asn Ser Ser Asp Ile Lys Leu Asp Ile Ser Arg Thr Pro Ala Ile
20 25 30

20 Asp Ser

<210> 12
<211> 29
<212> PRT
<213> *Helianthus annuus*

25 <400> 12

Val Lys Glu Glu Ser Leu Ser Asn Met Phe Cys Gly Ile Asp Asp Gln
1 5 10 15

Ser Gly Phe Trp Pro Trp Leu Glu Gln Gln His Phe Asn
20 25

30 <210> 13
<211> 91
<212> PRT

ES 2 531 294 T3

<213> *Helianthus annuus*

<400> 13

Met Thr Cys Thr Gly Met Ala Phe Phe Ser Ser Asn Phe Met Leu Gln
 1 5 10 15
 Ser Ser Gln Glu Asp Asp His His Ala Pro Thr Ser Leu Ser Pro Ile
 20 25 30
 Leu Pro Pro Cys Ser Thr Thr Thr Gln Asp Phe Ser Gly Ala Ala Phe
 35 40 45
 Leu Gly Lys Arg Ser Met Ser Ser Tyr Ser Gly Leu Asn Asn Asn Asn
 50 55 60
 Met Asp Gly Cys Asp Gln Glu Gly Asn Met Asn Gly Glu Asp Glu Leu
 65 70 75 80
 Ser Asp Asp Gly Ser Gln Leu Leu Ala Gly Glu
 85 90

5

<210> 14

<211> 57

<212> PRT

<213> *Helianthus annuus*

10

<400> 14

Lys Lys Arg Arg Leu Thr Asp Glu Gln Val Lys Ala Leu Glu Lys Ser
 1 5 10 15
 Phe Glu Leu Glu Asn Lys Leu Glu Pro Glu Arg Lys Val Gln Leu Ala
 20 25 30
 Arg Glu Leu Gly Leu Gln Pro Arg Gln Val Ala Val Trp Phe Gln Asn
 35 40 45
 Arg Arg Ala Arg Trp Lys Thr Lys Gln
 50 55

15

<210> 15

<211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<223> Cebador PrH1R

25

<400> 15

cggggatccc ctcttagct ttgattatgt ggc

33

<210> 16

<211> 16

ES 2 531 294 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Cebador PR-TOPO

 <400> 16
 aacagctatg accatg 16

 10 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Cebador H1qF

 <400> 17
 20 ggccggcaga tcatcaactt c 21

 <210> 18
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> Cebador H1qR

 <400> 18
 30 ccaaccatgg ccaaaacctt g 21

 <210> 19
 <211> 32
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador PR4 CDS-F

 40 <400> 19
 ggcgatccc caccaagaaa acaaagactt at 32

 <210> 20
 <211> 27
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador PR4 CDS-R

 50 <400> 20
 ggggagctcc cgatcgatat tgacctt 27

 <210> 21
 <211> 30
 55 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> Cebador PR2 CDS-F

 <400> 21
 ggcgatcca agaaaatgtc tgaatcaagg 30

 65 <210> 22
 <211> 27

ES 2 531 294 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

 5 <220>
 <223> Cebador PR2 CDS-R

 <400> 22
 ggggagctcg cccacaagtc tctaagg 27

 10 <210> 23
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Cebador Glucanasa CDS-F

 <400> 23
 cgcggatccc taaggagcta agaacaaacc c 31
 20
 <210> 24
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador Glucanasa CDS-R

 <400> 24
 30 cccgagctca tcaactcaacc gccgtaccg 29

 <210> 25
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador tc23839-F
 40 <400> 25
 aaaagtgggt tatttggatg agga 24

 <210> 26
 <211> 22
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador tc23839-R
 50 <400> 26
 gacacgtcag aacaaaattc ca 22

 <210> 27
 <211> 25
 55 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador tc19654-F
 60 <400> 27
 gatcttcgtg acctgcttct aaaac 25

 <210> 28
 65 <211> 26

ES 2 531 294 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Cebador tc19654-R

 <400> 28
 caaaccactt ctaaactc ccatag 26

 10 <210> 29
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Cebador tc16546-F

 <400> 29
 20 caaacaact tctccacca atagtc 26

 <210> 30
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> Cebador tc16546-R

 <400> 30
 30 aataaacctg tgactttct tcacc 25

 <210> 31
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador tc18434-F

 <400> 31
 40 acatcatcaa cgggtggtta gaat 24

 <210> 32
 <211> 25
 <212> ADN
 45 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador 18434-R

 <400> 32
 50 acatggtgca atacctctg taaaa 25

 <210> 33
 <211> 24
 <212> ADN
 55 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador At3g12500-F

 <400> 33
 60 ggggtatgga gtgattacga acat 24

 <210> 34
 65 <211> 24

ES 2 531 294 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Cebador At3g12500-R

 <400> 34
 taccaccagg attaacacca aata 24

 10 <210> 35
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Cebador At3g57260-R

 <400> 35
 20 taagaaggaa ccaacgtatg agaa 24

 <210> 36
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> Cebador At3g57260-R

 <400> 36
 30 cataaaaagc ccacaagtct ctaa 24

 <210> 37
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador At3g04720-F

 <400> 37
 40 attgaacatt gctacatcca aatc 24

 <210> 38
 <211> 24
 <212> ADN
 45 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador At3g04720-R

 <400> 38
 50 attgaacatt gctacatcca aatc 24

 <210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> Cebador At1g62440-F

 <400> 39
 accaacacca ccttctctgc 20

 65 <210> 40
 <211> 20

ES 2 531 294 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Cebador At1g62440-R

 <400> 40
 ttgatgtgg aggaggagac 20

 10 <210> 41
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Cebador At2g43050-F

 <400> 41
 20 ggttaaattgg agtgggtgc at 22

 <210> 42
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> Cebador At2g43050-R

 <400> 42
 30 caagtcctgg gtcgaaacta ac 22

 <210> 43
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador At4g16260-R

 <400> 43
 40 gagacctgga agaggagtgg aaac 24

 <210> 44
 <211> 24
 <212> ADN
 45 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador At4g16260-R

 <400> 44
 50 aatgtgatcg gaaattttgg ttgt 24

 <210> 45
 <211> 24
 <212> ADN
 55 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> Cebador At4g25480-F

 <400> 45
 gacgttggtg gaggctattt acac 24

 65 <210> 46
 <211> 24

ES 2 531 294 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Cebador At4g25480-R

 <400> 46
 tattagccaa caaactcggc atct 24

 10 <210> 47
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Cebador At4g02380-F

 <400> 47
 20 atgctatctt cgcacgtggt tatg 24

 <210> 48
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador At4g02380-R

 <400> 48
 30 cttccactcc cttctcttc atca 24

 <210> 49
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador At4g25490-R

 <400> 49
 40 cgttggttt tcaagatgag ac 22

 <210> 50
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> Cebador At4g25490-R

 <400> 50
 50 cgctctgttc cgggtataa atag 24

 <210> 51
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador At1g27730-F

 <400> 51
 60 gtccactagc cacgtagca gta 23

 <210> 52
 <211> 23
 65

ES 2 531 294 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Cebador At1g27730-R

 <400> 52
 agttgaagtt tgaccgaaa gtc 23

 10 <210> 53
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Cebador At3g04720-F

 <400> 53
 attgaacatt gctacatcca aatc 24
 20
 <210> 54
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador At3g12500-F

 <400> 54
 30 gggttatgga gtgattacga acat 24

 <210> 55
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador At3g12500-R

 <400> 55
 40 taccaccagg attaacacca aata 24

 <210> 56
 <211> 25
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador At3g52130-F
 50
 <400> 56
 tttctcttta ataacctgc tgctt 25

 <210> 57
 <211> 24
 55 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> Cebador At3g52130-R

 <400> 57
 gctaatgact gagatttga ttcg 24

 65 <210> 58
 <211> 24

ES 2 531 294 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

 5 <220>
 <223> Cebador At3g07450-F

 <400> 58
 gacactggt caacctgtt tatg 24

 10 <210> 59
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Cebador At3g07450-R

 <400> 59
 20 tacatggaag aaaattggca gaac 24

 <210> 60
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> Cebador At5g44420-F

 <400> 60
 30 cttgttctt ttgctgctt cgacg 25

 <210> 61
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador At5g44420-R

 <400> 61
 40 cttcaagggtt aatgcactga ttct 24

 <210> 62
 <211> 24
 <212> ADN
 45 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador At3g57260-F

 <400> 62
 50 taagaaggaa ccaacgtatg agaa 24

 <210> 63
 <211> 24
 <212> ADN
 55 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador At3g57260-R

 <400> 63
 60 cataaaaagc ccacaagtct ctaa 24

 <210> 64
 65 <211> 1813

ES 2 531 294 T3

<212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 64

5

```
accagaagtg gtatagtcta ggccgataca tttcactatc tctctctctt ttgtttttcc 60
tcttcttctt tttttccatt tgatttcaaa ctctcacaca aagagcttca gatttataag 120
accatgataa tggctttaag acaaagattg gcaagaagaa aaaactaaag agaaacgacc 180
aaaatctcaa gcaaacagta ctaacttctg ttgcaaaaca gaagaagatg tcttgtaata 240
```

ES 2 531 294 T3

atggaatgtc ttttttcct tcaaatttca tgatccaaac ctcttacgaa gatgatcatc 300
 ctcatcaate tccatctett gctcctcttc ttctctcttg ctctctacct caagatctcc 360
 atggtatata tacataaact tccacacaca tctcctctgt tttctctcta tctctttcta 420
 atgctctggt ctggtctggt tcaggatttg ctctggttct aggtaagaga tctccaatgg 480
 aagggtggtg tgatttagaa acagggaaca atatgaatgg agaagaggat tattcagatg 540
 atgggtcaca aatgggagag aagaagagga gattgaacat ggaacaagtg aagacactag 600
 agaagaactt tgagcttgga acaaaacttg aaccagagag gaaaatgcag ctagctcgtg 660
 ccttaggttt gcaaccaaga cagatcgcga tttggtttca aaatcgaaga gctcgttgga 720
 aaacaaagca gctagagaaa gattatgata ctcttaaacg acagtttgat aactttaaag 780
 ctgaaaatga tcttcttcaa actcataatc agaaactcca agctgaggta attaacttca 840
 taaattaaca aaaaaaatca atatgtgta ttttttttg ggtaaatgat caataattac 900
 agttattttc catctaaagg atgatttttt tctttttaa aaaggtaaa aattatattt 960
 ctggtttata attatttgga tcaggagttg ctttcaggta gggtaaaaa actggacatg 1020
 attcatgact tttcagacat cattatctct tttttcttc actcttgtct ggaagagat 1080
 ctgaaaacaa tagtttcttt atgcttatca cattgtacag taactctggt tatgtttaa 1140
 attttgcctt taattacgca gataatggga ttaaaaaaca gagaacaaac agaatcaata 1200
 aatctaaaca aagaaactga aggatcttgc agtaacagaa gtgataacag ttcagataat 1260
 ctcagactag atatctcaac tgcgccgcca tcaaacgaca gtacattaac cggtggccac 1320
 ccaccgccac cacagacagt tggcgcacac ttcttcccac cgtcgccagc caccgcaacg 1380
 acaactacta caacaatgca gttcttcaa aactcatctt caggacagag tatggttaa 1440
 gaagagaata gtatcagtaa catggtctgt gcaatggatg accattctgg tttttggcca 1500
 tggcttgatc agcaacagta caattgaaat tggctctacct gtttttttg tttttgtttt 1560
 taaaaaaatt tatatttttt tttttgtat ttggaatttt gatcagaaga acccatgcat 1620
 gttttcaaaa actggaatct atatcattag ctcaacttga aatctgcaac caaacaccac 1680
 tgaggttttt tgtttacttt ttgagtaaat gagatgtaa aaaatgggta atatccatta 1740
 tattatataa aaaataatat cattatggcc caacattttt ctgtatggag aaaaataaaa 1800
 taaattgtat att 1813

<210> 65
 <211> 1544
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*
 <400> 65

5

ctactaaaa aattgtaagt acatacatat caatgttaat ttgtatataa ggagctaaga 60
acaaaaccaa ttaggcaact agcaattgct aaaacacgta agatctcaaa tatgaccacg 120

ttattcctcc ttattgctct attcatcaca accatcctca acccaacaag tctctctctc 180
tctctcttta atctcacatg atttattctc attttcaatt tttatagata tataaactta 240
atcataatta accttaatta tgttatatga taaactaggt ggagaatcag taggtgtatg 300
ctatggaatg atggggaaca accttccttc tcaatcagac acaatcgctc tctttagaca 360
aaacaacatc cgacgtgta gactctacga tccaaaccaa gccgctttaa acgctcttag 420
aaacacgggt atcgaagtca tcatcggcgt tccaaacacc gatcttcggt cactcactaa 480
cccttcttcc gctagatcat ggctccaaaa caacgtcctc aactattacc cgcgcgtag 540
cttcaagtac atcgccgtag gtaacgaagt atctccgctc aacggcgggtg atgttgctgct 600
ccctgccatg cgtaacgttt acgatgctct aagaggtgca aatcttcaag atcgtattaa 660
agtttctacc gccattgata tgactttgat tggaaactct ttccctcctt cctccggaga 720
gtttcgtggt gacgttagat ggtatatcga tcccgctcctc gggtaatfff ccaaccaaac 780
caaataacca aattcatta gatttagtta tttccaata tttttcattt ctggttactt 840
gtggaatgat tatttaattt ctctctatgt ggctaattag gtttcttacg agtacgaact 900
cagcgttact agccaacatc tacccttact tcagctacgt tgacaatcca cgtgacatat 960
ctctctctta cgtctctctc acttctcctt ccgtcgtcgt atgggacggc tctcgtgget 1020
acaaaaacct ctttgacgct ttacttgacg ttgtttactc tgccggtgaa cgctcaggcg 1080
gtggatctct cccagtgggt gtttccgaga gcggatggcc ttctaacgggt ggaaacgccg 1140
cgagtttctga taacgcgcga agctttttac acgaatcttg cgtcgcgtgt gagagagaac 1200
agaggaacac cgaagagacc tggaagagga gtggaacgtg atttgttcgc tatgtttgat 1260
gagaatcaaa agagtctga gatcgagaag aattttggtt tgttttttcc taataaacia 1320
ccaaaatttc cgtcacatt ctctgcgcg agagacggta cggcggttga gtgatgattt 1380
tatatgctga gatttatgtg aataattggg agattatccc ataaaagggt ccaataaag 1440
acaaatttca aataaaacct gttagtcaa gttaaattaa atactcggct ttgttttggt 1500
ccacgttaga cttggtaaag tcatgcaata tttttatttg atat 1544

<210> 66
<211> 1343
<212> ADN
<213> *Arabidopsis thaliana*

5

<400> 66

atatcatttt tcacagaatc atagaaaaat caagaaaatg tctgaatcaa ggagcttagc 60
 ctcaccacca atgttgatga ttctttctcag ccttgtaata gcttccttct tcaaccacac 120
 aggttcagtc atcttttaag ctattgtaac atctattaat catctccatc ttcacaaatt 180
 tattcaattt aatgattctt attttgaaa atgaagctgg acaaatcgga gtatgctacg 240
 ggatgctagg cgataccttg ccaagtccat cggacgttgt ggctctttac aaacaacaaa 300
 acatccagcg aatgcggctc tacggccctg acccagggcg tcttgccgct ctccgtggct 360
 ctgacatcga gctcatcctc gacgttccca gttcagatct tgaacgtctc gcctccagtc 420
 aaacggaggc cgacaagtgg gttcaagaaa acgttcagag ctacagagat ggtgtcagat 480
 tccggtacat caacgttggg aatgaggtga aaccctcagt tgggggggtt ctcttacaag 540
 caatgcagaa catcgagaac gcggtttctg gagcagggtc tgaagtcaag gtctcaacag 600
 ctatagccac tgacaccacc actgatacgt ctctccgctc tcaaggaagg ttcagggatg 660
 agtataagag ctttctcgaa ccagtgatag gtttcttggc aagcaagcaa tctcccttgc 720
 tctgtaatct ctacccttac ttcagctaca tgggagacac ggccaacatc catctagact 780
 acgctctggt caccgcccag tccactggtg ataacgatcc aggggtactca taccaaaacc 840
 tattcgacgc aatctctgac tccggtttatg cagcattgga gaaatcaggg ggcggatcgt 900
 tggaaatcgt ggtgtcggag accggttggc ccacagaggg agcagtcggg acgagtgtgg 960
 aaaacgcaaa gacttatggt aacaatttga tacaacatgt gaagaatgga tcaccgagaa 1020
 ggccagggaa agctatagag acttatatat tccgctatgt cgatgagaat aagaaggaa 1080
 caacgtatga gaagtthtgg ggactgtttc atccagatcg acagtctaag tatgaagtta 1140
 atttcaacta atccttagag acttgtgggc tttttatgta agcgtattta aaaattggga 1200
 acttgttgta gtaataagga ataattaatg cgctttcagc gtgtagtatg ttgttatttt 1260
 taaggttata aatgagctgc aagcataaat aaggaaaaaa aatagcatgg gcctataggg 1320
 ccaataataa aacaagcttg ctt 1343

<210> 67
 <211> 998
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

5

<400> 67

ES 2 531 294 T3

agaccaccaa gaaaacaaag acttatcgat catgaagatc ägäcttagca taaccatcat 60
 acttttatca tacacagtgg ctaoggtggc cggacaacaa tgcggtcgtc aaggcgggtg 120
 tcgaacttgt cccggttaaca tctgctgcag tcagtacggt tactgtggta ccaccgcgga 180
 ctactgttct ccgaccaaca actgtcagag caattgttgg ggaagtgggc ctacgcggacc 240
 aggggagagc gegtogaacg tacgcgccac ctaccatttc tataatccgg cgcagaataa 300
 ttgggatttg agagccgtga gtgcttattg ctccacgtgg gatgctgata agccgtacgc 360
 atggcggagc aagtatggct ggaccgcctt ctgcggggccg gcaggacctc gtggtaaacg 420
 ttcttgccgc aagtgttaa gggtaagtta attaattatc tttttctcaa atctttatat 480
 aagtatgttt gtgcaaaaag agatcatata gaaagtgttg gaattaagac gaatacaaga 540
 taaaatttgt taccatttac caacgtcaac gtgttagtga aatatttcaa aagatgtata 600
 gccggtaaaa attgtgatta accggtgggt ataatggat tcaggtgaag aacacaagaa 660
 caaatgctgc agtaactgtg agaatagtgg accaatgcag caacggaggc ttggatttgg 720
 atgtagcaat gttcaatcaa atagacaccg atggttttgg ctatcaacaa ggccatctca 780
 ttgttgacta ccaatttgtc gactgtggca atgagctcat tgggcagcct gattccagaa 840
 acatgcttgt ttcggccatt gatogcgttt gatattatgt aatgattttg aggtcaatat 900
 cgatcggctc acataaaaat aataaagacc gctatatatg tattgtcgag ggatatatgt 960
 ttogtatcaa taaggaaatt ttaaataatta ttatcatt 998

5 <210> 68
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> GmPR2qF

<400> 68
 ccttctctg gtggaactgc 20

15 <210> 69
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> GmPR2qR

<400> 69
 ataggagaaa agagcccca 20

25 <210> 70
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> NtPR2qF

ES 2 531 294 T3

	<code><400> 70</code>		
	<code>ctggtttggg aaacaacatc aa</code>		22
5	<code><210> 71</code> <code><211> 22</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Artificial</code>		
10	<code><220></code> <code><223> NtPR2qR</code>		
	<code><400> 71</code>		
	<code>aatctggcct ggattaccag aa</code>		22
15	<code><210> 72</code> <code><211> 22</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Artificial</code>		
20	<code><220></code> <code><223> GmPR4qF</code>		
	<code><400> 72</code>		
25	<code>acaggaacag gagcaaacac aa</code>		22
30	<code><210> 73</code> <code><211> 22</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Artificial</code>		
35	<code><220></code> <code><223> GmPR4qR</code>		
	<code><400> 73</code>		
40	<code>cattcccaca atccacaaac tg</code>		22
45	<code><210> 74</code> <code><211> 22</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Artificial</code>		
50	<code><220></code> <code><223> NtPR4qF</code>		
	<code><400> 74</code>		
55	<code>tttggcatgg aggaggaagt at</code>		22
60	<code><210> 75</code> <code><211> 22</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Artificial</code>		
65	<code><220></code> <code><223> NtPR4qR</code>		
	<code><400> 75</code>		
65	<code>tccacgattc tcactgtggt ct</code>		22
65	<code><210> 76</code> <code><211> 22</code> <code><212> ADN</code> <code><213> Artificial</code>		
65	<code><220></code> <code><223> GmGlucqF</code>		

ES 2 531 294 T3

	<400> 76 gagaaagtag gggcaccaaa tg	22
5	<210> 77 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> GmGlucqR	
	<400> 77 ttctggttc catcaaacat gg	22
15	<210> 78 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> GmEFlaqF	
25	<400> 78 tgaaacagat gattgctgc tgta	24
30	<210> 79 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> GmEFlaqR	
35	<400> 79 caatcatggt gtcccctca aaac	24
40	<210> 80 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> NtActqF	
45	<400> 80 ctgatggaca ggttatcacc attg	24
50	<210> 81 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> NtActqR	
55	<400> 81 taatgcgta attccttgc tcat	24

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de aumento de la tolerancia tanto a la sequía como a la alta salinidad y la congelación que comprende transformar una planta con un ácido nucleico que comprende una secuencia de SEC ID N° 6 o 7 o una secuencia con al menos el 90 % o al menos el 95 % de homología con una secuencia que comprende SEC ID N° 6 o 7.
- 10 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la secuencia de ácidos nucleicos está bajo el control del promotor de HAHB1, que comprende un ácido nucleico de SEC ID N° 1.
- 15 3. Una construcción de ácidos nucleicos quimérica aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de extremo N de otra proteína HD Zip de la subfamilia I asociada operativamente a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia que comprende el extremo C de HAHB1 como se define en SEC ID N° 8.
4. Un polipéptido codificado por medio de una construcción génica de la reivindicación 3.
5. Un polipéptido de la reivindicación 4, en el que el extremo N es el extremo N de HAHB4.
- 20 6. Un procedimiento para conferir tolerancia en una planta tanto a la sequía como a la alta salinidad y la congelación que comprende introducir y expresar en una planta una construcción génica como se define en la reivindicación 3 o un polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5.
- 25 7. Uso de una secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N° 6 o 7, o una secuencia con al menos el 90 % o al menos el 95 % de homología con SEC ID N° 6 o 7 o uso de un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N° 6 o 7 o una secuencia con al menos el 90 % o al menos el 95 % de homología con SEC ID N° 6 o 7, confiriendo elevada tolerancia tanto a la sequía como a la alta salinidad y la congelación.

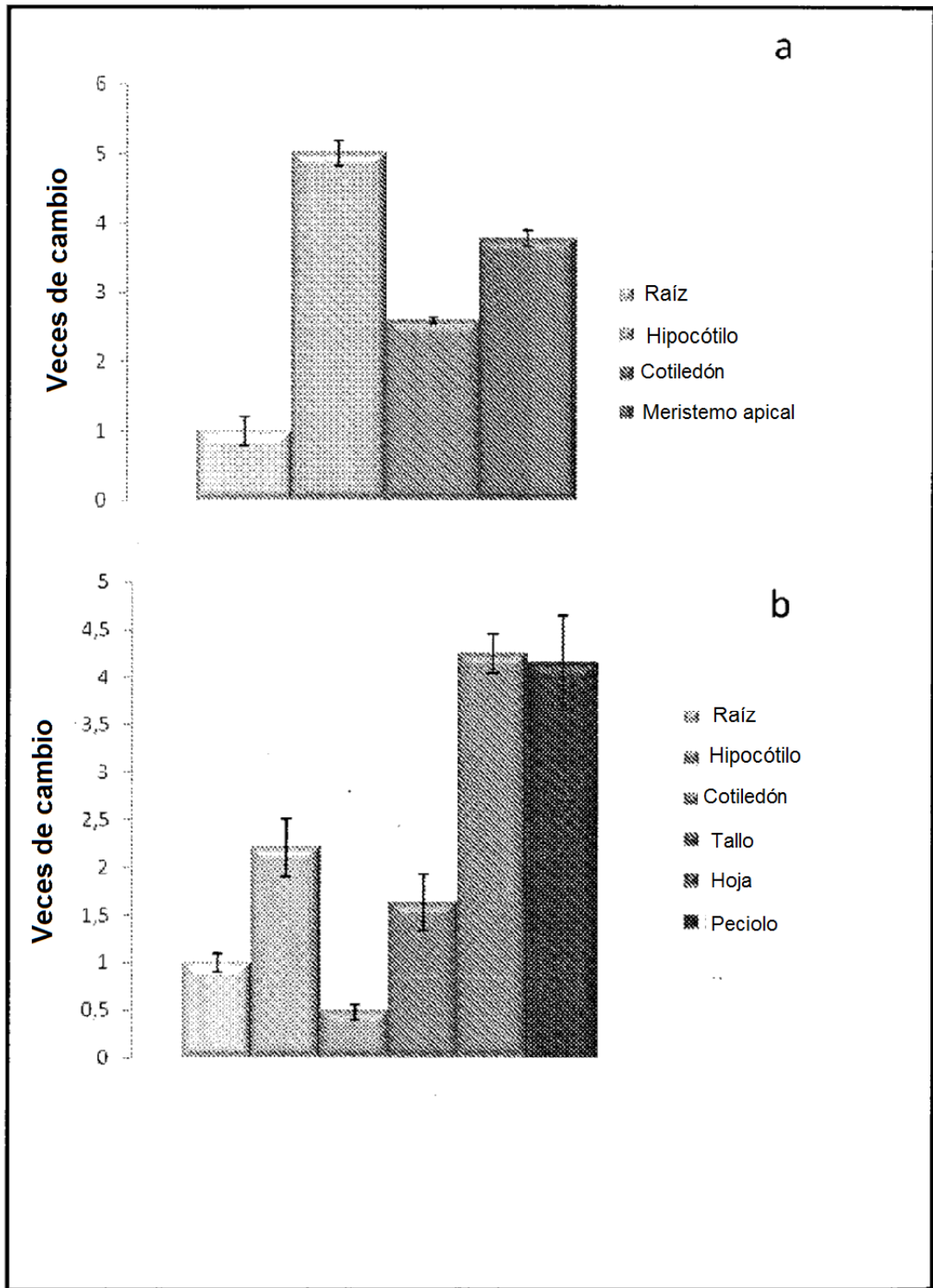


Figura 1

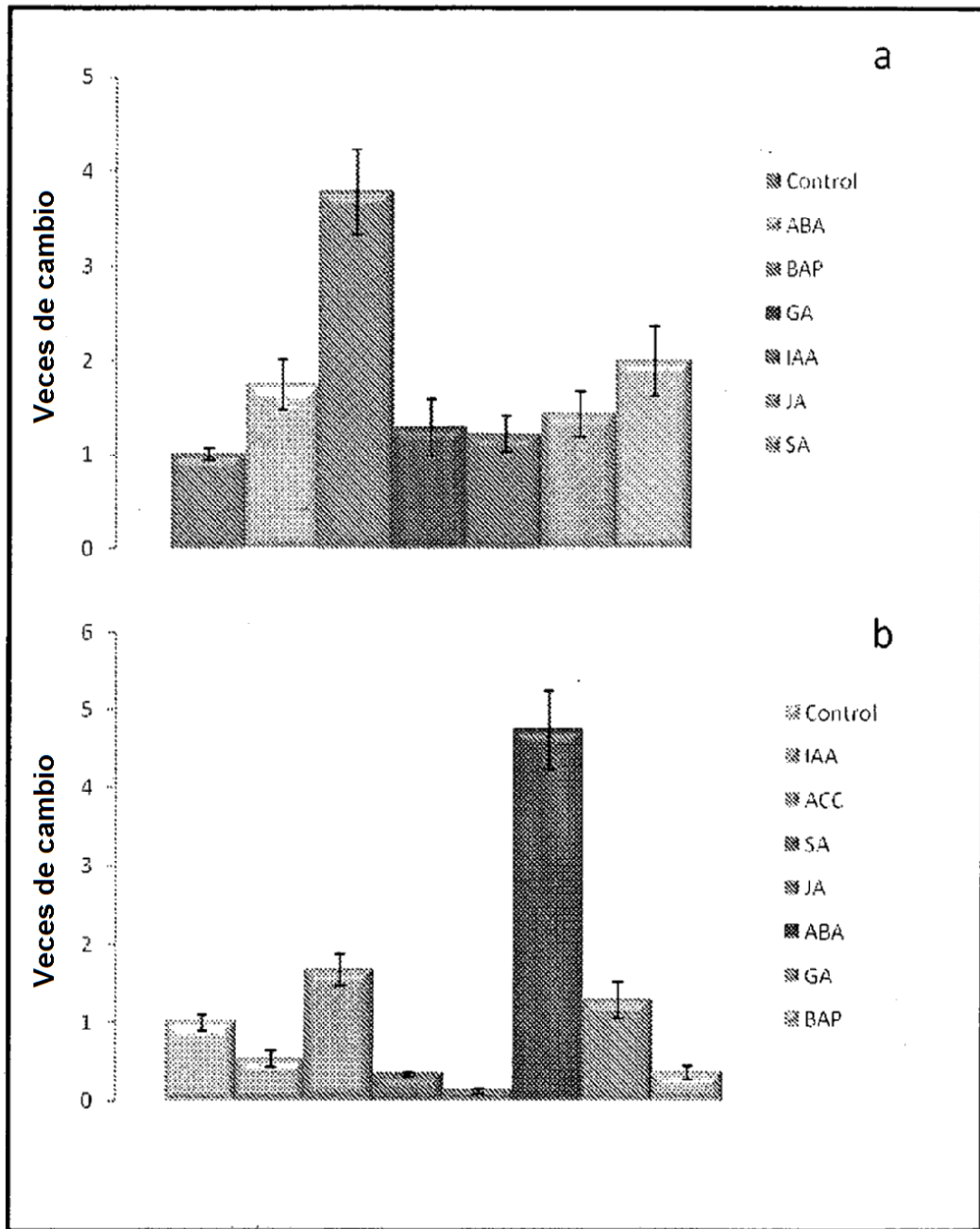


Figura 2

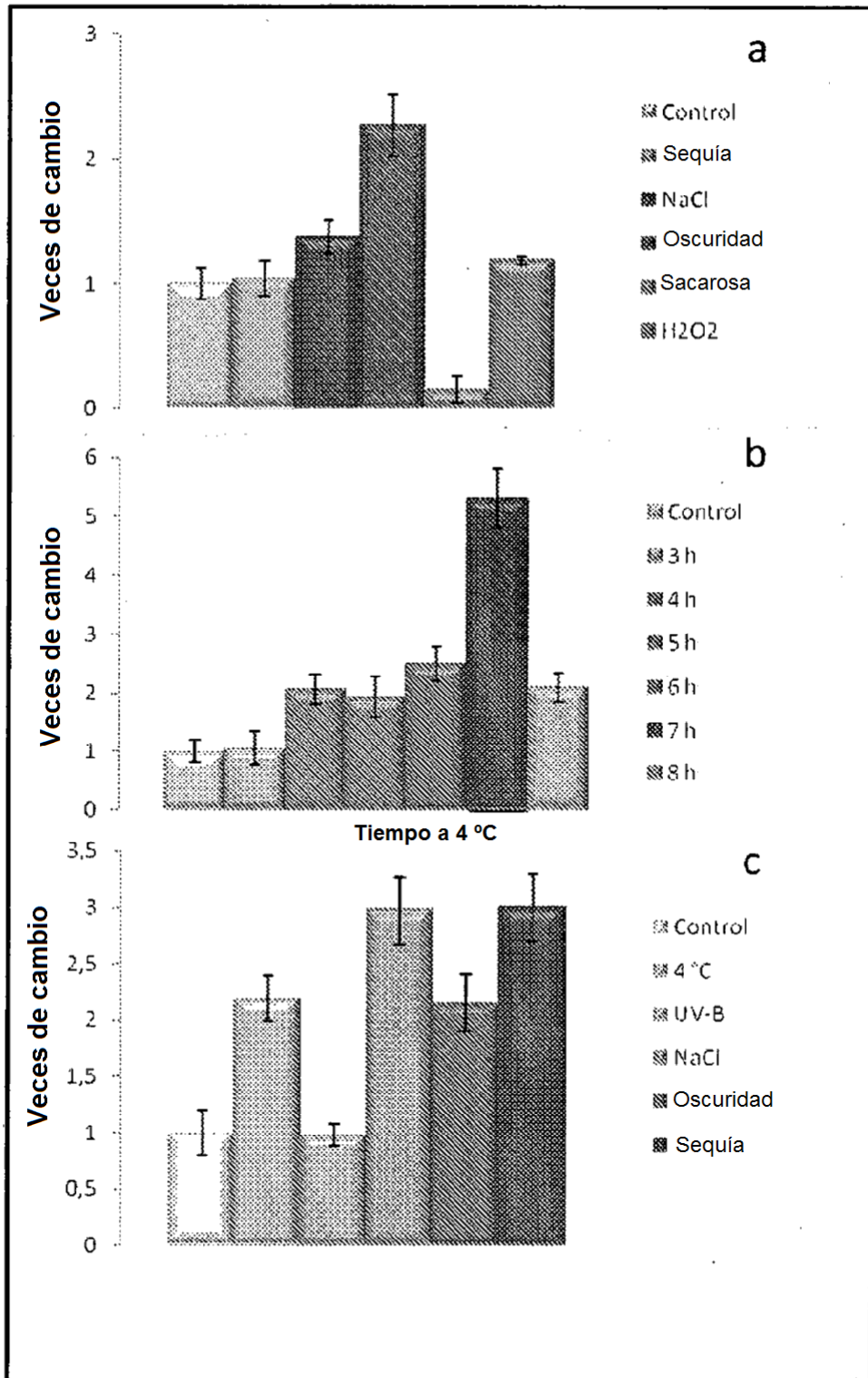


Figura 3

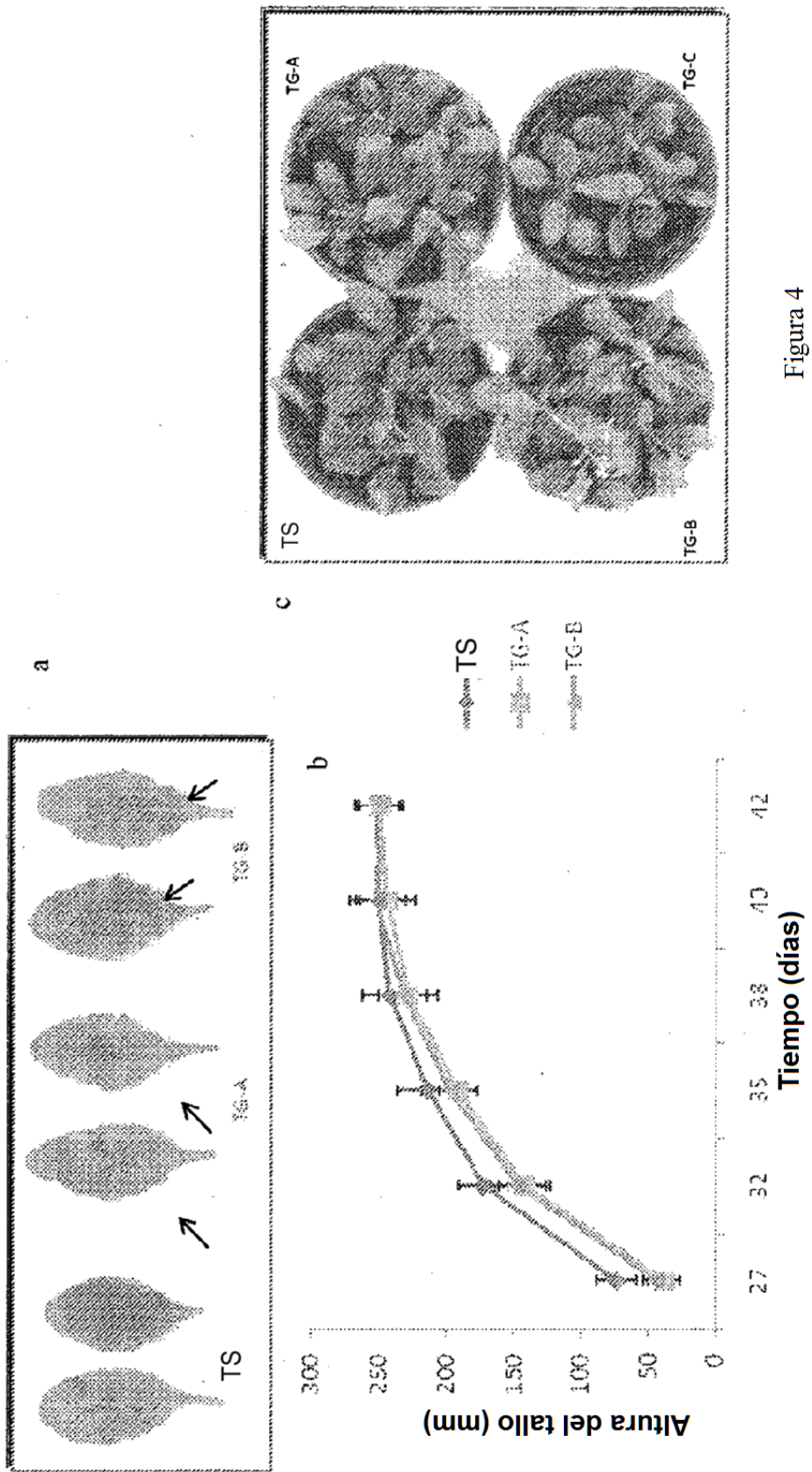
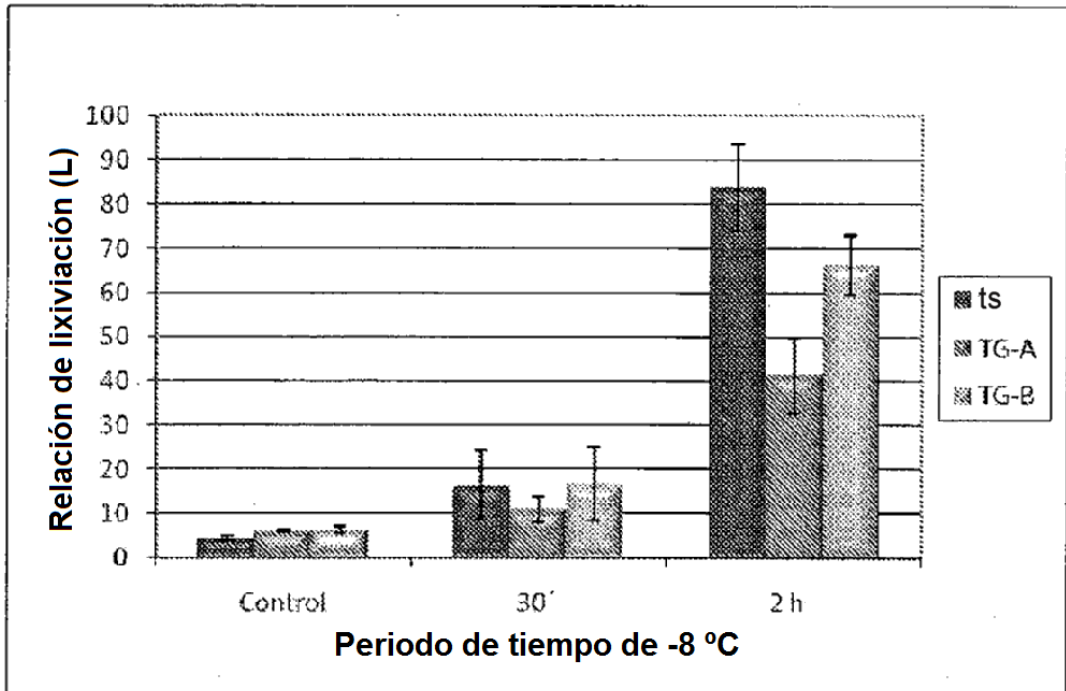
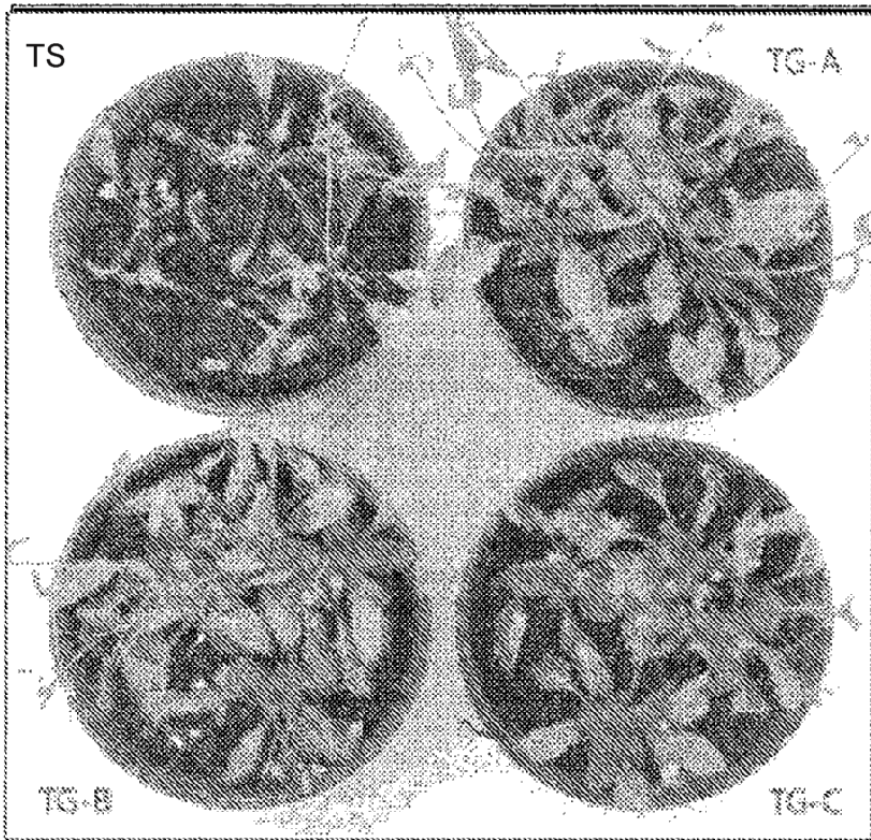


Figura 4



a



b

Figura 5

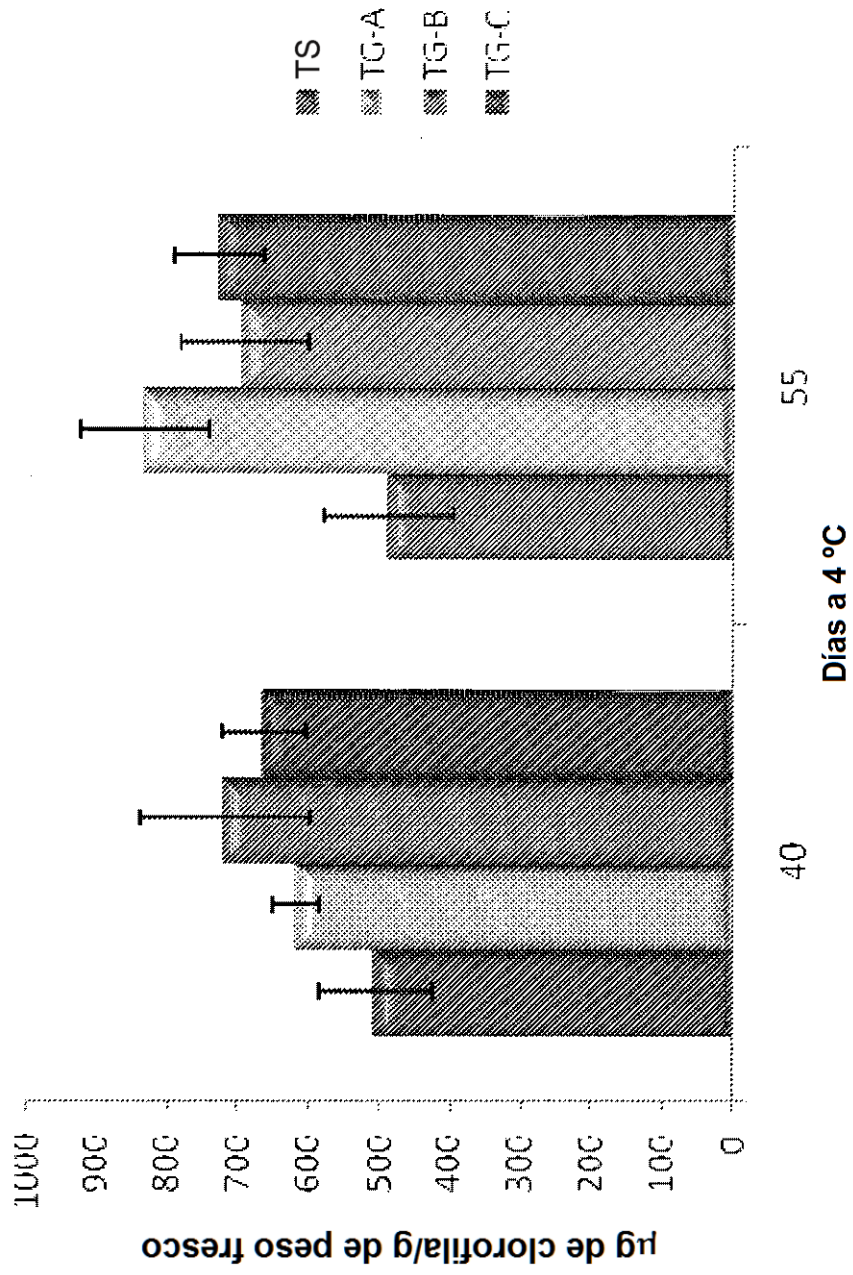


Figura 6

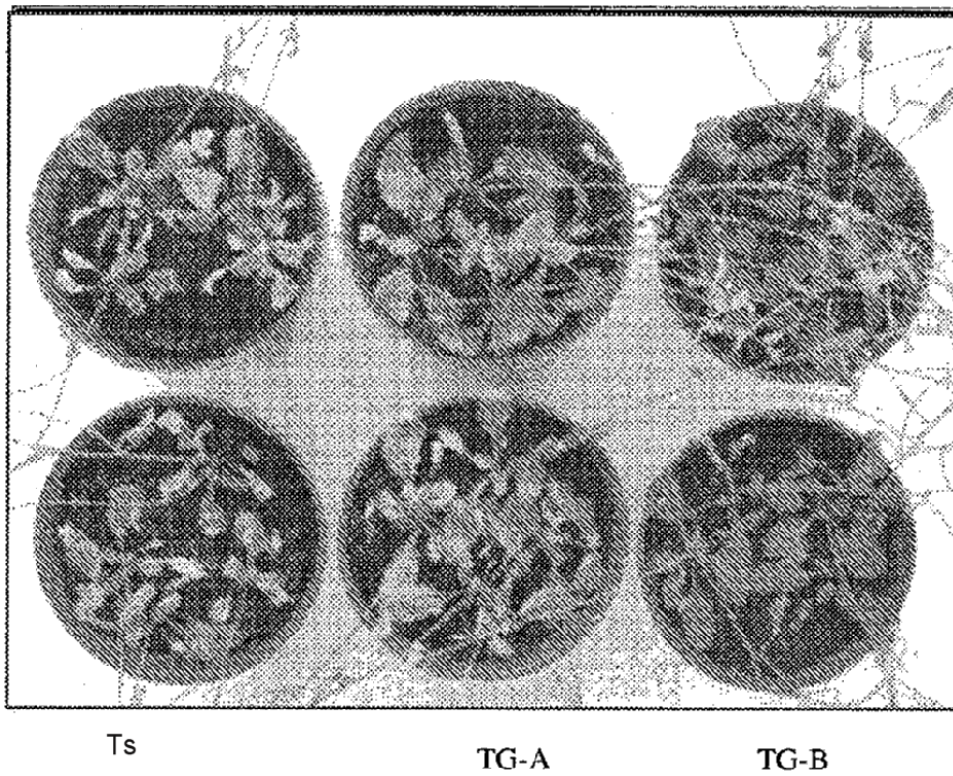
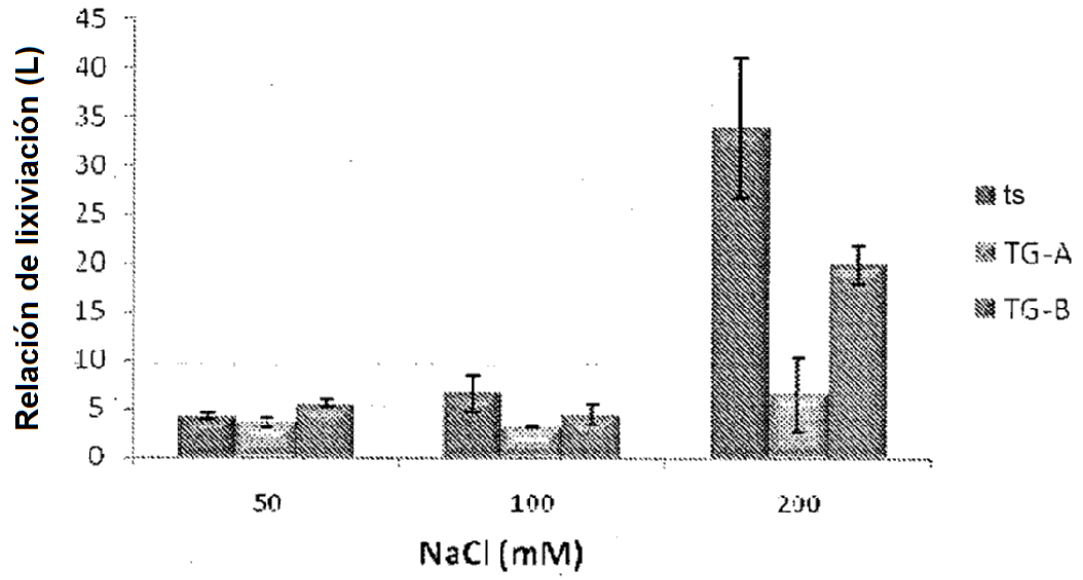


Figura 7

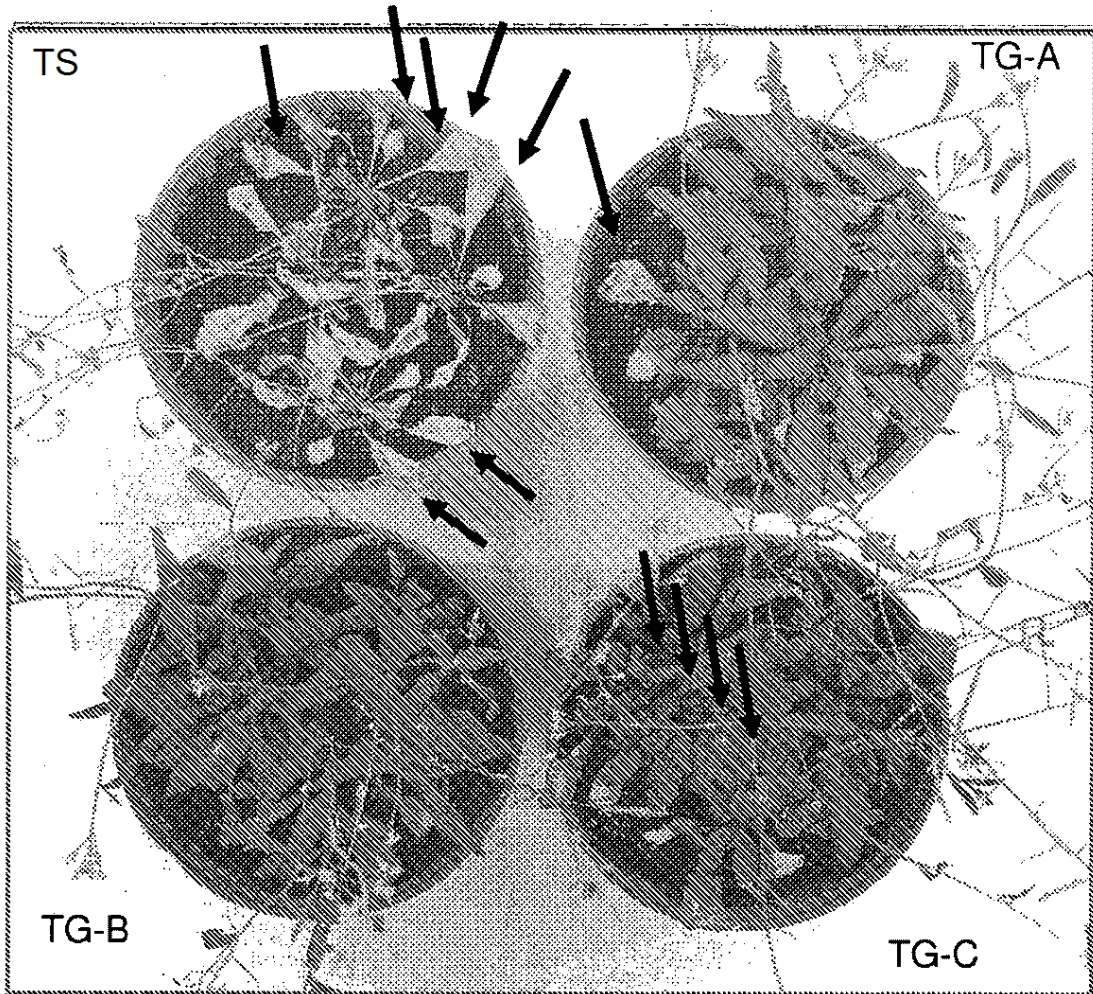


Figura 8

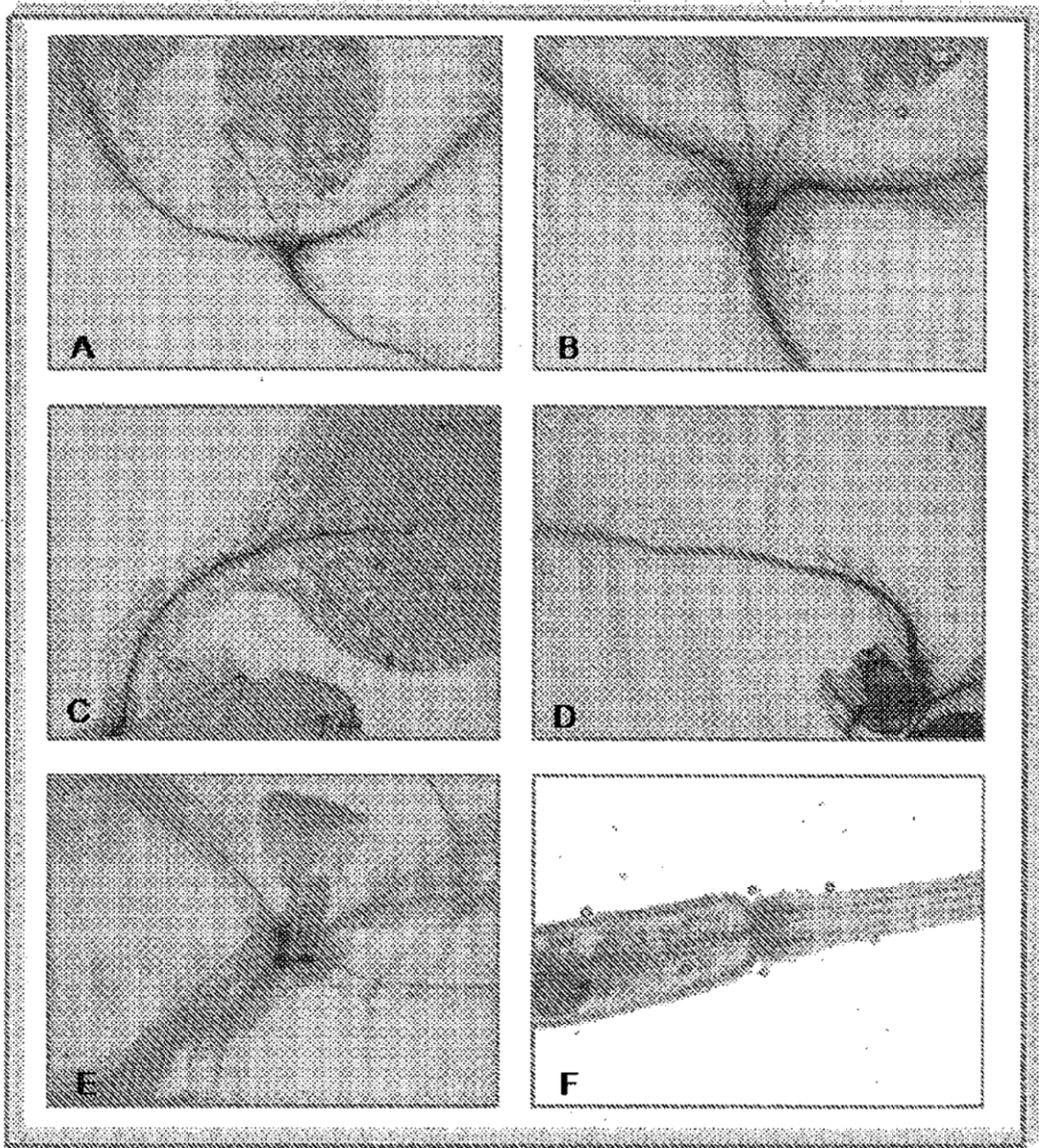


Figura 9

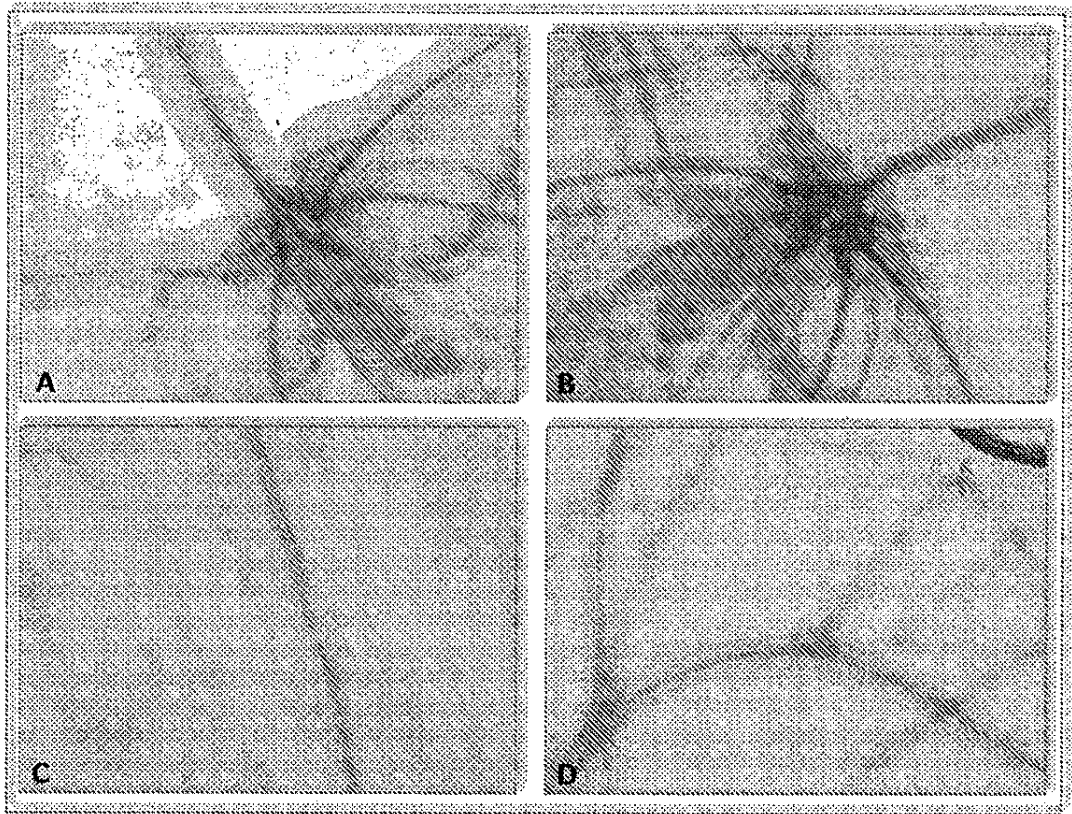


Figura 10

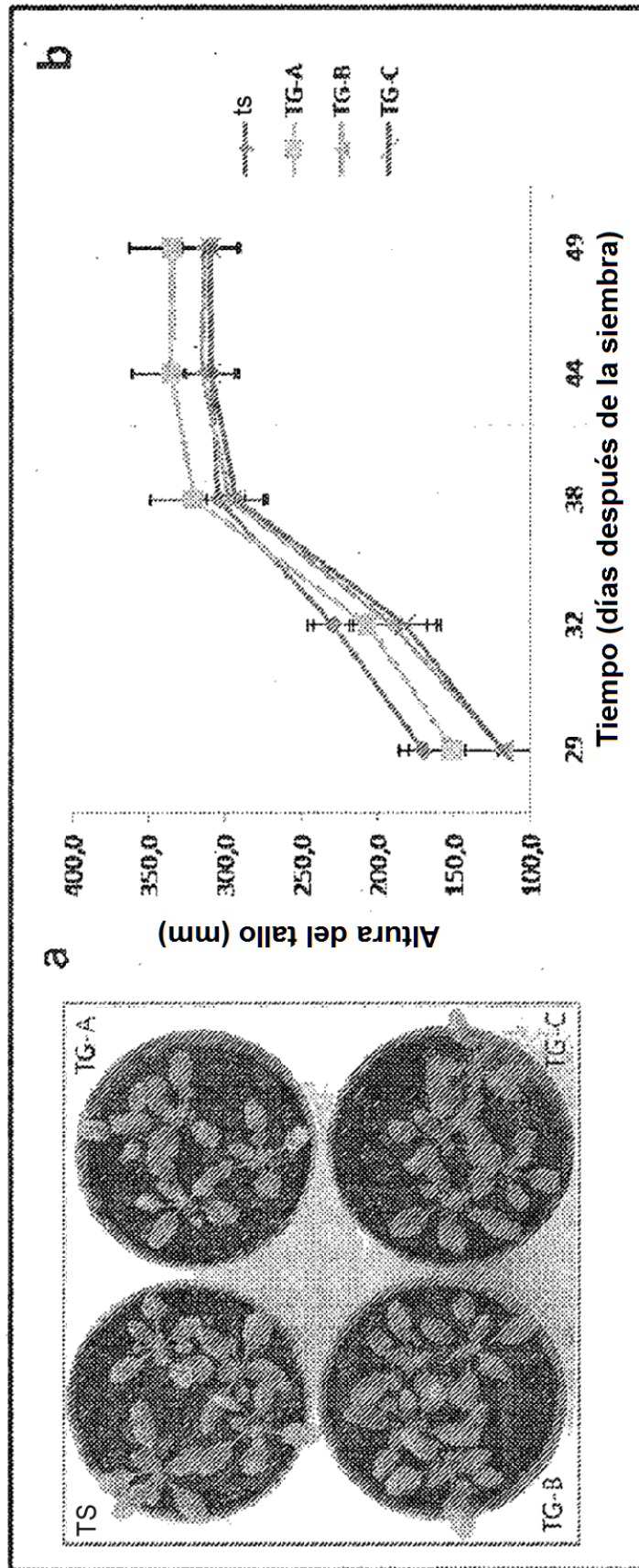
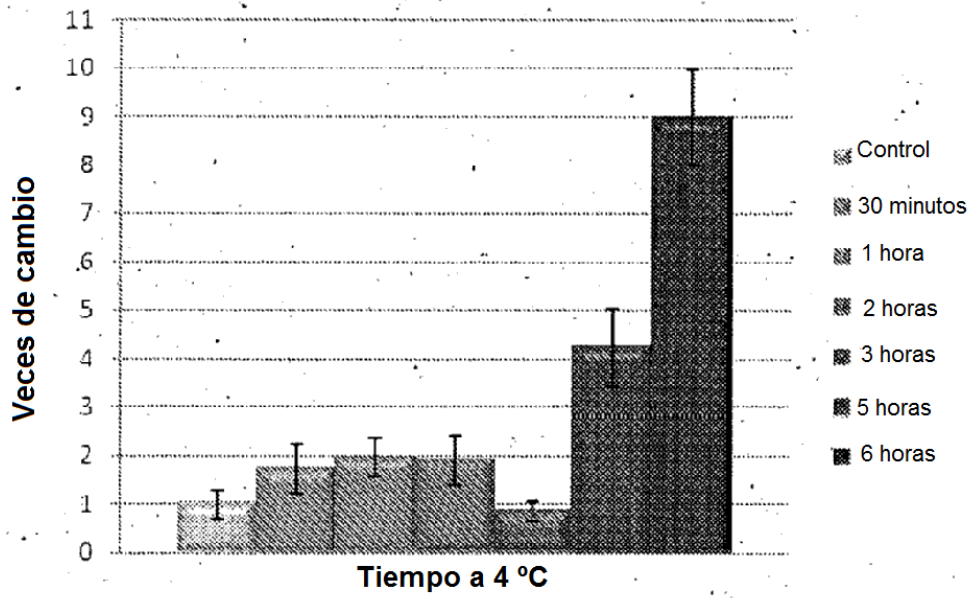
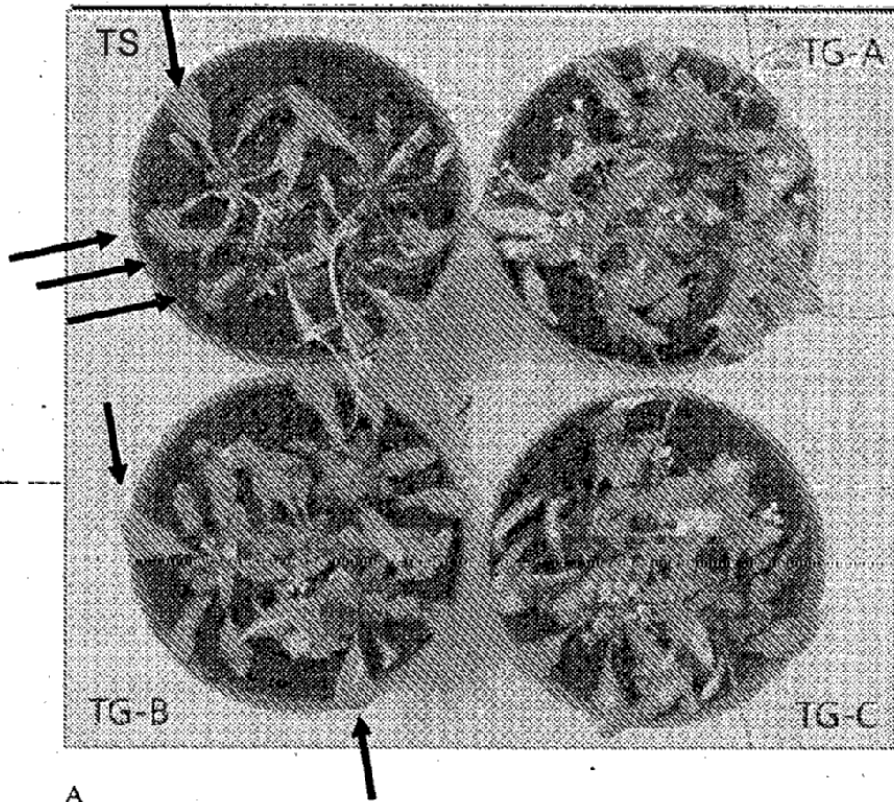


Figura 11



B

Figura 12

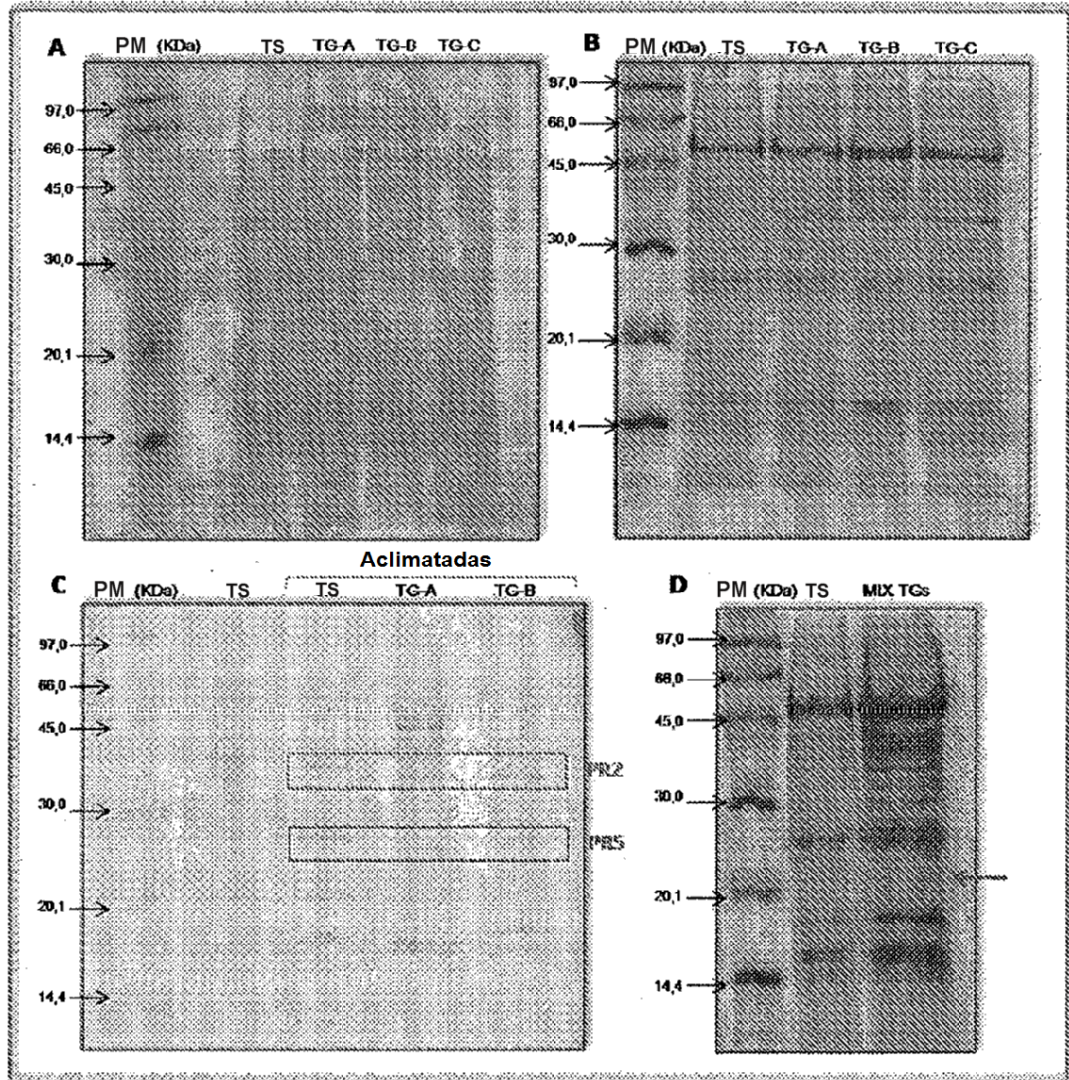


Figura 13

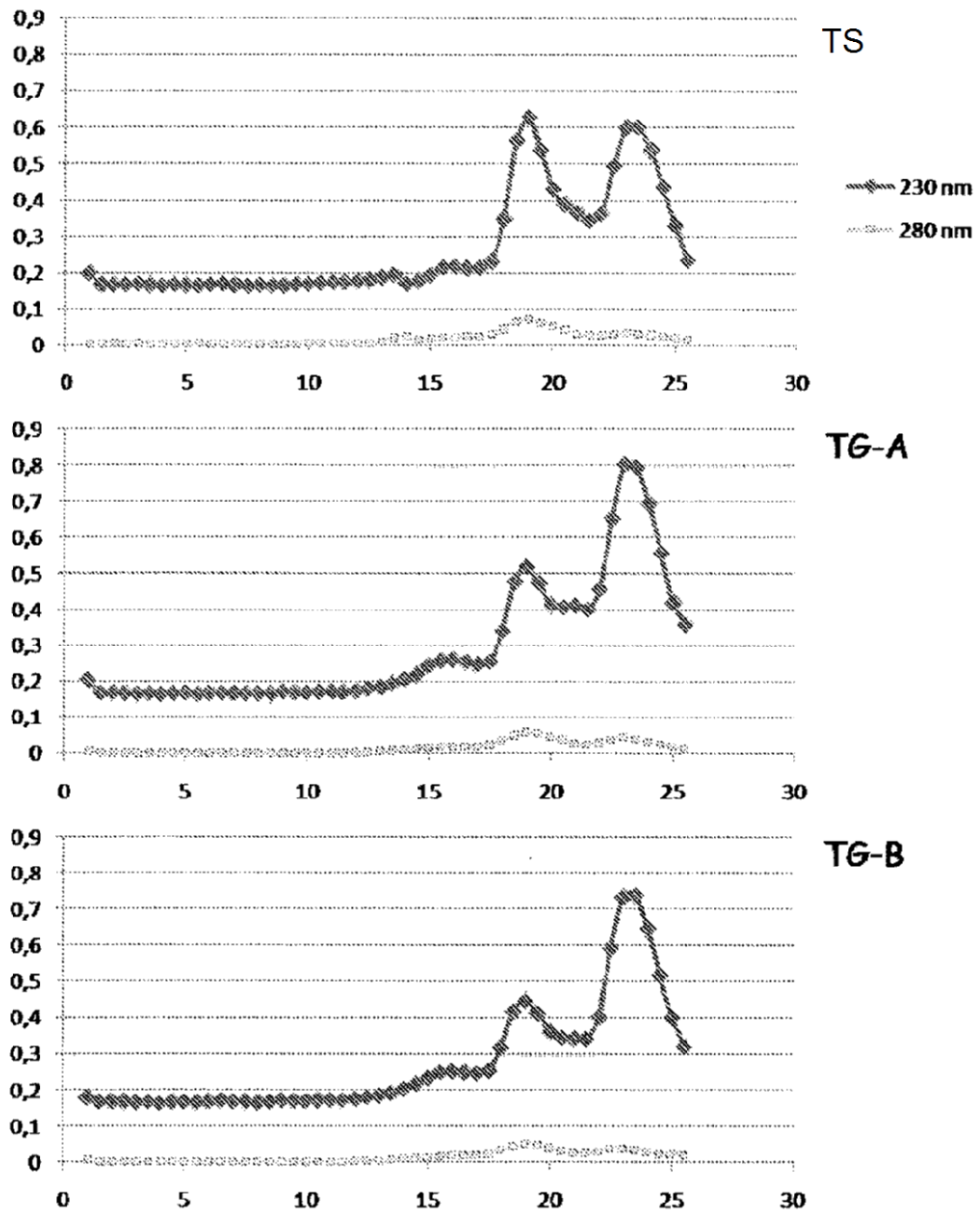


Figura 14

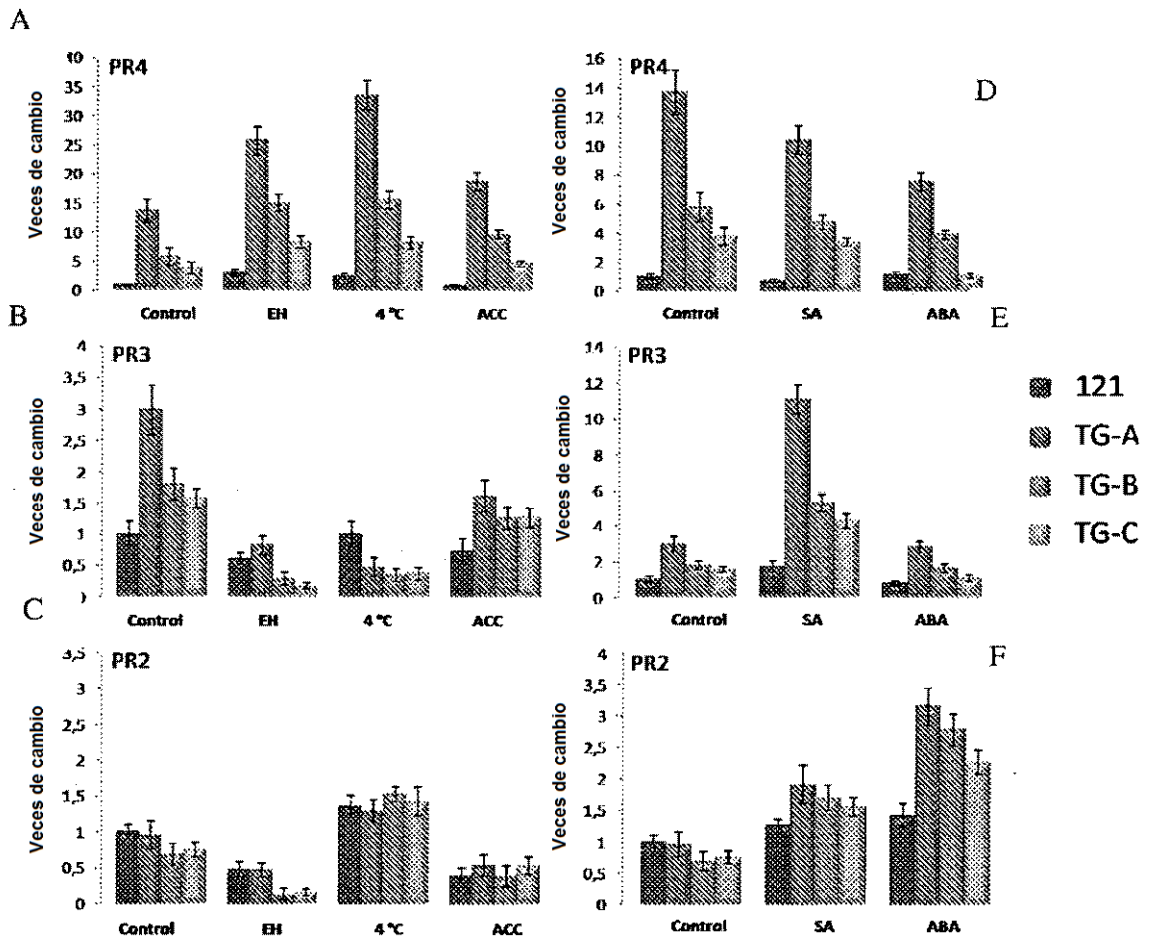


Figura 15

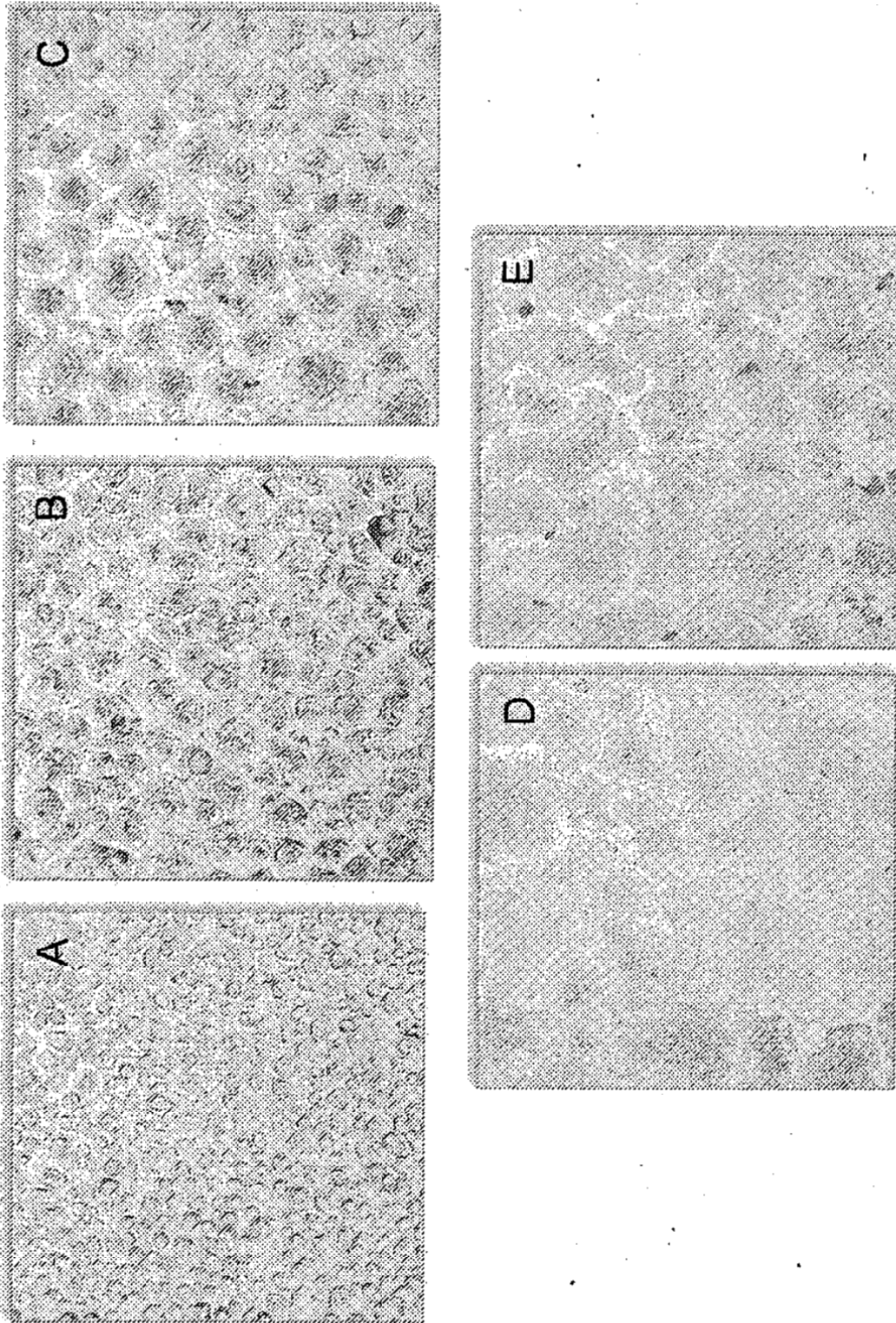
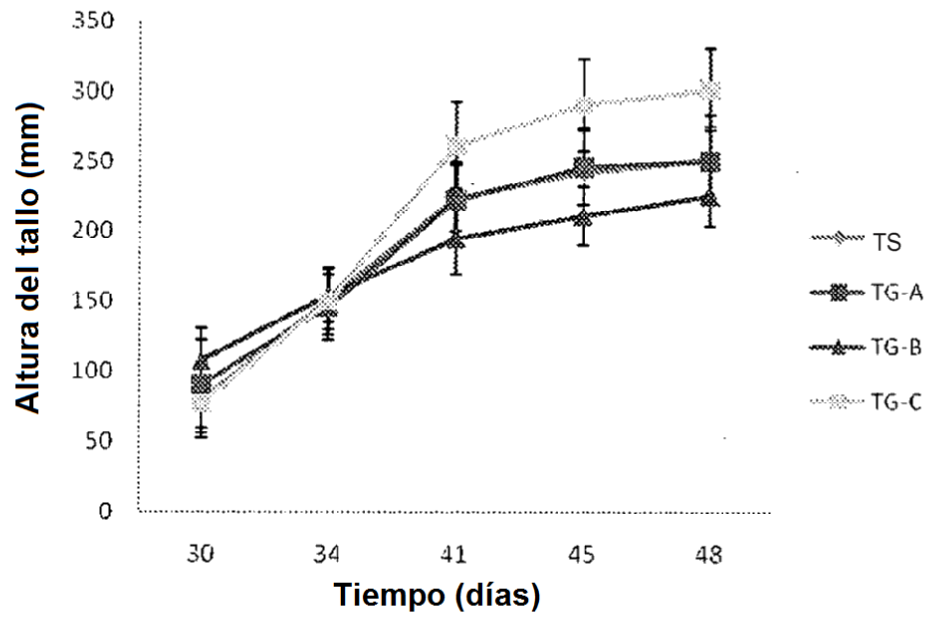
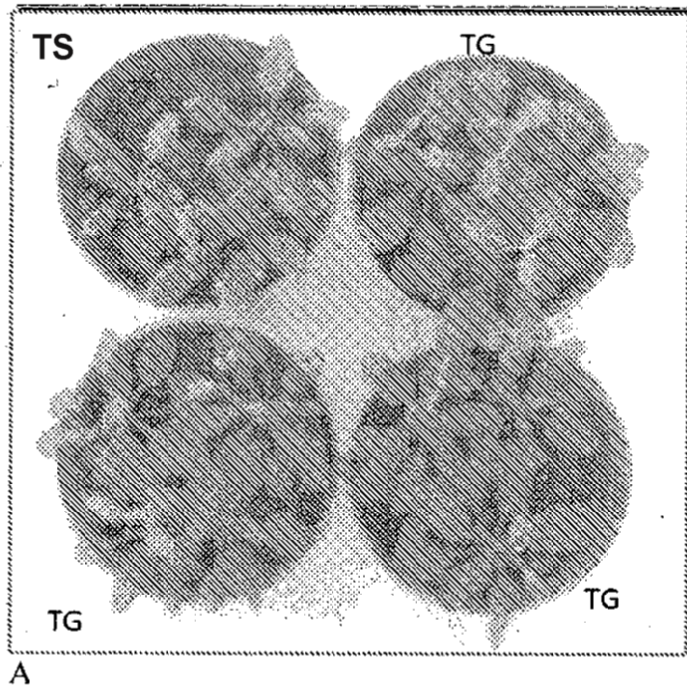
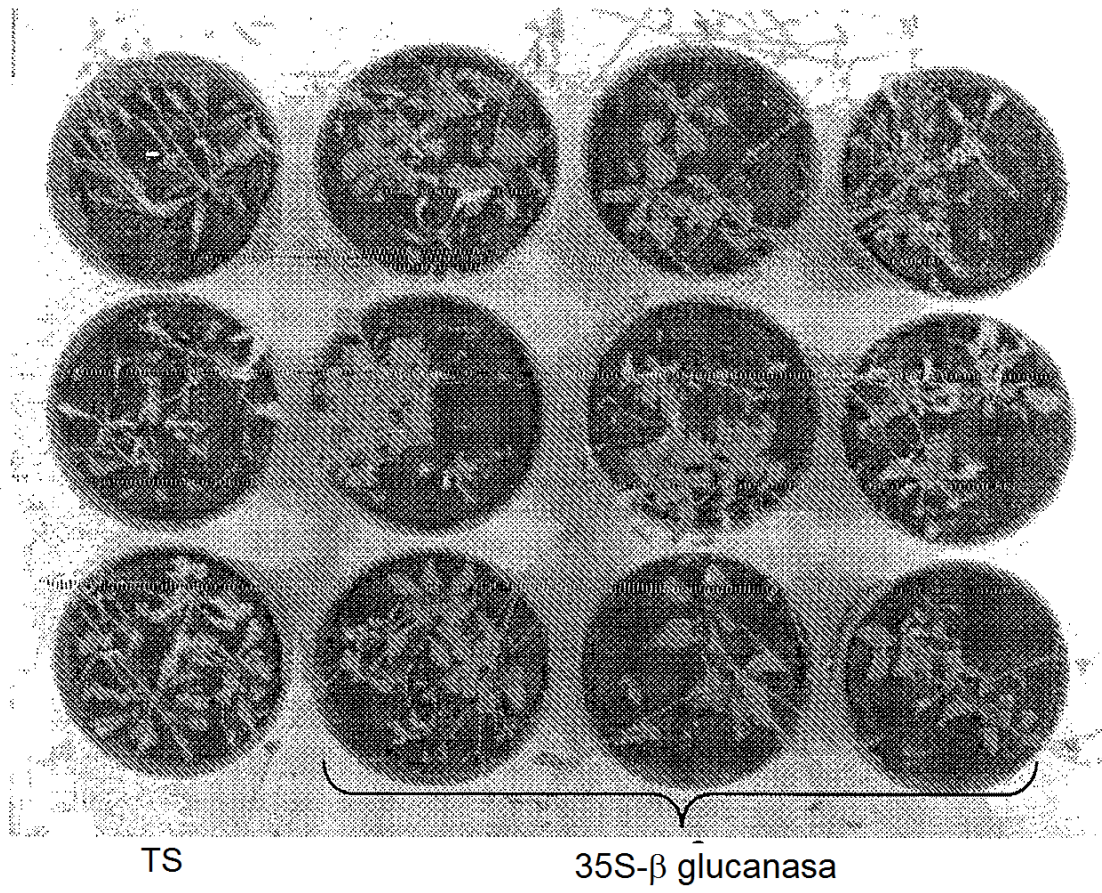


Figura 16

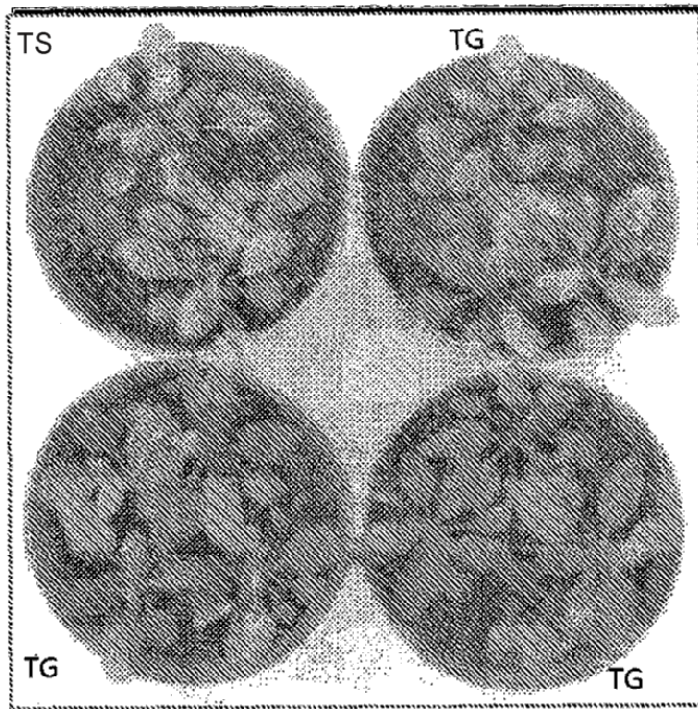


B

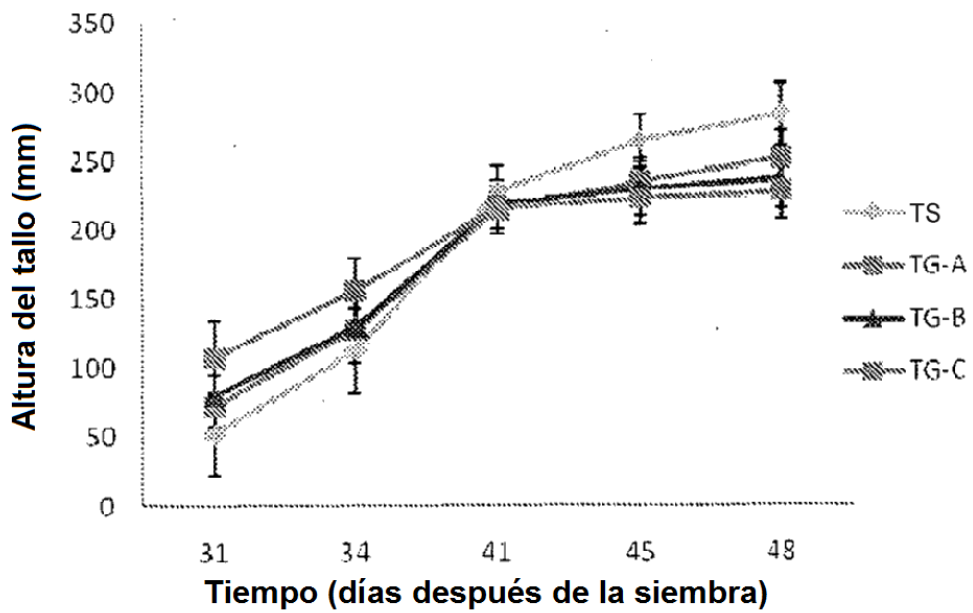
Figura 17



c
Figura 17



A



B

Figura 18

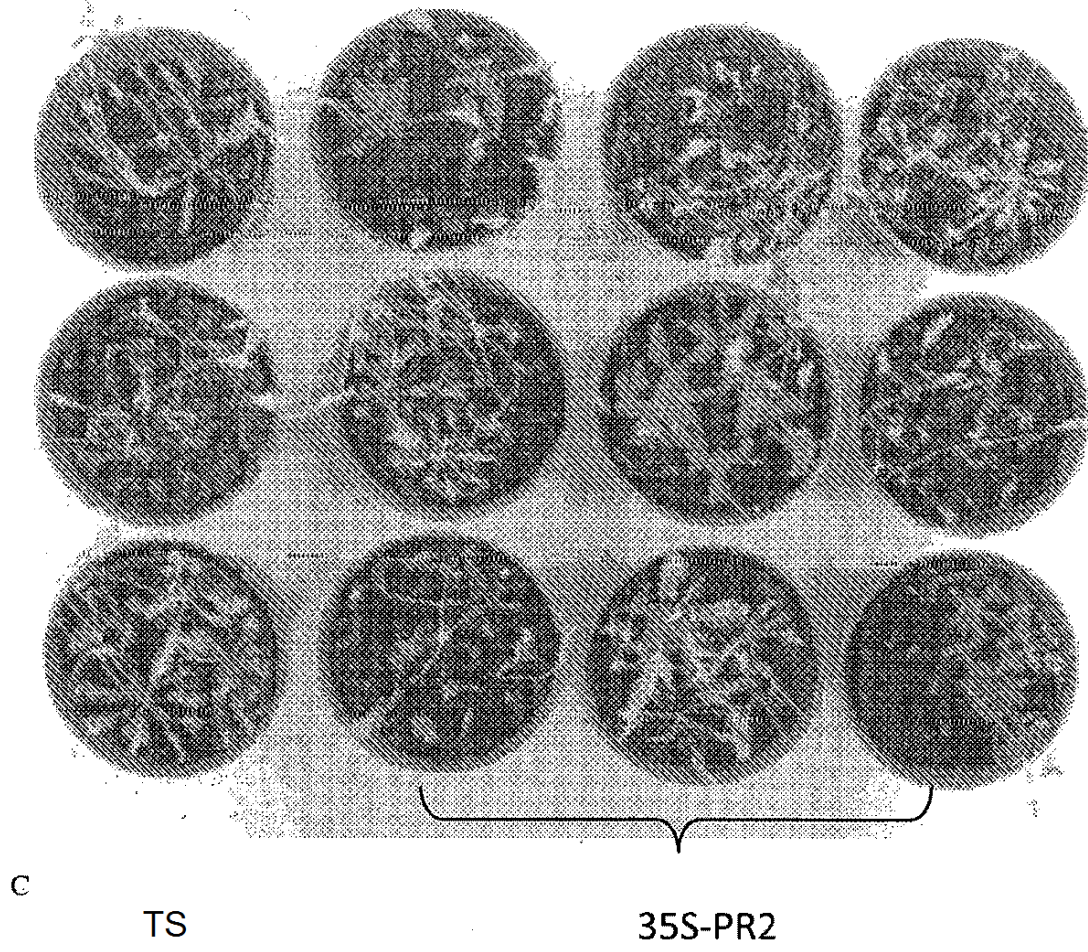


Figura 18

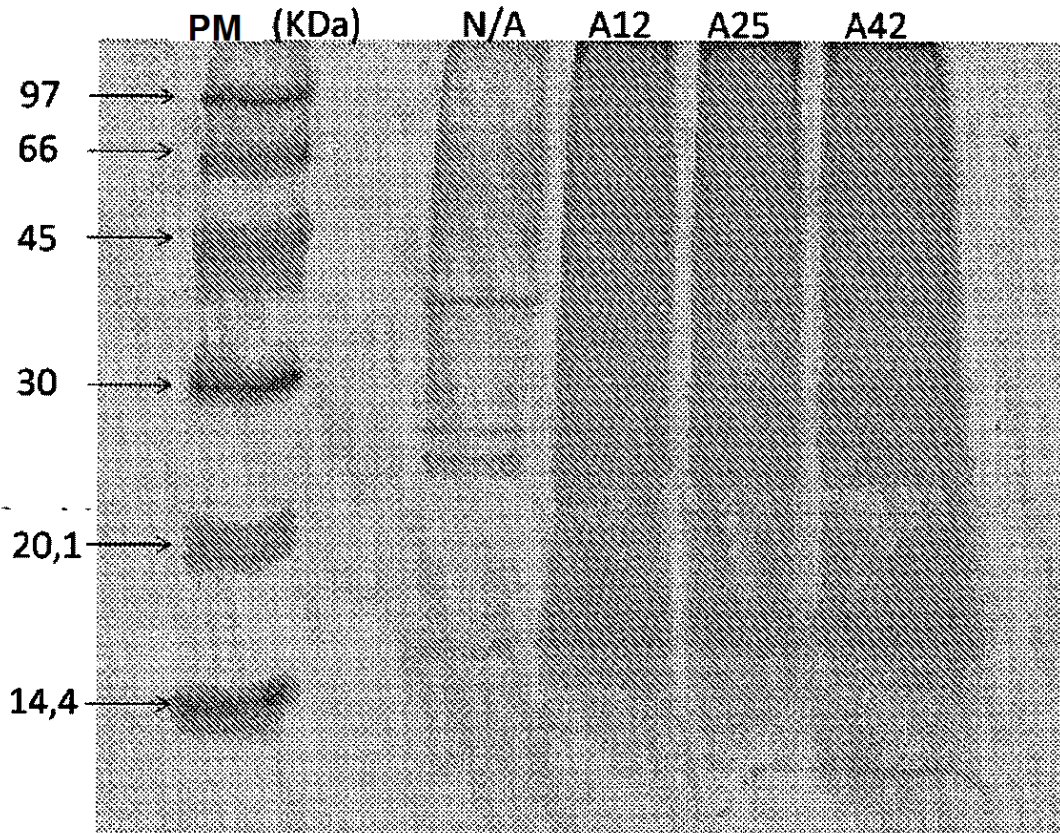


Figura 19

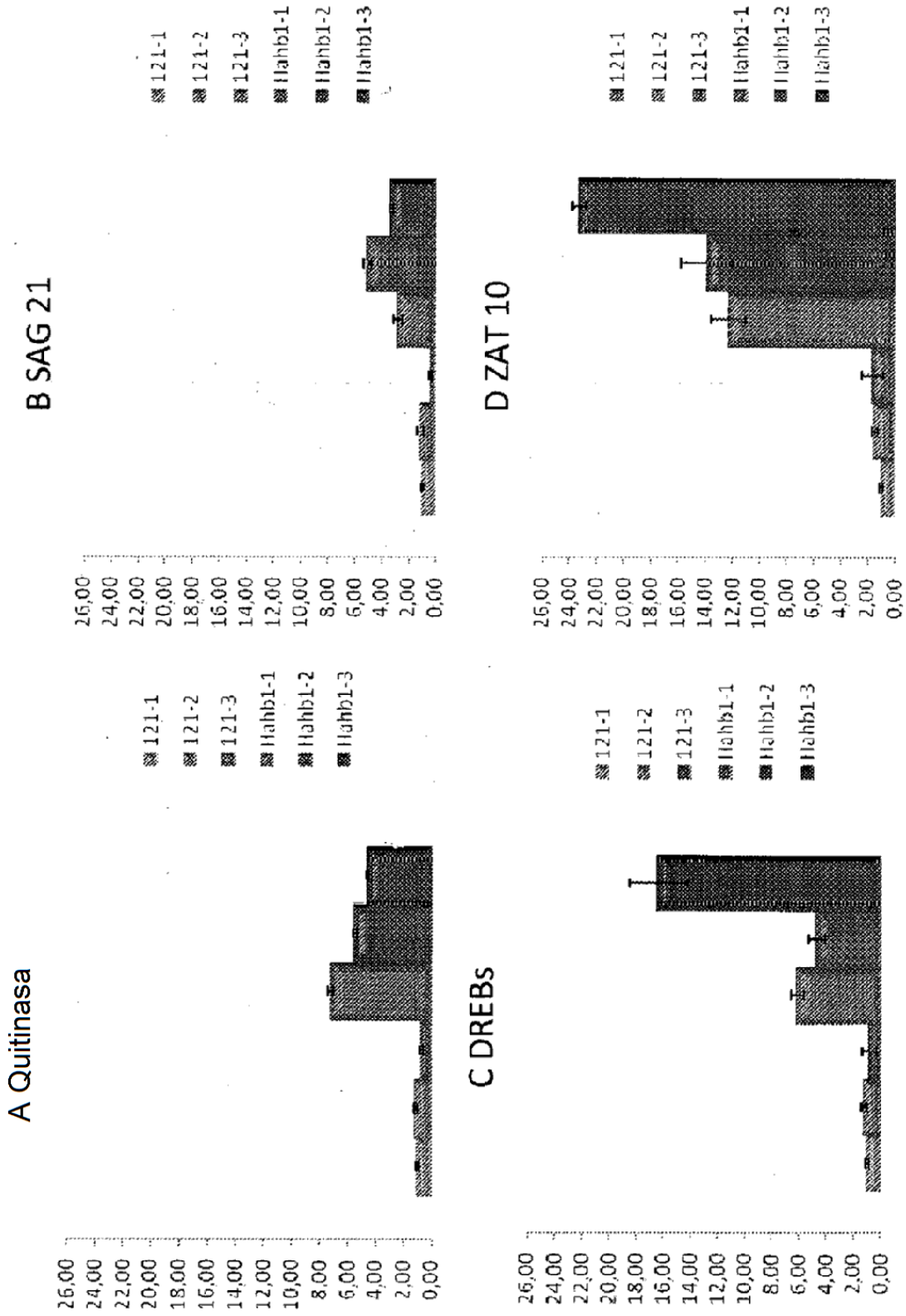
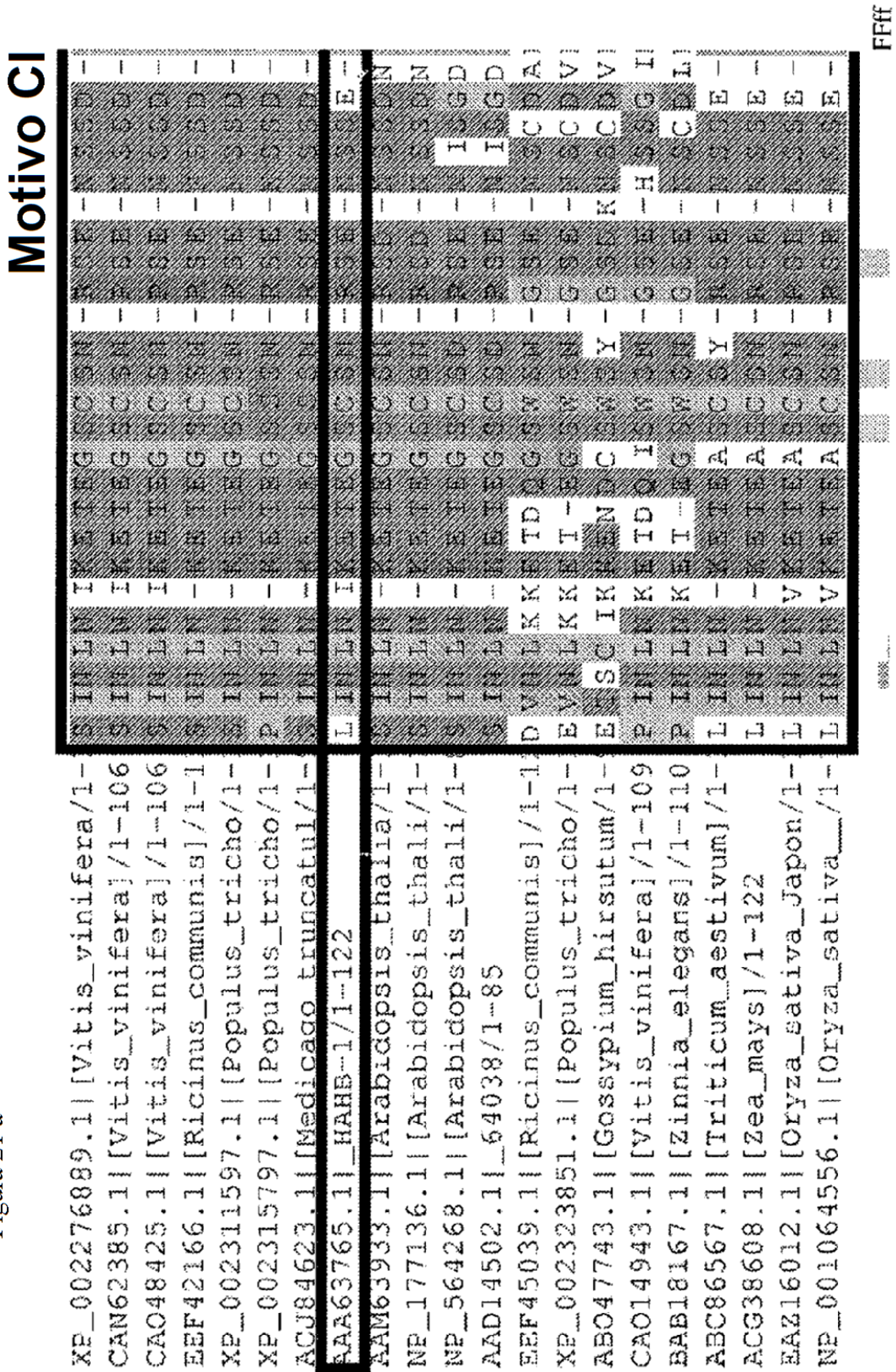


Figura 20

Figura 21 a



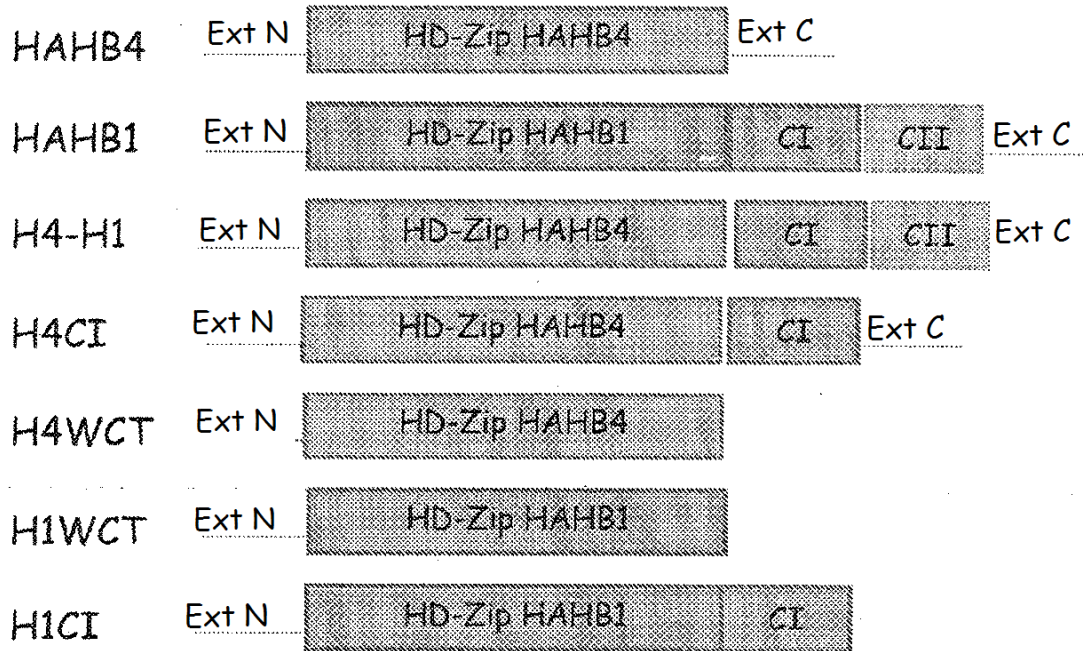


Figura 22

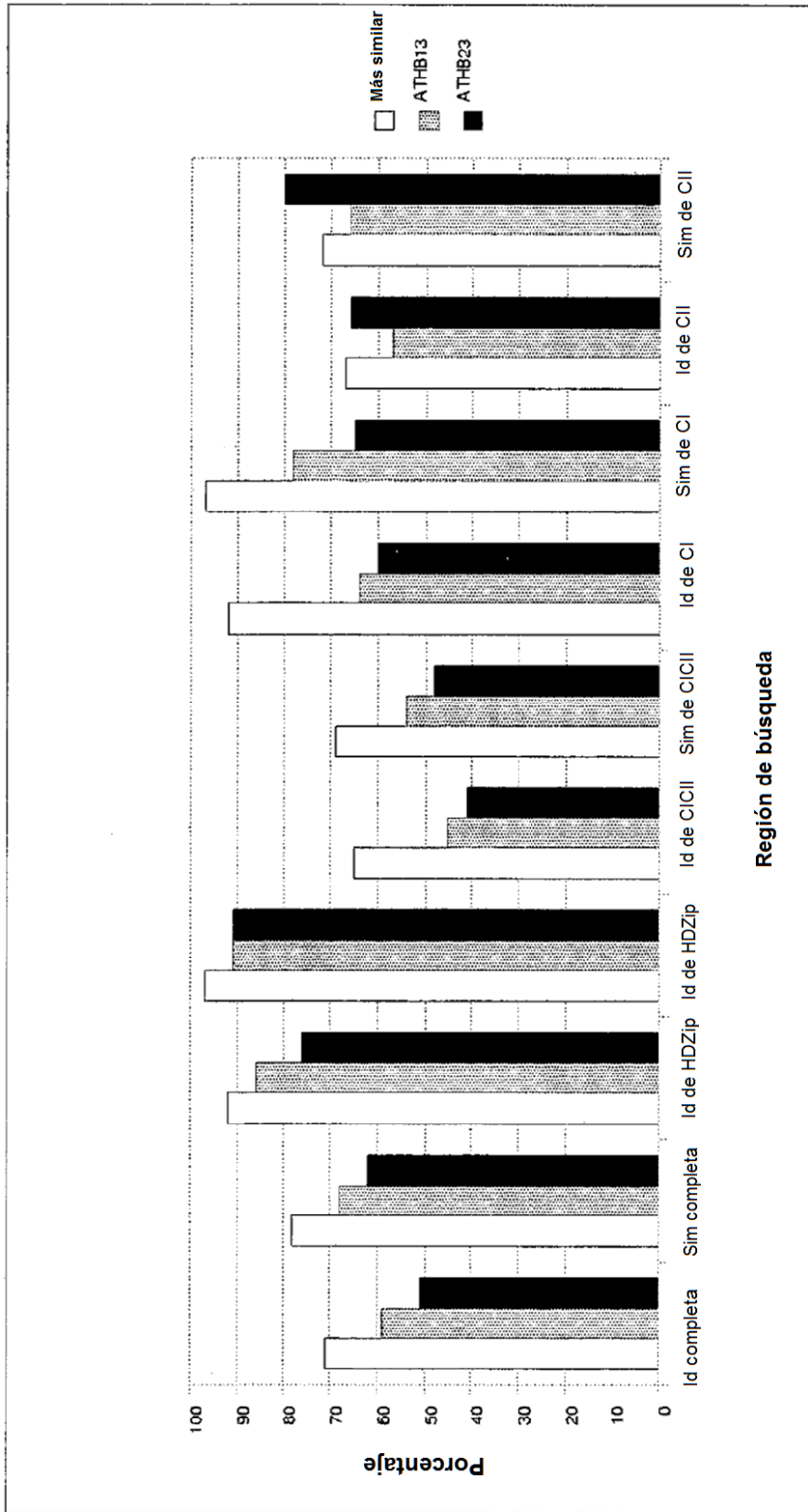


Figura 23

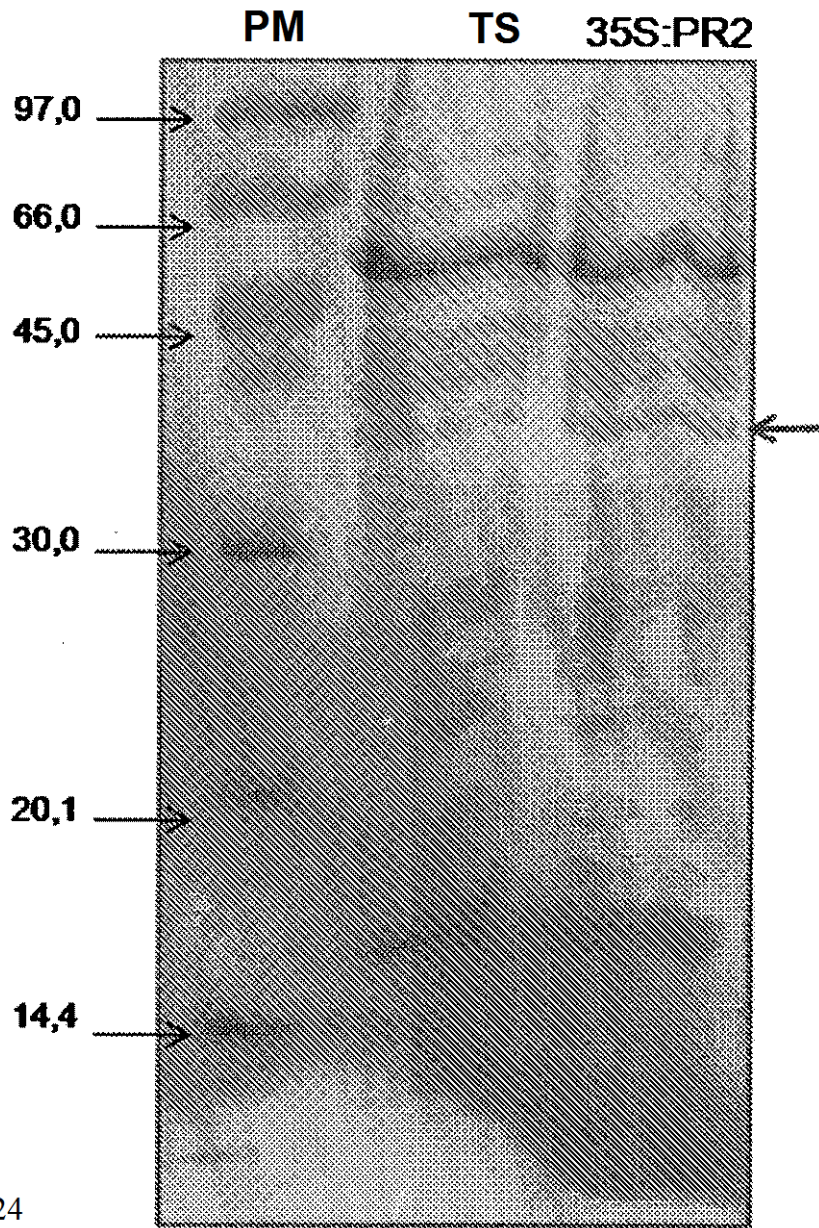
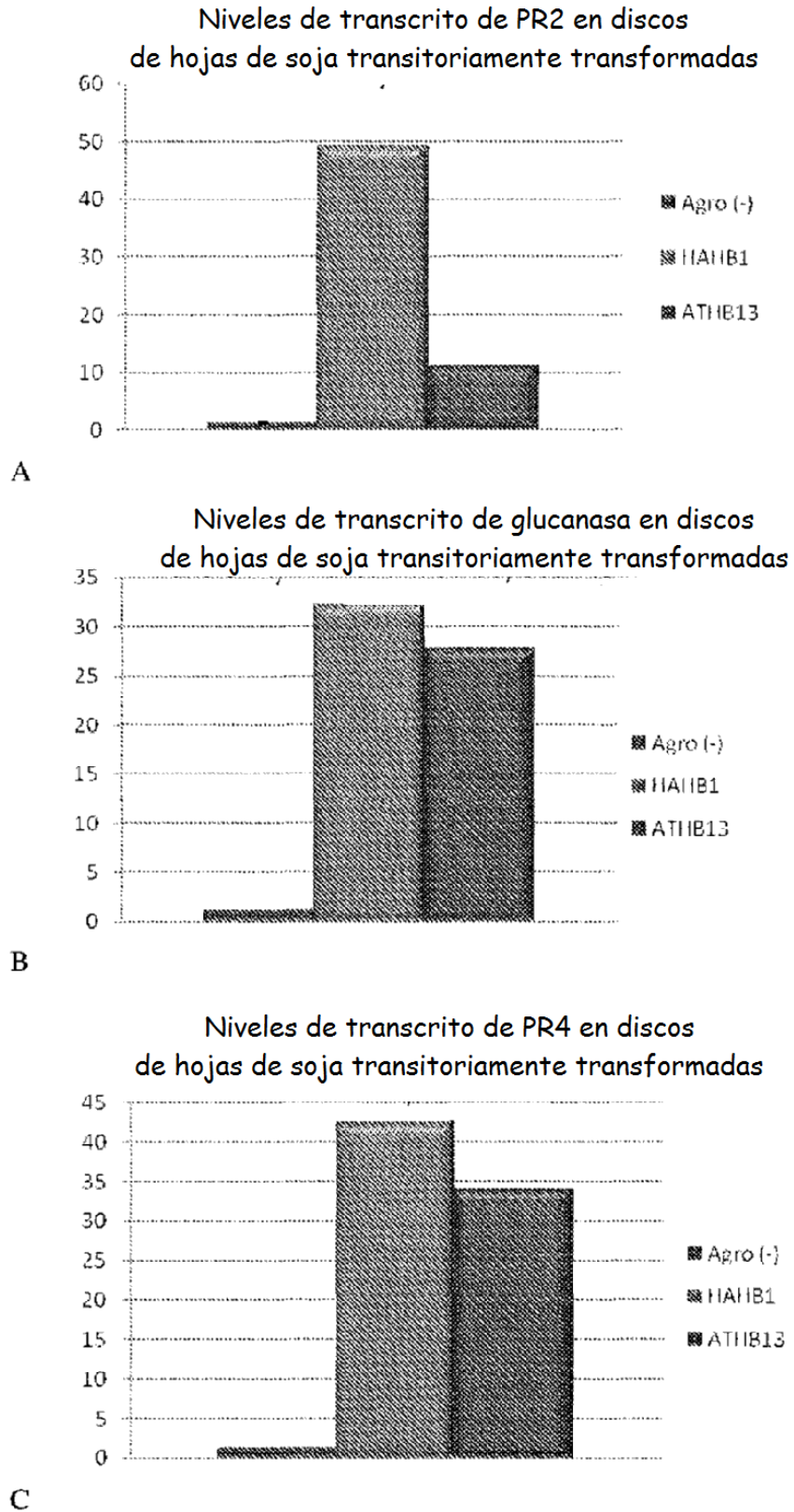
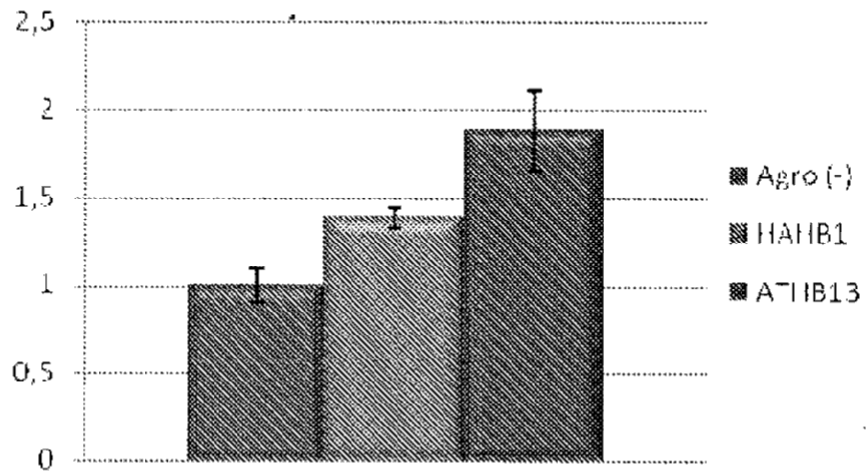


Figura 24

Figura 25

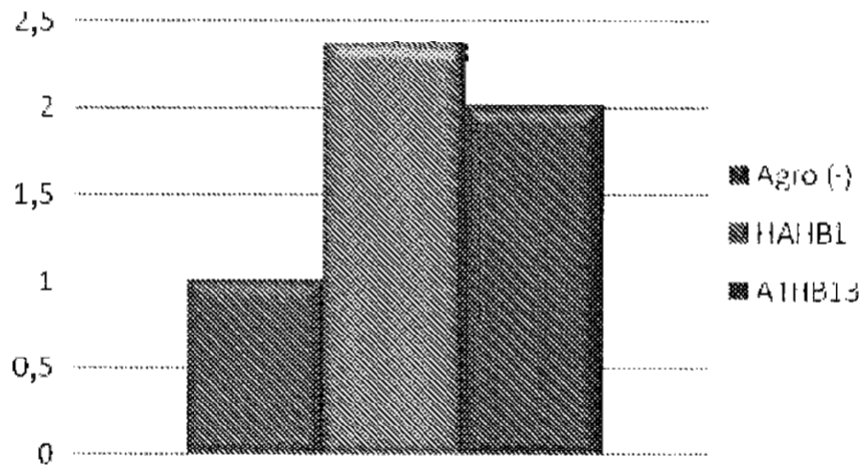


Niveles de transcrito de PR2 en discos de hojas de *Nicotiana tabacum* transitoriamente transformadas



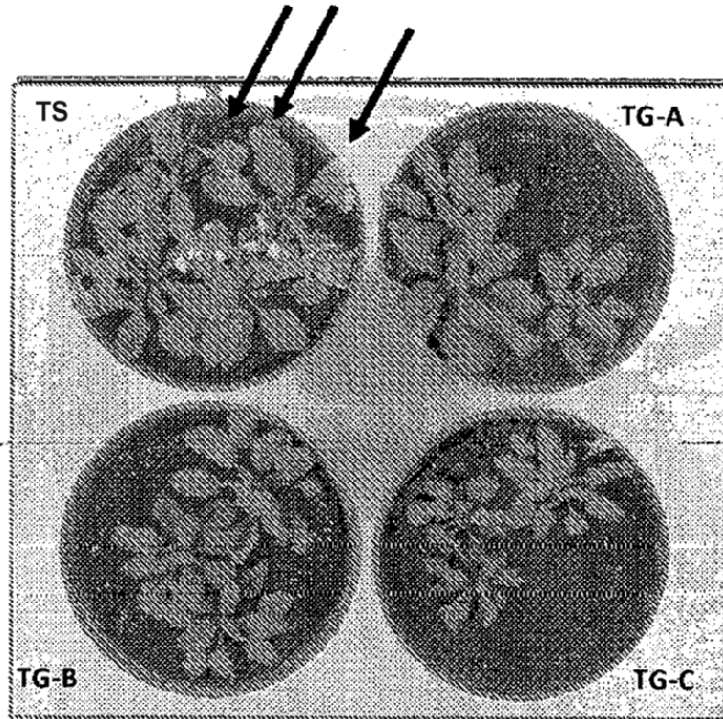
D

Niveles de transcrito de PR4 en discos de hojas de *Nicotiana tabacum* transitoriamente transformadas

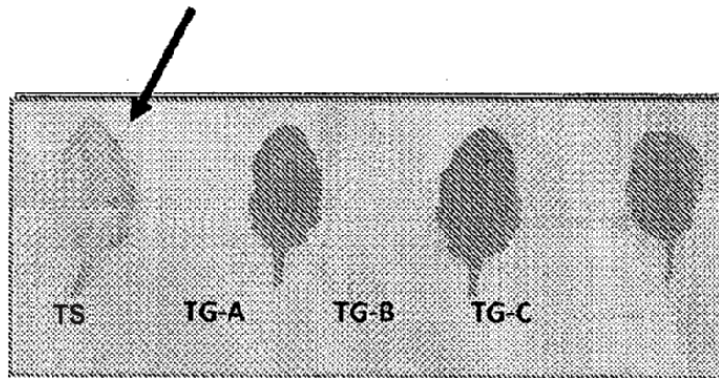


E

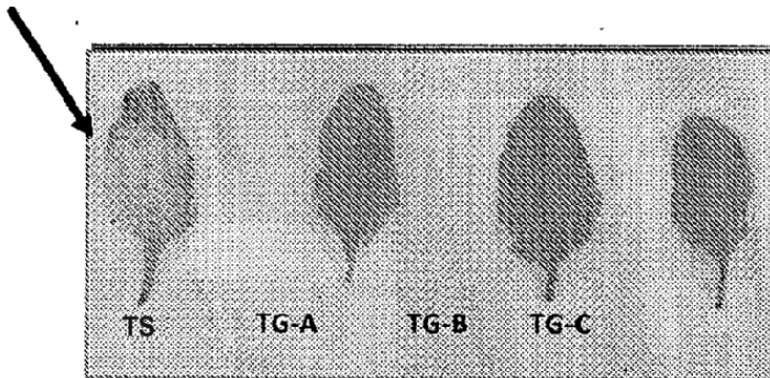
Figura 26



a



b



c

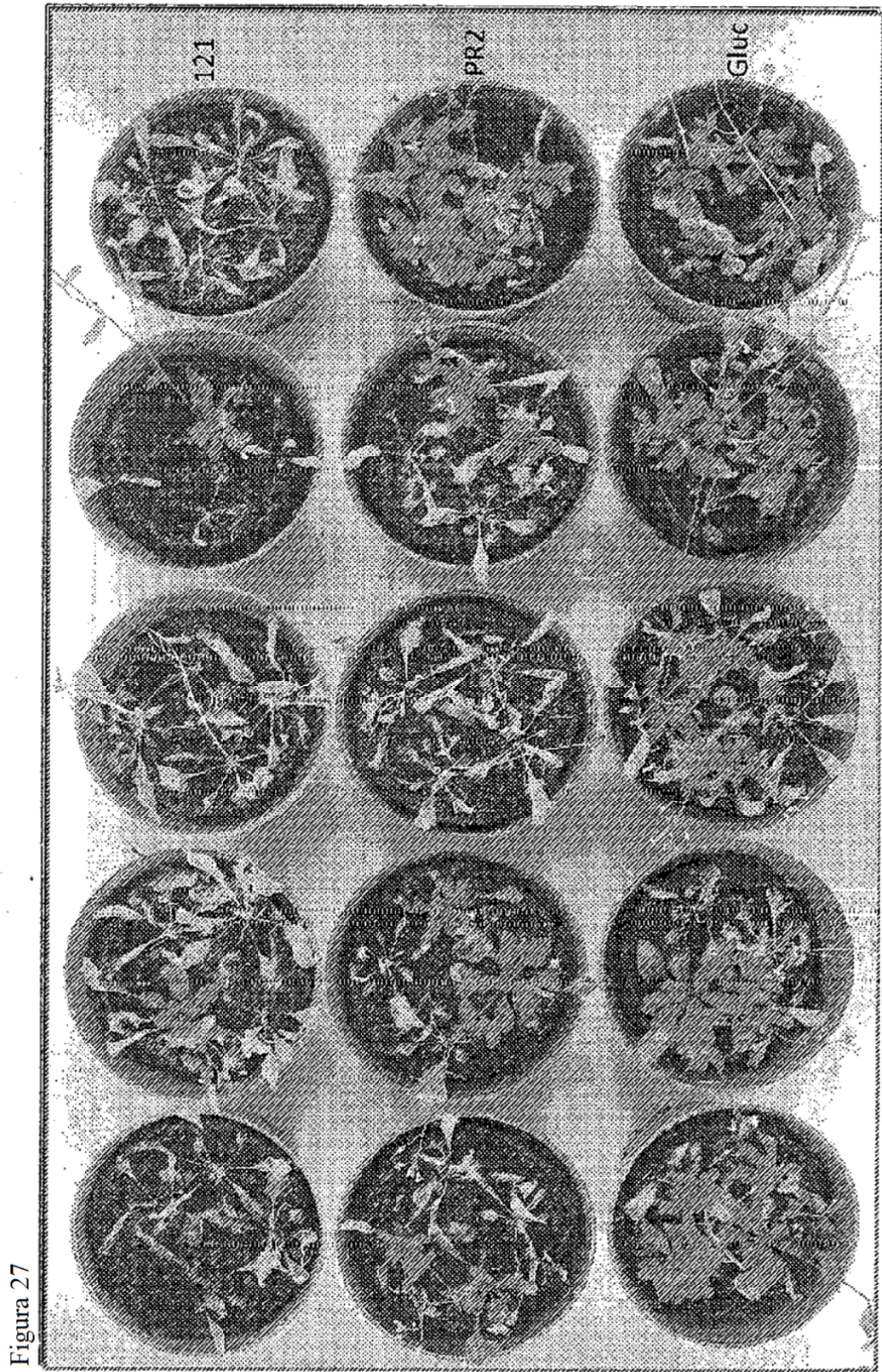


Figura 27

Figura 28

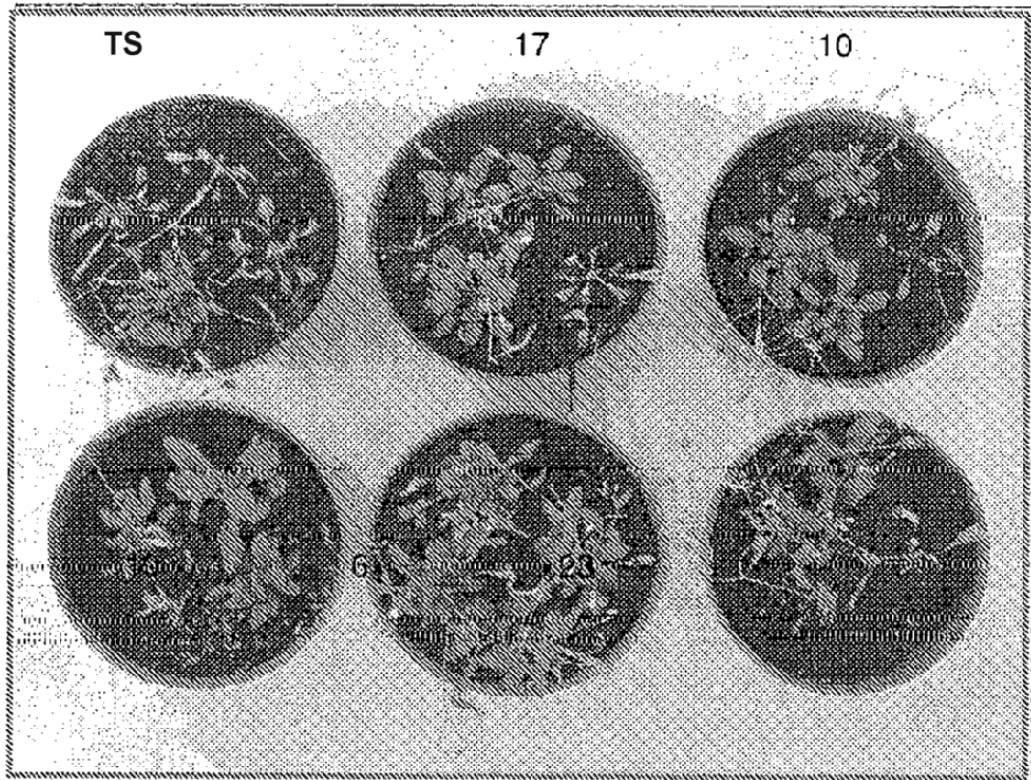


Figura 29

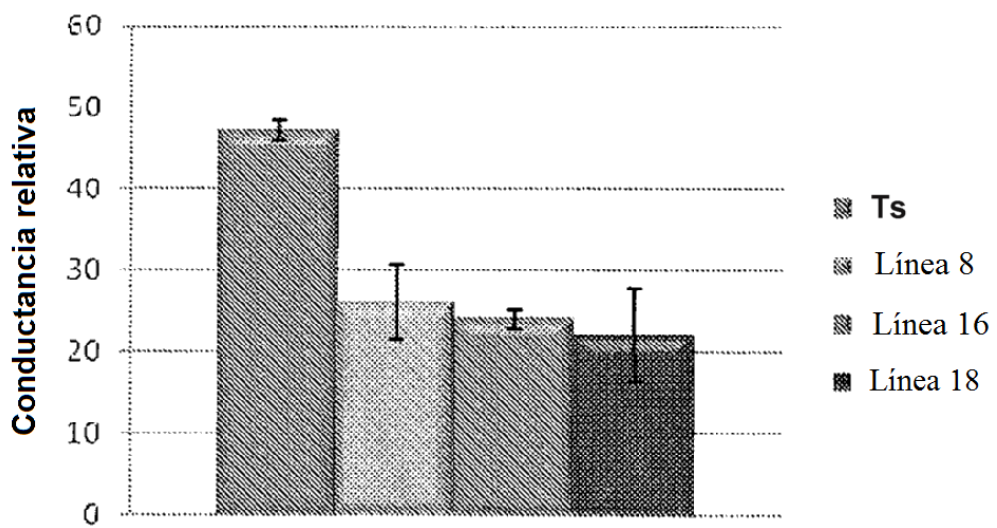


Figura 30

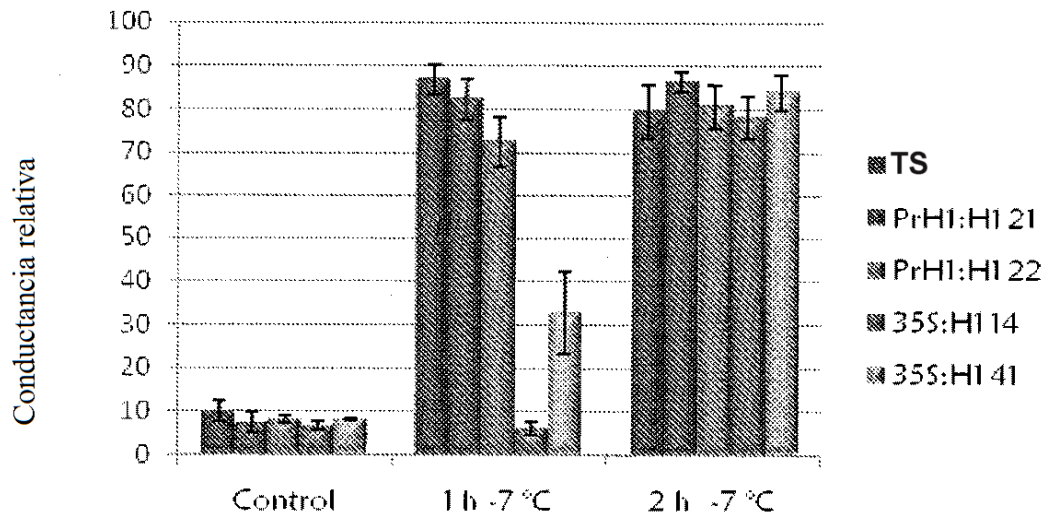


Figura 31

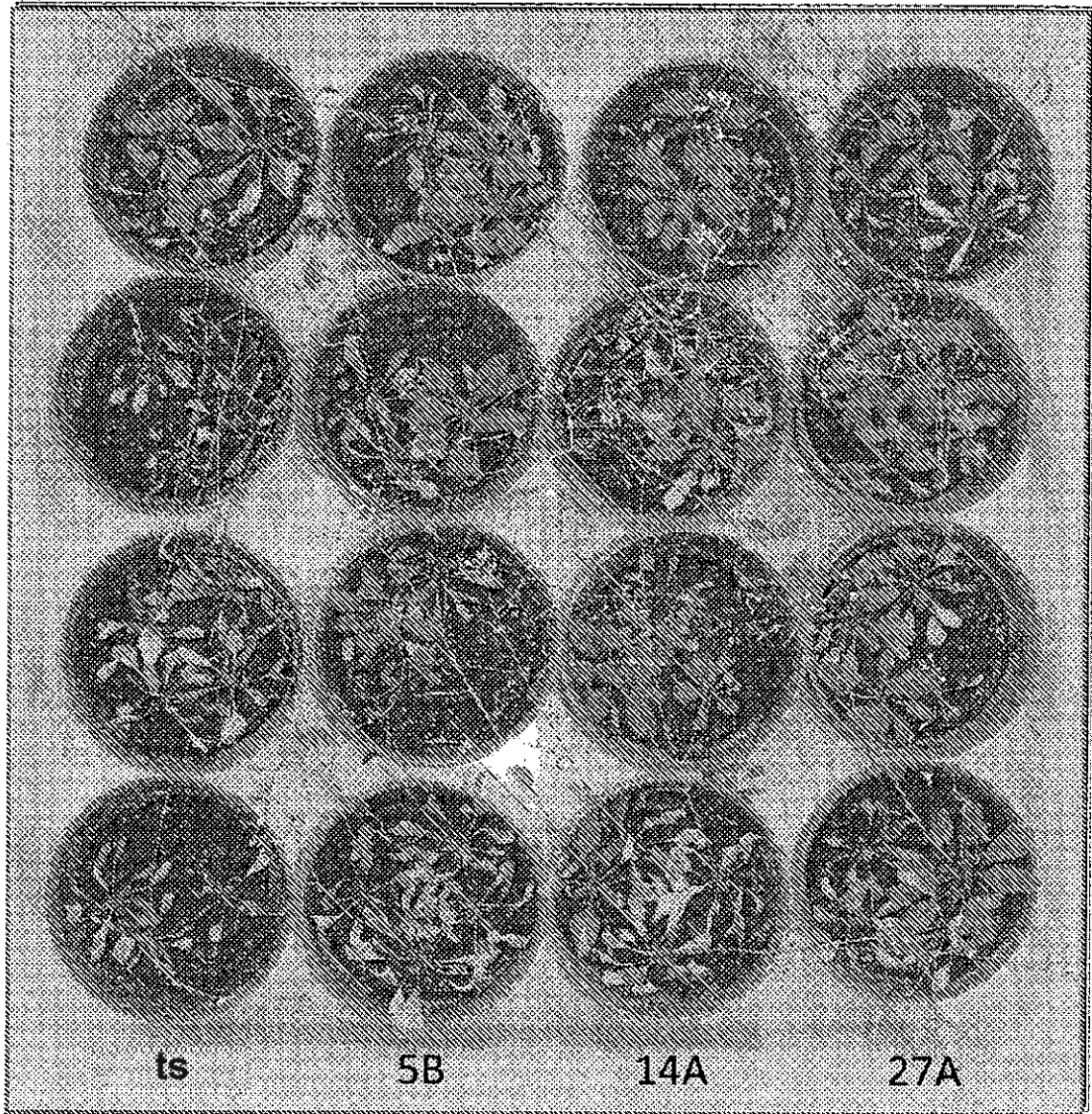


Figura 32

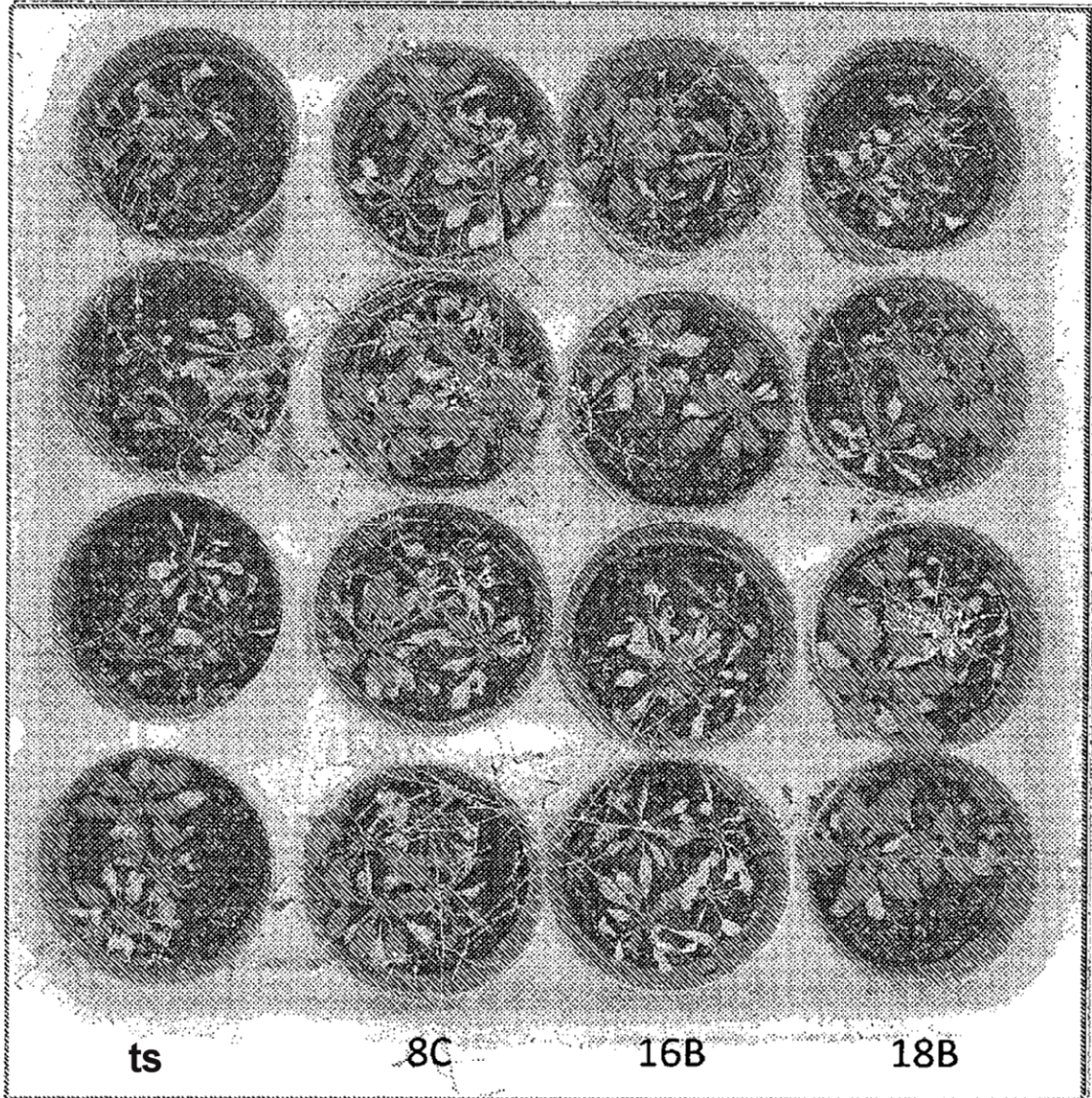


Figura 33

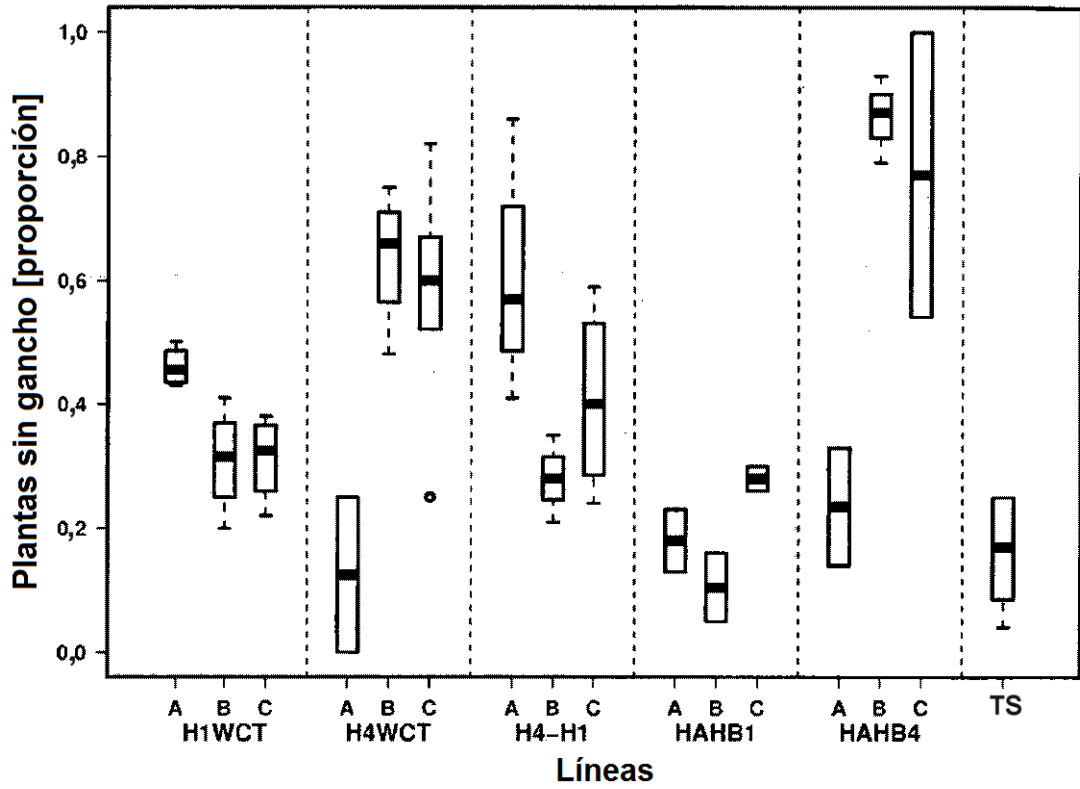


Figura 34

