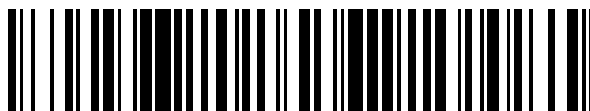


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 588**

51 Int. Cl.:

A01H 1/00 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01)
C12N 5/14 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2006 E 11155855 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 2324703**

54 Título: **Método para mejorar la eficiencia del uso de agua en plantas**

30 Prioridad:

21.03.2005 US 664035 P

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

10.07.2015

73 Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (50.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US y
TECHNION RESEARCH & DEVELOPMENT FOUNDATION (50.0%)

72 Inventor/es:

GEPSTEIN, SHIMON;
GEPSTEIN, AMIRA y
BLUMWALD, EDUARDO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 540 588 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para mejorar la eficiencia del uso de agua en plantas

Antecedentes de la invención

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

Se ha sugerido que promotores específicos de la senescencia pueden utilizarse para impulsar la expresión de genes selectos durante la senescencia. La patente U.S. 5.689.042, por ejemplo, utiliza un constructo genético que comprende un promotor específico de la senescencia, SAG12, enlazado operativamente a una secuencia de DNA codificante de isopentil-transferasa (IPT) de *Agrobacterium* que no está conectada en la naturaleza a la secuencia promotora. Las plantas transgénicas que comprenden este constructo retienen hojas verdes durante más tiempo por impulsar la expresión de IPT por medio del promotor SAG12. Es sabido que IPT aumenta el nivel de citoquinina, una clase de hormonas de plantas cuya concentración disminuye durante la senescencia y por tanto puede jugar un papel en el control de la senescencia de las hojas.

Análogamente, Gan y Amasino han demostrado que la inhibición de la senescencia de las hojas puede conseguirse por producción autorregulada de citoquinina (Gao, *et al.*, Science 270:1986-1988, 1995). Otros promotores inducibles de senescencia han sido identificados. Por ejemplo, el promotor SARK de *Phaseolus vulgaris* se describe en WO 99/29159 y Hajouj *et al.* Plant Physiol. 124:1305-1314 (2000).

Un aspecto útil y deseable de regulación interna de la expresión del gen de interés reside en la posibilidad de regular la expresión únicamente en aquellas células que sufren senescencia, dejando así las células normales inafectadas y exentas de los efectos posiblemente negativos de la superproducción de citoquinina.

Aunque se ha demostrado que el uso de la expresión controlada de IPT por SAG12 controla la senescencia de las hojas, otros fenotipos de tales plantas no están bien comprendidos. La presente invención aborda estas y otras necesidades.

Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere a un método de aumentar la eficiencia de uso del agua por una planta. Esta invención está dirigida a la preparación de plantas transgénicas que expresan una proteína implicada en la síntesis de citoquinina bajo el control de un promotor inducible por senescencia.

Los métodos de medición comprenden (a) transformar en una población de plantas una casete de expresión recombinante que comprende un promotor SARK inducible por senescencia enlazado operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína implicada en la síntesis de citoquinina; y (b) seleccionar una planta que es resistente al estrés de sequía. El paso de introducción de la casete de expresión puede realizarse utilizando cualquier método conocido. Por ejemplo, la casete expresión puede introducirse por un cruce sexual o utilizando *Agrobacterium*.

El promotor SARK se prepara convenientemente a partir de *Phaseolus vulgaris* y puede tener una secuencia al menos 95 % idéntica a SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la proteína implicada en la síntesis de citoquinina es isopentenil-transferasa (IPT) de *Agrobacterium*. Una secuencia ilustrativa de IPT es una que es al menos 95% idéntica a SEQ ID NO: 3.

La secuencia puede introducirse en cualquier planta capaz de transformación con constructos de expresión recombinantes. En esta memoria se ilustra la expresión en tabaco. Otras plantas convenientemente utilizadas en la invención incluyen céspedes de hipódromo.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra que las plantas de tabaco WT exhibían un marchitamiento progresivo de las hojas, mientras que dos linajes transgénicos independientes no exhibían síntomas de marchitamiento durante un estrés de sequía de 5 y 7 días sin agua.

Las Figuras 2A-2L muestran plantas de tabaco de 4 meses sometidas a estrés de sequía seguido por rehidratación. Tanto las plantas de tipo salvaje (Fig. 2A) como las plantas transgénicas (Figs. 2B y 2C) exhibían síntomas de

marchitamiento de las hojas al cabo de 7 días de sequía. Los síntomas de marchitamiento de las hojas se hacían más pronunciados después de 18 días de sequía, tanto en WT (Fig. 2D) como en los dos linajes transgénicos (Figs. 2E y 2F). La rehidratación de las plantas durante 7 días tenía poco efecto sobre las plantas WT marchitas (Fig. 2G), pero inducía una recuperación parcial de los linajes transgénicos (Fig. 2H y 2I) mostrando el linaje transgénico T4-24 (Fig. 2I) mejor recuperación que el linaje transgénico T2-36 (Fig. 2H). La rehidratación de las plantas durante 14 días no recuperaba las plantas WT (Fig. 2J), pero recuperaba por completo ambos linajes transgénicos (Figs. 2K y 2L).

La Figura 3 muestra el peso fresco de las plantas que se representan en Fig. 2 después de 14 días de rehidratación. Los valores son la media $\pm$ SD ($n = 40$).

La Figura 4 muestra plantas WT de *Arabidopsis* y plantas transgénicas T1 (pSARK:IPT) después de estrés de sequía y 5 días de hidratación.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Como se utilizan en esta memoria, los términos “resistencia a la sequía” o “tolerancia a la sequía” se refieren a la capacidad de una planta para recuperarse de periodos de estrés de sequía (es decir, escasez o ausencia total de agua durante un periodo de días). Típicamente, el estrés de sequía será al menos 5 días y puede ser tan largo como 18 a 20 días.

El término “eficiencia de uso del agua” se refiere a la capacidad de una planta para crecer sin prácticamente penalidad alguna de rendimiento durante periodos prolongados con menos de las cantidades normales (por regla general aproximadamente la mitad) de agua.

El término “senescencia” (al que se hace referencia también como muerte celular programada) se refiere a un proceso activo, generalmente controlado, por el cual las células y tejidos de las plantas pierden organización y función.

El término “gen asociado a la senescencia” se refiere a un gen implicado en la senescencia. La expresión de un gen de esta clase puede ser inducida (o alterada) durante el proceso de la senescencia.

Como se utiliza esta memoria, el término “promotor” incluye todas las secuencias capaces de impulsar la transcripción de una secuencia codificante en la célula de la planta. Así, los promotores utilizados en los constructos de la invención incluyen elementos de control de la transcripción con acción cis y secuencias reguladoras que están implicadas en la regulación o modulación de la temporización y/o la velocidad de transcripción de un gen. Por ejemplo, un promotor puede ser un elemento de control de la transcripción con acción cis, que incluye un intensificador, un promotor, un terminador de la transcripción, un origen de replicación, una secuencia de integración cromosómica, regiones 5' y 3' no traducidas, o una secuencia intrónica, que están implicadas en la regulación de la transcripción. Estas secuencias de acción cis interaccionan típicamente con proteínas u otras biomoléculas para llevar a cabo (activar/desactivar, regular, modular, etc.) la transcripción.

Un “promotor inducible por maduración” es un promotor que confiere especificidad temporal de una secuencia codificante enlazada operativamente tal que la expresión ocurre a la finalización de la maduración y/o durante el proceso de senescencia.

Un “promotor inducible por senescencia” es un promotor que confiere especificidad temporal de una secuencia codificante enlazada operativamente tal que la expresión ocurre durante el proceso de senescencia.

El término “planta” incluye plantas enteras, órganos/estructuras de brotes vegetativos (v.g. hojas, tallos y tubérculos), raíces, flores y órganos/estructuras florales (v.g. brácteas, sépalos, pétalos, estambres, carpelos, anteras y óvulos), semillas (con inclusión de embrión, endospermo, y cubierta de la semilla) y frutos (el ovario maduro), tejido de planta (v.g. tejido vascular, tejido subterráneo, y análogos) y células (v.g. células de protección, células huevo, tricomas y análogos), y progenie de los mismos. La clase de plantas que pueden utilizarse en el método de la invención es generalmente tan amplia como la clase de plantas superiores e inferiores tratables por técnicas de transformación, que incluyen angiospermas (plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas), gimnospermas, helechos, y algas multicelulares. La misma incluye plantas de una diversidad de niveles de ploidía, que incluyen plantas aneuploides, poliploides, diploides, haploides, y hemigigóticas.

Se dice que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son “idénticas” si la secuencia de nucleótidos o residuos de aminoácidos, respectivamente, en las dos secuencias es la misma cuando están alineadas para correspondencia máxima como se describe más adelante. El término “complementario a” se utiliza aquí para significar que la secuencia es complementaria a la totalidad o una porción de una secuencia de polinucleótido de referencia.

La alineación óptima de secuencias para comparación puede realizarse por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Add. APL. Math. 2:482 (1981), algoritmo de alineación de homología de Needleman y

Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970), por el método de búsqueda de semejanza de Pearson y Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 10 2444 (1988), por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección.

- 5 El "porcentaje de identidad de secuencia" se determina por comparación de dos secuencias óptimamente alineadas en una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, lagunas) comparada con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula por determinación del número de posiciones en las cuales el residuo de bases de ácido nucleico o aminoácidos idénticos ocurre en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, división del número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicación del resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

- 15 El término "identidad sustancial" de secuencias de polinucleótidos significa que un polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos 70% de identidad de secuencia, al menos 80% de identidad de secuencia, al menos 85%, 90%, 93%, 95%, o 97% comparada con una secuencia de referencia utilizando los programas descritos en esta memoria; preferiblemente BLAST utilizando parámetros estándar, como se describe más adelante. Un experto reconocerá que estos valores pueden ajustarse adecuadamente para determinar la identidad correspondiente de las proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degeneración de los codones, la semejanza de aminoácidos, el posicionamiento del marco de lectura y factores análogos. Identidad sustancial de secuencias de aminoácidos para estos propósitos significa normalmente una identidad de secuencia de al menos 40%, 60%, 70%, 80%, 90%, 25% o 97% comparada con una secuencia de referencia utilizando los programas descritos en esta memoria. Los polipéptidos que son "sustancialmente similares" comparten secuencias como se ha indicado arriba, excepto que las posiciones de los residuos que no son idénticos pueden diferir por cambios de aminoácidos conservadores. Las sustituciones de aminoácidos conservadores se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifático-hidroxilo es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina, y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Grupos de sustitución de aminoácidos conservadores preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, ácido aspártico-ácido glutámico, y asparagina-glutamina.

- 35 Otra indicación de que secuencias de nucleótidos son sustancialmente idénticas es si dos moléculas se hibridan una a otra, o a un tercer ácido nucleico, en condiciones severas. Las condiciones severas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Por regla general, las condiciones severas se seleccionan de modo que sean aproximadamente 5°C más bajas que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una concentración iónica y pH definidos. El valor T_m es la temperatura (a concentración iónica y pH definidos) a la cual el 50% de la secuencia diana se hibrida a una sonda perfectamente coincidente. Típicamente, condiciones severas serán aquellas en las cuales la concentración de sales es aproximadamente 0,02 molar a pH 7 y la temperatura es al menos aproximadamente 60°C.

Para los propósitos de esta descripción, condiciones severas para las hibridaciones son aquellas que incluyen al menos un lavado en 0,2 X SSC a 63 °C durante 20 minutos, o condiciones equivalentes. Condiciones moderadamente severas incluyen al menos un lavado (usualmente 2) en 0,2 X SSC a una temperatura de al menos aproximadamente 50 °C, típicamente aproximadamente 55 °C, durante 20 minutos, o condiciones equivalentes.

- 45 El término "casete de expresión" se refiere a cualquier sistema de expresión recombinante para el propósito de expresar una secuencia de ácido nucleico de la invención in vitro o in vivo, constitutiva o induciblemente, en cualquier célula, que incluye, además de células de plantas, células procariotas, de levadura, fúngicas, de insecto o de mamífero. El término incluye sistemas de expresión lineales o circulares. El término incluye todos los vectores. Las casetes pueden mantenerse episódicas o integrarse en el genoma de células del hospedador. Las casetes de expresión pueden tener la posibilidad de autorreplicarse o no, es decir, impulsar sólo la expresión transitoria en una célula. El término incluye casetes de expresión recombinantes que contienen únicamente los elementos mínimos necesarios para la transcripción del ácido nucleico recombinante.

Preparación de Casetes de Expresión

- 55 Las casetes de expresión de la invención comprenden promotores inducibles de senescencia. A continuación se ilustra el promotor SARK de *Phaseolus vulgaris*. El promotor se describe en WO 99/29159 y en Hajouj *et al.*, *Plant Physiol.* 124:1305-1314 (2000). Otros promotores adecuados incluyen el promotor SAG12 de *Arabidopsis* como se describe en Gan *et al.*, *Science*, 270:1986-8 (1995). Un experto reconocerá el promotor particular utilizado en los constructos de la invención, siempre que la expresión sea inducida por senescencia. Así, por ejemplo, los promotores procedentes de homólogos de los genes SARK o SAG12 de otras especies pueden utilizarse convenientemente en las casetes de expresión de la invención.

Los promotores se utilizan para impulsar la expresión de un gen que codifica una proteína que inhibe o ralentiza el proceso de senescencia. En algunas realizaciones preferidas, el gen codifica una proteína implicada en la síntesis de citoquinina. Por ejemplo, la isopentenil-transferasa (IPT) cataliza la síntesis de citoquinina. Ejemplos de secuencias IPT se presentan en: Crespi *et al.*, *EMBO J.* 11:795-804 (1992); Goldberg *et al.*, *Nucleic Acids. Res.* 12:4665-4677 (1984); Heide Kamp *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 11:6211-6223 (1983); Strabala *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 216:388-394 (1989) Número de Acceso a GenBank: NC_003308, así como X14410 (véase SEQ ID NOs: 2 y 3).

Producción de plantas transgénicas

Los constructos de DNA pueden introducirse en el genoma del hospedador de la planta deseada por una diversidad de técnicas convencionales. Por ejemplo, el constructo de DNA puede introducirse directamente en el DNA genómico de la célula de la planta utilizando técnicas tales como electroporación y microinyección de protoplastos de células de la planta, o los constructos de DNA pueden introducirse directamente en el tejido de la planta utilizando métodos balísticos, tales como bombardeo con partículas de DNA. Alternativamente, los constructos de DNA pueden combinarse con regiones flanqueantes de T-DNA adecuadas e introducirse en un vector hospedador de *Agrobacterium tumefaciens* convencional. Las funciones de virulencia del hospedador de *Agrobacterium tumefaciens* dirigirán la inserción del constructo y el marcador adyacente en el DNA de la célula de la planta cuando la célula está infectada por las bacterias.

Los métodos de microinyección son conocidos en la técnica y están bien descritos en la literatura científica y de patentes. La introducción de constructos de DNA utilizando precipitación con polietilenglicol se describe en Paszkowski *et al. Embo. J* 3:2717-2722 (1984). Las técnicas de electroporación se describen en Fromm *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5824 (1985). Los métodos de transformación balísticos se describen en Klein *et al. Nature* 327:70-73 (1987).

Las técnicas de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, con inclusión de desactivación y utilización de vectores binarios están bien descritas en la literatura científica. Véase, por ejemplo, Horsch *et al. Science* 233:496-498 (1984), y Fraley *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803 (1983).

Células de plantas transformadas que se derivan por cualquiera de las técnicas de transformación anteriores pueden cultivarse para regenerar una planta entera que posee el genotipo transformado y por tanto el fenotipo deseado, tal como carencia de semillas. Tales técnicas de regeneración están basadas en la manipulación de ciertas fitohormonas en un medio de crecimiento de cultivo de tejidos, que se basa típicamente en un marcador biocida y/o herbicida que se ha introducido junto con las secuencias de nucleótidos deseadas. La regeneración de plantas a partir de protoplastos cultivados se describe en Evans *et al.*, *Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture*, pp. 124-176, MacMillan Publishing Company, Nueva York, 1983; y Binding, *Regeneration of Plants, Plant Protoplasts*, pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985. La regeneración puede obtenerse también a partir de callos de planta, explantes, órganos, o partes de los mismos. Dichas técnicas de regeneración se describen generalmente en Klee *et al. Ann. Rev. of Plant Phys.* 38:467-486 (1987).

Una persona con experiencia reconocerá que, después que la casete de expresión se incorpora de manera estable en plantas transgénicas y se confirma que es operativa, la misma puede introducirse en otras plantas por cruzamiento sexual. Pueden utilizarse cualquiera de numerosas técnicas estándar de reproducción, dependiendo de la especie a cruzar.

Pueden utilizarse casetes de expresión para conferir resistencia a la sequía esencialmente a cualquier planta. Así, la invención es utilizable en una amplia gama de plantas, que incluyen especies de los géneros *Asparagus*, *Atropa*, *Avena*, *Brassica*, *Citrus*, *Citrullus*, *Capsicum*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Daucus*, *Fragaria*, *Glycine*, *Gossypium*, *Helianthus*, *Heterocallis*, *Hordeum*, *Hyoscyamus*, *Lactuca*, *Linum*, *Lolium*, *Lycopersicon*, *Malus*, *Manihot*, *Majorana*, *Medicago*, *Nicotiana*, *Oryza*, *Panicum*, *Pannasetum*, *Persea*, *Pisum*, *Pyrus*, *Prunus*, *Raphanus*, *Secale*, *Senecio*, *Sinapis*, *Solanum*, *Sorghum*, *Trigonella*, *Triticum*, *Vitis*, *Vigna* y *Zea*.

Los métodos de la descripción se utilizan para conferir resistencia a la sequía a céspedes de hipódromo. Numerosos céspedes de hipódromo son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden utilizarse festuca, *Festuca spp.* (v.g., *F.* la grama azul de Kentucky *Poa pratensis* y la enredadera rizada *Agrostis palustris*).

Los expertos reconocerán que pueden utilizarse numerosas especies de plantas pueden utilizarse como modelos para predecir los efectos fenotípicos de la expresión de transgenes en otras plantas. Por ejemplo, está plenamente reconocido que tanto plantas de tabaco (*Nicotiana*) como de *Arabidopsis* son modelos útiles de expresión de transgenes, particularmente en otras dicotiledóneas.

La resistencia a la sequía puede ensayarse conforme a cualquiera de varias técnicas bien conocidas. Por ejemplo, pueden cultivarse plantas en condiciones en las cuales se proporciona a la planta una cantidad subóptima de agua. La resistencia a la sequía puede determinarse por cualquiera de numerosas medidas estándar que incluyen presión de turgencia, crecimiento, producción y análogas. En algunas realizaciones, pueden utilizarse convenientemente los métodos descritos a continuación en la sección de Ejemplos.

Ejemplos

Identificación del gen SARK (quinasa receptora asociada a la senescencia)

El cDNA del gen SARK se aisló de *Phaseolus vulgaris* por una técnica de presentación diferencial como se describe en Hajouj *et al.* (2000). La secuencia del cDNA de longitud total de SARK reveló que el mismo codifica una proteína-quinasa serina/treonina. Se observó un dominio transmembranal hidrófobo que sugería que el gen SARK codifica una quinasa receptora (Hajouj *et al.* 2000). El análisis por transferencia Northern reveló la regulación ascendente del gen SARK durante las primeras etapas de la senescencia de las hojas. La iniciación de la expresión del gen SARK precedía a cualquier signo visual (amarilleo) de la senescencia, de las hojas de judía unidas. Cuando se incubaron en la oscuridad, los discos de hoja exhibían un amarilleo acelerado.

Análogamente a las hojas asociadas intactas, los niveles de transcritos del gen SARK aumentaban al comienzo del proceso de senescencia antes de cualquier amarilleo visual de la hoja (Hajouj *et al.* (2000)). Así, el gen SARK puede definirse como un gen asociado a la senescencia (SAG). Además, el aspecto de los transcritos de SARK en las etapas muy tempranas de la senescencia, tanto en las hojas unidas como en las hojas desprendidas, sugiere un papel regulador en el proceso de senescencia. Se produjeron y utilizaron anticuerpos generados contra la proteína SARK para análisis por transferencia Western. El patrón temporal de los niveles de la proteína SARK se asemejaba al del RNA y soportaba adicionalmente la noción de que la proteína SARK está asociada con los procesos de senescencia de las hojas desprendidas y unidas.

Aislamiento del promotor SARK

La región de aguas arriba del extremo 5' del gen SARK se aisló por el método de la PCR inversa como ha sido descrito por Maniatis *et al.* (Molecular Cloning, a Laboratory manual, 2ª edición. Se aisló DNA genómico de judía por un kit de extracción de DNA de plantas (Scotlab) conforme a las instrucciones del fabricante. Se digirió el DNA con la enzima de restricción XbaI y se recirculó por relegación. Se utilizaron para la reacción PCR los cebadores siguientes.

1) 5' ACGTCCAACCAAGACC 3'

2) 5' TCTGCAGCTAGTGCGATATCC 3'

La reacción PCR se realizó en las condiciones siguientes: 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C, 2 min a 72 °C durante 40 ciclos y finalmente 10 min a 720 °C.

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

Para aislar un fragmento más largo aguas arriba de la región 5' del gen SARK, se realizó una técnica PCR térmica asimétrica entrelazada (TAIL) como ha sido descrito por Liu *et al.* (Plant J. 8:457-463). Se utilizaron 3 cebadores PCR:

1) 5'TCTGCAGCTAGTGCGATATCC 3'

2) 5' TTGGTGGATGAATAATGGAG 3'

3) 5' ACTGTAAC TCACAAATTAGA 3'

Se realizaron tres reacciones PCR para amplificar las secuencias diana.

Se secuenciaron los productos PCR. Se identificaron aproximadamente 800 pb del extremo 5' del cDNA, y se muestran en SEQ ID NO: 1. El fragmento PCR se clonó en pUC57.

Creación de plantas transgénicas que llevan el constructo pSARK:IPT

La IPT (isopentenil-transferasa) de *Agrobacterium*, la enzima que cataliza el paso limitante de la velocidad en la biosíntesis de las citoquininas, se fusionó al promotor SARK. Gan y Amasino (Science 270; 1996 (1995) han demostrado que el promotor del gen SAG12 de *Arabidopsis* (gen asociado a la senescencia), cuando se enlazaba al gen IPT, inducía la síntesis de citoquininas y retardaba el proceso de senescencia de las hojas. La IPT de *Agrobacterium* se enlazó operativamente al promotor de 830 nucleótidos de longitud del gen SARK y se introdujo como un fragmento HinIII/XbaI en pBI101 (ClonTech) para crear el pBI p-SARK:IPT. La transformación en *Agrobacterium* se realizó por electroporación.

Transformación de tabaco

Se transformaron plantas por el método de transformación mediada por *Agrobacterium*. La expresión del gen de isopentenil-transferasa (IPT) de *Agrobacterium* bajo la regulación del promotor SARK causada una senescencia

retardada de las hojas de tabaco. El tabaco transgénico que contiene el p-SARK-IPT ha demostrado un retardo considerable en la senescencia regular tanto de las hojas individuales como de las plantas enteras. Las plantas WT florecen usualmente 3 a 3,5 meses después de la germinación y comienzan a exhibir amarilleo de las primeras hojas (en el fondo) después de 4 meses. En cambio, las plantas transgénicas presentaban una senescencia significativamente retardada y no exhibían amarilleo alguno de las primeras hojas hasta 10 meses después de la germinación.

Las hojas desprendidas del tabaco transgénico exhibían también un retardo significativo del amarilleo cuando se incuban en condiciones oscuras. Normalmente, las hojas de tabaco desprendidas presentan amarilleo inicial al cabo de 5-6 días de incubación en la oscuridad y completan su amarilleo después de 10-12 días. En cambio, las hojas desprendidas de las plantas transgénicas no exhibían signo alguno de amarilleo durante 20 días e incluso después de 30 días de incubación en la oscuridad estaban todavía verdes, aunque se observaba amarilleo inicial. Estos resultados demostraron que, además de las hojas unidas, el mecanismo autorregulador de la síntesis de citoquininas en las hojas desprendidas de las plantas transgénicas era también funcional.

Transformación de *Arabidopsis*

La amplificación PCR del pSARK:IPT se realizó utilizando los cebadores siguientes con la turbo DNA-polimerasa Pfu (Stratagene).

```
SARKIPF      5' T T C C T T A G A T G C T G T C A C A A T C A   3'
SARKIPTR     5' G A A C A T C T T A T C C A G A T G A A G A C A G 3'
```

El molde para la amplificación PCR era el DNA de tabaco transgénico que contenía el pSARK:IPT.

El producto PCR (pSARK:IPT) se clonó con el kit de clonación TOPO en células competentes Topo (DH5 α -T1) conforme a las instrucciones del fabricante (Invitrogen).

Se realizaron minipreps de DNA plasmídico con el kit Qiaprep (Qiagen).

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

La electroporación del vector Cambia que llevaba el pSARK:IPT se realizó en células competentes (DH5 α). La miniprep de DNA plasmídico de las colonias DH5 α transfectadas se llevó a cabo con el kit Qiaprep (Qiagen). El vector Cambia, que contenía el pSARK:IPT se introdujo por electroforesis en *Agrobacterium* para transformación de plantas. Plantas de *Arabidopsis thaliana* se transformaron por la técnica de infiltración a vacío con *Agrobacterium tumefaciens* que contenía el pSARK: IPT y el gen de resistencia a higromicina (gen *hptII*) para selección en plantas.

La expresión de isopentil-transferasa (IPT) bajo la regulación del promotor del gen SARK en plantas de tabaco confiere resistencia a la sequía

Plantas transgénicas de tabaco que llevaban el pSARK: IPT se han cultivado en invernadero durante 2-3 meses. No pudieron visualizarse diferencias morfológicas de ningún tipo entre las plantas transgénicas y las plantas WT durante los primeros 3-4 meses.

Después del comienzo de la floración, las plantas de tabaco de 3 meses de edad se sometieron a estrés de sequía (no se añadió cantidad alguna de agua a los tiestos) durante 5-16 días. Las plantas WT exhibían un marchitamiento progresivo de las hojas (Fig. 1). En cambio, las plantas transgénicas (dos linajes independientes) no exhibían síntoma alguno de marchitamiento (Fig. 1) durante un estrés de sequía de 5 y 7 días sin agua. Periodos de deshidratación de 16 días de duración causaban un marchitamiento irreversible severo las plantas WT y marchitamiento menos severo, y reversible, en las plantas que llevaban el pSARK:IPT. La rehidratación (renovación del riego de las plantas deshidratadas) causaba la recuperación de las plantas transgénicas pSARK:IPT, mientras que las plantas WT no pudieron recuperarse (Fig. 1) del estrés de sequía.

Plantas de tipo salvaje (WT) y dos linajes transgénicos de plantas de tabaco que llevaban el p SARK-IPT (T2-36 y T4-24) se cultivaron en el invernadero durante 5 meses. No pudieron observarse diferencias morfológicas de ningún tipo entre las plantas transgénicas y las de tipo salvaje durante los primeros 34 meses de cultivo en condiciones óptimas. Después del comienzo de la floración, plantas de tabaco de 4 meses se sometieron a estrés de sequía (no se añadió agua alguna a los tiestos) durante un periodo de 18 días consecutivos (Fig. 2, A-F). Tanto las plantas de tipo salvaje (Fig. 2A) como las plantas transgénicas (Figs. 2B y 2C) exhibían síntomas de amarilleo de las hojas después de 7 días de sequía. Los síntomas de marchitamiento de las hojas se hicieron más pronunciados después de 18 días de sequía, tanto en las plantas WT (Fig. 2D) como en los dos linajes transgénicos (Figs. 2E y 2F). La rehidratación de las plantas durante 7 días tuvo poco efecto sobre las plantas WT marchitas (Fig. 2G), pero inducía recuperación parcial de los linajes transgénicos (Figs. 2H y 2I), mostrando el linaje transgénico T4-24 (Fig. 2I) mejor recuperación que el linaje transgénico T2-36 (Fig. 2H). La rehidratación de las plantas durante 14 días no recuperó las plantas WT (Fig. 2J), pero recuperó por

completo ambos linajes transgénicos (Figs. 2K y 2L). Las medidas del peso fresco de las plantas de tipo salvaje y transgénicas a finales del periodo de rehidratación demostraron que los linajes transgénicos alcanzaban un peso fresco de ~250 gramos/planta, mientras que el tipo salvaje seguía seco, con un peso que no excedía del 20% del correspondiente a los linajes transgénicos (Fig. 2). La Figura 3 muestra el peso fresco de las plantas representadas en Fig. 2 después de 14 días de rehidratación. Los valores son la media $\pm$ SD (n = 40).

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

Se cultivaron plantas de *Arabidopsis thaliana* bajo un régimen de día largo (16/8 horas) a 23 °C. No pudieron distinguirse diferencias morfológicas y de desarrollo de ningún tipo entre las plantas WT y las plantas transgénicas (pSARK:IPT) cultivadas en condiciones normales. En cambio, cuando se sometieron plantas de dos meses (en la etapa de floración avanzada) a estrés de sequía (sin adición alguna de agua a los tiestos) exhibían resistencia diferencial al estrés. Las plantas WT sufrieron marchitamiento severo irreversible y amarilleo de las hojas después de 12 días de deshidratación, mientras que 10 linajes independientes diferentes de las plantas transgénicas T1 (pSARK:IPT) exhibían amarilleo moderado y se recuperaban del estrés de sequía después de 5 días de rehidratación (Fig. 4).

SEQ ID NO: 1

TTCTTCCTTAGATGCTGTCACAATCATTTTTATTATTTTATATTTGGTTTTACTGC
ACAAGTGACATAATGAGTGCTGAATTGTGGTATTGTGGGAACCTTAAGCAATAGT
TTCATTAGACCACTTGTGCAGGTTTTTGGGGTGGTAGAAGGAATGCTCGTTGTCT
CTGAATGAGTTCTATTTTCATCTTTAGAACTAGTAATTTAGTTAGTTTGGGTCT
CGTGGTTCTACAGAGGGTTGAGATACTTTTGAAGTATCTCTCTTTTATTATATTAT
ACTTTTGTCTGATAAAAAAAGGTAGGTAGTTTTTTTTTGGGAATATTTGTAGGATTT
TGTGGAGGTGTTTGGTATAAGGATTGAAATATTTCAAAAATATTTCCATTTAATTT
ACTTTTCTTATAAAAAAAATCCTCCATGAAACAAGATCATCTTCTAGAAACAAC
AAGTAATATATTAGAATCTCTTTCTGAATTTTCTCATTTGTGAGTTATAGTACTTT
TTTTCCAATAATAATTATAAGTGGTAAGATGTGTGGTGTGGAAGTTGGAAGGAA
AGAAGGAAAGAAAGGTAGTTTTTGTATTGTATTGAAAGTAAGTCAAGGTCATT
GGCTTAGGGTTCTACCACTGCAACTATTCCACATTGGCTTCTACCACTGCAATTAT
TCCACATTGGCTTGTACTGTAAGGACAAACCTTGGCATGTCAAATACTTTTCATC
ACATATAACCATATTATAAACTACTTTCCATCTCCATTATTCATCCACCAAAATCT
AGAGTCACTGAGAGTGACAGATAACACAATTCTCTAATATAAAAATCAGTTTGTAT
TCAATATACTGCAAAAAAATTATGGACCTGCATCTAATTTTCGGTCCAACCTTGCA
CAGGAAAGACGACGACCGCGATAGCTCTTGCCCAGCAGACAGGGCTTCCAGTCC
TTTCGCTTGATCGGGTCCAATGCTGTCCTCAACTATCAACCGGAAGCGGACGACC
AACAGTGGAAGAAGTGAAGGAACGACGCGTCTCTACCTTGATGATCGGCCTCT
GGTGGAGGGTATCATCGCAGCCAAGCAAGCTCATCATAGGCTGATCGAGGAGGT
GTATAATCATGAGGCCAACGGCGGGCTTATTCTTGAGGGAGGATCCACCTCGTTG
CTCAACTGCATGGCGCGAAACAGCTATTGGAGTGCAGATTTTCGTTGGCATATTA
TTCGCCACAAGTTACCCGACCAAGAGACCTTCATGAAAGCGGCCAAGGCCAGAG
TTAAGCAGATGTTGCACCCCGCTGCAGGCCATTCTATTATTCAAGAGTTGGTTTA
TCTTTGGAATGAACCTCGGCTGAGGCCATTCTGAAAGAGATCGATGGATATCGA
TATGCCATGTTGTTTGCTAGCCAGAACCAGATCACGGCAGATATGCTATTGCAGC
TTGACGCAAATATGGAAGGTAAGTTGATTAATGGGATCGCTCAGGAGTATTTTCAT
CCATGCGCGCCAACAGGAACAGAAATTCCCCCAAGTTAACGCAGCCGCTTTCGA
CGGATTCGAAGGTCATCCGTTGGAATGTATTAGGTTACGCCAGCCCTGCGTCGC
ACCTGTCTTCATCTGGATAAGATGTTTCAGATC

SEQ ID NO: 2

```

1  ggatcccggtt  acaagtattg  cacgttttgt  aaattgcata  ttaatgcaat  ctggatgttt
61  aataacgaat  gtaatggcgt  agaaatatgt  attttattgt  atttatcttt  cactatgttg
121  aagtttgcaa  taatatgcta  atgtaaaatt  aaaaaattat  gtactgccgc  atttgttcaa
181  atggcgccgt  tatttcaaaa  atatctttga  ttttgttacg  aggacaacga  ctgcaggaag
241  taaataaaaag  acgctgttgt  taagaaattg  ctatcatatg  tgcccagcta  tagggccatt
301  taagttcaat  tgtgaaatag  ccgcccttat  tttgacgtct  catcaaatca  aatattaaaa
361  aatatctcac  tctgtcgcca  gcaatgatgt  aataaccgca  gaaaagtga  agtaaatcgc
421  ggaaaaacgt  cgccgagtg  catgaatagc  ggcttcgta  ttgctgattt  agtcagcttt
481  atttgactta  agggtgccct  cgttagtga  aaattgcttt  caaggagaca  gccatgcccc
541  acactttgtt  gaaaaacaag  ttgccttttg  ggaagaacct  aaagccactt  gctcttcaag
601  gaggaatatc  gaggaagaga  atataacagc  ctctggtaca  gacttctctt  gtgcaaaaat
661  caattttgat  tcaacatata  gcaagaccga  tggatctacg  tctaattttc  ggtccaactt
721  gcacaggaaa  gacatcgact  gcgatagctc  ttgccagca  gactggcctc  ccagtcctct
781  cgctcgatcg  cgtccaatgc  tgtcctcaac  tatcaaccgg  aagcggcgca  ccaacagtgg
841  aagaactgaa  aggaacgact  cgtctgtacc  ttgatgatcg  ccctttggta  aagggtatca
901  ttacagccaa  gcaagctcat  gaacggctca  ttgcggaggt  gcacaatcac  gaggccaaag
961  gcgggcttat  tcttgaggga  ggatctatct  cgttgctcag  gtgcatggcg  caaagtcgtt
1021  attggaacgc  ggattttcgt  tggcatatta  ttcgcaacga  gttagcagac  gaggagagct
1081  tcatgagcgt  ggccaagacc  agagttaagc  agatgttacg  cccctctgca  ggtctttcta
1141  ttatccaaga  gttggttcaa  ctttgagggg  agcctcggct  gaggccata  ctggaaggga
1201  tcgatggata  tcgatatgcc  ctgctatttg  ctaccagaa  ccagatcacg  cccgatatgc
1261  tattgcagct  cgacgcagat  atggagaata  aattgattca  cggtatcgct  caggagtctc
1321  taatccatgc  gcgtcgacag  gaacagaaat  tccctttgg  gggcgcgaca  gctgtcgaag
1381  cgtttgaagg  accaccattt  cgaatgtgat  agattgcacc  agttttgttt  cagacttgtc
1441  gctatttgaa  taagatgttc  gttctttgtt  gtgttggtgt  gttgtgatag  aggcaagtgg
1501  tttgaaactt  gtttttactg  gtttattttc  agtctcttgg  acgatgtttt  acaaataata
1561  tattgtgaaa  attgtggttt  tatattcgta  gaacgaaata  aatggttaagt  atagccgtta
1621  tcaaaaattta  gcaaaaattg  ttaaagggtc  ttttatgcgg  tgaggttgct  gacttttcat
1681  cattgtcgcg  taaggagtta  cggatatcca  taactgtaaa  aacgccgcag  aatttacggg
1741  tgggtgcattt  agtttgccgt  tcaacatgat  tttggcaata  gttggttaacc  aagcactagc
1801  caaccgttcg  ataactactt  aatcgatgga  accgttcagc  tttccttcgt  gaggtgctc
1861  ttgatgatga  gctgccgtct  agtttttata  acgccgggtt  acgcattata  gacaagctt

```

SEQ ID NO: 3

```

MDLRLIFGPTCTGKTSTAIALAQQTG L PVL SLDRVQCCPQLSTGSGRPTVEELKGTTRLYLDDRPLVKGIITAKQ
AHERLIAEVHNHEAKGGLILEGGISLLRCMAQSRYNADFRWHIIRNELADEESFMSVAKTRVKQMLRPSAGLS
IIQELVQLWREPRLRPILLEGIDGYRYALLFATQNQITPDMLLQLDADMENKLIHGIAQEFLIHARRQEQKFPLVG
ATAVEAFEGPPFRM

```

Listado de secuencias

<110> The Regents of the University of California

5 <120> Drought-Resistant Plants

<130> N.102688A

<140>

10 <141> 2006-03-21

<150> US 60/664,035

<151> 2005-03-21

15 <160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20 <211> 1631

<212> DNA

<213> Phaseolus vulgaris

<220>

25 <223> promotor de proteína quinasa de tipo receptor asociada a senescencia (SARK), región 5' del gen SARK

<400> 1

```

ttcttcctta gatgctgtca caatcatttt cattattttt atatttggtt ttactgcaca 60
agtgcataa tgagtgtga attgtggtat tgtgggaacc ttaagcaata gtttcattag 120
accacttgtg cagggttttg gggtagtaga aggaatgctc gttgtctctg aatgagttct 180
attttcatct ttgaaacta gtaatttagt tagttttggg tctcgtggtt ctacagaggg 240
ttgagatact ttgaagtat ctctctttta ttatattata ctttttgctg ataaaaaag 300
gtaggtagtt ttttttgga tattttgtag gattttgtgg aggtgtttgg tataaggatt 360
gaaatatttc aaaaatattt ccatttaatt tactttttct tataaaaaaa atcctccatg 420
aaacaagatc atcttctaga aacaacaagt aatatattag aatctctttc tgaattttct 480
catttgtgag ttatagtact ttttttccaa taataattat aagtggtaag atgtgtggtt 540
gtggaagttg gaaggaaaga aggaaagaaa ggtagtttt tgttttgtat ttgaaagtaa 600
gtcaagggtca ttggcttagg gttctaccac tgcaactatt ccacattggc ttctaccact 660
gcaattattc cacattggct tgtactgtaa ggacaaacct tggcatgtca aatacttttc 720
atcacatata accatattat aaactacttt ccatctccat tattcatcca ccaaaatcta 780
gagtcactga gagtgcagat aacacaattc tctaataata aaatcagttt gtattcaata 840
tactgcataa aacttatgga cctgcatcta attttcggtc caacttgcac aggaaagacg 900
acgaccgcga tagctcttgc ccagcagaca gggcttccag tcctttcgct tgatcgggtc 960
caatgctgtc ctcaactatc aaccggaagc ggacgaccaa cagtggaaga actgaaagga 1020
acgacgcgtc tctaccttga tgatcggcct ctgggtgagg gtatcatcgc agccaagcaa 1080
gctcatcata ggctgatcga ggaggtgtat aatcatgagg ccaacggcgg gcttattctt 1140
gagggaggat ccacctcgtt gctcaactgc atggcgcgaa acagctattg gagtgcagat 1200
tttcgttggc atattattcg ccacaagtta cccgaccaag agaccttcac gaaagcggcc 1260
aaggccagag ttaagcagat gttgcacccc gctgcaggcc attctattat tcaagagttg 1320
gtttatcttt ggaatgaacc tcggctgagg ccatttctga aagagatcga tggatatcga 1380
tatgccatgt tgtttgctag ccagaaccag atcacggcag atatgctatt gcagcttgac 1440
gcaaatatgg aaggtaaagt gattaatggg atcgtcagg agtatttcat ccatgcgcgc 1500
caacaggaac agaaattccc ccaagttaac gcagccgctt tcgacggatt cgaagggtcat 1560
ccgttcggaa tgtattaggt tacgccagcc ctgcgtcgca cctgtcttca tctggataag 1620
atgttcagat c                                     1631

```

30

<210> 2

<211> 1919

<212> DNA

<213> Agrobacterium tumefaciens

35

<220>

<223> isopenitenil transferasa (IPT) del plásmido Ti Bo542

<220>

40 <221> CDS

<222> (690)..(1409)

ES 2 540 588 T3

<223> IPT

<400> 2

```

ggatcccggtt acaagtattg cacgttttgt aaattgcata ttaatgcaat ctggatgttt 60
aataacgaat gtaatggcgt agaaatatgt attttattgt atttatcttt cactatgttg 120
aagtttgcaa taatatgcta atgtaaaatt aaaaaattat gtactgccgc atttgttcaa 180
atggcgccgt tatttcaaaa atatctttga ttttgttacg aggacaacga ctgcaggaag 240
taaataaaaag acgctgttgt taagaaattg ctatcatatg tgcccagcta tagggccatt 300
taagttcaat tgtgaaatag ccgcccttat tttgacgtct catcaaatca aatattaaaa 360
aatatctcac tctgtcgcca gcaatgatgt aataaccgca gaaaagtgag agtaaatcgc 420
ggaaaaacgt cgccgagtgg catgaatagc ggccctccgta ttgctgattt agtcagcttt 480
atttgactta aggggtccct cgttagtgac aaattgcttt caaggagaca gccatgcccc 540
acactttggt gaaaaacaag ttgccttttg ggaagaacct aaagccactt gctcttcaag 600
gaggaatata gaggaagaga atataacagc ctctggtaca gacttctctt gtgcaaaaat 660
caatttgatat tcaacatata gcaagaccg atg gat cta cgt cta att ttc ggt 713
                               Met Asp Leu Arg Leu Ile Phe Gly
                               1                               5

cca act tgc aca gga aag aca tcg act gcg ata gct ctt gcc cag cag 761
Pro Thr Cys Thr Gly Lys Thr Ser Thr Ala Ile Ala Leu Ala Gln Gln
    10                               15                               20

act ggc ctc cca gtc ctc tcg ctc gat cgc gtc caa tgc tgt cct caa 809
Thr Gly Leu Pro Val Leu Ser Leu Asp Arg Val Gln Cys Cys Pro Gln
    25                               30                               35                               40

cta tca acc gga agc ggg cga cca aca gtg gaa gaa ctg aaa gga acg 857
Leu Ser Thr Gly Ser Gly Arg Pro Thr Val Glu Glu Leu Lys Gly Thr
                               45                               50                               55

act cgt ctg tac ctt gat gat cgc cct ttg gta aag ggt atc att aca 905
Thr Arg Leu Tyr Leu Asp Asp Arg Pro Leu Val Lys Gly Ile Ile Thr
                               60                               65                               70

gcc aag caa gct cat gaa cgg ctc att gcg gag gtg cac aat cac gag 953
Ala Lys Gln Ala His Glu Arg Leu Ile Ala Glu Val His Asn His Glu
    75                               80                               85

```

5

ES 2 540 588 T3

```

gcc aaa ggc ggg ctt att ctt gag gga gga tct atc tcg ttg ctc agg 1001
Ala Lys Gly Gly Leu Ile Leu Glu Gly Gly Ser Ile Ser Leu Leu Arg
    90                      95                      100

tgc atg gcg caa agt cgt tat tgg aac gcg gat ttt cgt tgg cat att 1049
Cys Met Ala Gln Ser Arg Tyr Trp Asn Ala Asp Phe Arg Trp His Ile
105                      110                      115                      120

att cgc aac gag tta gca gac gag gag agc ttc atg agc gtg gcc aag 1097
Ile Arg Asn Glu Leu Ala Asp Glu Glu Ser Phe Met Ser Val Ala Lys
    125                      130                      135

acc aga gtt aag cag atg tta cgc ccc tct gca ggt ctt tct att atc 1145
Thr Arg Val Lys Gln Met Leu Arg Pro Ser Ala Gly Leu Ser Ile Ile
    140                      145                      150

caa gag ttg gtt caa ctt tgg agg gag cct cgg ctg agg ccc ata ctg 1193
Gln Glu Leu Val Gln Leu Trp Arg Glu Pro Arg Leu Arg Pro Ile Leu
    155                      160                      165

gaa ggg atc gat gga tat cga tat gcc ctg cta ttt gct acc cag aac 1241
Glu Gly Ile Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Leu Leu Phe Ala Thr Gln Asn
    170                      175                      180

cag atc acg ccc gat atg cta ttg cag ctc gac gca gat atg gag aat 1289
Gln Ile Thr Pro Asp Met Leu Leu Gln Leu Asp Ala Asp Met Glu Asn
185                      190                      195                      200

aaa ttg att cac ggt atc gct cag gag ttt cta atc cat gcg cgt cga 1337
Lys Leu Ile His Gly Ile Ala Gln Glu Phe Leu Ile His Ala Arg Arg
    205                      210                      215

cag gaa cag aaa ttc cct ttg gtg ggc gcg aca gct gtc gaa gcg ttt 1385
Gln Glu Gln Lys Phe Pro Leu Val Gly Ala Thr Ala Val Glu Ala Phe
    220                      225                      230

gaa gga cca cca ttt cga atg tga tagattgcac cagttttggt tcagacttgt 1439
Glu Gly Pro Pro Phe Arg Met
    235                      240

cgctatttga ataagatggt cggtctttgt tgtgttggtg tggtgtgata gaggcaagtg 1499

gtttgaaact tgtttttact gggtttatctt cagtctcttg gacgatgttt tacaaatata 1559

atattgtgaa aattgtgggt ttatatctgt agaacgaaat aaatggtaag tatagccggt 1619

atcaaaattt agcaaaaatt gttaaagggt cttttatgcg gtgaggttgt cgacttttca 1679

tcattgtcgc gtaaggaggt acggatatcc ataactgtaa aaacgccgca gaatttacgg 1739

gtggtgcatt tagtttgccg ttcaacatga ttttggaat agttggtaac caagcactag 1799

ccaaccgttc gataatcact taatcgatgg aaccgttcag ctttccttcg tgaggctgct 1859

cttgatgatg agctgccgtc tagtttttat aacgccgggt tacgcattat agacaagctt 1919

<210> 3
<211> 239
5 <212> PRT
  <213> Agrobacterium tumefaciens

<220>
10 <223> isopentenil transferasa (IPT) del plásmido Ti Bo542

<400> 3

```

Met Asp Leu Arg Leu Ile Phe Gly Pro Thr Cys Thr Gly Lys Thr Ser
 1 5 10 15
 Thr Ala Ile Ala Leu Ala Gln Gln Thr Gly Leu Pro Val Leu Ser Leu
 20 25 30
 Asp Arg Val Gln Cys Cys Pro Gln Leu Ser Thr Gly Ser Gly Arg Pro
 35 40 45
 Thr Val Glu Glu Leu Lys Gly Thr Thr Arg Leu Tyr Leu Asp Asp Arg
 50 55 60
 Pro Leu Val Lys Gly Ile Thr Ala Lys Gln Ala His Glu Arg Leu
 65 70 75 80
 Ile Ala Glu Val His Asn His Glu Ala Lys Gly Gly Leu Ile Leu Glu
 85 90 95
 Gly Gly Ser Ile Ser Leu Leu Arg Cys Met Ala Gln Ser Arg Tyr Trp
 100 105 110
 Asn Ala Asp Phe Arg Trp His Ile Ile Arg Asn Glu Leu Ala Asp Glu
 115 120 125
 Glu Ser Phe Met Ser Val Ala Lys Thr Arg Val Lys Gln Met Leu Arg
 130 135 140
 Pro Ser Ala Gly Leu Ser Ile Ile Gln Glu Leu Val Gln Leu Trp Arg
 145 150 155 160
 Glu Pro Arg Leu Arg Pro Ile Leu Glu Gly Ile Asp Gly Tyr Arg Tyr
 165 170 175
 Ala Leu Leu Phe Ala Thr Gln Asn Gln Ile Thr Pro Asp Met Leu Leu
 180 185 190
 Gln Leu Asp Ala Asp Met Glu Asn Lys Leu Ile His Gly Ile Ala Gln
 195 200 205
 Glu Phe Leu Ile His Ala Arg Arg Gln Glu Gln Lys Phe Pro Leu Val
 210 215 220
 Gly Ala Thr Ala Val Glu Ala Phe Glu Gly Pro Pro Phe Arg Met
 225 230 235

<210> 4

<211> 17

5 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador 1 de PCR inversa para aislar la región secuencia arriba del extremo 5' del gen SARK

<400> 4

acgtccaacc aaagacc 17

15 <210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador 2 de PCR inversa para aislar la región secuencia arriba del extremo 5' del gen SARK, cebador 1 de PCR termal de entrelazado asimétrico para aislar el fragmento secuencia arriba de la región 5' del gen SARK

25 <400> 5

tctgcagcta gtgcgatatc c 21

30 <210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador 2 de PCR termal de entrelazado asimétrico para aislar el fragmento secuencia arriba de la región 5' del gen SARK

<400> 6

ttggtggatg aataatggag 20

5 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador 3 de PCR termal de entrelazado asimétrico para aislar el fragmento secuencia arriba de la región 5' del gen SARK

<400> 7

15 actgtaactc acaaattaga 20

<210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador SARKIPF para amplificación por PCR de pSARK:IPT

25 <400> 8

ttccttagat gctgtcacao tca 23

30 <210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador SARKIPTR para amplificación por PCR de pSARK:IPT

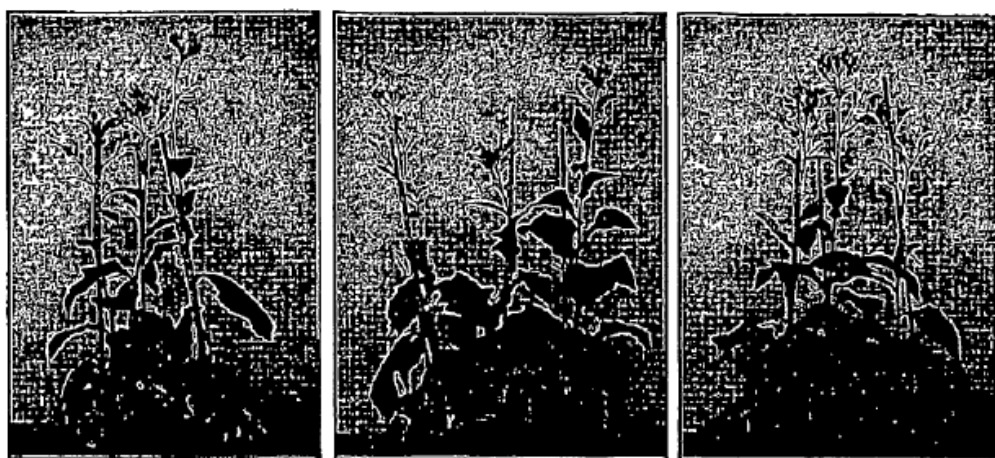
<400> 9

40 gaacatctta tccagatgaa gacag 25

REIVINDICACIONES

1. Un método de aumento de la eficiencia de uso del agua por una planta, comprendiendo el método:
 - (a) transformar una población de plantas con una casete de expresión recombinante que comprende un promotor SARK inducible por senescencia enlazado operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica isopentenil-transferasa; y
 - (b) seleccionar una planta que tiene una eficiencia de uso del agua incrementada, en donde el promotor SARK es (i) al menos 95% idéntico al promotor de SEQ ID NO: 1 o (ii) al menos 95% idéntico a 800 pb del extremo 5' de SEQ ID NO: 1.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el paso de transformación se lleva a cabo utilizando *Agrobacterium*.
3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en donde el promotor SARK es de *Phaseolus vulgaris*.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la isopentenil-transferasa es de *Agrobacterium*.
5. El método de la reivindicación 4, en donde la isopentenil-transferasa es al menos 95% idéntica a SEQ ID NO: 3.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la planta es una dicotiledónea.
7. El método de la reivindicación 6, en donde la planta es tabaco.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la planta es una monocotiledónea.
9. El método de la reivindicación 8, en donde la planta es del género *Oryza*.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la planta es de uno de los géneros siguientes: *Asparagus*, *Atropa*, *Avena*, *Brassica*, *Citrus*, *Citrullus*, *Capsicum*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Daucua*, *Festuca*, *Fragaria*, *Glycine*, *Gossypium*, *Helianthus*, *Heterocallis*, *Hordeum*, *Hyoscyamus*, *Lactuca*, *Linum*, *Lolium*, *Lycopersicon*, *Malus*, *Manihot*, *Majorana*, *Medicago*, *Nicotiana*, *Oryza*, *Panicum*, *Pannasetum*, *Persea*, *Pisum*, *Pyrus*, *Prunus*, *Raphanus*, *Secale*, *Senecio*, *Sinapis*, *Solanum*, *Sorghum*, *Trigonella*, *Triticum*, *Vitis*, *Vigna* y *Zea*.
11. Uso de una casete de expresión recombinante que comprende un promotor SARK inducible por senescencia, enlazado operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica isopentenil-transferasa para aumentar la eficiencia de uso del agua por una planta, en donde el promotor SARK es (i) al menos 95% idéntico al promotor de SEQ ID NO: 1 o (ii) al menos 95% idéntico a 800 pb del extremo 5' de SEQ ID NO: 1.
12. Uso conforme a la reivindicación 11, en donde el promotor SARK es como se define en la reivindicación 3.
13. Uso conforme a la reivindicación 11 ó 12, en donde la secuencia de ácido nucleico es como se define en la reivindicación 4 ó 5.
14. Uso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde la planta es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10.

FIG. 1

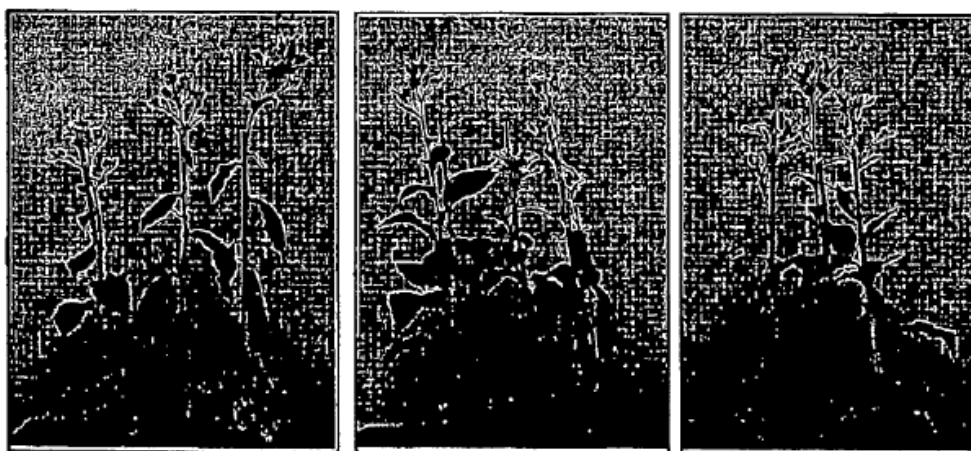


WT

T4-24

T2-36

5 días de deshidratación



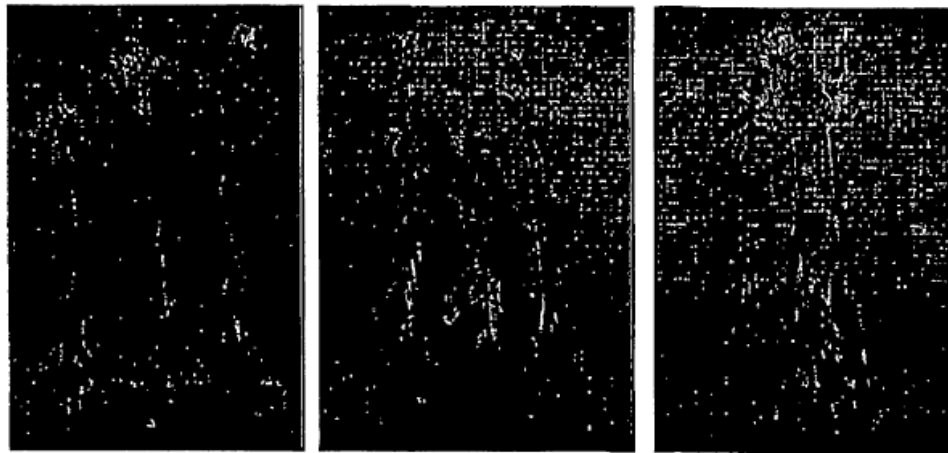
WT

T4-24

T2-36

7 días de deshidratación

FIG. 1 (CONT.)

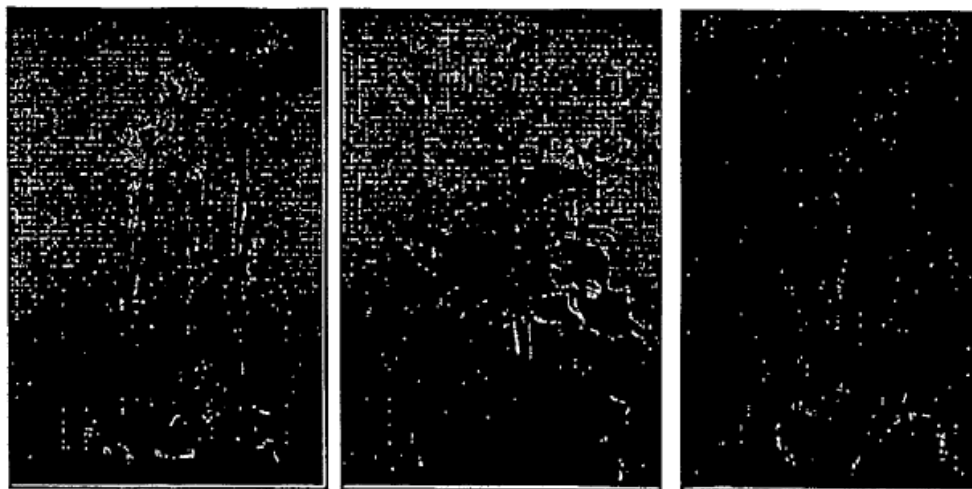


WT

T4-24

T2-36

16 días de deshidratación



WT

T4-24

T2-36

8 días de deshidratación

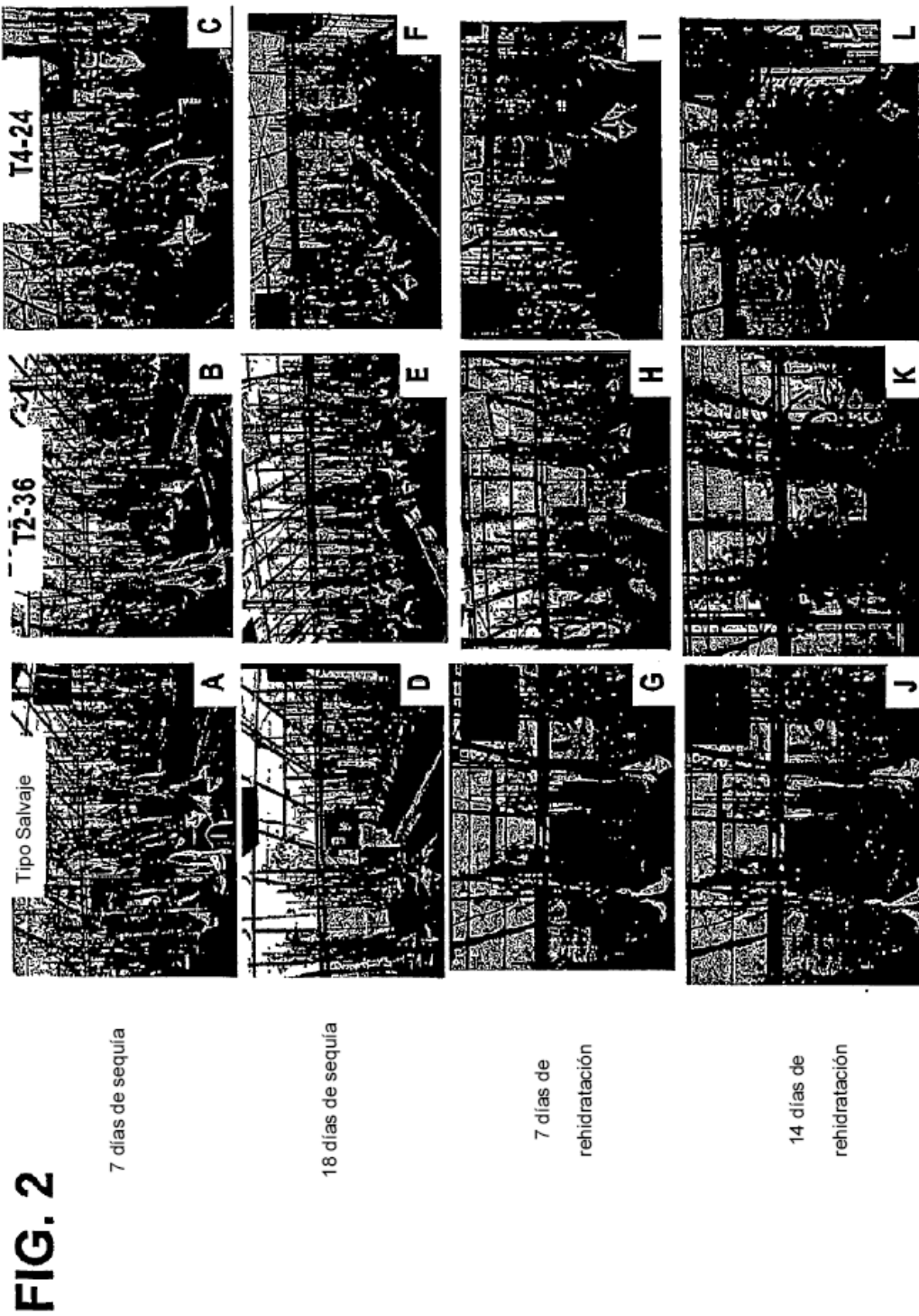


FIG. 3

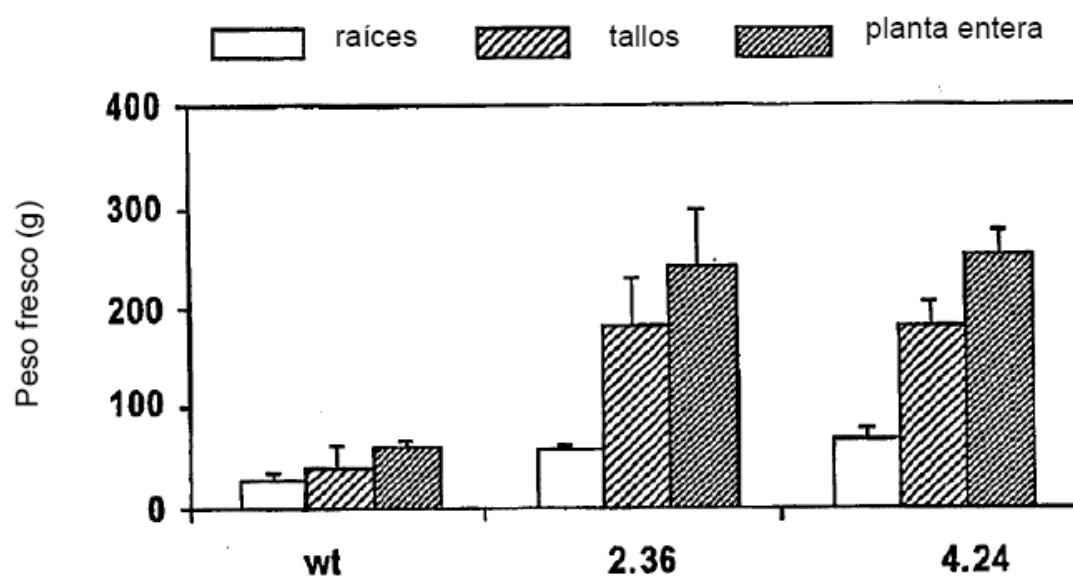


FIG. 4

