(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 543 382**

(51) Int. CI.:

C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2009 E 09793978 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2015 EP 2314702**

(54) Título: **Planta con resistencia a estrés por bajas temperaturas y método de producción de la misma**

(30) Prioridad:

11.07.2008 ES 200802145

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.08.2015

(73) Titular/es:

UNIVERSIDAD DE BARCELONA (50.0%)
Centro de Patentes de la UB, Baldiri Reixac, 4
08028 Barcelona, ES y
UNIVERSIDAD DE VALENCIA (50.0%)

(72) Inventor/es:

FERNÁNDEZ TIBURCIO, ANTONIO;
ALTABELLA ARTIGAS, TERESA y
FERRANDO MONLEÓN, ALEJANDRO

(74) Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

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

Planta con resistencia a estrés por bajas temperaturas y método de producción de la misma.

La presente invención está relacionada con plantas que tienen resistencia mejorada a bajas temperaturas. Además, la presente invención describe un método para la producción de dichas plantas.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Las plantas se adaptan a diferentes tipos de estrés ambiental tales como la temperatura de su hábitat. Sin embargo, en condiciones de estrés por temperatura, por ejemplo, las plantas son susceptibles al calor o a temperaturas frías cuando están expuestas a ambientes por encima o por debajo de su temperatura óptima de crecimiento máxima o mínima, lo que lleva a su debilidad debida a la pérdida gradual o súbita de las funciones fisiológicas de las células.

Se han realizado esfuerzos para ampliar la adaptación de las plantas a la temperatura mediante procedimientos de mejora tales como la selección o cruzamiento con el objeto de utilizar plantas silvestres adaptadas a diferentes temperaturas ambientales como cultivos comestibles, plantas de horticultura, y similares. El período en el que pueden cultivarse verduras, flores y plantas ornamentales, árboles frutales y similares se ha expandido mediante estos procedimientos de mejora, así como mediante horticultura protegida.

Las poliaminas, término general aplicado a hidrocarburos alifáticos con 2 o más grupos amino primarios, son sustancias naturales ubicuas en los organismos, con más de 20 tipos descubiertos hasta el momento. Las poliaminas típicas incluyen la putrescina, la espermidina y la espermina. Las enzimas conocidas relacionadas con el metabolismo de poliaminas implicadas en la biosíntesis de las poliaminas mencionadas incluyen la arginina descarboxilasa (ADC), la ornitina descarboxilasa (ODC), la S-adenosil-metionina descarboxilasa (SAMDC), la espermidina sintasa (SPDS), y la espermina sintasa (SPMS). Recientemente se ha publicado que algunas de las enzimas relacionadas con el metabolismo de poliaminas están implicadas en diferentes tipos de estrés ambiental.

La solicitud de patente europea EP 1.329.153 enseña que en tejidos vegetales que exhiben resistencia a estrés por frío, se incrementa el contenido de espermidina y espermina. En esta solicitud de patente se ejemplifica que introduciendo el gen de la espermidina sintasa en una planta, se incrementan los niveles de espermidina y espermina. Cuando la planta transgénica se sometió a bajas temperaturas, se confirmó que tenía mayor resistencia a estrés por frío.

La solicitud de patente de número US 2006/0225154 enseña que los niveles de espermidina, espermina y putrescina están incrementados cuando una planta se transforma con un gen espermidina sintasa. Esta solicitud de patente indica que el efecto de la defensa a estrés por bajas temperaturas puede ser implementada en la planta introduciendo el gen de la espermidina sintasa.

Respecto a la utilización del gen *ADC* para conferir resistencia a estrés por frío en plantas, es destacable el hecho de que en la familia de las *Brassicaceae,* el gen *ADC* parece estar duplicado, dando lugar así a dos parálogos, denominados generalmente *ADC1* y *ADC2* (cfr. Galoway *et al.*, “Phylogenetic utility of the nuclear gene Arginine Decarboxylase: an example from Brassicaceae”, Molecular Biology and Evolution, 1998, v. 15, p.1312-1320). Se han estudiado las diferentes funciones desempeñadas por cada uno de los parálogos.

En Hummel I. *et al.* (cfr. Hummel *et al*, “Differetial expresión of *ARGININE DECARBOXYLASE ADC1* y *ADC2* in *Arabidopsis thaliana*: characterization of transcriptional regulation during seed germination and seedling development”, New Phytologist, 2004, v. 163, p. 519-531), se estudiaron las actividades de los promotores de *ADC1* y *ADC2* en plantas transformadas de forma estable. En este estudio, se demostró que el frío tenía un poderoso efecto en la actividad de los promotores de *ADC1* y *ADC2.* Se concluyó que en *Arabidopsis* la respuesta de poliaminas al frío se demuestra que correlaciona con la activación transcripcional del promotor de *ADC1.*

En Alcázar *et al*. (Alcazar *et al*., “Overexpression of *ADC2* in Arabidopsis induces dwarfism and late-flowering through GA deficiency”, The Plant Journal, 2005, v. 43, p. 425-436) se generó una planta transgénica de Arabidopsis. La planta transgénica sobreexpresaba el gen *ADC2*, dando lugar a una acumulación de putrescina, sin afectar los niveles de espermidina o espermina. Además, las plantas sobreexpresoras de *ADC2* mostraron enanismo y retraso en la floración.

A pesar de los esfuerzos realizados en el estado de la técnica, la búsqueda de nuevas plantas con resistencia mejorada a estrés y de métodos para su obtención es todavía un campo activo.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

Los inventores de la presente invención han encontrado que introduciendo en una planta una secuencia del gen *ADC1,* la planta transgénica resultante presenta resistencia a estrés por baja temperatura. Además, el fenotipo de la planta transgénica no difiere del fenotipo de la planta de tipo silvestre, tal como se ilustra más abajo.

En Alcázar *et al.* (ver más arriba), se describió que sobreexpresando el gen *ADC2* (el parálogo del gen *ADC1*), la planta transgénica resultante experimentaba cambios en su fenotipo (tales como enanismo) y en su crecimiento (retraso en la floración).

Por otra parte, en Hummel I. *et al.* (ver más arriba) se menciona que el efecto del frío estaba correlacionado con cambios en los niveles de RNAm, y era coherente con la presencia específica de dos copias de un elemento de respuesta a bajas temperaturas en el promotor de *ADC1* y con el impacto potencial del elemento transponible en la expresión del gen, ya que una copia de este elemento de respuesta a temperaturas bajas forma parte del elemento transponible de *ADC1.*

Sorprendentemente, se ha encontrado que la sobreexpresión de *ADC1* confiere a la planta resistencia a estrés por las bajas temperaturas y no afecta al fenotipo o crecimiento de la planta transgénica.

Además, y tal como se ilustra más abajo, la resistencia a estrés por bajas temperaturas se consigue por sobreexpresión del gen *ADC1*, independientemente del promotor utilizado para su expresión. Tal como se muestra más abajo, la construcción utilizada para introducir el gen *ADC1* en la planta comprendía un promotor constitutivo distinto al promotor ortólogo del gen. Por tanto, los inventores de la presente invención han encontrado que el factor relevante para conferir resistencia a estrés por bajas temperaturas es la sobreexpresión del gen *ADC1,* independientemente de si el promotor ortólogo de *ADC1* está presente en la construcción utilizada para transformar la planta.

Por otra parte, los inventores han descubierto que cuando el gen *ADC1* se sobreexpresa en la planta: a) hay una acumulación de putrescina; b) el nivel de espermidina casi no cambia; y c) el nivel de espermina se reduce (niveles comparados con una planta de tipo silvestre). Este descubrimiento contraviene las divulgaciones realizadas en el estado de la técnica utilizando otro gen de síntesis de poliaminas (i.e. el gen espermidina sintasa), en el que los efectos observados se basaban en un incremento de espermidina y/o espermina como consecuencia de la acumulación de putrescina, o una producción estable de las poliaminas mencionadas.

Así, en un primer aspecto la presente invención se refiere a un método de producción de plantas con resistencia mejorada a estrés por bajas temperaturas, que comprende el paso de la transformación de células de una planta con una secuencia exógena del gen *ADC1* de la arginina descarboxilasa bajo el control de un promotor capaz de funcionar en la planta.

Sin estar limitados a una teoría, los inventores creen que las plantas transgénicas resultantes no presentan alteraciones en su desarrollo debido a la diferente localización subcelular de ADC1, incrementándose la productividad y el rendimiento, en comparación con las que sobreexpresan *ADC2.*

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una planta transformada obtenible por el método definido de acuerdo con en el primer aspecto de la invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y variantes de la palabra, tal como “comprendiendo”, no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1: Estructura de la construcción de expresión que contiene el gen de la biosíntesis de putrescina *ADC1* bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S.

FIG. 2: Niveles relativos de transcrito del gen de la biosíntesis de putrescina *ADC1* en plantas trasgénicas (l11, 17, 19) y control (wt).

FIG. 3: Niveles de poliaminas en plantas de *Arabidopsis* de tipo silvestre (wt) y transgénicas sobreexpresoras de *ADC1* (l11, 17, 19).

FIG. 4: Tolerancia a la congelación de plantas de tipo silvestre y transgénicas. Plantas de 3 semanas de edad se expusieron a diferentes temperaturas de congelación durante 6 horas: (A)- 5ºC (no aclimatadas), y (B) -12ºC (aclimatadas al frío). La tolerancia a la congelación se estimó como el porcentaje de plantas que sobreviven a cada temperatura específica después de 14 días de recuperación en condiciones de ausencia de estrés.

FIG. 5: Análisis de la PCR de DNA genómico de tabaco preparado a partir de brotes de tipo silvestre (C-) y regenerados resistentes a kanamicina. M marcadores de DNA digeridos con λ-PstI, C+ plásmido pBI121-ADC1, A1.1-A1.16 líneas resistentes a kanamicina.

FIG. 6: Análisis de transcriptasa reversa (RT-PCR) del transcrito de *ADC1* de Arabidopsis en plantas transgénicas de tomate To. Se utilizaron cebadores específicos de *ADC1* y *actina*.

FIG. 7: Niveles de poliamina en plantas de tabaco silvestres (wt) y transgénicas que sobre-expresan el gen ADC1 de Arabidopsis (A1.6, A1.13, A1.16).

FIG. 8: Resistencia a congelación de plantas de tabaco silvestres (wt) y transgénicas. Plantas de tres semanas se expusieron a -3ºC durante 4 h. La resistencia a congelación se estimó como el porcentaje de plantas que sobrevivió después de 14 días de recuperación en condiciones de no estrés.

FIG. 9: Análisis de la PCR de DNA genómico de tomate preparado a partir de brotes salvajes y regenerados resistentes a kanamicina.

FIG. 10: Niveles de transcrito relativos del gen ADC1 de Arabidopsis en plantas de tomate transgénicas (847-2, 847-3, 847-4, 847-5) y control (ctrl).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PARTICULARES

En la presente invención “plantas con resistencia mejorada a estrés por temperaturas bajas” son plantas en las que la limitación de crecimiento o el daño ocasionados por el estrés por bajas temperaturas puede eliminarse o reducirse.

Como se usa aquí, ‘exógeno’, indica que no es intrínseco a la planta sino que se ha introducido externamente. De este modo, una “secuencia exógena del gen *ADC1*” puede ser un gen que codifica la enzima ADC1 homólogo a la planta huésped (es decir, derivado de la planta huésped) que se introduce externamente por manipulación genética. El uso de un gen derivado del huésped que codifica la enzima ADC1 es preferible al considerar la identidad del uso de codones.

En una realización del primer aspecto de la invención, el método además comprende la regeneración de la planta a partir de las células transformadas que contienen la secuencia génica exógena del gen *ADC1* bajo el control de un promotor capaz de funcionar en plantas.

La secuencia completa del gen *ADC1* está disponible en la base de datos GenBank con la referencia génica ID 816149.

La secuencia codificante del gen *ADC1* de la arginina descarboxilasa de *Arabidopsis thaliana* (SEC ID NO: 1) está disponible en la base de datos GenBank. Su número de acceso es NM_127204.

La secuencia de aminoácidos de la arginina descarboxilasa ADC1 (SEC ID NO: 2) está disponible en la base de datos GenBank. Su número de acceso es Q95I64.

En otra realización del primer aspecto de la invención, la secuencia exógena del gen *ADC1* de la arginina descarboxilasa se selecciona del grupo que consiste en: a) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia SEC ID NO: 1; b) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia SEC ID NO: 2; c) una secuencia de nucleótidos que hibrida con la SEC ID NO: 1 o una secuencia complementaria de la misma en condiciones severas y que codifica una proteína con actividad arginina descarboxilasa, y d) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con actividad arginina descarboxilasa que comprende la secuencia (a) con una o más bases deleccionadas, sustituidas, insertadas o añadidas. Preferiblemente, la secuencia corresponde a SEC ID NO: 1.

La secuencia exógena del gen *ADC1* puede ser introducida en las células por cualquier método de ingeniería genética. Ejemplos incluyen fusión de protoplastos con células vegetales heterólogas que tienen la secuencia del

gen ADC1, infección con virus de plantas con el genoma viral manipulado genéticamente para expresar el gen que codifica la enzima ADC1, o transformación de células de la planta huésped usando un vector de expresión que contiene el gen que codifica la enzima ADC1.

Ejemplos de promotores capaces de funcionar en plantas incluyen el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) que se expresa de forma estructural en las células vegetales, el promotor del gen que codifica la nopalina sintasa (NOS), el promotor del gen que codifica la octopina sintasa (OCS), el promotor del gen que codifica la fenilalanina amonio liasa (PAL) y el promotor del gen que codifica la chalcona sintasa (CHS). También hay disponibles otros promotores de plantas bien conocidos además de los mencionados.

No sólo promotores que se expresan constitutivamente en todos los órganos como el promotor 35S, sino también promotores regulados por bajas temperaturas, estrés, sequía, luz, calor, hormonas, daño o similar pueden utilizarse para expresar el gen diana de acuerdo con el medio ambiente. Por ejemplo, se puede utilizar un gen que codifica la enzima ADC1 y un promotor que active su transcripción sólo cuando la planta se expone a bajas temperaturas, para controlar el metabolismo de poliaminas de la planta sólo en condiciones de bajas temperaturas y así mejorar la resistencia a estrés por bajas temperaturas. Un promotor específico de órgano o tejido también puede utilizarse para expresar el gen diana sólo en órganos o tejidos específicos.

Cuando la secuencia del gen exógeno *ADC1* se introduce por infección con *Agrobacterium tumefaciens*, el casete de expresión que incluye el gen que codifica la enzima ADC1 puede insertarse en la región T-DNA (región que se transfiere al cromosoma de la planta) en un plásmido Ti o Ri de las células. En la actualidad se utilizan sistemas de vectores binarios en métodos de transformación estándar con *Agrobacterium*. Ejemplos de vectores binarios comerciales incluyen los plásmidos pBI101 y pBI121 (ambos comercializados por Clontech). La región Vir implicada en la incorporación del T-DNA tiene acción en trans en el plásmido separado Ti (o Ri), en un vector conocido como plásmido de ayuda o 'helper'.

Para la transformación de plantas pueden utilizarse varios métodos convencionales conocidos. Ejemplos incluyen el método del PEG, en el que los protoplastos se aíslan de células vegetales por tratamiento con una enzima que degrada la pared celular como la celulasa o la hemicelulasa, y se añade el polietilenglicol a una suspensión de protoplastos junto a un vector de expresión que contiene el casete de expresión del gen que codifica la enzima ADC1 mencionado antes, para incorporar el vector de expresión en los protoplastos por un proceso como la endocitosis; el método de liposomas en el que un vector de expresión se introduce por tratamiento de ultrasonidos o similar en vesículas de membranas lipídicas como fosfatidilcolina, y las vesículas se fusionan con los protoplastos en presencia de PEG; métodos de fusión en un proceso similar utilizando micelas; y por electroporación, en el que se aplican pulsos eléctricos a una suspensión de protoplastos y un vector de expresión para incorporar los vectores que se encuentran en la solución externa en los protoplastos. Sin embargo, estos métodos son complejos puesto que requieren técnicas de cultivo para la re-diferenciación de los protoplastos en plantas. Procesos para introducir el gen de interés en células intactas con pared celular incluyen la inyección directa como la microinyección en la que una micropipeta se inserta en las células para inyectar el DNA del vector por presión a gas o hidráulica, o el método del cañón de partículas en el que se aceleran micropartículas de metal cubiertas con DNA por la detonación de un explosivo o presión gaseosa y de esta forma se introducen en las células, y métodos que emplean la infección con *Agrobacterium*. Los inconvenientes de la microinyección son la necesidad de una experiencia considerable y el pequeño número de células que se manipulan. Por ello es más aconsejable transformar plantas con métodos más prácticos tales como el método *Agrobacterium* y el método del cañón de partículas. En el método del cañón de partículas, bolas diminutas de metal (normalmente oro) cubiertas con el DNA de interés se disparan directamente sobre la célula vegetal. El método del cañón de partículas es útil ya que los genes pueden ser introducidos directamente en el meristemo apical de las plantas mientras son cultivadas. *Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria del suelo que contiene, además de su cromosoma, un minicromosoma extra circular denominado plásmido inductor de tumores (Ti). Parte del plásmido Ti se transfiere a los cromosomas de la planta huésped donde queda integrado (T-DNA). Varios loci génicos del cromosoma bacteriano y un grupo de genes de virulencia (vir) localizados en el plásmido Ti codifican para funciones que intervienen en el reconocimiento de la célula vegetal y su unión, así como en la excisión, transferencia e integración del T-DNA en el genoma de la planta. En general el método de *Agrobacterium* está más aceptado que el cañón de partículas por la mayor frecuencia de inserciones únicas en el DNA foráneo, siendo más fácil su monitorización.

Ejemplos ilustrativos no limitantes de células vegetales que pueden ser transformadas con el gen exógeno *ADC1* de acuerdo con el primer aspecto de la invención, son las células derivadas de: callos, semillas, hojas, tallos, sarmientos, raíces, tubérculos de raíz o tallo, flores y similares.

Ejemplos de plantas que pueden ser transformadas con el procedimiento de acuerdo con el primer aspecto de la invención incluyen, pero no se limitan a, dicotiledóneas, monocotiledóneas, plantas herbáceas y arbustos. Ejemplos incluyen patatas dulces, tomates, pepinos, calabaza, melones, sandías, tabaco (*Nicotinia tabacum*), *Arabidopsis thaliana*, pimientos, berenjena, judías, taro, espinaca, zanahorias, fresas, patatas blancas, arroz, maíz, alfalfa, trigo,

cebada, soja, colza, sorgo, Eucaliptos, olmo, kenaf, *Eucommia ulmoides*, caña de azúcar, remolacha, cassaya, cica, *Chenopodium album*, lirios, orquídeas, claveles, rosas, crisantemo, petunias, *Torenia fournieri*, antirrhinum, ciclamen, gypsohila, geranio, girasol, *Zoisia japonica*, algodón, hongos matsutake, hongos shiitake, champiñones, ginseng, frutos cítricos, bananas y kiwi.

Las "secuencias de base con una o más bases deleccionadas, sustituidas, insertadas o añadidas" aquí referidas, son ampliamente conocidas para aquellas personas expertas en la materia, para retener algunas veces actividad fisiológica incluso cuando la secuencia de aminoácidos de una proteína que generalmente tiene dicha actividad fisiológica tiene uno o más aminoácidos sustituidos, deleccionados, insertados o añadidos. Los genes que tienen dichas modificaciones y que codifican una enzima ADC1 están incluidos en el ámbito de la presente invención. Sin embargo, es esencial que dichas modificaciones no resulten en una pérdida de actividad para la enzima mencionada.

Las "condiciones severas" aquí referidas, significan condiciones bajo las cuales sólo secuencias de bases que codifican un polipéptido con actividad enzimática ADC1 equivalente a la enzima ADC1 codificada por una secuencia génica específica de la enzima ADC1 forma híbridos con la secuencia específica (referido aquí como híbridos específicos), y secuencias de bases que codifican polipéptidos que no tienen dicha actividad equivalente no forman híbridos con la secuencia específica (referidos aquí como híbridos no específicos). Un experto en la materia puede seleccionar fácilmente tales condiciones variando la temperatura durante la reacción de hibridación y proceso de lavado, la concentración de sales durante reacción de hibridación y proceso de lavado, y así otras cosas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis*

A. Construcción del Plásmido

El cDNA de *ADC1* de *Arabidopsis* se amplificó por PCR a partir de DNA genómico, utilizando los siguientes cebadores: sentido directo 5'-ATGCCTGCTCTAGCTTTTG-3' (SEC ID NO: 3), y sentido inverso 5'-ACCGAAATAAGACCAATTC-3' (SEC ID NO: 4). El fragmento de DNA amplificado se clonó en el vector pGEM (Stratagene, Heidelberg) y se comprobó por secuenciación. La construcción que contenía el cDNA de *ADC1*, flanqueado por el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S) y el terminador de la nopalina sintasa (NOS), en un vector binario (pBI121-*ADC1*), se obtuvo reemplazando el gen *GUS* SmaI/SacI en el vector pBI121 (cfr. Chen *et al.*, "Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning t-DNA insertion from transgenic plants", Molecular Breeding, 2003, v. 11, p. 289-293; accession number AF485783), por el fragmento XbaI/XbaI del cDNA de *ADC1* (2.6 kb). Esta construcción se introdujo por electroporación en *Agrobacterium tumefaciens* C58C1, que se utilizó para transformar diferentes especies vegetales, tal como se explica más abajo.

B. Transformación de *Arabidopsis thaliana*

Plantas de *Arabidopsis thaliana* Col0 se transformaron con *A.tumefaciens,* que contenía la contrucción pBI121-*ADC1* por inmersión floral (cfr. Clough S. J. *et al*., "Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*", Plant J.*,* 1998, v. 16, p. 735-743). Las semillas producidas por estas plantas se recolectaron y se seleccionaron en medio de cultivo de Murashige and Skoog, abreviado a partir de ahora como "MS" (cfr. Murashige T. *et al*., "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture", Physiol. Plant., 1962, v. 15, p. 473-497), que contenía 50 mg/l de kanamicina como antibiótico para la selección de los transformantes. La progenie de las plantas resistentes a kanamicina se analizó para la segregación de resistencia a kanamicina. Las semillas de las plantas con una proporción de segregación 3:1 se cultivaron de nuevo y la progenie resultante se analizó de nuevo para la segregación de resistencia a kanamicina para identificar plantas homocigotas para el T-DNA insertado. Se seleccionaron tres líneas homocigotas (I7, I9 e I11) para posteriores análisis.

C. Caracterización de las plantas transgénicas

C.1. Estimación de RNAm de *ADC1* por RT-PCR a tiempo real

El RNA total se obtuvo de toda la parte aérea de plantas de *Arabidopsis thaliana* de 4 semanas no transformadas (wt) y transformadas con el plásmido pBI121*ADC1* (I7, I9, I11) utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Un microgramo de RNA total se trató con DNasa de grado amplificación (Invitrogen) para eliminar la contaminación con DNA genómico. La primera hebra de cDNA se obtuvo con hexámeros degenerados utilizando el sistema de síntesis de primera hebra SuperScript III (Invitrogen), siguiendo las especificaciones del fabricante. La RT-PCR a tiempo real con el método de marcaje SYBR Green I se llevó a cabo utilizando la primera hebra de cDNA como molde en un sistema detector de secuencias (modelo 7700; Applied Biosystems, Foster, CA). La eficiencia de

la amplificación de cada muestra analizada se determinó utilizando la hoja de cálculo DART-PCR (cfr. Peirson S. N. *et al.* "Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis", Nucleic Acids Res., 2003, v. 31, e73), que utiliza un algoritmo simple (cfr. Tichopad A. *et al*., "Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up", Nucleic Acids Res., 2003, v. 31, e122.) y los datos de fluorescencia sin tratar, lo cual permite obtener resultados comparables sin necesidad de curvas de calibración con patrones. Las eficiencias de amplificación se calcularon para cada reacción individual a partir de su perfil de amplificación y se comprobaron por ANOVA para detectar muestras anómalas (outliners) y diferencias entre grupos (equivalencia de amplificación) utilizando la misma hoja de calculo DART-PCR. La media de fluorescencia inicial (R_0) obtenida a partir de la eficiencia media se normalizó utilizando RNAm de *Actina2* como control interno en cada experimento. Estos análisis se llevaron a cabo dos veces en experimentos independientes con resultados muy similares. Se utilizaron los siguiente juegos de cebadores específicos para cada gen: *ADC1* (sentido directo: 5'-gtggtgataaggggaacgaca-3' (SEC ID NO: 5), sentido inverso: 5'- caaccgaaataagacca-attctcat-3' (SEC ID NO: 6)), y *Actina2* (sentido directo: 5'-GATTCAGATGCCCAGAAGTCTTGT-3' (SEC ID NO: 7), sentido inverso: 5'-TGGATTCCAGCAGCTT-CCAT-3' (SEC ID NO: 8).

C.2. Análisis de poliaminas

Las poliaminas (PAs) se analizaron por separación de los derivados de PAs con cloruro de dansilo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los métodos de extracción y determinación habían sido descritos previamente (cfr. Marcé M. *et al.*, "Rapid high-perfomance liquid chromatographic method for quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: Application to plant and animal tissues", J. Chromatogr. B. Biomed. Appl., 1995, v. 666, p. 329-33).

Como se muestra en la FIG. 3, los niveles de putrescina en las plantas transgénicas están incrementados, mientras que la espermidina no está afectada y el nivel de espermina está reducido. A partir de estos resultados, se puede concluir que la sobreexpresión de *ADC1* incrementa la acumulación de putrescina.

C.3. Ensayos de congelación

En este ensayo se utilizaron plantas de 3 semanas (wt, I7, I9, I11). Para obtener las plantas, las semillas se sembraron en macetas que contenían una mezcla de tierra y vermiculita (3:1 v/v), se regaron con agua y una solución mineral de Hogland, y crecieron a 21±1°C en fotoperíodos de día neutro (12 horas de luz fluorescente blanca fría, flujo de fotones de 70-90 µmol m^{-2} seg^{-1}).

Los tratamientos a bajas temperaturas se llevaron a cabo transfiriendo las plantas a cámaras de crecimiento programadas a 4±1°C durante diferentes períodos de tiempo en las condiciones de luz y fotoperíodo descritas más arriba.

Los ensayos de congelación se realizaron en un congelador de temperatura programable. Plantas de 3 semanas no-aclimatadas o aclimatadas a frío (7 días, 4°C) se expusieron a 4°C durante 30 min en la oscuridad y a continuación se bajó la temperatura 2°C por hora. La temperatura final de congelación (-5ºC para no aclimatadas, y -11ºC para aclimatadas a frío) se mantuvo durante 6 horas, y luego se incrementó de nuevo la temperatura hasta 4°C a la misma velocidad. Tras descongelarlas a 4°C durante 12 horas en la oscuridad, las plantas se devolvieron a sus condiciones originales de crecimiento (ver arriba). La resistencia a congelación se determinó como la capacidad de las plantas para reanudar el crecimiento tras 14 días de recuperación en condiciones control.

Como se deduce de los resultados obtenidos, las plantas transgénicas que sobreexpresan el gen exógeno *ADC1* son más resistentes a estrés por bajas temperaturas mostrando, al mismo tiempo, las mismas características fenotípicas que las plantas de tipo silvestre.

Ejemplo 2: Obtención de plantas transgénicas de tabaco

Discos de hojas de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Burley 21) se transforman con *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 portador de la construcción de interés tal como se describe en Horsch *et al*. (cfr. R.B. Horsch et al., "A simple and general method for transferring genes into plants" Science 1985, vol. 227, pp. 1229-1231) . El medio para el desarrollo de yemas contiene sales minerales MS (Duchefa, ND), vitaminas B5 Gamborg (Duchefa), 1 mg/l de benziladenina (BA, Sigma), 0.1 mg/l de ácido naftalenacético (NAA, Sigma), 50 mg/l de kanamicina como antibiótico para la selección de células transformadas y 100 mg/l de Claforan para evitar el crecimiento de *A. tumefaciens*. Tras 6-7 semanas en este medio, se obtienen yemas del tamaño adecuado para ser transferidas a medio de enraizamiento. Las yemas regeneradas se separan y se transfieren a medio de enraizamiento: MS con 50 mg/l kanamicina pero sin hormonas (BA, NAA). Las plantas resistentes a kanamicina (3-10 cm alto) se transfieren a substrato con abono y se cultivan en invernadero. Después de 3 meses las plantas están floreciendo y se consigue la autopolinización cubriendo una inflorescencia entera y las yemas con una bolsa de papel. Normalmente, un mes

más tarde las semillas están maduras y pueden utilizarse para germinación. Estas semillas se analizan para segregación por resistencia a kanamicina, y las plantas que son capaces de crecer en presencia de kanamicina se utilizan para posteriores análisis.

Los niveles de expresión de *ADC1* en las plantas transgénicas, así como los niveles de putrescina, se determinan en la parte aérea de plantas de tabaco de 4 semanas como se describe en el protocolo de *Arabidopsis*.

La resistencia a congelación de 3 líneas transgénicas seleccionadas por sus elevados niveles de putrescina se determina como se describe para *Arabidopsis*.

Ejemplo 3: Obtención de plantas transgénicas de tabaco

A. Transformación de *Nicotiana tabacum*

Se introdujo el plásmido pBI121-*ADC1,* descrito en el ejemplo 1, en *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 mediante el método de transformación por frío. Las bacterias de Agrobacterium se hicieron crecer a 28 °C en un caldo YEB que contenía 100 µg/ml de estreptomicina, 100 µg/ml de rifampicina y 50 µg/ml de kanamicina y en agitación (200 rpm). Para la transformación se usó la suspensión bacteriana con un OD_{600} = 0.80. Las plantas de tabaco transgénicas (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) se generaron mediante el procedimiento de transformación de disco de hoja estándar (cf. Horsch et al. *supra*). Se sumergieron discos de hojas (0.5 × 0.5 cm^2) de plantas de tabaco ésteriles en la suspensión de *Agrobacterium,* que contenía la construcción pBI121-ADC1, durante 5-10 min con agitación puntual. Los discos de hoja infectados por *Agrobacterium* se cultivaron en medio MS a 25 °C durante 2 días y se transfirieron a un medio para el desarrollo de yemas, que contiene una mezcla de sales MS (Duchefa, ND), vitaminas B5 Gamborg (Duchefa), 1 mg/l bencilaminopurina (BAP, Sigma), 0.1 mg/l ácido naftaleno acético (NAA, Sigma), 100 mg/l kanamicina como antibiótico para la selección de células transformadas y 250 mg/l de Claforan con el fin de evitar el crecimiento de *A. tumefaciens.*. Después de 7-8 semanas en el medio las yemas regeneradas eran de un tamaño adecuado para ser cortadas y transferidas a un medio de desarrollo de yemas: MS con 100 mg/l de kanamicina pero sin hormonas (BAP, NAA).

Las plantas resistentes a kanamicina (de 5-10 cm de altura) se transfirieron a un sustrato con abono y crecieron en un invernadero (plantas T_0). Después de 4-5 meses las plantas florecieron y se consiguió la autopolinización cubriendo una inflorescencia entera y los brotes con una bolsa de papel. Aproximadamente un mes más tarde las semillas ya estaban maduras y se pudieron usar en la germinación. Se analizaron estas semillas por segregación de resistencia a kanamicina, y las plantas que fueron capaces de crecer en presencia de kanamicina se utilizaron para posteriores análisis (plantas T_1).

Se extrajo el ADN genómico de plantas transgénicas de 5 a 6 semanas, usando Qiagen DNeasy Plant Mini kit, y aproximadamente 50 ng de ADN se usó para la PCR. Las plantas transgénicas putativas se confirmaron por amplificación del ADN genómico con 35S-F (5'- GGCTTACGCAGCAGGTCTCA-3', SEC ID NO: 9) como cebador sentido diseñado contra la región del promotor de CaMV 35S y ADC1-R (5'- TCCGACTCCCCCGATTTAGA-3', SEC ID NO: 10) como cebador antisentido, diseñado contra el ORF de *ADC1*.

Se obtuvieron un total de 11 líneas transgénicas independientes a partir del cribado de plantas regeneradas resistentes a kanamicina y detección por PCR (FIG. 5). Se analizó la progenie de estas plantas por la segregación de resistencia a kanamicina. Se cultivaron otra vez y se usaron para el análisis aquellas semillas de planta con una proporción de segregación 3:1, que son las que se suponen que tienen una única inserción del transgén.

B. Caracterización de plantas transgénicas

B.1. Estimación del nivel de expresión de *ADC1* mediante RT-PCR semicuantitativa

Se aisló el RNA total de hojas de plantas de *N. tabacum* de 3 semanas, transformadas o no con el plásmido pB1121-ADC1, usando el reactivo Trizol (Invitrogen) y tratadas con DNAsa libre de RNasa (Invitrogen). Se usaron dos microgramos de RNA total para la síntesis del ADNc usando el kit de síntesis de primera hebra Superscript III (Invitrogen) con hexámeros aleatorios, a un volumen final de 25 µl. Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo tomando 1 µl de la solución de ADNc en un volumen total de reacción de 20 µl que contenía 0.25 mM de cada dNTP, 1x de tampón para la reacción, 0.5 U de Taq DNA polimerasa (Takara) y 0.5 µM del par de cebadores adecuados: *AtADC1* (directo: 5'-AGAAGCTGGTTCCAAGCCTG-3' SEC ID NO: 11, inverso: 5'-GCTTTCACGA TCACCACGC-3' SEC ID NO: 12) y *NtActin* (directo: 5'-CATTGGCGCTGAGAGATTCC-3' SEC ID NO: 13, inverso: 5'-GCAGCTTCCATTCCGATCA-3' SEC ID NO: 14). Las condiciones de la PCR para la amplificación consistieron en

una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguida de 35 ciclos de 95 °C/30 sec, 62 °C/30 sec y 72 °C/2 min, y finalmente una extensión de 10 min a 72ºC. Los productos de la PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñida con bromuro de etidio y se visualizó mediante UV. Se normalizó la expresión usando *NtActin* como control interno (FIG. 6).

El gen *ADC1* de Arabidopsis se expresó en las líneas transgénicas, aunque el nivel de expresión varió en cierta medida (FIG. 6). No se observaron fenotipos morfológicos o de crecimiento/desarrollo anormales significativos en las plantas de tabaco que sobre-expresaban el gen *ADC1* de Arabidopsis. Se escogieron las líneas transgénicas independientes A1.6, A1.13 y A1.16 para otros estudios por ser las líneas que mostraron unos niveles elevados de expresión de *ADC1*.

B.2 Análisis de poliaminas

Los niveles de PA se determinaron en la parte aérea de plantas de tabaco de 4 semanas de la generación T_1 tal y como se describe en el protocolo para Arabidopsis (sección C.2). Puesto que no es una población homogénea, se usó una mezcla de varias plantas (aproximadamente 50) para la extracción y cuantificación de poliaminas. Como se muestra en la FIG. 7, los niveles de putrescina eran más elevados en las líneas transgénicas que en el control, mientras que no se detectaron diferencias significativas en los niveles de espermidina y espermina. A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que la sobre-expresión de *ADC1* de Arabidopsis en tabaco induce la acumulación de putrescina.

B.3 Ensayos de tolerancia a frío

Se determinó la tolerancia a frío de 3 líneas transgénicas seleccionadas por su elevada expresión de *ADC1* de Arabidopsis (A1.6, A1.13, A1.16) de una manera similar a la descrita para Arabidopsis (sección C.3), pero a una temperatura diferente. Plantas de tres semanas crecidas a 24±1 °C bajo fotoperiodos de día largo (16 horas de luz/8 horas de oscuridad) se expusieron a 4 °C durante 30 min en la oscuridad y a continuación se bajó la temperatura 2 °C por hora hasta los -3 °C. La temperatura de congelación se mantuvo durante 4 horas, y a continuación se aumentó otra vez a 4 °C. Después de 12h at 4 °C las plantas se volvieron a someter a las condiciones de crecimiento originales, y aquellas plantas capaces de retomar el crecimiento después de dos semanas fueron las consideradas como resistentes.

Como se deriva de los resultados obtenidos (FIG. 8), las plantas transgénicas de tabaco que sobre-expresan el gen *ADC1* de Arabidopsis son más resistentes a estrés por congelación que el control, y presentan los mismos rasgos fenotípicos que las plantas silvestres. El porcentaje de supervivencia en las líneas transgénicas es un 10-14% superior que en las plantas control.

Como se ha mencionado en la sección B.2 estos ensayos se llevaron a cabo con plantas procedentes de la generación T_1, por esta razón se analizó una gran cantidad de plantas, que significa 6 experimentos independientes con 40-50 plantas de cada línea por experimento. Así, estos resultados son la media de aproximadamente unas 250 plantas por línea. Se esperan diferencias más significativas cuando se use una población de plantas más homogénea (plantas homocigotas). En el caso del tabaco no se observaron diferencias en la tolerancia a frío entre plantas aclimatadas y no aclimatadas.

Ejemplo 4: Obtención de plantas transgénicas de tomate

A. Transformación de *Licopersicum sculentum*

Se introdujo el plásmido pBI121-*ADC1* en *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 mediante el método de transformación por frío. Se inoculó una única colonia de *A. tumefaciens* transformada en 3 ml de medio AB que contenía 100 µg/ml de estreptomicina, 100 µg/ml de rifampicina y 50 µg/ml de kanamicina. Después de 8 h de incubación a 28 °C con agitación (180 rpm), se hizo crecer 1 ml del cultivo de bacterias durante toda la noche, en las mismas condiciones, en 50 ml medio AB medio que contenía los antibióticos mencionados más arriba y glucosa al 2%. Después de eso se centrifugó la suspensión bacteriana a 3000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente y el pellet, resuspendido en MSO a una concentración final con una OD_{600}=0.6, se usó para la transformación de las plantas.

Se usaron cotiledones de plantones de tomate de 10- a 12-días (*Licopersicum sculentum* cv. UC82) crecidos *in vitro* para la transformación. Se cortaron los cotiledones en dos o tres partes transversales y se inviertieron boca abajo en una construcción de *Agrobacterium tumefaciens* que contenía la solución diluida de la construcción pB1121-ADC1. Después de 10 min se extrajeron los explantes y se secaron invertidos directamente en papel de filtro estéril de

Whatman colocado directamente encima del medio GCF10 que contenía 375 µM de acetosiringona en placas de Petri y se volvieron a hacer crecer a ambiente en oscuridad durante aproximadamente 48 horas. Después de 48 h de co-cultivo, los cotiledones se transfirieron a un medio GCF10 que contenía 500 µg/ml de carbenicilina y 40µg/ml de kanamicina. Se pusieron los cotiledones invertidos. Se observaron los brotes o callos verdes 3 semanas después de la incubación, demostrando que la transformación fue exitosa. Los callos verdes se transfirieron a un medio GCF11 que contenía 250 µg/ml de carbenicilina y 40 µg/ml de kanamicina.

Después de ocho semanas de cultivo se transfirieron los brotes a un medio TRI2 para que arraigaran suplementado con 250 µg/ml carbenicilina y 25 µg/ml de kanamicina, en cajas Magenta, a 25 °C durante periodos de 8 h con poca luz/16 h de oscuridad. A continuación se extrajeron de las cajas Magenta, plantaron y transfirieron al invernadero.

Se confirmó la integración del gen *ADC1* de Arabidopsis en el genoma de tomate de plantas To amplificando un fragmento interno de 810 pb mediante PCR, usando el siguiente par de cebadores: ADC1-1 F (5'-CCAGCTTCT GCATTTTCACA-3' SEC ID NO: 15) y ADC1-1R (5'-CCATTGTTGTCCATCTCGTG-3 SEC ID NO: 16). Hasta ahora se han obtenido 3 líneas transgénicas independentes (FIG. 9).

Tabla 1. Composición de los diferentes medios

MEDIO	MSO	TRI1	GCF10	GCF11	TRI2
Sales de MS	4.3 g/L	2.2 g/L	4.3 g/L	4.3 g/L	2.2 g/L
Tiamina	0.4 mg/L	0.2 mg/L	0.4 mg/L	0.5 mg/L	0.2 mg/L
Mio-Inositol	100 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	50 mg/L
Glicina	-	-	-	2.0 mg/L	-
Piridoxina	-	-	0.5 mg/L	0.5 mg/L	-
Ácido Fólico*	-	-	-	0.5 mg/L	-
Biotina*	-	-	-	0.05 mg/L	-
Ribósido de Zeatina*	-	-	1.5 mg/L	1.9 mg/L	-
NAA	-	-	-	-	0.1 mg/L
IAA	-	0.2 mg/L	0.2 mg/L	-	-
Amcimidol*	-	-	-	-	0.5 mg/L
Ácido nicotínico	-	-	0.5 mg/L	4.9 mg/L	-
Sacarosa	30 g/L	15 g/L	30 g/L	30 g/L	15 g/L
Carbenicilina*	-	-	500 mg/L	500 mg/L	250 mg/L
Kanamicina*	-	-	50±10 mg/L	50±10 mg/L	25 mg/L
Agar	-	8 g/L	8 g/L	8 g/L	8 g/L
pH	5.8	5.9	5.9	5.9	5.9
*(Filtro esterilizado)					

Tabla 2. AB (medio de Agrobacterium)

K_2HPO_4	3.0 g/L
NaH_2PO_4	1.0 g/L
NH_4Cl	1.0 g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.3 g/L
KCl	0.15 g/L
$CaCl_2$	0.01 g/L
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	2.5 g/L
Glucosa	5.0 g/L
Bacto-Agar	15 g/L

B. Caracterización de las plantas transgénicas

B.1. Estimación del nivel de expresión de *ADC1* mediante RT-PCR a tiempo real

Se obtuvo el RNA total de la parte aérea de plantas de *Licopersicum sculentum* transformadas y no transformadas como se ha descrito en los ejemplos 1 y 2. La cantidad relativa de expresión de *ADC1* se determinó mediante RT-PCR a tiempo real, tal y como se ha descrito en el ejemplo 1 (sección C.1). En este caso se usó el RNA de 18S como control interno para normalizar los resultados.

Se detectó un nivel elevado de expresión del gen *ADC1* de Arabidopsis en las líneas de tomate transgénicas 847-3 y 947-4, aunque el nivel de expresión variaba en cierta medida (FIG. 10). No se observaron fenotipos morfológicos o de crecimiento/desarrollo anormales significativos en las plantas de tomate que sobre-expresaban el gen *ADC1* de Arabidopsis.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Barcelona Universitat de València

<120> Plant having resistance to low-temperature stress and method of production thereof.

<130> WO AVCRI051

<150> ES200802145
<151> 2008-07-11

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 2109
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

atgcctgctc tagcttttgt tgatactccc atcgatacct tttccagtat ctttacaccg 60

tcgtctgttt ccaccgccgt tgttgacggt tcctgccatt ggtctccgtc cctctcctcc 120

tctctttacc gtatcgacgg atggggagct ccgtatttcg cagcgaattc ctccgggaac 180

atctctgttc gtcctcatgg ctcaaacact ttacctcacc aagacatcga tctgatgaaa 240

gttgtgaaga aagttacaga tccgagtggt ttaggattac agcttccgct tattgttcgt 300

ttccctgatg ttctgaagaa tcgtcttgag tgtcttcaat ccgcgtttga ttacgcgatt 360

cagagtcaag gatatgattc tcattaccaa ggtgtgtatc ctgtgaaatg taatcaagat 420

cggtttatca tcgaagatat tgtcgaattc ggatccggtt ttcgattcgg tttagaagct 480

ggttccaagc ctgagattct tcttgctatg agttgtttgt gtaaaggtaa tcctgaagct 540

tttcttgtgt gtaatggttt taaagactct gagtatatct cattggcttt gtttgggagg 600

aaacttgaat tgaatactgt tattgttctt gagcaagaag aagagcttga tttggttatt 660

gatttgagcc agaagatgaa tgttaggcct gttattgggt taagagctaa gcttagaact 720

aaacattctg gtcattttgg ttctacttct ggtgagaagg ggaagtttgg tttgactacg 780

gttcagattc ttcgtgtggt gaggaagctg agtcaagttg gtatgcttga ttgtctccag 840

cttctgcatt ttcacattgg ttcacagatt ccgtccacgg ctttgctttc cgacggtgtg 900

gctgaggctg cgcagcttta ctgtgagctt gtccgtcttg gtgctcatat gaaggtgatt 960

gatattggtg gtgggttggg gattgattac gacgggtcta aatcgggggga gtcggatctc 1020

tctgttgctt atagtctcga ggagtatgct gcagctgttg tggcttcggt taggtttgtt 1080

tgtgatcaga agtctgtgaa gcatccggtg atttgcagcg agagcggtcg agccattgtg 1140

tctcatcact cggtgttgat ctttgaagct gtctcagctg gtcaacaaca tgagacccct 1200

actgatcatc agtttatgct tgaagggtac tctgaggaag ttcgaggtga ttacgagaat 1260

ctttatggtg ctgctatgcg tggtgatcgt gaaagctgct tgctttatgt tgatcagctg 1320

aagcagagat gtgttgaagg gttcaaagaa ggttccttgg gcattgaaca gttagctggt 1380

gttgatggat tatgcgagtg ggtgattaag gcgattggtg catcggatcc ggttcttact 1440

taccatgtca atctatcggt tttcacttcg attcctgatt tctgggggat tgatcagctg 1500

tttcctattg ttccaatcca taaacttgac caaaggcctg ccgcgagagg gatcttatcg 1560

gatttgacgt gtgacagcga cggaaagatc aacaagttca taggcggaga atcgagcttg 1620

ccattgcacg agatggacaa caatggctgc agcggtgggc ggtactattt gggaatgttc 1680

ctaggtggag cttatgagga agctctcggt ggagtccaca atctgttcgg tggaccaagc 1740

gtggttcgcg tattgcagag cgatggacct cacggattcg cagtgacccg tgctgtgatg 1800

ggccaatcct ctgcagatgt cctcagagca atgcagcatg agcctgagct catgtttcag 1860

actcttaaac accgagccga ggagccgagg aacaacaaca acaaagcttg tggtgataag 1920

gggaacgaca aactagtagt cgcatcgtgt cttgctaagt cattcaacaa catgccttat 1980

ctttccatgg aaacgtcaac aaacgctctc accgcagcgg tcaataacct tggcgtttac 2040

tactgcgatg aagctgcagc tggtggcggc ggcaagggca aagatgagaa ttggtcttat 2100

ttcggttga 2109

<210> 2
<211> 702
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Pro Ala Leu Ala Phe Val Asp Thr Pro Ile Asp Thr Phe Ser Ser
1 5 10 15

Ile Phe Thr Pro Ser Ser Val Ser Thr Ala Val Val Asp Gly Ser Cys
20 25 30

His Trp Ser Pro Ser Leu Ser Ser Ser Leu Tyr Arg Ile Asp Gly Trp
35 40 45

```
Gly Ala Pro Tyr Phe Ala Ala Asn Ser Ser Gly Asn Ile Ser Val Arg
    50                  55                  60

Pro His Gly Ser Asn Thr Leu Pro His Gln Asp Ile Asp Leu Met Lys
65                  70                  75                  80

Val Val Lys Lys Val Thr Asp Pro Ser Gly Leu Gly Leu Gln Leu Pro
                85                  90                  95

Leu Ile Val Arg Phe Pro Asp Val Leu Lys Asn Arg Leu Glu Cys Leu
            100                 105                 110

Gln Ser Ala Phe Asp Tyr Ala Ile Gln Ser Gln Gly Tyr Asp Ser His
        115                 120                 125

Tyr Gln Gly Val Tyr Pro Val Lys Cys Asn Gln Asp Arg Phe Ile Ile
    130                 135                 140

Glu Asp Ile Val Glu Phe Gly Ser Gly Phe Arg Phe Gly Leu Glu Ala
145                 150                 155                 160

Gly Ser Lys Pro Glu Ile Leu Leu Ala Met Ser Cys Leu Cys Lys Gly
                165                 170                 175

Asn Pro Glu Ala Phe Leu Val Cys Asn Gly Phe Lys Asp Ser Glu Tyr
            180                 185                 190

Ile Ser Leu Ala Leu Phe Gly Arg Lys Leu Glu Leu Asn Thr Val Ile
        195                 200                 205

Val Leu Glu Gln Glu Glu Glu Leu Asp Leu Val Ile Asp Leu Ser Gln
    210                 215                 220

Lys Met Asn Val Arg Pro Val Ile Gly Leu Arg Ala Lys Leu Arg Thr
225                 230                 235                 240

Lys His Ser Gly His Phe Gly Ser Thr Ser Gly Glu Lys Gly Lys Phe
                245                 250                 255

Gly Leu Thr Thr Val Gln Ile Leu Arg Val Val Arg Lys Leu Ser Gln
            260                 265                 270

Val Gly Met Leu Asp Cys Leu Gln Leu Leu His Phe His Ile Gly Ser
        275                 280                 285

Gln Ile Pro Ser Thr Ala Leu Leu Ser Asp Gly Val Ala Glu Ala Ala
    290                 295                 300

Gln Leu Tyr Cys Glu Leu Val Arg Leu Gly Ala His Met Lys Val Ile
305                 310                 315                 320

Asp Ile Gly Gly Gly Leu Gly Ile Asp Tyr Asp Gly Ser Lys Ser Gly
                325                 330                 335
```

```
Glu Ser Asp Leu Ser Val Ala Tyr Ser Leu Glu Glu Tyr Ala Ala Ala
            340                 345                 350

Val Val Ala Ser Val Arg Phe Val Cys Asp Gln Lys Ser Val Lys His
        355                 360                 365

Pro Val Ile Cys Ser Glu Ser Gly Arg Ala Ile Val Ser His His Ser
    370                 375                 380

Val Leu Ile Phe Glu Ala Val Ser Ala Gly Gln Gln His Glu Thr Pro
385                 390                 395                 400

Thr Asp His Gln Phe Met Leu Glu Gly Tyr Ser Glu Glu Val Arg Gly
                405                 410                 415

Asp Tyr Glu Asn Leu Tyr Gly Ala Ala Met Arg Gly Asp Arg Glu Ser
            420                 425                 430

Cys Leu Leu Tyr Val Asp Gln Leu Lys Gln Arg Cys Val Glu Gly Phe
        435                 440                 445

Lys Glu Gly Ser Leu Gly Ile Glu Gln Leu Ala Gly Val Asp Gly Leu
    450                 455                 460

Cys Glu Trp Val Ile Lys Ala Ile Gly Ala Ser Asp Pro Val Leu Thr
465                 470                 475                 480

Tyr His Val Asn Leu Ser Val Phe Thr Ser Ile Pro Asp Phe Trp Gly
                485                 490                 495

Ile Asp Gln Leu Phe Pro Ile Val Pro Ile His Lys Leu Asp Gln Arg
            500                 505                 510

Pro Ala Ala Arg Gly Ile Leu Ser Asp Leu Thr Cys Asp Ser Asp Gly
        515                 520                 525

Lys Ile Asn Lys Phe Ile Gly Gly Glu Ser Ser Leu Pro Leu His Glu
    530                 535                 540

Met Asp Asn Asn Gly Cys Ser Gly Gly Arg Tyr Tyr Leu Gly Met Phe
545                 550                 555                 560

Leu Gly Gly Ala Tyr Glu Glu Ala Leu Gly Gly Val His Asn Leu Phe
                565                 570                 575

Gly Gly Pro Ser Val Val Arg Val Leu Gln Ser Asp Gly Pro His Gly
            580                 585                 590

Phe Ala Val Thr Arg Ala Val Met Gly Gln Ser Ser Ala Asp Val Leu
        595                 600                 605

Arg Ala Met Gln His Glu Pro Glu Leu Met Phe Gln Thr Leu Lys His
    610                 615                 620
```

```
Arg Ala Glu Glu Pro Arg Asn Asn Asn Asn Lys Ala Cys Gly Asp Lys
625                 630                 635                 640

Gly Asn Asp Lys Leu Val Val Ala Ser Cys Leu Ala Lys Ser Phe Asn
                645                 650                 655

Asn Met Pro Tyr Leu Ser Met Glu Thr Ser Thr Asn Ala Leu Thr Ala
            660                 665                 670

Ala Val Asn Asn Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Asp Glu Ala Ala Ala Gly
        675                 680                 685

Gly Gly Gly Lys Gly Lys Asp Glu Asn Trp Ser Tyr Phe Gly
    690                 695                 700
```

<210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador sentido directo para amplificar el DNA genómico de ADC1 de Arabidopsis

<400> 3
atgcctgctc tagcttttg 19

<210> 4
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador sentido inverso para amplificar el DNA genómico de ADC1 de Arabidopsis

<400> 4
accgaaataa gaccaattc 19

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador sentido directo para la determinación cuantitativa del mRNA de ADC1

<400> 5
gtggtgataa ggggaacgac a 21

<210> 6
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador sentido inverso para la determinación cuantitativa del mRNA de ADC1

<400> 6
caaccgaaat aagaccaatt ctcat 25

<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador sentido directo para la determinación cuantitativa de mRNA de Actina 2

<400> 7
gattcagatg cccagaagtc ttgt 24

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador sentido inverso para la determinación cuantitativa de mRNA de Actina 2

<400> 8
tggattccag cagcttccat 20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador sentido directo para amplificar el DNA a partir del promotor CaMV35S fusionado al gen ADC1 de Arabidopsis en tabaco

<400> 9
ggcttacgca gcaggtctca 20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador sentido inverso para amplificar el DNA a partir del promotor CaMV35S fusionado al gen ADC1 de Arabidopsis en tabaco

<400> 10
tccgactccc ccgatttaga 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador sentido directo para la determinación cuantitativa del mRNA de ADC1 de Arabidopsis en plantas transgénicas de tabaco

<400> 11
agaagctggt tccaagcctg 20

<210> 12
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador sentido inverso para la determinación cuantitativa del mRNA de ADC1 mRNA de Arabidopsis en plantas transgénicas de tabaco

<400> 12
gctttcacga tcaccacgc 19

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador sentido directo para la determinación cuantitativa de mRNA de Actina 2 en tabaco

<400> 13
cattggcgct gagagattcc 20

<210> 14
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador sentido inverso para la determinación cuantitativa del mRNA de Actina 2 en tabaco

<400> 14
gcagcttcca ttccgatca 19

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador sentido directo para amplificar el DNA de ADC1 de Arabidopsis en tomate

<400> 15
ccagcttctg cattttcaca 20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador sentido inverso para amplificar el DNA de ADC1 de Arabidopsis en tomate

<400> 16
ccattgttgt ccatctcgtg 20

REIVINDICACIONES

1. Método para producir plantas con resistencia mejorada a estrés por bajas temperaturas, que comprende la etapa de transformar células de una planta con una secuencia exógena del gen *ADC1* de la arginina descarboxilasa bajo el control de un promotor capaz de funcionar en la planta.

2. Método según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de regenerar las plantas a partir de las células transformadas.

3. Método según las reivindicaciones 1 ó 2, donde la secuencia exógena tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

a) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia SEC ID NO: 1;
b) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia SEC ID NO: 2;
c) una secuencia de nucleótidos que hibrida con SEC ID NO: 1, o una secuencia complementaria de la misma, en condiciones severas y codifica una proteína que tiene actividad arginina descarboxilasa, y
d) una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína con actividad arginina descarboxilasa, que comprende la secuencia (a) con una o más bases delecionadas, sustituidas, insertadas o añadidas.

4. Método según la reivindicación 3, donde la secuencia exógena tiene la secuencia SEC ID NO: 1.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el nivel de expresión del gen exógeno de la arginina descarboxilasa *ADC1* se incrementa en las células transformadas.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el nivel de expresión del gen exógeno de la arginina descarboxilasa *ADC1* se sobreexpresa en las células transformadas.

7. Planta transformada obtenible por el método según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

8. Uso de la secuencia del gen de la arginina descarboxilasa *ADC1* para conferir resistencia a estrés por baja temperatura a una planta.

FIG. 1

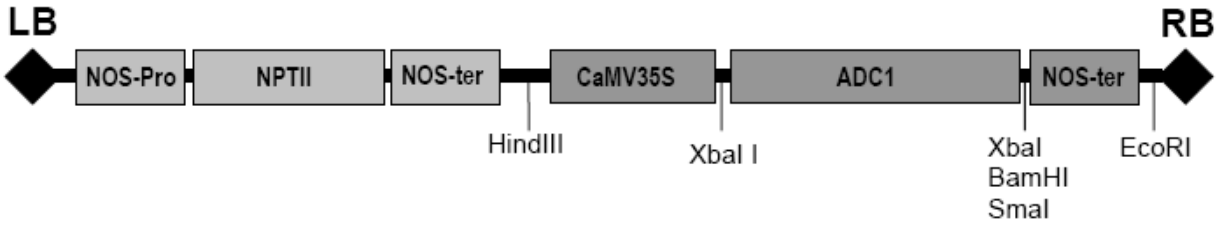

LB
RB
NOS-Pro
NPTII
NOS-ter
CaMV35S
ADC1
NOS-ter
HindIII
Xbal I
Xbal
BamHI
SmaI
EcoRI

FIG. 2

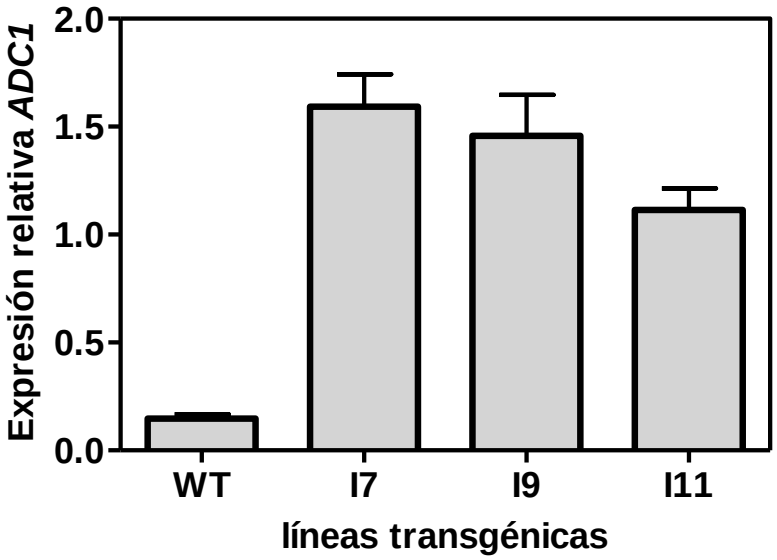

Expresión relativa ADC1
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
WT
I7
I9
I11
líneas transgénicas

FIG. 3

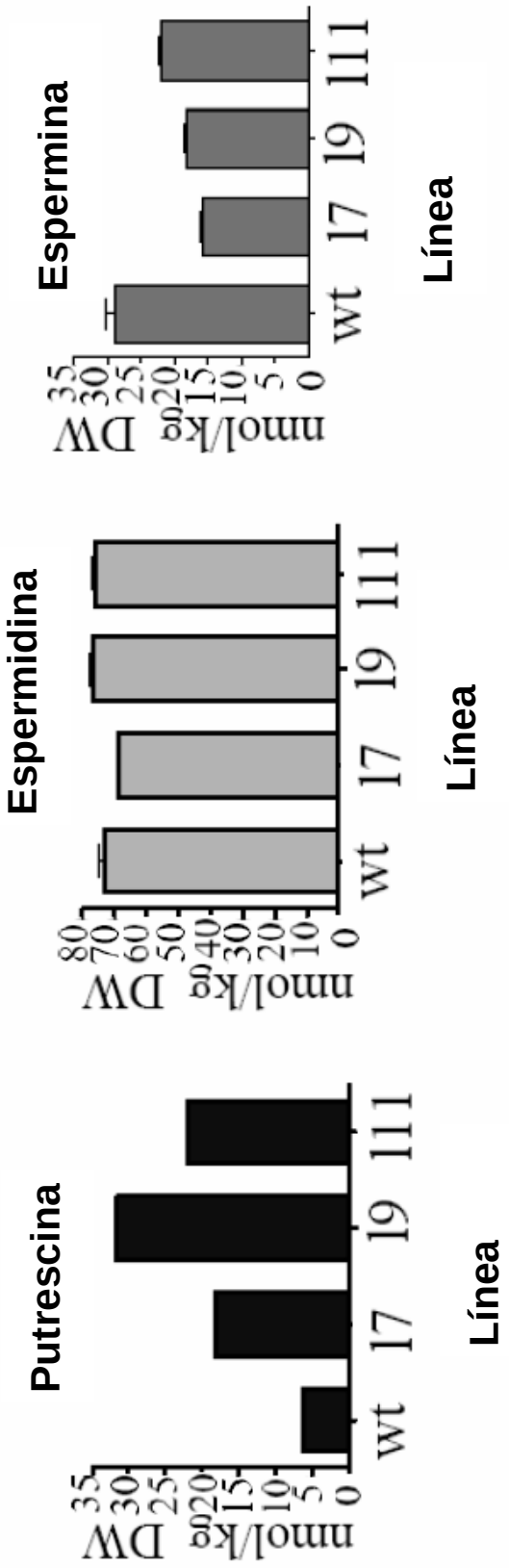
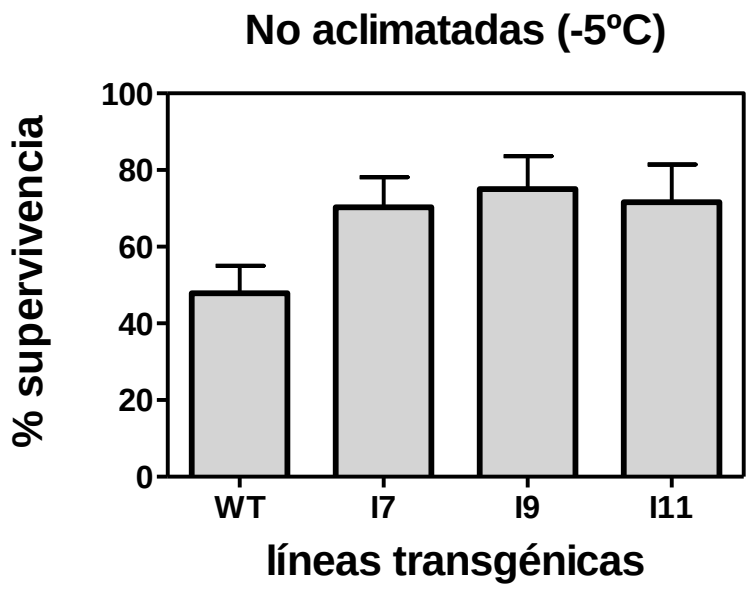

Putrescina
nmol/kg DW
0
5
10
15
20
25
30
35
wt
17
19
111
Línea
Espermidina
nmol/kg DW
0
10
20
30
40
50
60
70
80
wt
17
19
111
Línea
Espermina
nmol/kg DW
0
5
10
15
20
25
30
35
wt
17
19
111
Línea

FIG. 4

A)


No aclimatadas (-5ºC)
% supervivencia
100
80
60
40
20
0
WT
I7
I9
I11
líneas transgénicas

B)

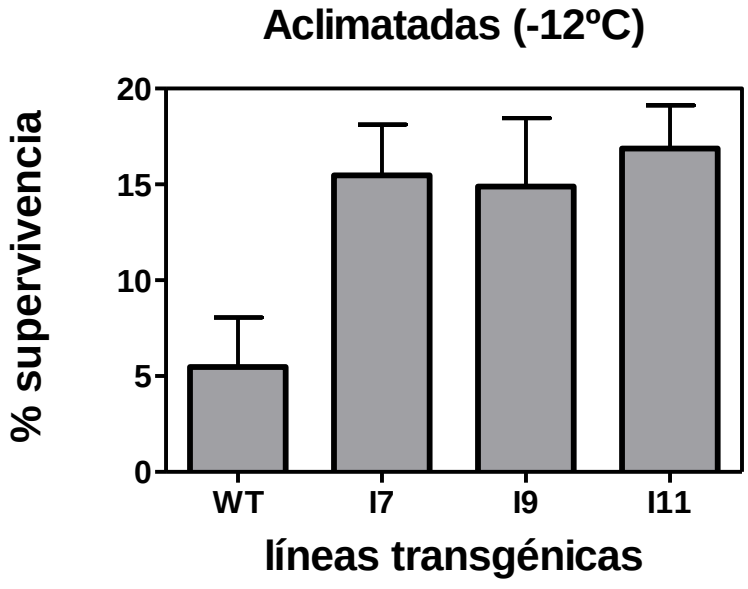
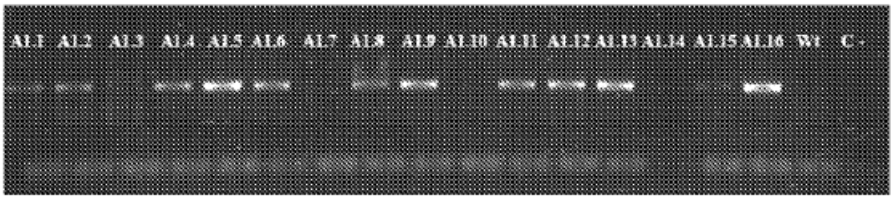

Aclimatadas (-12ºC)
% supervivencia
20
15
10
5
0
WT
I7
I9
I11
líneas transgénicas

FIG. 5

FIG. 6



ADC1: 804 pb

Actina: 200 pb

FIG. 7

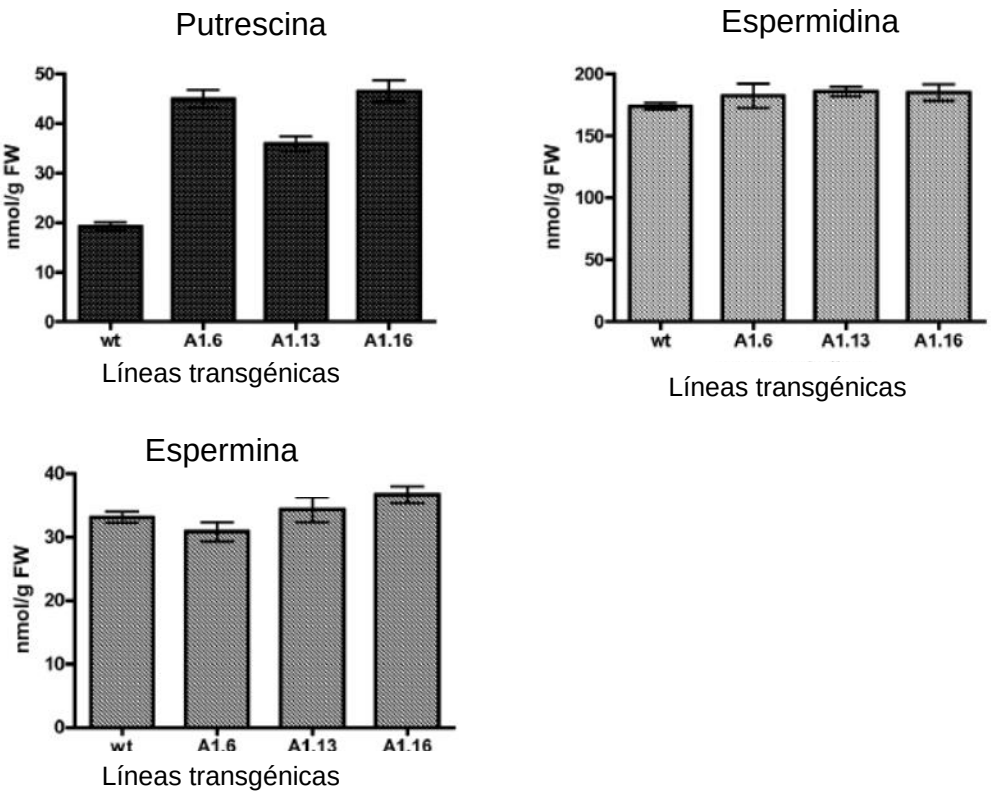

Putrescina
nmol/g FW
0
10
20
30
40
50
wt
A1.6
A1.13
A1.16
Líneas transgénicas
Espermidina
nmol/g FW
0
50
100
150
200
wt
A1.6
A1.13
A1.16
Líneas transgénicas
Espermina
nmol/g FW
0
10
20
30
40
wt
A1.6
A1.13
A1.16
Líneas transgénicas

FIG. 8

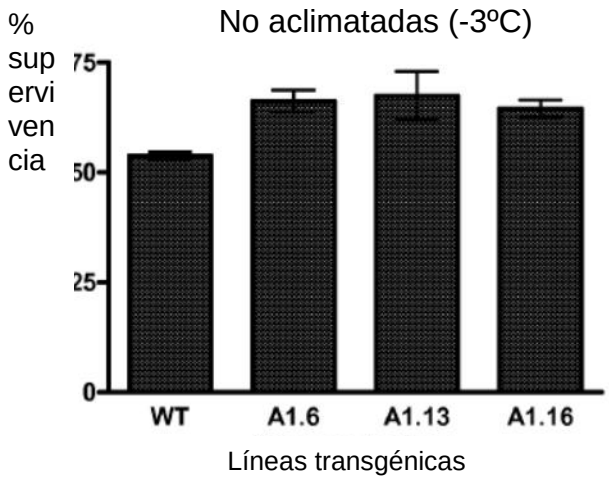

%
supervivencia
No aclimatadas (-3ºC)
0
25
50
75
WT
A1.6
A1.13
A1.16
Líneas transgénicas

FIG. 9

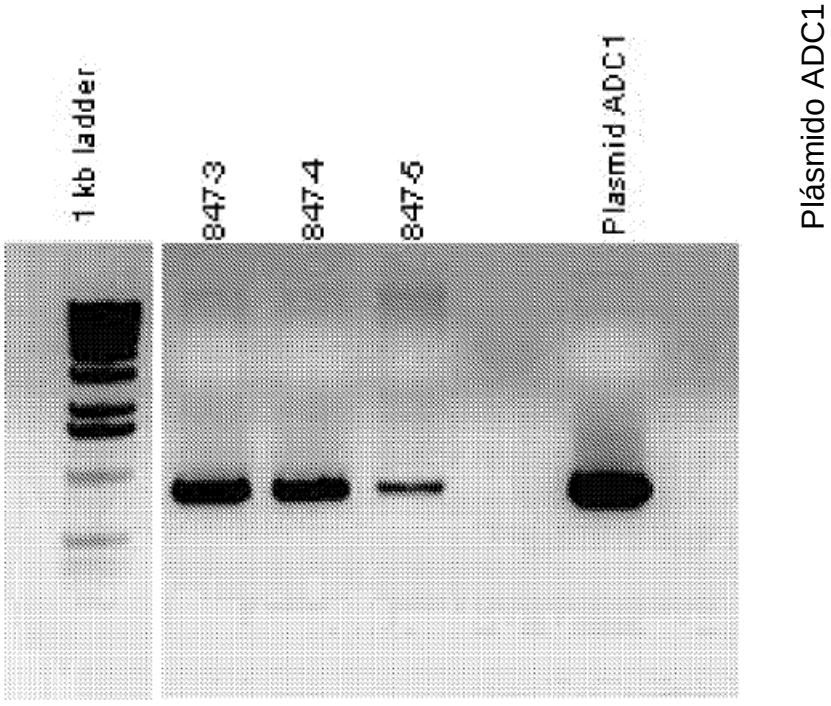
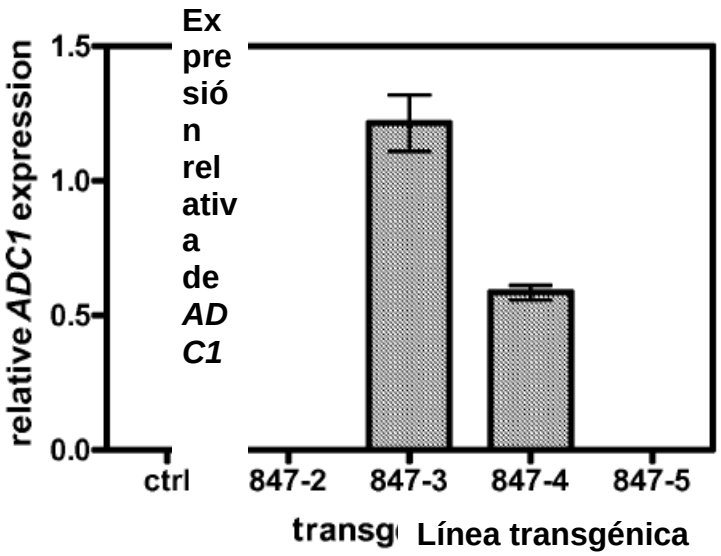

1 kb ladder
847-3
847-4
847-5
Plasmid ADC1
Plásmido ADC1

FIG. 10


relative ADC1 expression
1.5
1.0
0.5
0.0
Expresión relativa de ADC1
ctrl
847-2
847-3
847-4
847-5
transg
Línea transgénica

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- EP 1329153 A **[0005]**
- US 20060225154 A **[0006]**
- ES 200802145 **[0066]**

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **GALOWAY et al.** Phylogenetic utility of the nuclear gene Arginine Decarboxylase: an example from Brassicaceae. *Molecular Biology and Evolution,* 1998, vol. 15, 1312-1320 **[0007]**
- **HUMMEL et al.** Differential gene expression of ARGININE DECARBOXYLASE ADC1 and ADC2 in Arabidopsis thaliana: characterization of transcriptional regulation during seed germination and seedling development. *New Phytologist,* 2004, vol. 163, 519-531 **[0008]**
- **ALCAZAR et al.** Overexpression of ADC2 in Arabidopsis induces dwarfism and late-flowering through GA deficiency. *The Plant Journal,* 2005, vol. 43, 425-436 **[0009]**
- **CHEN et al.** Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning t-DNA insertion from transgenic plants. *Molecular Breeding,* 2003, vol. 11, 289-293 **[0038]**
- **CLOUGH S. J. et al.** Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J.,* 1998, vol. 16, 735-743 **[0039]**
- **MURASHIGE T. et al.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.,* 1962, vol. 15, 473-497 **[0039]**
- **PEIRSON S. N.** Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res.,* 2003, vol. 31, e73 **[0040]**
- **TICHOPAD A. et al.** Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res.,* 2003, vol. 31, e122 **[0040]**
- **MARCÉ M. et al.** Rapid high-perfomance liquid chromatographic method for quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: Application to plant and animal tissues. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.,* 1995, vol. 666, 329-33 **[0041]**
- **R.B. HORSCH et al.** A simple and general method for transferring genes into plants. *Science,* 1985, vol. 227, 1229-1231 **[0047]**