

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 984**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.04.2012 PCT/EP2012/057342**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2012 WO12143545**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2012 E 12717108 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2699683**

54 Título: **Métodos y medios para producir plantas tolerantes a estrés abiótico**

30 Prioridad:

22.04.2011 US 201161517622 P
26.04.2011 GB 201106845

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.04.2017

73 Titular/es:

VIB VZW (50.0%)
Rijvisschestraat 120
9052 Gent, BE y
UNIVERSITEIT GENT (50.0%)

72 Inventor/es:

INZÉ, DIRK, GUSTAAF;
SKIRYCZ, ALEKSANDRA;
CLAEYS, HANNES y
COPPENS, FREDERIK

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 607 984 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

Métodos y medios para producir plantas tolerantes a estrés abiótico

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la biología molecular de plantas, más particularmente al campo de la agricultura, y se refiere a métodos para potenciar la tolerancia a estrés abiótico en plantas modulando la expresión de un gen implicado en la ruta de transducción de señales de etileno durante el periodo de estrés abiótico. La presente invención también proporciona construcciones quiméricas útiles en los métodos de la invención. Además, la invención proporciona plantas transgénicas que tienen una resistencia potenciada a estrés abiótico.

Introducción a la invención

15 El estrés abiótico se define como el impacto negativo de factores no biológicos sobre los organismos vivos en un entorno específico. La variable no biológica debe influenciar en el entorno más allá de su intervalo normal de variación para afectar de forma adversa al rendimiento de la población o la fisiología individual del organismo de un modo significativo. El estrés abiótico es esencialmente inevitable. El estrés abiótico afecta a los animales, pero las plantas son especialmente dependientes de los factores ambientales, de modo que es particularmente restrictivo. El estrés abiótico es el factor más dañino que afecta al crecimiento y productividad de los cultivos en el mundo. La sequía, las temperaturas extremas y los suelos salinos son los estreses abióticos más comunes que encuentran las plantas. Globalmente, aproximadamente el 22% de la tierra agrícola es salina y las áreas bajo sequía ya se están expandiendo y se espera que aumenten más. Otros cultivos están expuestos a múltiples estreses, y la manera en que una planta detecta y responde a diferentes factores ambientales parece ser solapante. El daño más obvio referente al estrés abiótico implica la agricultura. Se ha calculado que el estrés abiótico causa la mayoría de pérdidas de cultivo que cualquier otro factor y que la mayoría de cultivos principales se reducen en su producción en más del 50% de su producción potencial. Además, se ha especulado que esta reducción de la producción solamente empeorará con los drásticos cambios del clima esperados en el futuro. Como el estrés abiótico está ampliamente considerado como un efecto dañino, la investigación en esta área del problema es extensa. Cuando se someter a estrés ambiental, las plantas reducen de forma activa su crecimiento vegetativo para ahorrar y redistribuir recursos y, por tanto, aumentar sus posibilidades de supervivencia cuando el estrés se vuelve severo (Skirycz e Inzé, 2010). Sin embargo, cuando el estrés no amenaza la supervivencia, la inhibición del crecimiento puede verse como contraproducente porque conduce a una bajada innecesaria en la productividad y penalizaciones sustanciales en la producción. Las plantas "más fuertes" que son capaces de crecer durante episodios de estrés leve podrían demostrar un modo eficaz de reforzar la productividad en regiones que no experimentan condiciones meteorológicas severas (Tardieu, 2003). Por lo tanto, la comprensión de los mecanismos subyacentes a la inhibición del crecimiento en respuesta a estrés puede conducir a los puntos de partida para interferir con las reducciones del crecimiento inducidas por estrés. En plantas, el crecimiento de órganos está dirigido por dos procesos fuertemente controlados y dinámicos: la proliferación celular y la posterior expansión celular. La coordinación de estos dos procesos durante el crecimiento de las hojas determina finalmente el tamaño y la forma de las hojas. En dicotiledóneas, tales como las especies modelo *Arabidopsis thaliana*, las hojas se inician el lateral del meristemo y, en la fase inicial, su crecimiento está dirigido exclusivamente por la proliferación celular (Donnelly et al., 1999). En hojas de un poco más de edad, las células saldrán del ciclo celular mitótico y empezarán a expandirse desde la punta en adelante. Esta transición se manifiesta por la aparición de endoreduplicación, que es un ciclo celular modificado en que la replicación prosigue sin mitosis con niveles de mayor ploidía como consecuencia (Beemster et al., 2005). En entornos de agua limitada, las plantas responden por una reducción de rápido crecimiento inicial seguida de adaptación del crecimiento, produciendo hojas con menos células y más pequeñas (Schuppler et al., 1998; Granier y Tardieu, 1999; Aguirrezabal et al., 2006; Skirycz et al., 2010). Aunque previamente se investigaron los procesos implicados en la adaptación del crecimiento a exposición a largo plazo a estrés (Skirycz et al., 2010), el objetivo de la investigación fue aprender más acerca de los mecanismos subyacentes a la inhibición del crecimiento mediada por estrés agudo. Aunque la reducción de la proliferación celular tras la aparición de estrés es un fenómeno bien conocido, el modo en los cambios en el entorno se traducen en tasas reducidas de proliferación está solamente mal comprendido. Al nivel de la maquinaria del ciclo celular, el escenario más frecuentemente propuesto que media la inhibición del ciclo celular inducida por estrés asume la regulación positiva de la transcripción de inhibidores del ciclo celular que pertenecen a la familia del inhibido de quinasa dependiente de ciclina (CDK) (ICK)/proteína relacionada con KIP (KRP) y/o la familia SIAMESE. Se cree que estos inhibidores detienen de forma transitoria la proliferación celular inhibiendo los complejos CDKA/ciclina (De Veylder et al., 2001; Churchman et al., 2006; Peres et al., 2007; Rymen et al., 2007). La actividad de la quinasa A dependiente de ciclina (CDKA), que es un impulsor principal de la progresión del ciclo celular, también puede reducirse mediante degradación dirigida de ciclinas y/o fosforilación inhibitoria, como se muestra para plantas de trigo (*Triticum aestivum*) sometidas a estrés por sequía (Schuppler et al., 1998). Corriente arriba de la maquinaria del ciclo celular, la hormona vegetal ácido abscísico (ABA) ha demostrado afectar a la expresión de los genes *ICK/KRP* y/o *SIAMESE* (Wang et al., 1998; Pettkó-Szandtner et al., 2006). Otra hormona clásica de estrés es el etileno, que demostró acumularse tras sequía (Kalantari et al., 2000; Sobeih et al., 2004) y de forma similar a ABA, se sabe que el precursor de etileno 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) se transporta de la raíz al brote (revisado por Sobeih et al., 2004). Por tanto, ABA y etileno se consideran buenos candidatos para comunicar los cambios en el estado acuoso del suelo a los meristemas. Ejemplos de

efectos positivos, así como negativos del etileno y ABA sobre el crecimiento pueden encontrarse en la bibliografía (revisado por Sharp y LeNoble, 2002; Pierik et al., 2006) pero su papel exacto en la regulación del ciclo celular sigue siendo, en gran medida, desconocido.

5 En la presente invención se examinó el modo en que el estrés por sequía leve afecta a la proliferación celular durante el desarrollo prematuro de las hojas. En contraste con las hojas en expansión, las hojas en plena proliferación de *Arabidopsis* son extremadamente pequeñas (menos de 0,1 mm² de tamaño) y, por tanto, es un reto técnico obtener una base molecular de detención del ciclo celular inducida por estrés con suficiente resolución en el desarrollo y temporal. Con este fin, tuvo que establecerse un novedoso sistema experimental para posibilitar el análisis simultáneo de parámetros relacionados con el crecimiento y mecanismos moleculares específicamente en las hojas en proliferación tras exposición a corto plazo a estrés. A diferencia de muchos estudios previos centrados en estrés muy severo en hojas maduras o plántulas completas (por ejemplo, Fujita et al., 2007; Kant et al., 2007; Papdi et al., 2008), este mecanismo de estrés leve ralentizaba el crecimiento sin afectar a la supervivencia de la planta. Los ejemplos de la invención demuestran claramente que la detención del ciclo celular es una respuesta muy rápida al estrés mediado por mecanismos postranscripcionales en lugar de una cascada transcripcional, con la hormona vegetal etileno corriente arriba de la detención reversible del ciclo celular. Aunque el etileno es una señal primera para la detención del crecimiento, la posterior salida del ciclo celular independiente de etileno sucede de forma relativamente posterior y solamente cuando persiste el estrés. Dicha regulación altamente temporal permite a las plantas afinar su respuesta de crecimiento de acuerdo con la duración del estrés. Por tanto, la presente invención muestra que el etileno es una señal principal responsable de la detención del meristemo durante exposición a estrés y, por tanto, posteriormente contribuye a la penalización del crecimiento asociada a estrés y las pérdidas de producción. Sin embargo, como el etileno tiene efectos pleiotrópicos sobre el crecimiento y desarrollo de la planta, y la modificación ectópica del metabolismo y/o señalización de etileno puede producir varios fenotipos indeseables, hubo la necesidad de reducir la producción de etileno, durante el periodo de estrés abiótico, en los meristemos crecidos de la planta. Se ha demostrado que disminuir los niveles de etileno en tejidos meristemáticos puede aliviar, por lo tanto, la represión observada del crecimiento y, por tanto, limitar las pérdidas de producción. Esto se consiguió construyendo genes quiméricos especializados para la regulación negativa o regulación positiva de genes en la ruta de transducción de señales de etileno. Se demostró sorprendentemente que la detención del crecimiento impuesta por el estrés abiótico podría superarse con un grupo de promotores meristemáticos específicos, aunque este efecto estaba ausente con otros promotores meristemáticos o con promotores que dirigen una expresión constitutiva en plantas.

Leyendas de las figuras

35 Figura 1: Sistema experimental.

(A) Representación esquemática del desarrollo de la hoja 3 con células en proliferación (P, rojo), expansión (E, verde) y maduras (M, blanco). A los 9 días después de la estratificación (DAS), las plantas se transfirieron a manitol y la hoja 3 se diseccionó para el crecimiento, la ploidía y el análisis molecular.

40 (B) Plántulas de nueve días de edad.

(C) Micrografía electrónica de la 3ª y 4ª hoja en 9 DAS.

45 Barras = 2 mm en (B) y 200 µm en (C).

Figura 2: Análisis cinemático de la hoja 3 diseccionada de plantas transferidas a medio de control, que contiene manitol o que contiene ACC en 9 DAS, cuando la 3ª hoja está en plena proliferación.

50 (A) Área de la hoja, tasa relativa de crecimiento de la hoja y porcentaje de reducción del área de la hoja causada por manitol o ACC.

(B) Cantidad de células, tasas relativas de división celular y porcentaje de reducción de la cantidad de células causada por manitol o ACC.

55 (C) Plantas 6 días después de la transferencia al medio de control, que contiene manitol o que contiene ACC. El círculo rojo marca la 3ª hoja. Barra = 2 cm.

(D) Área celular.

60 (E) Índice estomático.

(A-E) Los datos ± error típico (SE) son las medias de tres experimentos independientes. El área de la hoja se midió para 8-10 hojas en cada experimento. Los datos celulares son de cuatro hojas en cada experimento.

65 Figura 3: El estrés osmótico detiene el ciclo celular y posteriormente desencadena la salida del ciclo celular.

(A) Análisis de ploidía de la hoja 3 diseccionada de plantas transferidas a medio de control, que contiene manitol o que contiene ACC en 9 DAS cuando la 3ª hoja está en plena proliferación. Se presenta el porcentaje de núcleos 2C, 4C, y 8C. El significa índice de endorreduplicación y representa la cantidad promedio de endociclos experimentados por un núcleo típico ($EI=1*4C+2*8C+3*16C$). Los datos \pm SE son las medias de tres experimentos independientes con múltiples hojas combinadas en cada experimento.

(B) Hoja 3 de plantas *CYCB1;1:DBox-GUS* 48 h (11 DAS) después de la transferencia a medio de control, que contiene manitol o que contiene ACC. La tinción azul indica la actividad mitótica. El punto naranja indica la punta de la hoja. Barra de escala = 0,5 mm.

Figura 4: Efectos de duración variable del estrés sobre las hojas en proliferación.

Las plantas se transfirieron a placas que contenían manitol en 9 DAS y después de ello se transfirieron de nuevo a placas de control después de 10 h (10M), 24 h (24M) o 48 h (48M) de tratamiento con manitol, o se mantuvieron en placas de manitol (M). La tercera hoja se diseccionó para análisis adicional.

(A) Reducción del área de la hoja en 10 DAS (24 h después de la primera transferencia).

(B) Reducción del área de la hoja y la cantidad de células en 14 DAS.

(C) Análisis de ploidía. El significa índice de endorreduplicación y representa la cantidad promedio de endociclos experimentados por un núcleo típico. Los datos \pm SE son las medias de tres experimentos independientes con múltiples hojas medidas en cada experimento.

Figura 5: Efectos del estrés osmótico sobre la actividad de división meristemoide y la zona de proliferación.

Las plantas se transfirieron a placas que contenían manitol en 9 DAS y después de ello se transfirieron de nuevo a placas de control después de 48 h de tratamiento con manitol (48M) o se mantuvieron en placas de manitol (M). La tercera hoja se diseccionó para análisis adicional.

(A) Actividad de división meristemoide determinada por tinción *CYCB1;1:DBox-GUS*, expresada respecto al control. Los datos \pm SE son las medias de tres experimentos independientes con 6-12 hojas medidas en cada experimento. Se representa un meristemoide activo representativo a la izquierda.

(B) Base de la hoja de la 3ª hoja teñida para la expresión de *CYCB1;1:DBox-GUS* en 14 DAS. Aún puede observarse alguna actividad mitótica en la zona de proliferación de las hojas tratadas con manitol. Barra = 0,5 mm.

Figura 6: Efectos del estrés osmótico sobre el ciclo celular.

(A) Mapa térmico de genes seleccionados del ciclo celular regulados de forma diferencial por estrés osmótico en la 3ª hoja en plena proliferación 1,5, 3, 12 y 24 h después de la imposición del estrés. Los datos son de series Affymetrix ATH1 y se expresan como el \log_2 del cambio factorial (manitol - control). El rojo y el verde indican regulación positiva y regulación negativa, respectivamente.

(B) Actividad CDKA relativa medida en la 3ª hoja en proliferación, microdiseccionada de plantas transferidas a medio de control, que contiene manitol o que contiene ACC 10 y 24 h después de la transferencia. Los datos \pm SE son las medias de dos (24 h) o tres experimentos independientes (10 h) con \pm 50 hojas combinadas en cada experimento.

Figura 7: Aumento rápido en los niveles de ACC después de la imposición del estrés.

(A) Mapa térmico de genes seleccionados de señalización de etileno regulados de forma diferencial por estrés osmótico en la 3ª hoja en plena proliferación 1,5, 3, 12 y 24 h después de la imposición del estrés. Los datos son de series Affymetrix ATH1 y se expresan como el \log_2 del cambio factorial (manitol - control). El rojo y el verde indican regulación positiva y regulación negativa, respectivamente.

(B) Se determinaron los niveles de ACC en brotes de plántulas 9-DAS 1 h y 10 h después de la transferencia a manitol. Los datos son la media \pm SE de múltiples plantas de tres experimentos independientes.

Figura 8: Implicación de la señalización de etileno en la detención del ciclo celular.

(D-F) Mutantes insensibles a etileno. Porcentaje de reducción en el área foliar (C) y en la cantidad de células de la 3ª hoja de mutantes insensibles a etileno tratados con manitol frente a plantas de tipo silvestre (WT) (D). Porcentaje de reducción en el área foliar de la 3ª hoja de mutantes insensibles a etileno tratados con ACC frente a plantas de tipo silvestre (WT) (E). Ejemplo de plántulas de tipo silvestre (WT), *ein3*, *etr1* y *ein5* 6 días después de la transferencia a ACC (F).

(C-E) Los datos \pm SE son las medias de dos o tres experimentos independientes. El área foliar se midió para un mínimo de 8-10 hojas en cada experimento. Los datos celulares fueron de cuatro hojas en cada experimento. D, DAS.

5 Figura 9: Esquema simplificado que representa la regulación de la inhibición del ciclo celular y la diferenciación celular en respuesta al estrés osmótico.

10 Muy rápidamente (en horas) después de la imposición del estrés, se desencadena la producción de etileno, inhibiendo la actividad CDKA a través de un mecanismo postranscripcional que inhibe de forma reversible el ciclo celular por detención G1/S y G2/M. La detención del ciclo celular es independiente del control transcripcional de EIN3 y posiblemente está mediado por una ruta de señalización de MAPK o la ribonucleasa EIN5. En una fase posterior, una señal diferente conduce a inhibición permanente y salida del ciclo celular mitótico en favor del endociclo y la diferenciación celular. Posteriormente en el desarrollo de la hoja, la actividad de división meristemoide se hace mayor en hojas estresadas y la división meristemoide potenciada provoca una pequeña recuperación de las cantidades de células.

15 Figura 10: La expresión se midió en ARN aislado de brotes de 8 días de edad por PCR con cebadores específicos para la ACC desaminasa bacteriana o la ACC desaminasa de *Arabidopsis thaliana*. Como control se usó el gen de referencia PP2AA3 (entrada a genbank AT1G13320).

20 Figura 11: Área foliar en D11 (48 horas después de la aparición del estrés); barras azules (barra izquierda) = control, barras rojas (barra derecha) = manitol 25 mM; las barras de error indican SEM.

25 Figura 12: Área foliar en D11 (48 horas después de la aparición del estrés); barras azules (barras izquierdas) = control, barras rojas (barras derechas) = manitol 25 mM; las barras de error indican SEM.

30 Figura 13: Área foliar en D11 (48 horas después de la aparición del estrés); barras azules (barras izquierdas) = control, barras rojas (barras derechas) = manitol 25 mM; las barras de error indican SEM.

35 Figura 14: Área foliar en D11 (48 horas después de la aparición del estrés); barras azules (barras izquierdas) = control, barras rojas (barras derechas) = manitol 25 mM; las barras de error indican SEM.

40 Figura 15: Área foliar en D11 (48 horas después de la aparición del estrés); barras azules (barras izquierdas) = control, barras rojas (barras derechas) = manitol 25 mM; las barras de error indican SEM.

45 Figura 16: Área foliar en D11 (48 horas después de la aparición del estrés); barras azules (barras izquierdas) = control, barras rojas (barras derechas) = manitol 25 mM; las barras de error indican SEM

40 Descripción detallada de la invención

Para facilitar la comprensión de esta invención, a continuación se definen varios términos. Los términos definidos en este documento (salvo que se especifique de otro modo) tienen significados comprendidos habitualmente por los expertos en las áreas relevantes a la presente invención. Como se usa en esta memoria descriptiva y sus reivindicaciones adjuntas, términos tales como "uno", "una" y "el", "la" no pretenden hacer referencia solamente a una entidad singular, sino que incluyen la clase general de la cual puede usarse un ejemplo específico para ilustración, salvo que el contexto indique otra cosa. La terminología de este documento se usa para describir realizaciones específicas de la invención, pero su uso no determina la invención, excepto lo perfilado en las reivindicaciones.

50 A pesar de su importancia para la agricultura, la inhibición del crecimiento inducida por estrés ambiental, que es responsable de reducciones significativas de la producción, está solamente mal comprendida. En la presente invención, se desentrañaron los mecanismos moleculares subyacentes a la inhibición del ciclo celular en hojas jóvenes en proliferación de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* cuando se sometía a estrés osmótico leve. Un análisis celular detallado demostró que en cuanto se detecta estrés osmótico, la progresión del ciclo celular se detiene rápidamente, pero las células se mantienen en un estado ambivalente, permitiendo una rápida recuperación ("pausa"). De forma destacable, se descubrió que la detención del ciclo celular coincide con un aumento en los niveles de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) y la activación de la señalización de etileno. Un estudio cuidadoso mostró que el etileno actúa sobre la progresión del ciclo celular mediante la inhibición de la actividad quinasa A dependiente de ciclina independientemente del control transcripcional de *EIN3*. Sin embargo, cuando persiste el estrés, las células sales del ciclo celular mitótico e inician el proceso de diferenciación ("parada"), reflejado por la prematura aparición de endorreproducción, en un proceso independiente de etileno.

65 Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para producir una planta tolerante a estrés abiótico respecto a una planta de control, disminuyendo la ruta de transducción de señales de etileno en dicha planta durante el periodo de estrés abiótico impuesto sobre dichas plantas, que comprende introducir y expresar en dicha planta un

gen quimérico que comprende un promotor específico de meristemo unido de forma funcional a un gen o fragmento génico derivado de la ruta de transducción de señales de etileno. En una realización particular, dicho estrés abiótico (o estrés ambiental que es equivalente) es estrés leve. El significado de "estrés leve" es evidente a partir del texto de la solicitud y los ejemplos adjuntos adicionales.

La expresión "disminuir la ruta de transducción de señales de etileno" implica que la producción de etileno se reduce (en un cierto punto en el tiempo, es decir, cuando la planta sufre estrés abiótico) en la planta con respecto a una planta de control. Los genes implicados en la ruta de transducción de señales de etileno son bien conocidos en la técnica. Una lista de genes para los que tienen que regularse negativamente al menos un gen para que tenga el efecto de la producción reducida de etileno consiste en la siguiente lista: ACO1, ACO2, ETR2, ETR1, CTR1, MKK7, MKK9, EIN3, EIN5 o EIL1. A la inversa, una lista de genes para los que tiene que regularse positivamente al menos un gen para que tenga el efecto de la producción reducida de etileno consiste en la siguiente lista: EBF1, EBF2, ACC desaminasa, un receptor de etileno negativo dominante o un factor de transcripción negativo dominante EIN3 o EIL1. Se entiende en la presente invención que la reducción de etileno en la planta transgénica sucede preferentemente en los tejidos proliferativos de interés en la planta, más particularmente en los tejidos meristemáticos de las plantas transgénicas.

El concepto de un receptor de etileno negativo dominante es bien conocido en la técnica. Un receptor que comprende una mutación dominante altera la actividad de unión a etileno y plantas transgénicas que comprenden un gen quimérico que codifica un receptor de etileno negativo dominante son insensibles a etileno. Un mutante del receptor dominante ETR1 habitualmente usado es la mutación dominante *etr1-1* como se describe en Bleecker et al. (1998) Science 241: 1086-9.

El concepto de un factor de transcripción negativo dominante también está bien descrito en la técnica. Ejemplos no limitantes son factores de transcripción con mutaciones en el dominio de unión a ADN o factores de transcripción que comprenden mutaciones en el dominio de transactivación.

Un representante de la ACC desaminasa de *Arabidopsis thaliana* es AT1G48420 (es decir, el código AGI para el gen de *Arabidopsis*). ACC es el precursor de etileno y las ACC desaminasas son un grupo de enzimas que escinden ACC en amoniaco y α -cetobutirato. Pueden identificarse varios genes ortólogos para los genes de ACC desaminasa en bases de datos de secuencias disponibles al público (los números de acceso de la base de datos están entre paréntesis: *Arabidopsis lyrata* (AL1G42050), *Arabidopsis thaliana* (AT1G48420), *Brachypodium distachyon* (BD3G57520), *Brachypodium distachyon* (BD4G03710), *Carica papaya* (CP00007G01400), *Chlamydomonas reinhardtii* (CR07G01440), *Glycine max* (GM05G33540), *Glycine max* (GM08G06170), *Lotus japonicas* (LJ0G028460), *Malus domestica* (MD14G022550), *Malus domestica* (MD00G198360), *Manihot esculenta* (ME04612G00040), *Micromonas sp.* RCC299 (MRCC299_11G02790), *Medicago truncatula* (MT4G61890), *Ostreococcus lucimarinus* (OL17G01760), *Oryza sativa ssp. japonica* (OS02G53330), *Oryza sativa ssp. indica* (OSINDICA_02G51690), *Ostreococcus tauri* (OT09G01960), *Physcomitrella patens* (PP00224G00230), *Populus trichocarpa* (PT12G03410), *Ricinus communis* (RC29662G00090), *Sorghum bicolor* (SB04G034640), *Selaginella moellendorffii* (SM00001G01880), *Selaginella moellendorffii* (SM00016G03880), *Selaginella moellendorffii* (SM00016G03890), *Selaginella moellendorffii* (SM00001G01870), *Volvox carteri* (VC00048G01110), *Vitis vinifera* (VV00G26680), *Zea mays* (ZM05G34830).

Un representante para el gen ACO2 (ACC oxidasa) de *Arabidopsis thaliana* es AT1 G62380 (es decir, el código AGI para el gen de *Arabidopsis*). ACC se transporta a los meristemos desde las raíces donde se convierte en etileno por la actividad de ACC oxidasas. Pueden identificarse varios genes ortólogos para los genes ACO2 en bases de datos de secuencias disponibles al público (los números de acceso de la base de datos se describen después del nombre de la especie): *Arabidopsis lyrata* AL2G03110, *Arabidopsis lyrata* AL1G12340, *Arabidopsis thaliana* AT1G62380, *Arabidopsis thaliana* AT1G12010, *Carica papaya* CP00132G00310, *Carica papaya* CP00152G00570, *Glycine max* GM07G39420, *Glycine max* GM17G01330, *Glycine max* GM15G11930, *Glycine max* GM09G01110, *Malus domestica* MD00G333820, *Malus domestica* MD00G333830, *Malus domestica* MD17G009150, *Malus domestica* MD05G001020, *Malus domestica* MD10G027080, *Manihot esculenta* ME08317G00820, *Medicago truncatula* MT3G41110, *Medicago truncatula* MT5G67830, *Medicago truncatula* MT8G56840, *Medicago truncatula* MT8G56830, *Populus trichocarpa* PT04G00270, *Populus trichocarpa* PT11G00780, *Vitis vinifera* VV12G11440, *Brachypodium distachyon* BD3G57620, *Lotus japonicas* LJ0G427530, *Oryza sativa ssp. japonica* OS09G27750, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_09G22130, *Physcomitrella patens* PP00287G00300, *Ricinus communis* RC49629G00010, *Sorghum bicolor* SB04G034520, *Selaginella moellendorffii* SM00010G00400, *Selaginella moellendorffii* SM00026G03400, *Selaginella moellendorffii* SM00006G03800, *Selaginella moellendorffii* SM00006G03820, *Selaginella moellendorffii* SM00006G03790, *Selaginella moellendorffii* SM00006G03780, *Zea mays* ZM07G12430.

Un representante para el gen ACO1 (ACC oxidasa) de *Arabidopsis thaliana* es AT2G19590 (es decir, el código AGI para el gen de *Arabidopsis*). ACC se transporta a los meristemos desde las raíces donde se convierte en etileno por la actividad de ACC oxidasas. Pueden identificarse varios genes ortólogos para los genes ACO1 en bases de datos de secuencias disponibles al público (los números de acceso de la base de datos se describen después del nombre de la especie): *Arabidopsis lyrata* AL3G36600, *Arabidopsis thaliana* AT2G19590, *Brachypodium distachyon*

BD1G37420, *Glycine max* GM07G15480, *Glycine max* GM05G36310, *Glycine max* GM08G03310, *Glycine max* GM01G01170, *Lotus japonicas* LJ2G008930, *Malus domestica* MD15G014610, *Manihot esculenta* ME01863G00320, *Oryza sativa ssp. japonica* OS06G37590, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_06G33260, *Populus trichocarpa* PT06G15230, *Ricinus communis* RC29912G00850, *Sorghum bicolor* SB10G022640, *Vitis vinifera* VV11G03750, *Zea mays* ZM06G11580, *Carica papaya* CP00132G00310, *Medicago truncatula* MT3G41110, *Medicago truncatula* MT5G67830, *Physcomitrella patens* PP00046G00760, *Physcomitrella patens* PP00283G00400, *Selaginella moellendorffii* SM00026G03400, *Selaginella moellendorffii* SM00098G00980.

Un representante para el gen EIN3 de *Arabidopsis thaliana* es AT3G20770 (es decir, el código AGI para el gen de *Arabidopsis*). EIN3 es un factor de transcripción central en la cascada de señalización de etileno. Pueden identificarse varios genes ortólogos para los genes EIN3 en bases de datos de secuencias disponibles al público (los números de acceso de la base de datos se describen después del nombre de la especie): *Arabidopsis lyrata* AL3G22790, *Arabidopsis lyrata* AL4G10480, *Arabidopsis thaliana* AT3G20770, *Arabidopsis thaliana* AT2G27050, *Brachypodium distachyon* BD1G63780, *Brachypodium distachyon* BD3G46690, *Brachypodium distachyon* BD3G46680, *Brachypodium distachyon* BD4G33750, *Brachypodium distachyon* BD3G39970, *Brachypodium distachyon* BD5G12130, *Carica papaya* CP00103G00550, *Carica papaya* CP00054G00220, *Glycine max* GM20G12250, *Glycine max* GM13G03700, *Glycine max* GM13G03660, *Glycine max* GM14G04550, *Glycine max* GM02G44220, *Lotus japonicas* LJ2G036110, *Malus domestica* MD00G054980, *Malus domestica* MD02G025170, *Malus domestica* MD00G131400, *Malus domestica* MD00G407350, *Malus domestica* MD08G022690, *Malus domestica* MD07G004090, *Malus domestica* MD00G335120, *Manihot esculenta* ME04048G00040, *Medicago truncatula* MT5G69950, *Medicago truncatula* MT0G29830, *Oryza sativa ssp. japonica* OS03G20790, *Oryza sativa ssp. japonica* OS03G20780, *Oryza sativa ssp. japonica* OS08G39830, *Oryza sativa ssp. japonica* OS07G17160, *Oryza sativa ssp. japonica* OS02G36510, *Oryza sativa ssp. japonica* OS07G48630, *Oryza sativa ssp. japonica* OS09G31400, *Oryza sativa ssp. japonica* OS04G38400, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_03G19810, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_04G29950, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_02G35300, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_07G14940, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_09G25260, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_08G38220, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_07G40580, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_05G02810, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_08G38160, *Physcomitrella patens* PP00087G00240, *Populus trichocarpa* PT09G15890, *Populus trichocarpa* PT04G19690, *Populus trichocarpa* PT08G01010, *Populus trichocarpa* PT10G24230, *Populus trichocarpa* PT01G05180, *Populus trichocarpa* PT01G05170 1, *Ricinus communis* RC29708G00010, *Ricinus communis* RC30169G01650, *Sorghum bicolor* SB01G036740, *Sorghum bicolor* SB07G027790, *Sorghum bicolor* SB04G023730, *Sorghum bicolor* SB06G018710, *Sorghum bicolor* SB02G043350, *Sorghum bicolor* SB02G028390, *Selaginella moellendorffii* SM00043G02600, *Selaginella moellendorffii* SM00144G00050, *Selaginella moellendorffii* SM00042G02400, *Selaginella moellendorffii* SM00088G00860, *Zea mays* ZM01G12220, *Zea mays* ZM09G17170, *Zea mays* ZM02G11960, *Zea mays* ZM05G25920, *Zea mays* ZM07G25000, *Zea mays* ZM02G33750, *Zea mays* ZM07G14110, *Vitis vinifera* VV06G06520, *Vitis vinifera* VV06G12160.

Los representantes para los genes EIL1 de *Arabidopsis thaliana* son AT2G27050, At5G21120 y At1G73730 (es decir, los códigos AGI para los genes de *Arabidopsis*). Los genes EIL1 codifican factores centrales de la transcripción en la cascada de señalización de etileno. Pueden identificarse varios genes ortólogos para los genes EIL1 en bases de datos de secuencias disponibles al público (los números de acceso de la base de datos se describen después del nombre de la especie):

l) genes ortólogos para AT2G27050:

Arabidopsis lyrata AL4G10480, *Arabidopsis lyrata* AL3G22790, *Arabidopsis thaliana* AT2G27050, *Arabidopsis thaliana* AT3G20770, *Brachypodium distachyon* BD1G63780, *Brachypodium distachyon* BD3G46690, *Brachypodium distachyon* BD3G46680, *Brachypodium distachyon* BD4G33750, *Brachypodium distachyon* BD3G39970, *Brachypodium distachyon* BD5G12130, *Carica papaya* CP00103G00550, *Carica papaya* CP00054G00220, *Glycine max* GM14G04550, *Glycine max* GM02G44220, *Glycine max* GM20G12250, *Glycine max* GM13G03700, *Glycine max* GM13G03660, *Glycine max* GM06G47160, *Lotus japonicus* LJ2G036110, *Malus domestica* MD00G054980, *Malus domestica* MD02G025170, *Malus domestica* MD00G131400, *Malus domestica* MD07G004090, *Malus domestica* MD00G407350, *Malus domestica* MD08G022690, *Malus domestica* MD00G335120, *Manihot esculenta* ME04048G00040, *Medicago truncatula* MT5G69950, *Medicago truncatula* MT0G29830, *Oryza sativa ssp. japonica* OS03G20780, *Oryza sativa ssp. japonica* OS03G20790, *Oryza sativa ssp. japonica* OS02G36510, *Oryza sativa ssp. japonica* OS07G17160, *Oryza sativa ssp. japonica* OS04G38400, *Oryza sativa ssp. japonica* OS08G39830, *Oryza sativa ssp. japonica* OS07G48630, *Oryza sativa ssp. japonica* OS09G31400, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_03G19810, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_04G29950, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_02G35300, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_07G14940, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_09G25260, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_08G38220, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_07G40580, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_05G02810, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_08G38160, *Physcomitrella patens* PP00087G00240, *Populus trichocarpa* PT09G15890, *Populus trichocarpa* PT04G19690, *Populus trichocarpa* PT10G24230, *Populus trichocarpa* PT08G01010, *Ricinus communis* RC29708G00010, *Sorghum bicolor* SB01G036740, *Sorghum bicolor* SB04G023730, *Sorghum bicolor* SB06G018710, *Sorghum bicolor* SB02G043350, *Sorghum bicolor* SB02G028390, *Selaginella moellendorffii* SM00043G02600, *Selaginella moellendorffii* SM00144G00050, *Selaginella moellendorffii*

SM00042G02400, *Selaginella moellendorffii* SM00088G00860, *Zea mays* ZM09G17170, *Zea mays* ZM01G12220, *Zea mays* ZM02G33750, *Zea mays* ZM05G25920, *Zea mays* ZM02G11960, *Zea mays* ZM07G25000, *Zea mays* ZM07G14110, *Vitis vinifera* VV06G06520, *Vitis vinifera* VV06G12160.

5 II) genes ortólogos para AT5G21120:

Arabidopsis lyrata AL6G21370, *Arabidopsis lyrata* AL4G10480, *Arabidopsis thaliana* AT5G21120, *Carica papaya* CP00103G00550, *Carica papaya* CP00020G02350, *Glycine max* GM02G44220, *Glycine max* GM13G03660, *Glycine max* GM13G03700, *Glycine max* GM14G04550, *Glycine max* GM20G12250, *Glycine max* GM05G31410, *Glycine max* GM08G14630, *Glycine max* GM18G02190, *Glycine max* GM13G41750, *Glycine max* GM15G03650, *Glycine max* GM06G47160, *Glycine max* GM04G14900, *Lotus japonicus* LJ2G036110, *Lotus japonicus* LJ3G015320, *Medicago truncatula* MT0G29830, *Medicago truncatula* MT3G36600, *Medicago truncatula* MT4G55800, *Medicago truncatula* MT6G16890, *Medicago truncatula* MT2G47310, *Medicago truncatula* MT5G69950, *Populus trichocarpa* PT04G19690, *Populus trichocarpa* PT09G15890, *Populus trichocarpa* PT01G05170, *Populus trichocarpa* PT01G05180, *Populus trichocarpa* PT03G21140, *Vitis vinifera* VV06G06520, *Vitis vinifera* VV06G12160, *Brachypodium distachyon* BD1G63780, *Brachypodium distachyon* BD3G46690, *Brachypodium distachyon* BD3G46680, *Brachypodium distachyon* BD4G33750, *Brachypodium distachyon* BD3G39970, *Brachypodium distachyon* BD5G12130, *Malus domestica* MD00G054980, *Malus domestica* MD00G131400, *Malus domestica* MD00G407350, *Malus domestica* MD02G025170, *Malus domestica* MD00G437780, *Malus domestica* MD00G437790, *Malus domestica* MD00G058260, *Malus domestica* MD00G436270, *Malus domestica* MD00G436370, *Malus domestica* MD00G058250, *Malus domestica* MD11G001760, *Manihot esculenta* ME04048G00040, *Manihot esculenta* ME10578G00030, *Manihot esculenta* ME04747G00240, *Manihot esculenta* ME02229G00960, *Oryza sativa ssp. japonica* OS03G20780, *Oryza sativa ssp. japonica* OS03G20790, *Oryza sativa ssp. japonica* OS02G36510, *Oryza sativa ssp. japonica* OS07G17160, *Oryza sativa ssp. japonica* OS09G31400, *Oryza sativa ssp. japonica* OS08G39830, *Oryza sativa ssp. japonica* OS04G38400, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_03G19810, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_02G35300, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_07G14940, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_04G29950, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_09G25260, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_08G38160, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_08G38220, *Physcomitrella patens* PP00087G00240, *Physcomitrella patens* PP00011G01730, *Ricinus communis* RC29708G00010, *Ricinus communis* RC29713G00060, *Ricinus communis* RC30169G01650, *Ricinus communis* RC29713G00070, *Sorghum bicolor* SB01G036740, *Sorghum bicolor* SB04G023730, *Sorghum bicolor* SB06G018710, *Sorghum bicolor* SB02G028390, *Sorghum bicolor* SB07G027790, *Selaginella moellendorffii* SM00144G00050, *Selaginella moellendorffii* SM00043G02600, *Selaginella moellendorffii* SM00042G02400, *Selaginella moellendorffii* SM00088G00860, *Zea mays* ZM01G12220, *Zea mays* ZM05G25920, *Zea mays* ZM07G14110, *Zea mays* ZM02G11960.

35 III) genes ortólogos para AT1G73730:

Arabidopsis lyrata AL2G22590 4, *Arabidopsis thaliana* AT1G73730, *Brachypodium distachyon* BD4G33750, *Brachypodium distachyon* BD3G39970, *Glycine max* GM15G03650, *Glycine max* GM13G41750, *Lotus japonicus* LJ3G015320, *Malus domestica* MD11G001760, *Malus domestica* MD00G058250, *Malus domestica* MD00G436270, *Malus domestica* MD00G058260, *Malus domestica* MD00G436370, *Manihot esculenta* ME04747G00240, *Manihot esculenta* ME02229G00960, *Medicago truncatula* MT2G47310, *Medicago truncatula* MT6G16890, *Oryza sativa ssp. japonica* OS09G31400, *Oryza sativa ssp. japonica* OS08G39830, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_09G25260, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_08G38220, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_08G38160, *Populus trichocarpa* PT01G05170, *Populus trichocarpa* PT03G21140, *Populus trichocarpa* PT01G05180, *Ricinus communis* RC30169G01650, *Sorghum bicolor* SB02G028390, *Sorghum bicolor* SB07G027790, *Vitis vinifera* VV06G06520, *Zea mays* ZM07G14110, *Carica papaya* CP00103G00550, *Carica papaya* CP00020G02350, *Physcomitrella patens* PP00087G00240, *Physcomitrella patens* PP00011G01730, *Selaginella moellendorffii* SM00144G00050, *Selaginella moellendorffii* SM00043G02600, *Selaginella moellendorffii* SM00042G02400, *Selaginella moellendorffii* SM00088G00860.

50 Un gen representante para el gen EBF1 de *Arabidopsis thaliana* es AT5G25350 (es decir, el código AGI para el gen de *Arabidopsis*). El gen EBF1 codifica una proteína que media la degradación de los factores de transcripción EIN3 y EIL1. Pueden identificarse varios genes ortólogos para el gen EBF1 en bases de datos de secuencias disponibles al público (los números de acceso de la base de datos se describen después del nombre de la especie): *Arabidopsis lyrata* AL6G25490, *Arabidopsis lyrata* AL4G06680, *Arabidopsis thaliana* AT5G25350, *Arabidopsis thaliana* AT2G25490, *Brachypodium distachyon* BD3G07400, *Brachypodium distachyon* BD1G36530, *Carica papaya* CP00750G00010, *Carica papaya* CP00046G00080, *Glycine max* GM17G31940, *Glycine max* GM14G14410, *Glycine max* GM04G07110, *Glycine max* GM06G07200, *Glycine max* GM17G12270, *Glycine max* GM13G23510, *Glycine max* GM04G20330, *Lotus japonicus* LJ5G007560, *Lotus japonicus* LJ0G118050, *Malus domestica* MD15G006340, *Malus domestica* MD08G015310, *Malus domestica* MD00G485600, *Malus domestica* MD00G097680, *Malus domestica* MD15G010590, *Malus domestica* MD00G026250, *Manihot esculenta* ME10594G01970, *Manihot esculenta* ME09799G00070, *Manihot esculenta* ME02262G00040, *Medicago truncatula* MT1G06810, *Medicago truncatula* MT3G54680, *Medicago truncatula* MT8G41850, *Medicago truncatula* MT8G41910, *Oryza sativa ssp. japonica* OS02G10700, *Oryza sativa ssp. japonica* OS06G40360, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_02G10230, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_06G35900, *Physcomitrella patens* PP00352G00060, *Physcomitrella patens* PP00188G00250, *Populus trichocarpa* PT18G01520, *Populus trichocarpa* PT06G25310, *Populus trichocarpa*

PT18G12120, *Populus trichocarpa* PT06G06580, *Ricinus communis* RC29848G01830, *Ricinus communis* RC28320G00720, *Sorghum bicolor* SB04G006870, *Sorghum bicolor* SB10G023670, *Selaginella moellendorffii* SM00051G01700, *Selaginella moellendorffii* SM00071G00630, *Selaginella moellendorffii* SM00003G03080, *Selaginella moellendorffii* SM00025G01420, *Vitis vinifera* VV04G12150, *Vitis vinifera* VV11G06560, *Zea mays* ZM05G19050, *Zea mays* ZM09G10590, *Zea mays* ZM06G11160, *Chlamydomonas reinhardtii* CR12G15690, *Micromonas sp.* RCC299 MRCC299_14G00750, *Volvox carteri* VC00010G02190.

Un gen representante para el gen EBF2 de *Arabidopsis thaliana* es AT2G25490 (es decir, el código AGI para el gen de *Arabidopsis*). El gen EBF2 codifica una proteína que media la degradación de los factores de transcripción EIN3 y EIL1. Pueden identificarse varios genes ortólogos para el gen EBF2 en bases de datos de secuencias disponibles al público (los números de acceso de la base de datos se describen después del nombre de la especie): *Arabidopsis lyrata* AL4G06680, *Arabidopsis lyrata* AL6G25490, *Arabidopsis thaliana* AT2G25490, *Arabidopsis thaliana* AT5G25350, *Brachypodium distachyon* BD3G07400, *Brachypodium distachyon* BD1G36530, *Carica papaya* CP00750G00010, *Carica papaya* CP00046G00080, *Glycine max* GM14G14410, *Glycine max* GM17G31940, *Glycine max* GM04G07110, *Glycine max* GM06G07200, *Glycine max* GM17G12270, *Glycine max* GM13G23510, *Glycine max* GM04G20330, *Lotus japonicus* LJ5G007560, *Lotus japonicus* LJ0G118050, *Malus domestica* MD15G006340, *Malus domestica* MD08G015310, *Malus domestica* MD00G485600, *Malus domestica* MD00G097680, *Malus domestica* MD15G010590, *Malus domestica* MD00G026250, *Manihot esculenta* ME10594G01970, *Manihot esculenta* ME09799G00070, *Manihot esculenta* ME02262G00040, *Medicago truncatula* MT1G06810, *Medicago truncatula* MT3G54680, *Medicago truncatula* MT8G41850, *Medicago truncatula* MT8G41910, *Oryza sativa ssp. japonica* OS02G10700, *Oryza sativa ssp. japonica* OS06G40360, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_02G10230, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_06G35900, *Physcomitrella patens* PP00352G00060, *Physcomitrella patens* PP00188G00250, *Populus trichocarpa* PT18G01520, *Populus trichocarpa* PT06G25310, *Populus trichocarpa* PT18G12120, *Populus trichocarpa* PT06G06580, *Ricinus communis* RC29848G01830, *Ricinus communis* RC28320G00720, *Sorghum bicolor* SB04G006870, *Sorghum bicolor* SB10G023670, *Selaginella moellendorffii* SM00051G01700, *Selaginella moellendorffii* SM00071G00630, *Selaginella moellendorffii* SM00003G03080, *Selaginella moellendorffii* SM00025G01420, *Vitis vinifera* VV04G12150, *Vitis vinifera* VV11G06560, *Zea mays* ZM05G19050, *Zea mays* ZM09G10590, *Zea mays* ZM06G11160, *Chlamydomonas reinhardtii* CR28G00230, *Micromonas sp.* RCC299 MRCC299_14G00750, *Volvox carteri* VC00010G02190.

Un gen representante para el gen EIN5 de *Arabidopsis thaliana* es AT1G54490 (es decir, el código AGI para el gen de *Arabidopsis*). El gen EIN5 codifica una exorribonucleasa cadena arriba de los transcritos EBF1 y EBF2. Pueden identificarse varios genes ortólogos para el gen EIN5 en bases de datos de secuencias disponibles al público (los números de acceso de la base de datos se describen después del nombre de la especie): *Arabidopsis thaliana* AT1G54490, *Brachypodium distachyon* BD1G05660, *Brachypodium distachyon* BD2G56440, *Carica papaya* CP00117G00640, *Carica papaya* CP00076G00580, *Chlamydomonas reinhardtii* CR16G06690, *Chlamydomonas reinhardtii* CR06G06580, *Chlamydomonas reinhardtii* CR03G00960, *Glycine max* GM19G43160, *Glycine max* GM03G40500, *Glycine max* GM20G37260, *Glycine max* GM10G30150, *Glycine max* GM14G40510, *Lotus japonicus* LJ0G413420, *Lotus japonicus* LJ5G017580, *Malus domestica* MD12G023600, *Malus domestica* MD04G017840, *Malus domestica* MD00G306770, *Malus domestica* MD00G371520, *Manihot esculenta* ME10645G00090, *Manihot esculenta* ME07086G00150, *Medicago truncatula* MT7G55810, *Medicago truncatula* MT1G31820, *Medicago truncatula* MT7G60440, *Medicago truncatula* MT7G60430, *Medicago truncatula* MT0G01060, *Ostreococcus lucimarinus* OL06G03410, *Ostreococcus lucimarinus* OL06G03860, *Oryza sativa ssp. japonica* OS03G58060, *Oryza sativa ssp. japonica* OS01G65220, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_03G55400, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_01G61870, *Ostreococcus tauri* OT06G03610, *Ostreococcus tauri* OT06G04160, *Populus trichocarpa* PT00G17430, *Populus trichocarpa* PT05G04870, *Populus trichocarpa* PT05G04880, *Ricinus communis* RC30128G00400, *Ricinus communis* RC30073G00230, *Sorghum bicolor* SB01G005340, *Sorghum bicolor* SB07G005160, *Sorghum bicolor* SB03G010040, *Volvox carteri* VC00001G07190, *Vitis vinifera* VV16G06360, *Vitis vinifera* VV14G03630, *Vitis vinifera* VV06G09530, *Zea mays* ZM05G02360, *Zea mays* ZM03G07230, *Arabidopsis lyrata* AL8G08670, *Micromonas sp.* RCC299 MRCC299_02G03810, *Physcomitrella patens* PP00509G00110, *Selaginella moellendorffii* SM00091G00690.

Un gen representante para el gen MKK9 de *Arabidopsis thaliana* es AT1G73500 (es decir, el código AGI para el gen de *Arabidopsis*). El gen MKK9 codifica una MAP quinasa quinasa quinasa que está situada corriente abajo de los receptores de etileno. Pueden identificarse varios genes ortólogos para el gen MKK9 en bases de datos de secuencias disponibles al público (los números de acceso de la base de datos se describen después del nombre de la especie): *Arabidopsis lyrata* AL2G22310, *Arabidopsis lyrata* AL1G19280, *Arabidopsis thaliana* AT1G73500, *Arabidopsis thaliana* AT1G18350, *Brachypodium distachyon* BD1G10800, *Brachypodium distachyon* BD1G69400, *Carica papaya* CP00003G03590, *Carica papaya* CP01155G00030, *Glycine max* GM09G30300, *Glycine max* GM07G11910, *Lotus japonicus* LJ0G032430, *Malus domestica* MD06G019470, *Malus domestica* MD00G332250, *Manihot esculenta* ME04612G00380, *Medicago truncatula* MT6G21840, *Oryza sativa ssp. japonica* OS06G09180, *Oryza sativa ssp. japonica* OS03G12390, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_02G52870, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_03G10820, *Physcomitrella patens* PP00114G00510, *Physcomitrella patens* PP00016G01910, *Populus trichocarpa* PT15G04450, *Populus trichocarpa* PT12G03820, *Sorghum bicolor* SB04G035370, *Sorghum bicolor* SB01G042350, *Selaginella moellendorffii* SM00121G00650, *Selaginella moellendorffii* SM00017G02550, *Vitis vinifera* VV17G07540, *Zea mays* ZM05G04760, *Zea mays* ZM01G07530, *Zea mays* ZM01G41810, *Zea mays*

ZM03G27150, *Zea mays* ZM03G27550, *Chlamydomonas reinhardtii* CR06G00150, *Micromonas sp.* RCC299 MRCC299_07G06300, *Ostreococcus lucimarinus* OL04G03760, *Ostreococcus tauri* OT04G04050, *Ricinus communis* RC29748G00070, *Volvox carteri* VC00006G02490.

5 Un gen representante para el gen MKK7 de *Arabidopsis thaliana* es AT1G18350 (es decir, el código AGI para el gen de *Arabidopsis*). El gen MKK7 codifica una MAP quinasa quinasa que está situada corriente abajo de los receptores de etileno. Pueden identificarse varios genes ortólogos para el gen MKK7 en bases de datos de secuencias disponibles al público (los números de acceso de la base de datos se describen después del nombre de la especie): *Arabidopsis thaliana* AT1G18350, *Arabidopsis thaliana* AT1G73500, *Brachypodium distachyon* BD1G46880, *Brachypodium distachyon* BD1G10790, *Brachypodium distachyon* BD1G10770, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_02G52870, *Oryza sativa ssp. indica* OSINDICA_03G48910, *Sorghum bicolor* SB01G010180, *Zea mays* ZM01G07530, *Zea mays* ZM01G41830, *Arabidopsis lyrata* AL2G22310, *Arabidopsis lyrata* AL1G19280, *Glycine max* GM09G30300, *Glycine max* GM07G11910, *Glycine max* GM09G30310, *Vitis vinifera* VV17G07540, *Carica papaya* CP00003G03590, *Chlamydomonas reinhardtii* CR06G00150, *Lotus japonicus* LJ0G032430, *Malus domestica* MD06G019470, *Malus domestica* MD00G332250, *Manihot esculenta* ME04612G00380, *Micromonas sp.* RCC299 MRCC299_07G06300, *Medicago truncatula* MT6G21840, *Ostreococcus lucimarinus* OL04G03760, *Oryza sativa ssp. japonica* OS06G09180, *Ostreococcus tauri* OT04G04050, *Physcomitrella patens* PP00114G00510, *Physcomitrella patens* PP00016G01910, *Populus trichocarpa* PT15G04450, *Populus trichocarpa* PT12G03820 1, *Ricinus communis* RC29748G00070, *Selaginella moellendorffii* SM00110G00220, *Selaginella moellendorffii* SM00011G01810, *Volvox carteri* VC00006G02490.

En otra realización más, la invención proporciona un gen quimérico que comprende los siguientes elementos de ADN unidos de forma funcional: a) un factor de transcripción específico de meristemo, b) una región de ADN que cuando se transcribe produce una molécula de ARN bicatenaria capaz de reducir la expresión de un gen de la siguiente lista: ACO1, ACO2, ETR2, ESR1, CTR1, MKK9, MKK7, EIN3, EIN5 o EIL1 y c) una región final 3' que comprende señales de terminación de la transcripción y de poliadenilación que funcionan en células de dicha planta.

En otra realización más, la invención proporciona un gen quimérico que comprende los siguientes elementos de ADN unidos de forma funcional: a) un factor de transcripción específico de meristemo, b) una región de ADN que cuando se transcribe produce una molécula de ARN antisentido capaz de reducir la expresión de un gen de la siguiente lista: ACO1, ACO2, ETR2, ESR1, CTR1, MKK9, MKK7, EIN3, EIN5 o EIL1 y c) una región final 3' que comprende señales de terminación de la transcripción y de poliadenilación que funcionan en células de dicha planta.

En otra realización más, la invención proporciona un gen quimérico que comprende los siguientes elementos de ADN unidos de forma funcional: a) un factor de transcripción específico de meristemo, b) una región de ADN que cuando se transcribe produce una molécula de microARN artificial capaz de reducir la expresión de un gen de la siguiente lista: ACO1, ACO2, ETR2, ESR1, CTR1, MKK9, MKK7, EIN3, EIN5 o EIL1 y c) una región final 3' que comprende señales de terminación de la transcripción y de poliadenilación que funcionan en células de dicha planta.

En otra realización más, la invención proporciona un gen quimérico que comprende los siguientes elementos de ADN unidos de forma funcional: a) un promotor específico de meristemo, b) una región de ADN que codifica un gen de la siguiente lista: EBF1, EBF2, ACC desaminasa, un receptor de etileno negativo dominante o un factor de transcripción negativo dominante EIN3 o EIL1 y c) una región final 3' que comprende señales de terminación de la transcripción y de poliadenilación que funcionan en células de dicha planta.

En otra realización más, la invención proporciona un método para producir una planta tolerante a estrés abiótico respecto a una planta de control, disminuyendo la ruta de transducción de señales de etileno en dicha planta durante el periodo de estrés abiótico impuesto en dichas plantas, que comprende introducir y expresar en dicha planta un gen quimérico que comprende un promotor con una especificidad para células foliares en proliferación seleccionado de la lista que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, o un promotor ortólogo funcionalmente equivalente de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, donde dicho promotor está unido de forma funcional a un gen o fragmento génico derivado de la ruta de transducción de señales de etileno.

En otra realización más, la expresión de dicho gen quimérico en dicha planta conduce a una regulación negativa de al menos un gen de la siguiente lista: ACO1, ACO2, ETR2, ETR1, CTR1, MKK9, MKK7, EIN3, EIN5 o EIL1.

En otra realización más, la expresión de dicho gen quimérico en dicha planta conduce a una regulación positiva de al menos un gen de la siguiente lista: EBF1, EBF2, ACC desaminasa, un receptor de etileno negativo dominante o un factor de transcripción negativo dominante EIN3 o EIL1.

En otra realización más, la invención proporciona un gen quimérico que comprende los siguientes elementos de ADN unidos de forma funcional: a) un promotor con una especificidad para células foliares en proliferación seleccionado de la lista que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, o un promotor ortólogo funcionalmente equivalente de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, b) una región de ADN que cuando se transcribe produce una molécula de ARN bicatenaria capaz de reducir la

expresión de un gen de la siguiente lista: ACO1, ACO2, ETR2, ESR1, CTR1, MKK9, MKK7, EIN3, EIN5 o EIL1 y c) una región final 3' que comprende señales de terminación de la transcripción y de poliadenilación que funcionan en células de dicha planta.

5 En otra realización más, la invención proporciona a un gen quimérico que comprende los siguientes elementos de ADN unidos de forma funcional: a) un promotor con una especificidad para células foliares en proliferación seleccionado de la lista que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, o un promotor ortólogo funcionalmente equivalente de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, b) una región de ADN que codifica un gen de la siguiente lista: EBF1, EBF2, ACC desaminasa, un receptor de etileno negativo dominante o un factor de transcripción negativo dominante EIN3 o EIL1 y c) una región final 3' que comprende señales de terminación de la transcripción y de poliadenilación que funcionan en células de dicha planta.

En otra realización más, la invención proporciona una planta transgénica o una semilla transgénica o una célula de planta transgénica que comprende un gen quimérico como se ha descrito en este documento anteriormente.

15 Plantas, semillas o células vegetales transgénicas de la invención comprenden una planta de cultivo o una monocotiledónea o un cereal tal como arroz, trigo, maíz, cebada, mijo, centeno, triticale, sorgo, farro, espelta, secale, escanda y avena.

20 Un "gen quimérico" o "construcción quimérica" es una secuencia de ácido nucleico recombinante en que un promotor o secuencia de ácido nucleico reguladora está unida de forma funcional a, o asociada con, una secuencia de ácido nucleico que codifica un ARNm, de modo que la secuencia de ácido nucleico reguladora es capaz de regular la transcripción o expresión de la secuencia codificante de ácido nucleico asociada. La secuencia de ácido nucleico reguladora del gen quimérico no está normalmente unida de forma funcional a la secuencia de ácido nucleico asociada según se encuentra en la naturaleza.

En la presente invención, un "promotor de plantas" comprende elementos reguladores, que median la expresión de un segmento de secuencia codificante en células vegetales. Para la expresión en plantas, la molécula de ácido nucleico debe estar unida de forma funcional a o comprenden un promotor adecuado que exprese el gen en el punto correcto en el tiempo y con el patrón requerido de expresión espacial. En un aspecto preferido, el promotor de plantas de la invención se induce cuando la planta se encuentra con el estrés abiótico. Es particularmente preferido un promotor de plantas activo durante la fase de proliferación celular de la planta. Un promotor preferido es un promotor específico de meristemo. Otro promotor preferido es un promotor inducible por estrés. Lo más preferido es un promotor inducible por estrés que también es específico de meristemo.

La expresión "unido de forma funcional", como se usa en este documento, se refiere a una unión funcional entre la secuencia promotora y el gen de interés, de modo que la secuencia promotora es capaz de inicial la transcripción del gen de interés.

Un "promotor constitutivo" se refiere a un promotor que es transcripcionalmente activo durante la mayoría, pero no necesariamente todas, las fases de crecimiento y desarrollo y en la mayoría de condiciones ambientales, en al menos una célula, tejido u órgano. En la presente invención, no se prefiere un promotor constitutivo a causa de los efectos pleiotrópicos del etileno sobre el crecimiento de la planta.

Ejemplos no limitantes de promotores específicos de meristemo son el promotor p4TM1 de *Arabidopsis thaliana* (derivado del gen AT5G16250) y promotores homólogos y ortólogos del mismo, KNOLLE (derivado del gen AT1G08560) y otros promotores ortólogos de plantas del mismo; dichos promotores se inducen fuertemente en células mitóticas. Otro promotor es el promotor GRF5 (derivado del gen AT3G13960) o un homólogo del mismo, el último promotor se expresa fuertemente en primordios foliares en proliferación. La presente invención muestra ventajosamente que el promotor pATM1, promotores homólogos (como se resume adicionalmente en este documento posteriormente) y promotores ortólogos (como se resume adicionalmente en este documento posteriormente) del mismo son particularmente preferidos y ventajosos en la presente invención.

Promotores de 4TM de plantas

La presente invención muestra (por ejemplo, resumido en ejemplo 8) que los promotores de *Arabidopsis thaliana* derivados de la familia génica que consiste en los genes de *Arabidopsis thaliana* At5 g16250 (promotor derivado de dicho gen y denominado como p4TM1 y representado en la SEQ ID NO: 1), At3G02640 (promotor derivado de dicho gen y denominado como p4TM2 y representado en la SEQ ID NO: 2), At5 g36710 (promotor derivado de dicho gen y denominado como p4TM3a y representado en la SEQ ID NO: 3) y At5 g36800 (promotor derivado de dicho gen y denominado como p4TM3b y representado en la SEQ ID NO: 4) son particularmente ventajosos para la construcción de genes quiméricos que son capaces de modular la ruta de transducción de señales de etileno cuando se transforman y expresan en plantas. Las SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 4 son promotores que son fuertemente activos en tejidos meristemáticos de plantas, particularmente activos en células de hojas en proliferación. La presente invención muestra que los genes quiméricos de la invención que comprenden promotores del grupo (SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 4) son más ventajosos que genes quiméricos de la invención que comprenden otros promotores meristemáticos (tales

como el promotor de GRF5 (representado en la SEQ ID NO: 5) y también son más ventajosos que genes quiméricos de la invención que comprenden promotores constitutivos (tales como el promotor de CaMV 35S) para superar el estrés abiótico cuando estos genes quiméricos se transforman y expresan en plantas.

5 Varios métodos están disponibles para los expertos en la materia para aislar secuencias promotoras ortólogas de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4. Un método es un método *in silico* y se basa en herramientas bioinformáticas disponibles al público para buscar genes ortólogos (en las bases de datos de secuencias genómicas de plantas disponibles) de At5 g16250, At3 g02640, At5 g36710 y/o At5 g36800 (genes indicados de los que se obtuvieron las SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 4). Los genes ortólogos de los últimos genes de *Arabidopsis thaliana* en otras plantas son: ZM02G11160, ZM03G24300, ZM06G28010, ZM08G30050 y ZM10G19490 derivados de *Zea mays*; OSINDICA_01G63710, OSINDICA_04G33930 y OSINDICA_05G38340 de *Oryza sativa ssp. indica*; OS01G67110, OS04G41900 y OS05G43140 de *Oryza sativa ssp. japonica*; PT05G25880, PT08G07570, PT10G17500, PT13G12590 y PT19G11530 derivados de *Populus trichocarpa*; SB03G042590, SB06G021400 y SB09G024920 derivados de *Sorghum bicolor*, BD2G57580 y BD5G14540 de *Brachypodium distachyon*. Los números de referencia anteriores para los genes ortólogos se recuperaron del programa disponible al público PLAZA (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza> y el enlace para recuperar genes ortólogos para At5 g16250, At3 g02640, At5 g36710 y/o At5 g36800 es: http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/gene_families/view/HOM002837. Los promotores ortólogos anteriores pueden obtenerse de forma conveniente aislando 1000 bp, 1500 bp o 2000 bp cadena arriba del codón de inicio de las secuencias de los genes ortólogos identificados, para los cuales está disponible al público la secuencia de nucleótidos.

Para la identificación de promotores ortólogos funcionalmente equivalentes, puede analizarse la fuerza del promotor y/o el patrón de expresión de un promotor ortólogo candidato, por ejemplo, uniendo de forma funcional dicho promotor (o fragmentos del mismo) a un gen indicador y ensayando el nivel y el patrón de expresión del gen indicador en diversos tejidos de la planta. Los genes indicadores bien conocidos adecuados incluyen, por ejemplo, beta-glucuronidasa o beta-galactosidasa. La actividad del promotor se ensaya midiendo la actividad enzimática de la beta-glucuronidasa o beta-galactosidasa. Después puede compararse la fuerza del promotor y/o el patrón de expresión en tejidos meristemáticos con los de un promotor de referencia (tal como el usado en los ejemplos de la presente invención). Como alternativa, la fuerza del promotor puede ensayarse cuantificando los niveles de ARNm o comparando los niveles de ARNm del ácido nucleico usado en los métodos de la presente invención, con niveles de ARNm de genes constitutivos tales como ARNr 18S, usando métodos conocidos en la técnica, tales como transferencia de Northern con análisis densitométrico de autorradiogramas, PCR cuantitativa a tiempo real o RT-PCR (Heid et al., 1996 Genome Methods 6: 986-994). Generalmente, por "promotor débil" se entiende un promotor que dirige la expresión de una secuencia codificante a un nivel bajo. Por "nivel bajo" se entiende a niveles de aproximadamente 1/10.000 transcritos a aproximadamente 1/100.000 transcritos, hasta aproximadamente 1/500.000 transcritos por célula. A la inversa, un "promotor fuerte" dirige la expresión de una secuencia codificante a nivel alto, o a aproximadamente 1/10 transcritos a aproximadamente 1/100 transcritos, hasta aproximadamente 1/1000 transcritos por célula. Generalmente, por "promotor de fuerza media" se entiende un promotor que dirige la expresión de una secuencia codificante a un nivel inferior que un promotor fuerte, en particular a un nivel que está, en todos los casos, por debajo del obtenido cuando está bajo el control de un promotor de 35S CaMV.

Además, pueden aislarse promotores equivalentes (u ortólogos) de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 4 de otras plantas por hibridación. Con este fin, pueden aislarse fragmentos de promotores ortólogos de otras plantas usando las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4 o un fragmento funcional que tiene al menos 50 nucleótidos consecutivos de la misma como sonda e identificando secuencias de nucleótidos a partir de estas otras plantas que hibridan en las condiciones de hibridación descritas en este documento. A modo de ejemplo, un promotor de la invención puede usarse para explorar una genoteca de un cultivo o planta de interés para aislar secuencias promotoras correspondientes de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica. Por tanto, puede usarse una secuencia promotora de la invención como sonda para hibridación con una genoteca en condiciones de rigurosidad media a alta. Como pueden aislarse promotores equivalentes alternativos usando las secuencias codificantes de At5 g16250, At3 g02640, At5 g36710 y/o At5 g36800 para explorar una genoteca (por ejemplo, por hibridación) de un cultivo de interés. Cuando se obtiene suficiente identidad entre las secuencias codificantes (como norma, mayor del 85% de identidad), entonces las regiones promotoras pueden aislarse cadena arriba de los genes ortólogos At5 g16250, At3 g02640, At5 g36710 y/o At5 g36800. El término "hibridación" se refiere a la capacidad de una primera hebra de ácido nucleico de unirse con una segunda hebra mediante apareamiento de bases por enlaces de hidrógeno cuando las dos hebras de ácido nucleico tienen suficiente identidad de secuencia. La hibridación sucede cuando las dos moléculas de ácido nucleico hibridan entre sí en condiciones apropiadas. La hibridación de ácidos nucleicos es una técnica bien conocida para los expertos en la técnica de manipulación de ADN. La propiedad de hibridación de un par dado de ácidos nucleicos es una indicación de su similitud o identidad. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas hibridan entre sí en condiciones rigurosas. La expresión "hibridar específicamente con" se refiere a la unión, formación de dúplex o formación de híbridos de una molécula solamente con una secuencia particular de nucleótidos en condiciones rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja de ADN o ARN (por ejemplo, celular total). "Unir sustancialmente" se refiere a hibridación complementaria entre un ácido nucleico sonda y un ácido nucleico diana y abarca desapareamientos minoritarios que pueden acomodarse reduciendo la rigurosidad del medio de hibridación para conseguir la detección deseada de la secuencia de ácido nucleico diana. Las "condiciones rigurosas de hibridación" y "condiciones

rigurosas de lavado de hibridación" en el contexto de experimentos de hibridación de ácido nucleico, tales como hibridación de Southern y Northern son dependientes de secuencia, y son diferentes en diferentes parámetros ambientales. Un ejemplo de condiciones altamente rigurosas de lavado es NaCl 0,15 M a 72°C durante aproximadamente 15 minutos. Un ejemplo de condiciones rigurosas de lavado es un lavado SSC 0,2 X a 65°C durante 15 minutos. A menudo, un lavado de alta rigurosidad va precedido de un lavado de baja rigurosidad para retirar la señal de sonda de fondo. Un ejemplo de lavado de rigurosidad media para un dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es SSC 1 X a 45°C durante 15 minutos. Un ejemplo de lavado de baja rigurosidad para un dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es SSC 4 a 6 X a 40°C durante 15 minutos. Para sondas cortas (por ejemplo, de aproximadamente 10 a 50 nucleótidos), las condiciones rigurosas típicamente implican concentraciones salinas de menos de aproximadamente 1,5 M, más preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M, de concentraciones de iones Na (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3, y la temperatura es típicamente de al menos aproximadamente 30°C y al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, >50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también pueden conseguirse con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. En general, una relación de señal a ruido de 2 X (o mayor) que la observada para una sonda no relacionada en el ensayo particular de hibridación indica detección de una hibridación específica. Los ácidos nucleicos que no hibridan entre sí en condiciones rigurosas aún son sustancialmente idénticos si las proteínas que codifican son sustancialmente idénticas. Esto sucede, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la degeneración máxima de codones permitida por el código genético. Las condiciones muy rigurosas se seleccionan para que sean iguales a la T_m para una sonda particular. Un ejemplo de condiciones rigurosas para hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 restos complementarios en un filtro en una transferencia de Southern o Northern es formamida al 50%, por ejemplo, hibridación en formamida al 50%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en SSC 0,1 X a 60 hasta 65°C. Las condiciones de baja rigurosidad ejemplares incluyen hibridación con una solución tamponante de formamida al 30 hasta el 35%, NaCl 1 M, SDS (dodecil sulfato sódico) 1% a 37°C, y un lavado en SSC 1 X hasta 2 X (SSC 20 X = NaCl 3,0 M/citrato de trisodio 0,3 M) a 50 hasta 55°C. Las condiciones de rigurosidad moderada ejemplares incluyen hibridación en formamida al 40 hasta el 45%, NaCl 1,0 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en SSC 0,5 X a 1 X a 55 hasta 60°C. Lo siguiente son ejemplos de conjuntos de condiciones de hibridación/lavado que pueden usarse para clonar secuencias de nucleótidos ortólogas que son sustancialmente idénticas a secuencias de nucleótidos de referencia de la presente invención: una secuencia de nucleótidos de referencia preferiblemente hibrida con la secuencia de nucleótidos de referencia en dodecil sulfato sódico (SDS) al 7%, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C con lavado en SSC 2 X, SDS al 0,1% a 50°C, de forma más deseable en dodecil sulfato sódico (SDS) al 7%, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C con lavado en SSC 1 X, SDS al 0,1% a 50°C, de forma más deseable aún en dodecil sulfato sódico (SDS) al 7%, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C con lavado en SSC 0,5 X, SDS al 0,1% a 50°C, incluso de forma más deseable aún en dodecil sulfato sódico (SDS) al 7%, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C con lavado en SSC 0,1 X, SDS al 0,1% a 50°C.

En otra realización de la presente invención, se proporcionan promotores meristemáticos que comprenden una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 40%, al menos un 50% o al menos un 60%, o al menos un 70%, o al menos un 80%, o al menos un 90%, o al menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4. El término "variante" con respecto a las secuencias de nucleótidos reguladoras de la transcripción SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 4 de la invención pretende indicar secuencias sustancialmente similares. Variantes alélicas de origen naturales, tales como estas, pueden identificarse con el uso de técnicas bien conocidas de biología molecular como, por ejemplo, con reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas de hibridación, como se resumen en este documento anteriormente. Las secuencias de nucleótidos variantes también incluyen secuencias de nucleótidos obtenidas de forma sintética, tales como las generadas, por ejemplo, usando mutagénesis dirigida al sitio de la SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4. Generalmente, las variantes de secuencia de nucleótidos de la invención tendrán al menos un 40%, 50%, 60%, to 70%, por ejemplo, preferiblemente un 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, a un 79%, generalmente al menos un 80%, por ejemplo, de un 81% a un 84%, al menos un 85%, por ejemplo, un 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, a un 98% y 99% de identidad de secuencia de nucleótidos con la secuencia de nucleótidos nativa (de tipo silvestre o endógena). Los derivados de las moléculas de ADN descritas en este documento pueden incluir, aunque sin limitación, delecciones de secuencia, mutaciones puntuales individuales o múltiples, alteraciones en un sitio particular de enzima de restricción, adición de elementos funcionales, u otro medio de modificación molecular que pueda potenciar, o alterar de otro modo, la expresión del promotor. Las técnicas para obtener dichos derivados son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, J. F. Sambrook, D. W. Russell y N. Irwin (2000) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición, Volúmenes 1, 2, y 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press). Por ejemplo, un experto en la materia puede delimitar los elementos funcionales dentro de los promotores descritos en este documento y delecionar cualquier elemento no esencial. Los elementos funcionales pueden modificarse o combinarse para aumentar la utilidad o expresión de las secuencias de la invención para cualquier aplicación particular. Los expertos en la materia están familiarizados con los materiales didácticos convencionales que describen condiciones específicas y procedimientos para la construcción, manipulación y aislamiento de macromoléculas (por ejemplo, moléculas de ADN, plásmidos, etc.), así como la generación de organismos recombinantes y la exploración y aislamiento de moléculas de ADN. Como se usa en este documento, la expresión "porcentaje de identidad de secuencia" se refiere al porcentaje de nucleótidos idénticos entre dos segmentos de una ventana de ADN alineado de forma óptima. La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación es bien conocida para los expertos en la materia y puede realizarse por herramientas tales como el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Waterman, M. S. *Introduction to Computational Biology: Maps, sequences and genomes*. Chapman & Hall. Londres (1995)), el algoritmo de

alineación de homología de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol., 48:443-453 (1970)), el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci., 85:2444 (1988)) y, preferiblemente por implementaciones informáticas de estos algoritmos, tales como GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA disponibles como parte de GCG (marca registrada), Wisconsin Package (marca registrada de Accelrys Inc., San Diego, Calif.). Una "fracción de identidad" para segmentos alineados de una secuencia de ensayo y una secuencia de referencia es la cantidad de componentes idénticos que están compartidos por las dos secuencias alineadas dividida por la cantidad total de componentes en el segmento de la secuencia de referencia, es decir, la secuencia de referencia completa o una parte definida más pequeña de la secuencia de referencia. El porcentaje de identidad de secuencia se representa como la fracción de identidad por 100. La comparación de una o más secuencias de ADN puede ser con una secuencia de ADN de longitud completa o una parte de la misma, o con una secuencia de ADN más larga.

Los promotores de la presente invención (SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 4) pueden unirse de forma funcional a una secuencia de ácido nucleico que es heteróloga con respecto al promotor. La secuencia de ácido nucleico puede ser, generalmente, cualquier secuencia de ácido nucleico para la que se desea un nivel aumentado o nivel alterado (por ejemplo, en un órgano diferente) de transcripción en un tejido meristemático, en particular un tejido meristemático de las hojas. La secuencia de ácido nucleico puede codificar, por ejemplo, un polipéptido que es adecuado para su incorporación en la dieta de un ser humano o un animal o puede proporcionar alguna otra característica agrícola o industrial importante. Las secuencias de ácido nucleico heterólogas adecuadas incluyen, sin limitación, aquellas que codifican enzimas de la ruta de ácidos grasos, epoxidasas, hidroxilasas, citocromo P450 mono-oxigenasas, desaturasas, enzimas biosintéticas de tocoferol, enzimas biosintéticas de carotenoides, enzimas biosintéticas de aminoácidos, enzimas de la ruta de esteroides y enzimas de ramificación del almidón.

Por tanto, en otra realización particular, la invención proporciona un casete de expresión para regular la expresión específica del meristemo en plantas, que comprende un promotor unido de forma funcional a un ácido nucleico que es heterólogo en relación a dicho promotor y donde dicho promotor se selecciona del grupo que consiste en a) la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, b) un fragmento funcional de al menos 50 pares de bases consecutivas de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 que tiene actividad promotora y (c) una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones equivalente a hibridación en dodecil sulfato sódico al 7%, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C con lavado en SSC 2 X, SDS al 0,1% a 50°C con una secuencia de nucleótidos representada en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o un fragmento de al menos 50 bases consecutivas de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o el complemento de la misma.

En una realización particular, el casete de expresión, cuando se transforma en una planta, expresa un ácido nucleico que provoca la expresión de una proteína, o la expresión de un ARN antisentido, ARN con sentido o bicatenario.

En otra realización, la invención proporciona un vector recombinante que comprende un casete de expresión como se ha descrito en este documento anteriormente.

El término "terminador" abarca una secuencia de control que es una secuencia de ADN al final de una unidad transcripcional que señala el procesamiento 3' y la poliadenilación de un transcrito primario y la terminación de la transcripción. El terminador puede obtenerse del gen natural, de una diversidad de otros genes de plantas, o de ADN T. El terminador a añadirse puede obtenerse de, por ejemplo, los genes de la nopalina sintasa o la octopina sintasa o, como alternativa, de otro gen de plantas, o menos preferiblemente, de cualquier otro gen eucariota.

"Marcador de selección", "gen marcador de selección" o "gen indicador" incluye cualquier gen que confiera un fenotipo en una célula en que se expresa para facilitar la identificación y/o selección de células que se transfectan o transforman con una construcción de ácido nucleico de la invención. Estos genes marcadores posibilitan la identificación de una transferencia satisfactoria de las moléculas de ácido nucleico mediante una serie de principios diferentes. Los marcadores adecuados pueden seleccionarse de marcadores que confieren resistencia a antibióticos o herbicidas, que introducen un nuevo rasgo metabólico o que permiten la selección visual. Ejemplos de genes marcadores de selección incluyen genes que confieren resistencia a antibióticos (tales como nptII que fosforila neomicina y kanamicina, o hpt, que fosforila higromicina, o genes que confieren resistencia a, por ejemplo, bleomicina, estreptomycin, tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina, gentamicina, geneticina (G418), espectinomicina o blasticidina), a herbicidas (por ejemplo, bar que proporciona resistencia a Basta®; aroA o gox que proporcionan resistencia contra glifosato, o los genes que confieren resistencia a, por ejemplo, imidazolinona, fosfinotricina o sulfonilurea), o genes que proporcionan un rasgo metabólico (tal como manA que permite que las plantas usen manosa como única fuente de carbono o xilosa isomerasa para la utilización de xilosa, o marcadores antinutritivos tales como la resistencia a 2-desoxiglucosa). La expresión de genes marcadores visuales provoca la formación de color (por ejemplo, β -glucuronidasa, GUS o β -galactosidasa con sus sustratos coloreados, por ejemplo, X-Gal), luminiscencia (tal como el sistema de luciferina/luciferasa) o fluorescencia (proteína fluorescente verde, GFP, y derivados de la misma). Esta lista representa solamente una pequeña cantidad de posibles marcadores. Los expertos en la materia están familiarizados con dichos marcadores. Se prefieren diferentes marcadores, dependiendo del organismo y el método de selección.

Se sabe que, tras la integración estable o transitoria de ácidos nucleicos en células vegetales, solamente una

minoría de las células capta el ADN foráneo y, si se desea, lo integran en su genoma, dependiendo del vector de expresión usado y la técnica de transfección usada. Para identificar y seleccionar estos integrantes, habitualmente se introduce un gen que codifica un marcador de selección (tal como los descritos anteriormente) en las células hospedadoras junto con el gen de interés. Estos marcadores pueden usarse, por ejemplo, en mutantes en que estos genes no son funcionales por, por ejemplo, delección por métodos convencionales. Además, las moléculas de ácido nucleico que codifican un marcador de selección pueden introducirse en una célula hospedadora en el mismo vector que comprende la secuencia codificante de los polipéptidos de la invención o usarse en los métodos de la invención, o también en un vector diferente. Las células que se han transfectedo de forma estable con el ácido nucleico introducido pueden identificarse, por ejemplo, por selección (por ejemplo, células que han integrado el marcador de selección sobreviven mientras que las otras células mueren).

Como los genes marcadores, particularmente genes para resistencia a antibióticos y herbicidas, ya no son necesarios o son indeseados en la célula hospedadora transgénica una vez los ácidos nucleicos se han introducido satisfactoriamente, el proceso de acuerdo con la invención para introducir los ácidos nucleicos emplea ventajosamente técnicas que posibilitan la eliminación o escisión de estos genes marcadores. Uno de dichos métodos es el que se conoce como cotransformación. El método de cotransformación emplea dos vectores simultáneamente para la transformación, un vector que alberga el ácido nucleico de acuerdo con la invención y un segundo que alberga el gen o genes marcadores. Una gran proporción de transformantes recibe o, en el caso de plantas, comprende (hasta un 40% o más de los transformantes), ambos vectores. En caso de transformación con *Agrobacteria*, los transformantes habitualmente reciben solamente una parte del vector, es decir, la secuencia flanqueada por el ADN T, que habitualmente representa el casete de expresión. Los genes marcadores pueden eliminarse posteriormente de la planta transformada realizando cruces. En otro método, se usan genes marcadores integrados en un transposón para la transformación junto con el ácido nucleico deseado (conocido como la tecnología Ac/Ds). Los transformantes pueden cruzarse con una fuente de transposasa o los transformantes se transforman con una construcción de ácido nucleico que confiere la expresión de una transposasa, de forma transitoria o estable. En algunos casos (aproximadamente el 10%), el transposón salta del genoma de la célula hospedadora una vez la transformación ha tenido lugar de forma satisfactoria y se pierde. En una cantidad adicional de casos, el transposón salta a una localización diferente. En estos casos, el gen marcador debe eliminarse realizando cruces. En microbiología, se desarrollaron técnicas que hacen posible, o facilitan, la detección de dichos eventos. Un método ventajoso adicional depende de lo que se conoce como sistemas de recombinación; cuya ventaja es que puede prescindirse de la eliminación por cruce. El sistema mejor conocido de este tipo es lo que se conoce como el sistema Cre/lox. Cre1 es una recombinasa que elimina las secuencias localizadas entre las secuencias loxP. Si el gen marcador se integra entre las secuencias loxP, se elimina una vez la transformación ha tenido lugar de forma satisfactoria, por expresión de la recombinasa. Sistemas adicionales de recombinación son el sistema HIN/HIX, FLP/FRT y REP/STB (Tribble et al., J. Biol. Chem., 275, 2000: 22255-22267; Velmurugan et al., J. Cell Biol., 149, 2000: 553-566). Es posible una integración específica de sitio en el genoma de la planta de las secuencias de ácidos nucleico de acuerdo con la invención.

Para los propósitos de la invención, "transgénico", "transgén" o "recombinante" significa con respecto a, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico, un casete de expresión, una construcción génica o un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico o un organismo transformado con las secuencias de ácido nucleico, casetes de expresión o vectores de acuerdo con la invención.

Una planta transgénica, para los propósitos de la invención, se entiende, por tanto, que significa, como anteriormente, que los ácidos nucleicos usados en el método de la invención no están presentes en, o se originan a partir de, el genoma de dicha planta, o están presentes en el genoma de dicha planta, pero no en su locus natural en el genoma de dicha planta, siendo posible que los ácidos nucleicos se expresen de forma homóloga o heteróloga. Sin embargo, como se ha mencionado, transgénico también significa que, aunque los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención o usados en el método de la invención están en su posición natural en el genoma de una planta, la secuencia se ha modificado con respecto a la secuencia natural, y/o que las secuencias reguladoras de las secuencias naturales se han modificado. Se entiende preferiblemente que transgénico significa la expresión de los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención en un locus no natural en el genoma, es decir, tiene lugar expresión homóloga o heteróloga de los ácidos nucleicos. Se mencionan en este documento plantas transgénicas preferidas.

Para el propósito de esta invención, pueden aislarse genes relacionados u ortólogos de la ruta de transducción de señales de etileno como se ha descrito anteriormente en este documento de las bases de datos de secuencias disponibles (al público). La "identidad de secuencia" de dos secuencias relacionadas de nucleótidos o aminoácidos, expresada como un porcentaje, se refiere a la cantidad de posiciones en las dos secuencias alineadas de forma óptima que tienen restos idénticos (x100), dividida por la cantidad de posiciones comparadas. Un hueco, es decir, una posición en una alineación donde está presente un resto en una secuencia, pero no en la otra, se considera como una posición con restos no idénticos. La alineación de las dos secuencias se realiza por el algoritmo de Needleman y Wunsch (Needleman y Wunsch (1970) J Mol Biol. 48: 443-453). La alineación de secuencia asistida por ordenador anteriormente puede realizarse convenientemente usando un programa de software convencional, tal como GAP, que es parte del Wisconsin Package Versión 10.1 (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, EE. UU.) usando la matriz de valores por defecto con una penalización por creación de hueco de 50 y una penalización por extensión de hueco de 3. Las secuencias se indican como "esencialmente similares" cuando dicha secuencia

tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 75%, particularmente al menos aproximadamente un 80%, más particularmente al menos aproximadamente un 85%, bastante particularmente aproximadamente un 90%, especialmente aproximadamente un 95%, más especialmente aproximadamente un 100%, bastante especialmente son idénticas. Está claro que cuando las secuencias de ARN tienen que ser esencialmente similares o que tener un cierto grado de identidad de secuencia con secuencias de ADN, la timina (T) en la secuencia de ADN se considera igual a uracilo (U) en la secuencia de ARN.

Como alternativa, los expertos en la materia pueden aislar genes ortólogos de plantas implicados en la ruta de transducción de señales de etileno a través de métodos de hibridación genética. Dichos métodos son bien conocidos para biólogos moleculares expertos (plantas).

El término "modulación" significa, en relación a la expresión o expresión génica, un proceso en que el nivel de expresión se cambia por dicha expresión génica en comparación con la planta de control, el nivel de expresión puede estar aumentado o disminuido. La expresión no modulada original puede ser de cualquier tipo de expresión de un ARN estructural (ARNr, ARNt) o ARNm con posterior traducción. Para los propósitos de esta invención, la expresión no modulada original también puede ser la ausencia de cualquier expresión. La expresión "modulación de la actividad" significará cualquier cambio de la expresión de las secuencias de ácidos nucleicos de la invención o proteínas codificadas, que conduce a producción aumentada y/o crecimiento aumentado de las plantas. La expresión puede aumentar desde cero (ausencia de, o expresión inapreciable) hasta una cierta cantidad, o puede disminuir desde una cierta cantidad hasta cantidades pequeñas inapreciables o cero.

El término "expresión" o "expresión génica" significa la transcripción de un gen específico o genes específicos o construcción genética específica. El término "expresión" o "expresión génica" en particular significa la transcripción de un gen o genes o construcción genética en ARN estructural (ARNr, ARNt) o ARNm con o sin posterior traducción del último en una proteína. El proceso incluye transcripción de ADN y procesamiento del producto resultante de ARNm.

La expresión "expresión aumentada" o "sobrexpresión", como se usa en este documento, significa cualquier forma de expresión que sea adicional al nivel de expresión original de tipo silvestre. Para los propósitos de esta invención, el nivel de expresión original de tipo silvestre podría ser también cero, es decir, ausencia de expresión o expresión inapreciable.

Los métodos para aumentar la expresión de genes o productos génicos están bien documentados en la técnica e incluyen, por ejemplo, sobrexpresión dirigida por promotores apropiados (como se ha descrito anteriormente en este documento), el uso de potenciadores de la transcripción o potenciadores de la traducción. Los ácidos nucleicos aislados que sirven como elementos promotores o potenciadores pueden introducirse en una posición apropiada (típicamente cadena arriba) de una forma no heteróloga de un polinucleótido para regular positivamente la expresión de un ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés. Si se desea la expresión del polipéptido, generalmente es deseable incluir una región de poliadenilación en el extremo 3' de una región codificante polinucleotídica. La región de poliadenilación puede obtenerse del gen natural, de una diversidad de otros genes de plantas, o de ADN T. La secuencia del extremo 3' a añadirse puede obtenerse de, por ejemplo, los genes de la nopalina sintasa u octopina sintasa o, como alternativa, de otro gen de plantas o, menos preferiblemente, de cualquier otro gen eucariota.

También puede añadirse una secuencia intrónica en la región no traducida (UTR) 5' o la secuencia codificante de la secuencia codificante parcial para aumentar la cantidad del mensaje maduro que se acumula en el citosol. La inclusión de un intrón que se puede cortar y empalmar en la unidad de transcripción en construcciones de expresión tanto de plantas como de animales, ha demostrado aumentar la expresión génica a nivel tanto de ARNm como de proteína hasta 1000 veces (Buchman y Berg (1988) Mol. Cell Biol. 8: 4395-4405; Callis et al. (1987) Genes Dev 1: 183-1200). Dicha potenciación intrónica de la expresión génica es típicamente máxima cuando se coloca cerca del extremo 5' de la unidad de transcripción. El uso de los intrones de maíz Adh1-S intrón 1, 2, y 6, el intrón Bronze-1 es conocido en la técnica. Para información general véase: The Maize Handbook, Capítulo 1 16, Freeling y Walbot, Eds., Springer, N.Y. (1994).

Estrategias para la regulación negativa (o expresión disminuida) de genes de la lista que consiste en ACO1, ACO2, ETR2, ETR1, CTR1, MKK7, MKK9, EIN3, EIN5 y EIL1

Se acepta que una referencia en este documento a "expresión disminuida" o "reducción o eliminación sustancial" de la expresión significa una disminución en la expresión génica endógena y/o los niveles de polipéptido y/o la actividad del polipéptido respecto a plantas de control. La reducción o eliminación sustancial es, en orden creciente de preferencia, de al menos un 10%, 20%, 30%, 40% o 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, o 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más reducida en comparación con la de plantas de control.

Para la reducción o eliminación sustancial de la expresión de un gen endógeno en una planta, preferentemente en el tejido meristemático, más preferentemente en un tejido meristemático durante el periodo de estrés abiótico (leve), se requiere una longitud suficiente de nucleótidos sustancialmente contiguos de una secuencia de ácido nucleico. Para realizar silenciamiento génico, esta puede ser tan pequeña como de 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10 o

menos nucleótidos, como alternativa esta puede ser tan grande como el gen completo (incluyendo la UTR 5' y/o 3', en parte o en su totalidad). El tramo de nucleótidos sustancialmente contiguos puede obtenerse del ácido nucleico que codifica la proteína de interés (gen diana), o de cualquier ácido nucleico capaz de codificar un ortólogo, parólogo u homólogo de la proteína de interés. Preferiblemente, el tramo de nucleótidos sustancialmente contiguos es capaz de formar enlaces de hidrógeno con el gen diana (hebra con sentido o antisentido), más preferiblemente, el tramo de nucleótidos sustancialmente contiguos tiene, en orden creciente de preferencia, un 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% de identidad de secuencia con el gen diana (hebra con sentido o antisentido). Una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido (funcional) no es un requisito para los diversos métodos analizados en este documento para la reducción o eliminación sustancial de la expresión de un gen endógeno.

Esta reducción o eliminación sustancial de la expresión puede conseguirse usando herramientas y técnicas rutinarias. Un método preferido para la reducción o eliminación sustancial de la expresión génica endógena es introduciendo y expresando en una planta una construcción genética en que el ácido nucleico (en este caso un tramo de nucleótidos sustancialmente contiguos derivado del gen de interés, o de cualquier ácido nucleico capaz de codificar un ortólogo, parólogo u homólogo de una cualquiera de las proteínas de interés) se clona como una repetición invertida (en parte o completamente), separado por un espaciador (ADN no codificante).

En dicho método preferido, la expresión del gen endógeno se reduce o elimina sustancialmente a través de silenciamiento mediado por ARN usando una repetición invertida de un ácido nucleico o una parte del mismo (en este caso un tramo de nucleótidos sustancialmente contiguos derivado del gen de interés, o de cualquier ácido nucleico capaz de codificar un ortólogo, parólogo u homólogo de la proteína de interés), preferiblemente capaz de formar una estructura de horquilla. La repetición invertida se clona en un vector de expresión que comprende secuencias de control. Una secuencia de ácido nucleico de ADN no codificante (un espaciador, por ejemplo, un fragmento de la región de unión a matriz (MAR), un intrón, un polienlazador, etc.) se localiza entre los dos ácidos nucleicos invertidos que forman la repetición invertida. Después de la transcripción de la repetición invertida, se forma un ARN quimérico con una estructura autocomplementaria (parcial o completa). Esta estructura de ARN bicatenario se menciona como el ARN horquilla (ARNhp). El ARNhp se procesa por la planta en ARNip que se incorporan en un complejo de corte y empalme inducido por ARN (RISC). El RISC escinde adicionalmente los transcritos de ARNm, reduciendo de ese modo sustancialmente la cantidad de transcritos de ARNm a traducirse en polipéptidos. Para detalles general adicionales, véase, por ejemplo, Grierson et al. (1998) documento WO 98/53083; Waterhouse et al. (1999) documento WO 99/53050).

El rendimiento de los métodos de la invención no depende de la introducción y expresión en una planta de una construcción genética en que el ácido nucleico se clona como una repetición invertida, sino que puede usarse uno cualquiera o más de varios métodos de "silenciamiento génico" bien conocidos para conseguir los mismos efectos.

Uno de dichos métodos para la reducción de la expresión génica endógena es el silenciamiento mediado por ARN de la expresión génica (regulación negativa). El silenciamiento, en este caso, se desencadena en una planta por una secuencia de ARN bicatenario (ARNbc) que es sustancialmente similar al gen endógeno diana. Este ARNbc se procesa adicionalmente por la planta en aproximadamente 20 a aproximadamente 26 nucleótidos llamados ARN interferentes cortos (ARNip). Los ARNip se incorporan en un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) que escinde el transcrito de ARNm del gen diana endógeno, reduciendo de ese modo sustancialmente la cantidad de transcritos de ARNm a traducir en un polipéptido. Preferiblemente, la secuencia de ARN bicatenario corresponde con un gen diana.

Otro ejemplo de un método de silenciamiento de ARN implica la introducción de secuencias de ácido nucleico o partes de las mismas (en este caso, un tramo de nucleótidos sustancialmente contiguos derivado del gen de interés, o de cualquier ácido nucleico capaz de codificar un ortólogo, parólogo u homólogo de la proteína de interés) en una orientación con sentido en una planta. La "orientación con sentido" se refiere a una secuencia de ADN que es homóloga a un transcrito de ARNm de la misma. Introducida en la planta estaría, por lo tanto, una copia de la secuencia de ácido nucleico. La secuencia de ácido nucleico adicional reducirá la expresión del gen endógeno, dando lugar a un fenómeno conocido como cosupresión. La reducción de la expresión génica será más pronunciada si se introducen varias copias adicionales de una secuencia de ácido nucleico en la planta, ya que existe una correlación positiva entre los altos niveles de transcrito y la activación de la cosupresión.

Otro ejemplo de un método de silenciamiento de ARN implica el uso de secuencias de ácidos nucleico antisentido. Una secuencia de ácido nucleico "antisentido" comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de ácido nucleico "con sentido" que codifica una proteína, es decir, complementaria a la hebra codificante de una molécula de ADN bicatenaria o complementaria a una secuencia de transcrito de ARNm. La secuencia de ácido nucleico antisentido es preferiblemente complementaria al gen endógeno a silenciar. La complementariedad puede estar localizada en la "región codificante" y/o en la "región no codificante" de un gen. La expresión "región codificante" se refiere a una región de la secuencia de nucleótidos que comprende codones que se traducen en restos de aminoácido. La expresión "región no codificante" se refiere a secuencias 5' y 3' que flanquean la región codificante que se transcriben, pero no se traducen en aminoácidos (también mencionadas como secuencias no traducidas 5' y 3').

Pueden diseñarse secuencias de ácido nucleico antisentido de acuerdo con las normas de apareamiento de bases de Watson y Crick. La secuencia de ácido nucleico antisentido puede ser complementaria a la secuencia de ácido nucleico completa (en este caso un tramo de nucleótidos sustancialmente contiguos derivado del gen de interés, o de cualquier ácido nucleico capaz de codificar un ortólogo, parólogo u homólogo de la proteína de interés), pero también puede ser un oligonucleótido que es antisentido a solamente una parte de la secuencia de ácido nucleico (incluyendo la UTR 5' y 3' del ARNm). Por ejemplo, la secuencia oligonucleotídica antisentido puede ser complementaria a la región que rodea el sitio de inicio de la traducción de un transcrito de ARNm que codifica un polipéptido. La longitud de una secuencia oligonucleotídica antisentido adecuada es conocida en la técnica y puede empezar desde aproximadamente 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15 o 10 nucleótidos de longitud o menos. La secuencia de ácido nucleico antisentido puede producirse en la célula vegetal usando un vector de expresión (que comprende un gen quimérico de la invención) en que una secuencia de ácido nucleico se ha subclonado en una orientación antisentido (es decir, el ARN transcrito desde el ácido nucleico insertado será de una orientación antisentido a un ácido nucleico diana de interés). Preferiblemente, la producción de secuencias de ácido nucleico antisentido en plantas sucede mediante una construcción de ácido nucleico integrada de forma estable que comprende un promotor, un oligonucleótido antisentido unido de forma funcional y un terminador.

Las moléculas de ácido nucleico usadas para silenciamiento en los métodos de la invención (se introduzcan en una planta o se generen *in situ*) hibridan con o se unen a transcritos de ARNm y/o ADN genómico que codifica un polipéptido para inhibir de ese modo la expresión de la proteína, por ejemplo, inhibiendo la transcripción y/o la traducción. La hibridación puede ser por complementariedad convencional de nucleótidos para formar un dúplex estable o, por ejemplo, en el caso de una secuencia de ácido nucleico antisentido que se une a dúplex de ADN, a través de interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. Las secuencias de ácido nucleico antisentido pueden introducirse en una planta por transformación o inyección directa en un sitio tisular específico.

La reducción o eliminación sustancial de la expresión génica endógena también puede realizarse usando ribozimas. Las ribozimas son moléculas de ARN catalítico con actividad ribonucleasa que son capaces de escindir una secuencia de ácido nucleico monocatenaria, tal como un ARNm, para la que tienen una región complementaria. Por tanto, pueden usarse ribozimas (por ejemplo, ribozimas en cabeza de martillo (descritas en Haselhoff y Gerlach (1988) *Nature* 334, 585-591) para escindir catalíticamente transcritos de ARNm que codifican un polipéptido, reduciendo de ese modo sustancialmente la cantidad de transcritos de ARNm a traducir en un polipéptido. Puede diseñarse una ribozima que tenga especificidad por una secuencia de ácido nucleico (véase, por ejemplo: Cech et al. patente de Estados Unidos n.º 4.987.071; y Cech et al. patente de Estados Unidos n.º 5.116.742). Como alternativa, los transcritos de ARNm correspondientes a una secuencia de ácido nucleico pueden usarse para seleccionar un ARN catalítico que tenga una actividad ribonucleasa específica a partir de una combinación de moléculas de ARN (Bartel y Szostak (1993) *Science* 261, 1411-1418). El uso de ribozimas para silenciamiento génico en plantas es conocido en la técnica (por ejemplo, Atkins et al. (1994) documento WO 94/00012; Lenne et al. (1995) documento WO 95/03404; Lutziger et al. (2000) documento WO 00/00619; Prinsen et al. (1997) documento WO 97/13865 y Scott et al. (1997) documento WO 97/38116).

Un enfoque adicional al silenciamiento génico es dirigir secuencias de ácido nucleico complementarias a la región reguladora del gen (por ejemplo, el promotor y/o potenciadores) para formar estructuras de triple hélice que eviten la transcripción del gen en células diana. Véase Helene, C, *Anticancer Drug Res.* 6, 569-84, 1991; Helene et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660, 27-36 1992; y Maher, L.J. *Bioassays* 14, 807-15, 1992.

Otros métodos, tales como el uso de anticuerpos dirigidos contra un polipéptido endógeno para inhibir su función en plantas, o la interferencia en la ruta de señalización en que está implicado un polipéptido, serán bien conocidos para los expertos en la materia. En particular, puede preverse que moléculas artificiales pueden ser útiles para inhibir la función biológica de un polipéptido diana, o para interferir con la ruta de señalización en que está implicado el polipéptido diana.

Pueden usarse microARN (miARN) artificiales y/o naturales para anular la expresión génica y/o la traducción de ARNm. Los miARN endógenos son ARN pequeños monocatenarios de típicamente 19-24 nucleótidos de longitud. Funcionan principalmente regulando la expresión génica y/o la traducción de ARNm. La mayoría de microARN (miARN) de plantas tienen complementariedad perfecta o casi perfecta con sus secuencias diana. Sin embargo, existen dianas naturales con hasta cinco desapareamientos. Se procesan de ARN no codificantes más largos con estructuras replegadas características por RNAsas específicas de doble hebra de la familia Dicer. Tras el procesamiento, se incorporan en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) por unión a su componente principal, una proteína Argonauta. Los miARN sirven como componentes de especificidad de RISC, ya que forman pares de bases con ácidos nucleicos diana, principalmente ARNm, en el citoplasma. Los posteriores eventos reguladores incluyen escisión de ARNm diana y destrucción y/o inhibición de la traducción. Los efectos de la sobreexpresión de miARN a menudo se reflejan, por tanto, en niveles disminuidos de ARNm de genes diana.

Los microARN artificiales (amiARN), que son típicamente de 21 nucleótidos de longitud, pueden modificarse por ingeniería genética específicamente para regular negativamente la expresión génica de un único gen o múltiples genes de interés. Los determinantes de la selección de diana de microARN de plantas son bien conocidos en la

técnica. Se han definido parámetros empíricos para el reconocimiento de la diana y pueden usarse para ayudar en el diseño de amiARN específicos (Schwab et al., Dev. Cell 8, 517-527, 2005). Las herramientas convenientes para el diseño y la generación de amiARN y sus precursores también están disponibles al público (Schwab et al., Plant Cell 18, 1121 -1 133, 2006).

Para un rendimiento óptimo, las técnicas de silenciamiento génico usadas para reducir la expresión en una planta de un gen endógeno requieren el uso de secuencias de ácido nucleico de plantas monocotiledóneas para la transformación de plantas monocotiledóneas, y de plantas dicotiledóneas para la transformación de plantas dicotiledóneas. Preferiblemente, se introduce una secuencia de ácido nucleico de cualquier especie dada de planta en esa misma especie. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico de arroz se transforma en una planta de arroz. Sin embargo, no es una necesidad absoluta que la secuencia de ácido nucleico a introducir sea originaria de la misma especie de planta que la planta en que se introducirá. Es suficiente que haya homología sustancial entre el gen diana endógeno y el ácido nucleico a introducir.

En otra realización más, la interferencia de proteínas, como se describe en la solicitud de patente WO2007071789 (medios y métodos para mediar la interferencia de proteínas) puede usarse para regular negativamente un producto génico. La última tecnología es una tecnología knock-down que en contraste con iARN actúa a nivel postraducciona (es decir, trabaja directamente sobre el nivel de proteína induciendo una agregación de proteínas específica de una diana dada). La agregación de proteínas es esencialmente un evento de mal plegamiento que sucede a través de la formación de láminas beta intermoleculares produciendo una anulación funcional de una diana seleccionada. A través del uso de un algoritmo especializado, es posible predecir de forma precisa los tramos de aminoácidos en una secuencia elegida de proteína diana que tendrán la mayor tendencia de autoasociación (Fernandez-Escamilla A. M. et al. (2004) *Nat Biotechnol* 22(10): 1302-6). Expresando estos péptidos específicos en las células, la proteína de interés puede dirigirse específicamente induciendo su agregación irreversible y por tanto su anulación funcional.

Anteriormente se han descrito ejemplos de diversos métodos para la reducción o eliminación sustancial de la expresión en una planta de un gen endógeno o un producto génico endógeno. Un experto en la materia sería muy capaz de adaptar los métodos mencionados anteriormente para el silenciamiento para conseguir la reducción de la expresión del gen endógeno en una planta completa o en partes de la misma a través del uso de un promotor apropiado, por ejemplo.

El término "introducción" o "transformación", como se menciona en este documento, abarca la transferencia de un polinucleótido exógeno en una célula hospedadora, independientemente del método usado para la transferencia. El tejido vegetal con capacidad de posterior propagación clonal, sea por organogénesis o embriogénesis, puede transformarse con una construcción genética de la presente invención y un regenerarse una planta completa a partir de la misma. El tejido particular elegido variará dependiendo de los sistemas de propagación clonal disponibles para, y más adecuados para, la especie particular que se esté transformando. Dianas tisulares ejemplares incluyen discos foliares, polen, embriones, cotiledones, hipocótilos, megagametofitos, tejido calloso, tejido meristemático existente (por ejemplo, meristemo apical, yemas axilares y meristemas de la raíz) y tejido de meristemo inducido (por ejemplo, meristemo de cotiledón y meristemo de hipocótilo). El polinucleótido puede introducirse de forma transitoria o estable en una célula hospedadora y puede mantenerse no integrado, por ejemplo, como un plásmido. Como alternativa, puede integrarse en el genoma hospedador. La célula vegetal transformada resultante después puede usarse para regenerar una planta transformada de un modo conocido para los expertos en la materia.

La transferencia de genes foráneos en el genoma de una planta se llama transformación. La transformación de una especie de planta ahora es una técnica casi rutinaria. De forma ventajosa, puede usarse cualquiera de varios métodos de transformación para introducir el gen de interés en una célula progenitora adecuada. Los métodos descritos para la transformación y regeneración de plantas a partir de tejidos vegetales o células vegetales pueden utilizarse para transformación transitoria o estable. Los métodos de transformación incluyen el uso de liposomas, electroporación, agentes químicos que aumentan la captación de ADN libre, inyección del ADN directamente en la planta, bombardeo con pistola de partículas, transformación usando virus o polen y microproyección. Los métodos pueden seleccionarse del método de calcio/poli-etilenglicol para protoplastos (Krens, F.A. et al., (1982) *Nature* 296, 72-74; Negrutiu I et al. (1987) *Plant Mol Biol* 8: 363- 373); electroporación de protoplastos (Shillito R.D. et al. (1985) *Bio/Technol* 3, 1099-1 102); microinyección en material vegetal (Crossway A et al., (1986) *Mol. Gen Genet* 202: 179-185); bombardeo con partículas recubiertas con ADN o ARN (Klein TM et al., (1987) *Nature* 327: 70), infección con virus (no de integración) y similares. Las plantas transgénicas, incluyendo plantas transgénicas de cultivo, se producen preferiblemente mediante transformación mediada por *Agrobacterium*. Un método ventajoso de transformación es la transformación *in planta*. Con este fin, es posible, por ejemplo, permitir que las *Agrobacteria* actúen sobre semillas de plantas o inocular el meristemo de la planta con *Agrobacteria*. Se ha demostrado que es particularmente oportuno de acuerdo con la invención permitir que una suspensión de *Agrobacteria* transformadas actúe sobre la planta intacta o al menos sobre los primordios de la flor. La planta se cultiva posteriormente hasta que se obtiene las semillas de la planta tratada (Clough y Bent, *Plant J.* (1998) 16, 735-743). Los métodos para la transformación mediada por *Agrobacterium* del arroz incluyen métodos bien conocidos para la transformación del arroz, tales como los descritos en cualquiera de los siguientes: solicitud de patente europea EP1198985, Aldemita y Hodges (*Planta* 199: 612-617, 1996); Chan et al. (*Plant Mol Biol* 22 (3): 491 -506, 1993), Hiei et al. (*Plant J* 6 (2): 271 -282, 1994). En el caso de transformación de maíz, el método preferido es como se describe en Ishida et al. (*Nat.*

- Biotechnol 14(6): 745-50, 1996) o Frame et al. (Plant Physiol 129(1): 13-22, 2002). Dichos métodos se describen adicionalmente a modo de ejemplo en B. Jenés et al., Techniques for Gene Transfer, en: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. S.D. Kung y R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 y en Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205-225). Los ácidos nucleicos o la construcción a expresarse se clonan preferiblemente en un vector, que es adecuado para transformar *Agrobacterium tumefaciens*, por ejemplo, pBin19 (Bevan et al. (1984) Nucl. Acids Res. 12:8711). Las *Agrobacteria* transformadas por dicho vector después pueden usarse de un modo conocido para la transformación de plantas, tales como plantas usadas como modelo, como *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* está dentro del alcance de la presente invención no considerada como una planta de cultivo), o plantas de cultivo tales como, a modo de ejemplo, plantas de tabaco, por ejemplo, por inmersión de hojas mustias u hojas troceadas en una solución agrobacteriana y después cultivándolas en medio adecuado. La transformación de plantas mediante *Agrobacterium tumefaciens* se describe, por ejemplo, por Hofgen y Willmitzer en Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877 o es conocido *inter alia* de F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; en Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. S.D. Kung y R. Wu, Academic Press, 1993, pág. 15-38.
- Además de la transformación de células somáticas, que después tienen que regenerarse en plantas intactas, también es posible transformar las células de meristemos vegetales y, en particular, aquellas células que se desarrollan en gametos. En este caso, los gametos transformados siguen el desarrollo natural de la planta, dando lugar a plantas transgénicas. Por tanto, por ejemplo, se tratan semillas de *Arabidopsis* con *Agrobacteria* y se obtienen semillas de las plantas en desarrollo de las cuales se transforma una cierta proporción y por tanto son transgénicas [Feldman, KA y Marks MD (1987). Mol Gen Genet 208:1 -9; Feldmann K (1992). En: C Koncz, N-H Chua y J Shell, eds, Methods in Arabidopsis Research. World Scientific, Singapore, pág. 274-289]. Métodos alternativos se basan en la eliminación repetida de las inflorescencias y la incubación del sitio de escisión en el centro de la roseta con *Agrobacteria* transformadas, por lo cual se pueden obtener, asimismo, semillas transformadas en un punto temporal posterior (Chang (1994). Plant J. 5: 551 -558; Katavic (1994). Mol Gen Genet, 245: 363-370). Sin embargo, un método especialmente eficaz es el método de infiltración en vacío con sus modificaciones, tales como el método de "inmersión floral". En el caso de infiltración en vacío de *Arabidopsis*, se tratan a presión reducida plantas intactas con una suspensión agrobacteriana [Bechthold, N (1993). CR Acad Sci Paris Life Sci, 316: 1 194-1 199], mientras que en el caso del método de "inmersión floral", el tejido floral en desarrollo se incuba brevemente con una suspensión agrobacteriana tratada con tensioactivo [Clough, SJ y Bent AF (1998) The Plant J. 16, 735-743]. Se recoge una cierta proporción de semillas transgénicas en ambos casos, y estas semillas pueden distinguirse de semillas no transgénicas cultivando en las condiciones selectivas descritas anteriormente. Además, la transformación estable de plástidos es ventajosa porque los plástidos se heredan por vía materna en la mayoría de cultivos, reduciendo o eliminando el riesgo de que el transgén fluya a través de polen. La transformación del genoma del cloroplasto generalmente se consigue por un proceso que se ha presentado de forma esquemática en Klaus et al., 2004 [Nature Biotechnology 22 (2), 225-229]. En resumen, las secuencias a transformar se clonan junto con un gen marcador de selección entre secuencias flanqueantes homólogas al genoma del cloroplasto. Estas secuencias flanqueantes homólogas dirigen integración específica de sitio en el plastoma. La transformación de plástidos se ha descrito para muchas especies diferentes de plantas y se da una visión global en Bock (2001) Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. J Mol Biol. 2001 Sep 21; 312 (3):425-38 o Maliga, P (2003) Progress towards commercialization of plastid transformation technology. Trends Biotechnol. 21, 20-28. Recientemente se ha informado de progreso biotecnológico adicional en forma de transformantes de plástidos sin marcador, que pueden producirse por un gen marcador cointegrado transitorio (Klaus et al., 2004, Nature Biotechnology 22(2), 225-229).
- Las células vegetales modificadas genéticamente pueden regenerarse mediante todos los métodos con los que están familiarizados los expertos en la materia. Pueden encontrarse métodos adecuados en las publicaciones mencionadas anteriormente por S.D. Kung y R. Wu, Potrykus o Hofgen y Willmitzer.
- Generalmente después de la transformación, se seleccionan células vegetales o agrupaciones de células para la presencia de uno o más marcadores que están codificados por genes expresables en plantas cotransferidos con el gen de interés, después de los cual se regenera el material transformado en una planta completa. Para seleccionar plantas transformadas, el material vegetal obtenido en la transformación se somete, como norma, a condiciones selectivas de modo que las plantas transformadas puedan distinguirse de las plantas no transformadas. Por ejemplo, las semillas obtenidas del modo descrito anteriormente pueden plantarse y, después de un periodo de cultivo inicial, pueden someterse a una selección adecuada por pulverización. Una posibilidad adicional consiste en cultivar las semillas, si fuera apropiado después de esterilización, en placas de agar usando un agente de selección adecuado de modo que solamente las semillas transformadas puedan crecer en plantas. Como alternativa, las plantas transformadas se exploran para la presencia de un marcador de selección, tales como los descritos anteriormente.
- Después de la transferencia de ADN y la regeneración, también pueden evaluarse las plantas supuestamente transformadas, por ejemplo, usando análisis de Southern, para la presencia del gen de interés, el número de copias y/o la organización genómica. Como alternativa o adicionalmente, pueden controlarse los niveles de expresión del ADN recién introducido usando análisis de Northern y/o Western, siendo ambas técnicas bien conocidas para los expertos en la materia.
- Las plantas transformadas generadas pueden propagarse por una diversidad de medios, tales como por

propagación clonal o técnicas clásicas de reproducción. Por ejemplo, una planta transformada de primera generación (o T1) puede autocruzarse y seleccionarse los transformantes de segunda generación (o T2) homocigóticos, y las plantas T2 pueden después propagarse adicionalmente a través de técnicas clásicas de reproducción. Los organismos transformados generados pueden adoptar una diversidad de formas. Por ejemplo, pueden ser quimeras de células transformadas y células no transformadas; transformantes clonales (por ejemplo, todas las células transformadas que contienen el casete de expresión); injertos de tejidos transformados y no transformados (por ejemplo, en plantas, un rizoma transformado injertado en un retoño no transformado).

Habitualmente, sucede un aumento en la producción y/o la tasa de crecimiento si la planta está en condiciones no de estrés. Las plantas típicamente responden a la exposición a estrés creciendo más lentamente. En condiciones de estrés severo, la planta puede incluso detener el crecimiento por completo. El estrés leve, por otro lado, se define en este documento como cualquier estrés al que se expone una planta, que provoca que la planta deje de crecer más lento (o temporalmente) pero aún tiene la capacidad de reiniciar el crecimiento cuando desaparece el estrés (leve). El estrés leve, en el sentido de la invención, conduce a una reducción en el crecimiento de las plantas estresadas, de menos del 40%, 35%, 30% o 25%, más preferiblemente menos del 20% o 15% en comparación con la planta de control en condiciones no de estrés. Debido a los avances en la práctica agrícola (riego, fertilización, tratamientos con pesticida) los estreses severos no se encuentran a menudo en plantas de cultivo cultivadas. Como consecuencia, el crecimiento comprometido inducido por estrés leve a menudo es una característica indeseable para la agricultura. Los "estreses leves" son los estreses bióticos y/o abióticos (ambientales) habituales a los que se expone una planta. Los estreses abióticos pueden deberse a sequía o exceso de agua, estrés anaeróbico, estrés salino, toxicidad química, estrés oxidativo y temperaturas calientes, frías o de congelación.

Los "estreses bióticos" son típicamente aquellos estreses causados por patógenos, tales como bacterias, virus, hongos, nematodos e insectos.

El "estrés abiótico" puede ser un estrés osmótico causado por un estrés de agua, por ejemplo, debido a sequía, estrés salino o estrés por congelación. El estrés abiótico también puede ser un estrés oxidativo o un estrés por frío. El "estrés por congelación" pretende hacer referencia a estrés debido a temperaturas de congelación, es decir, temperaturas en que las moléculas disponibles de agua se congelan y se convierten en hielo. El "estrés por frío", también llamado "estrés por enfriamiento", pretende hacer referencia a temperaturas frías, por ejemplo, temperaturas por debajo de 10°C o preferiblemente por debajo de 5°C, pero en las que las moléculas de agua no se congelan. Como se presenta en Wang et al. (Planta (2003) 218: 1-14), el estrés abiótico conduce a una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que afectan de forma adversa al crecimiento y productividad de la planta. Se sabe que la sequía, salinidad, temperaturas extremas y estrés oxidativo están interconectados y pueden inducir daños en el crecimiento y celulares a través de mecanismos similares. Rabbani et al. (Plant Physiol (2003) 133: 1755-1767) describe un grado particularmente alto de "interferencia" entre el estrés por sequía y el estrés por alta salinidad. Por ejemplo, la sequía y/o la salinización se manifiestan principalmente como estrés osmótico, provocando la alteración de la homeostasis y la distribución de iones en la célula. El estrés oxidativo, que frecuentemente acompaña a una alta o baja temperatura, el estrés por salinidad o sequía, puede causar la desnaturalización de proteínas funcionales y estructurales. Como consecuencia, estos diversos estreses ambientales a menudo activan rutas similares de señalización celular y respuestas celulares, tales como la producción de proteínas de estrés, regulación positiva de antioxidantes, acumulación de solutos compatibles y detención del crecimiento. La expresión condiciones "no de estrés", como se usa en este documento, es las aquellas condiciones ambientales que permiten el crecimiento óptimo de las plantas. Los expertos en la materia son conscientes de las condiciones normales del suelo y las condiciones climáticas para una localización dada. Las plantas con condiciones óptimas de crecimiento (crecimiento en condiciones no de estrés) típicamente producen, en orden creciente de preferencia, al menos un 97%, 95%, 92%, 90%, 87%, 85%, 83%, 80%, 77% o 75% de la producción promedio de dicha planta en un entorno dado. La producción promedio puede calcularse sobre una base de recolección y/o estacional. Los expertos en la materia son conscientes de las producciones promedio de rendimiento de un cultivo.

En particular, los métodos de la presente invención pueden realizarse en condiciones no de estrés. En un ejemplo, los métodos de la presente invención pueden realizarse en condiciones no de estrés tales como sequía leve para dar plantas que tienen producción aumentada respecto a plantas de control.

En otra realización, los métodos de la presente invención pueden realizarse en condiciones de estrés.

En un ejemplo, los métodos de la presente invención pueden realizarse en condiciones de estrés, tales como sequía, para dar plantas que tienen producción aumentada respecto a plantas de control. En otro ejemplo, los métodos de la presente invención pueden realizarse en condiciones de estrés, tales como deficiencia de nutrientes, para dar plantas que tienen producción aumentada respecto a plantas de control.

La deficiencia de nutrientes puede resultar de la ausencia de nutrientes, tales como nitrógeno, fosfatos y otros compuestos que contienen fósforo, potasio, calcio, magnesio, manganeso, hierro y boro, entre otros.

En otro ejemplo más, los métodos de la presente invención pueden realizarse en condiciones de estrés, tales como

estrés salino, para dar plantas que tienen producción aumentada respecto a plantas de control. La expresión estrés salino no está restringida a la sal común (NaCl), sino que puede ser una cualquiera o más de: NaCl, KCl, LiCl, MgC, CaC, entre otras.

5 En otro ejemplo más, los métodos de la presente invención pueden realizarse en condiciones de estrés, tales como estrés por frío o estrés por congelación, para dar plantas que tienen producción aumentada respecto a plantas de control.

10 Las expresiones "aumentar", "mejorar" o "potenciar" son intercambiables e indicarán, en el sentido de la solicitud, al menos un 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% o 10%, preferiblemente al menos un 15% o 20%, más preferiblemente un 25%, 30%, 35% o 40% más de producción y/o crecimiento en comparación con plantas de control, como se define en este documento.

15 El término "planta", como se usa en este documento, abarca plantas completas, progenitores y descendencia de las plantas, incluyendo semillas, brotes, tallos, hojas, raíces (incluyendo tubérculos), flores y tejidos y órganos, donde cada uno de los mencionados anteriormente comprenden el gen/ácido nucleico de interés. El término "planta" también abarca células vegetales, cultivos en suspensión, tejido caloso, embriones, regiones meristemáticas, gametofitos, esporofitos, polen y microsporas, de nuevo donde cada uno de los mencionados anteriormente comprende el gen/ácido nucleico de interés.

20 Las plantas que son particularmente útiles en los métodos de la invención incluyen, en particular, plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, incluyendo forraje o legumbres forrajeras, plantas ornamentales, cultivos comestibles, árboles o arbustos seleccionados de la lista que comprende *Acer spp.*, *Actinidia spp.*, *Abelmoschus spp.*, *Agave sisalana*, *Agropiron spp.*, *Agrostis stolonifera*, *Allium spp.*, *Amaranthus spp.*, *Ammophila arenaria*, *Ananas comosus*, *Annona spp.*, *Apium graveolens*, *Arachis spp.*, *Artocarpus spp.*, *Asparagus officinalis*, *Avena spp.* (por ejemplo, *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua var. sativa*, *Avena hybrida*), *Averrhoa carambola*, *Bambusa sp.*, *Benincasa hispida*, *Bertholletia excelsea*, *Beta vulgaris*, *Brassica spp.* (por ejemplo, *Brassica napus*, *Brassica rapa ssp.* [canola, colza oleaginosa, nabo colza]), *Cadaba farinosa*, *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Cannabis sativa*, *Capsicum spp.*, *Carex elata*, *Carica papaya*, *Carissa macrocarpa*, *Carya spp.*, *Carthamus tinctorius*, *Castanea spp.*, *Ceiba pentandra*, *Cichorium endivia*, *Cinnamomum spp.*, *Citrullus lanatus*, *Citrus spp.*, *Cocos spp.*, *Coffea spp.*, *Colocasia esculenta*, *Cola spp.*, *Corchorus sp.*, *Coriandrum sativum*, *Corylus spp.*, *Crataegus spp.*, *Crocus sativus*, *Cucurbita spp.*, *Cucumis spp.*, *Cynara spp.*, *Daucus carota*, *Desmodium spp.*, *Dimocarpus longan*, *Dioscorea spp.*, *Diospiros spp.*, *Echinochloa spp.*, *Elaeis* (por ejemplo, *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*), *Eleusine coracana*, *Eragrostis tef*, *Erianthus sp.*, *Eriobotrya japonica*, *Eucalyptus sp.*, *Eugenia uniflora*, *Fagopyrum spp.*, *Fagus spp.*, *Festuca arundinacea*, *Ficus carica*, *Fortunella spp.*, *Fragaria spp.*, *Ginkgo biloba*, *Glycine spp.* (por ejemplo, *Glycine max*, *Soja hispida* o *Soja max*), *Gossypium hirsutum*, *Helianthus spp.* (por ejemplo, *Helianthus annuus*), *Hemerocallis fulva*, *Hibiscus spp.*, *Hordeum spp.* (por ejemplo, *Hordeum vulgare*), *Ipomoea batatas*, *Juglans spp.*, *Lactuca sativa*, *Lathyrus spp.*, *Lens culinaris*, *Linum usitatissimum*, *Litchi chinensis*, *Lotus spp.*, *Luffa acutangula*, *Lupinus spp.*, *Luzula sylvatica*, *Lycopersicon spp.* (por ejemplo, *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Lycopersicon piriforme*), *Macrotyloma spp.*, *Malus spp.*, *Malpighia emarginata*, *Mammea americana*, *Mangifera indica*, *Manihot spp.*, *Manilkara zapota*, *Medicago sativa*, *Melilotus spp.*, *Mentha spp.*, *Miscanthus sinensis*, *Momordica spp.*, *Morus nigra*, *Musa spp.*, *Nicotiana spp.*, *Olea spp.*, *Opuntia spp.*, *Ornithopus spp.*, *Oryza spp.* (por ejemplo, *Oryza sativa*, *Oryza latifolia*), *Panicum miliaceum*, *Panicum virgatum*, *Passiflora edulis*, *Pastinaca sativa*, *Pennisetum sp.*, *Persea spp.*, *Petroselinum crispum*, *Phalaris arundinacea*, *Phaseolus spp.*, *Phleum pratense*, *Phoenix spp.*, *Phragmites australis*, *Physalis spp.*, *Pinus spp.*, *Pistacia vera*, *Pisum spp.*, *Poa spp.*, *Populus spp.*, *Prosopis spp.*, *Prunus spp.*, *Psidium spp.*, *Punica granatum*, *Pirus communis*, *Quercus spp.*, *Raphanus sativus*, *Rheum rhabarbarum*, *Ribes spp.*, *Ricinus communis*, *Rubus spp.*, *Saccharum spp.*, *Salix sp.*, *Sambucus spp.*, *Secale cereale*, *Sesamum spp.*, *Sinapis sp.*, *Solanum spp.* (por ejemplo, *Solanum tuberosum*, *Solanum integrifolium* o *Solanum lycopersicum*), *Sorghum bicolor*, *Spinacia spp.*, *Syzygium spp.*, *Tagetes spp.*, *Tamarindus indica*, *Theobroma cacao*, *Trifolium spp.*, *Tripsacum dactyloides*, *Triticosecale rimpaii*, *Triticum spp.* (por ejemplo, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum hybernum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum*, *Triticum monococcum* o *Triticum vulgare*), *Tropaeolum minus*, *Tropaeolum majus*, *Vaccinium spp.*, *Vicia spp.*, *Vigna spp.*, *Viola odorata*, *Vitis spp.*, *Zea mays*, *Zizania palustris*, *Ziziphus spp.*, entre otras.

55 La elección de plantas adecuadas de control es una parte rutinaria de un sistema experimental y puede incluir plantas de tipo silvestre correspondientes o plantas correspondientes sin el gen de interés. La planta de control típicamente es de la misma especie de planta o incluso de la misma variedad que la planta a evaluar. La planta de control también puede ser un cigoto nulo de la planta a evaluar. Los cigotos nulos son individuos a han perdido el transgén por segregación. Una "planta de control", como se usa en este documento, se refiere no solamente a plantas completas, sino también a partes de plantas, incluyendo semillas y partes de semillas.

60 La invención proporciona una planta modificada genéticamente, que puede ser una planta transgénica, que es más tolerante a una condición de estrés que una planta de referencia correspondiente. Como se usa en este documento, el término "tolerante", cuando se usa en referencia a una condición de estrés de una planta, significa que la planta particular, cuando se expone a una condición de estrés, muestra menos de un efecto, o nada de efecto, en respuesta a la condición en comparación con una planta de referencia correspondiente (planta de tipo silvestre de

origen natural o una planta que no contiene una construcción de la presente invención). Como consecuencia, una planta abarcada dentro de la presente invención muestra producción agrícola mejorada como resultado de tolerancia potenciada a estrés abiótico y crece mejor en condiciones más ampliamente variables, tales como biomasa aumentada y/o producciones mayores y/o produce más semillas. Preferiblemente, la planta transgénica tiene capacidad de crecimiento sustancialmente normal en condiciones ambientales donde la planta de referencia correspondiente muestra crecimiento, producción, metabolismo o viabilidad reducida, o esterilidad masculina o femenina aumentada.

Como se usa en este documento, la expresión "tolerancia a sequía" se refiere a la productividad más deseable de una planta en condiciones de estrés por déficit de agua. El estrés por déficit de agua se desarrolla cuando la demanda por evapotranspiración de agua excede el suministro de agua. El estrés por déficit de agua puede ser de magnitud grande o pequeña (por ejemplo, días o semanas de poca o ninguna agua accesible), pero las plantas tolerantes a sequía muestran mejor crecimiento y/o recuperación del estrés, en comparación con plantas sensible a sequía. Como se usa en este documento, la expresión "eficacia en el uso de agua" se refiere a la productividad más deseable de una planta por unidad de agua aplicada. El agua aplicada puede ser el resultado de precipitaciones o riego. Como se usa en este documento, la expresión "tolerancia salina" se refiere a la productividad más deseable de una planta en condiciones de estrés por salinidad. Aunque para cada especie difiere el umbral al que el suelo y/o la salinidad del agua (a menudo expresada como conductividad), una planta tolerante a sal tendría un mayor umbral de salinidad antes del descenso de la producción. La tolerancia salina también se refiere a la sensibilidad de la producción al agua y/o la salinidad del suelo más allá del umbral. De modo que una planta tolerante a la sal mostraría menos impacto sobre la producción por unidad de salinidad que una planta sensible a sal. La tolerancia salina se refiere a un umbral aumentado y/o una sensibilidad disminuida más allá del umbral de producción a salinidad.

La expresión "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*, de forma constitutiva o inducible, en cualquier célula incluyendo, además de células vegetales, células procariotas, de levadura, fúngicas, de insecto o de mamífero. La expresión incluye sistemas lineales y circulares de expresión. La expresión incluye todos los vectores. Los casetes pueden permanecer episómicos o integrarse en el genoma de la célula hospedadora. Los casetes de expresión pueden tener la capacidad de autorreplicarse o no (es decir, dirigir la expresión únicamente transitoria en una célula). La expresión incluye casetes de expresión recombinantes que contienen solamente los elementos mínimos necesarios para la transcripción del ácido nucleico recombinante.

El término "inducible" o "induciblemente" significa que los polipéptidos de la presente invención no se expresan o se expresan a niveles muy bajos, en ausencia de un agente inductor. La expresión de los polipéptidos de la presente invención se induce enormemente en respuesta a un agente inductor.

Los siguientes ejemplos no limitantes describen métodos y medios de acuerdo con la invención. Salvo que se indique de otro modo en los ejemplos, todas las técnicas se realizan de acuerdo con protocolos convencionales en la técnica. Los siguientes ejemplos se incluyen para ilustrar realizaciones de la invención. Los expertos en la materia deben apreciar, a la luz de la presente descripción, que pueden hacerse muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen y aún obtener un resultado parecido o similar. Más específicamente, será evidente que ciertos agentes que están tanto química como fisiológicamente relacionados, pueden sustituirse en el lugar de los agentes descritos en este documento, aunque se conseguirían resultados iguales o similares.

Ejemplos

1. El estrés osmótico afecta a la proliferación celular y la aparición de endorreduplicación

Para descifrar los mecanismos por los que el déficit de agua inhibe la proliferación celular, se desarrolló un sistema experimental que reducía de forma reproducible el área foliar en aproximadamente un 50%. Los mejores resultados se obtuvieron por la adición de manitol al medio de cultivo a una baja concentración (25 mM), disminuyendo de ese modo el potencial acuoso del medio y, por tanto, la captación de agua de las raíces expuestas. Se germinaron plántulas de *Arabidopsis* y se cultivaron en mallas de nylon superpuestas en medio control hasta 9 días después de la estratificación (DAS), cuando la tercera hoja verdadera está en plena proliferación (Skirycz et al., 2010), y posteriormente se transfirieron a medio de control o que contenía manitol (Figuras 1A a 1C). Se realizó análisis cinemático, mediante lo cual las hojas se recogieron diariamente durante todo el desarrollo de la hoja 3 (9-20 DAS) y basándose en los esquemas de la epidermis abaxial se calcularon la cantidad de células, el área celular, la cantidad de células guardianas y las tasas de división celular y expansión celular (De Veylder et al., 2001). La disminución en el área foliar ya era evidente 24 h después de la transferencia (Figura 2A; ensayo *t*, valor *p* = 0,003) y resultó de tasas reducidas de proliferación, como se demuestra por las mediciones celulares (Figura 2B). Sin embargo, esta reducción era a corto plazo ya que las tasas de división celular de plantas estresadas eran indistinguibles de los controles en 72 h de transferencia, y después de ello incluso ligeramente aumentadas como compensación de la disminución inicial (Figura 2B). De forma importante, la propia transferencia no inhibía el crecimiento foliar y las cantidades reducidas de células podrían atribuirse completamente a estrés osmótico (no mostrado). No se alteraron la morfología foliar ni de la planta por manitol (Figura 2C). La expansión celular también se vio afectada por el estrés

y el área foliar final reducida era una combinación de menos células y más pequeñas (Figura 2D). El índice estomático, que representa la cantidad de estomas como una fracción del número total de células, se redujo también (Figura 2E). Para aprender más acerca de los mecanismos subyacentes a la rápida reducción de la división celular tras la aparición del estrés, se recogieron muestras foliares diariamente después de la transferencia. Como una medida de la diferenciación celular, se examinó la distribución de ploidía por citometría de flujo. Esto reveló diferencias significativas empezando desde 48 h después de la imposición del estrés (Figura 3A). En hojas estresadas, empezaron a acumularse núcleos 4C aproximadamente un día antes que en los controles a expensas de núcleos 2C (Figura 3A). De forma análoga, la cantidad de núcleos 8C aumentó abruptamente en 14 DAS en hojas estresadas, pero solamente en 15 DAS en muestras de control (Figura 3A). De nuevo, la propia transferencia no tuvo efecto sobre los niveles de ploidía (no mostrado). La aparición más rápida de endoreduplicación implicó que el estrés inducía salida mitótica. Esta observación se investigó adicionalmente con una línea indicadora *CYCB1;1:Dbox-GUS*. La tinción para la actividad *CYCB1;1:Dbox-GUS* visualiza células en la transición G2-a-M, reflejando la actividad mitótica (Colón-Carmona et al., 1999). Las diferencias más evidentes se observaron 48 h después de la transferencia. Aunque la diferenciación en el desarrollo se manifiesta por fuerte tinción en la base de la hoja, pero sin tinción en la punta de la hoja, podría verse claramente en hojas tanto de control como estresadas, que la actividad GUS global era mucho más débil en las hojas estresadas correspondientes a una cantidad reducida de células mitóticas (Figura 3B). Aunque el tamaño relativo de la zona de proliferación celular fue similar en hojas tratadas con manitol, las células restantes en proliferación se encontraron en un patrón disperso en toda esta zona. En conclusión, la exposición de hojas en proliferación a estrés osmótico leve conduce a una rápida disminución en las tasas de división celular y una aparición más rápida de endoreduplicación, indicativa de una salida mitótica prematura que también se observó por la expresión reducida de *CYCB1;1:Dbox-GUS* tras tratamiento de estrés. En unos pocos días después de la transferencia, las tasas de división se adaptaron a las nuevas condiciones y se observaron efectos de compensación.

2. La detención y la salida del ciclo celular dependen de la duración del estrés

Para investigar la dinámica de la señalización de estrés, se transfirieron plántulas de 9-DAS de edad a manitol durante 10, 24 o 48 h y posteriormente se transfirieron de nuevo a medio de control. Aunque en todos los casos el estrés osmótico produjo detención del ciclo celular, ilustrada por un área foliar reducida medida en 10 DAS (24 h después de la transferencia inicial) (Figura 4A), 10 h de imposición de estrés fue demasiado corto para desencadenar la salida mitótica, mientras que después de 24 h, era visible alguna diferenciación prematura (Figura 4C). Además, la reducción inicial en la cantidad de células medida después de exposición durante 10 h y 24 h se compensó completamente y no pudieron detectarse cambios en la cantidad de células en 14 DAS, aunque esta recuperación fue solamente parcial para plantas expuestas a estrés durante 48 h (Figura 4B). Junto con las cantidades de células, el índice estomático se recuperó también en estas plantas (no mostrado). En conclusión, una exposición corta a estrés detiene de forma reversible el ciclo celular y solamente cuando el estrés persiste se observa salida mitótica y diferenciación.

3. La actividad aumentada de división meristemoide ayuda en la recuperación de la cantidad de células

Después de la detención inicial de división celular en la zona de proliferación celular y la posterior salida del ciclo celular mitótico, se recuperaron las tasas de división celular y se volvieron ligeramente mayores en hojas tratadas con manitol (Figura 2B) empezando en 13 DAS, un punto temporal en que la zona de división celular definida se reduce a una zona muy estrecha cerca de la base de la hoja. Además, cuando las plantas se estresan durante 48 h, momento en el cual había sucedido la diferenciación, y después se transfirieron de nuevo al medio de control, sus cantidades de células se recuperaron parcialmente y, simultáneamente, el índice estomático se recuperó completamente también (Figura 4C). Las divisiones asociadas con la formación de estomas podrían justificar esta recuperación. Usando la línea *CYCB1;1:DBox-GUS*, de hecho se pudo demostrar que en el momento de la recuperación de la cantidad de células (13-14 DAS) la actividad de división meristemoide era mayor en muestras tratadas con manitol y en muestras en recuperación del tratamiento de manitol que en muestras de control (Figura 5A). Como el linaje meristemoide está restringido a la epidermis, también se comprobó la actividad de división en los tejidos internos de la hoja y se observó que en 14 DAS aún había alguna actividad mitótica en la base de la hoja de plantas cultivadas en manitol, mientras que en hojas de control la zona de proliferación celular había desaparecido completamente (Figura 5B).

4. Apreciación molecular en la inhibición del crecimiento revelada por perfilado de transcritos

Para obtener una mejor comprensión de los mecanismos molecular que inhiben la división celular durante el estrés, los primordios de la hoja en proliferación se sometieron a perfilado de transcritos del genoma completo. El análisis estadístico identificó 27, 189, 351, y 886 transcritos regulados positivamente y 31, 145, 84, y 622 regulados negativamente a las 1,5, 3, 12 y 24 h después de la transferencia a manitol 25 mM, respectivamente. Los datos de microserie seleccionados pudieron validarse con una plataforma nCounter que contenía sondas para 100 genes implicados en el crecimiento, el estrés y la regulación hormonal. Se usaron transcritos diferenciales para construir diagramas Venn y se sometieron a agrupaciones de medias *k*. La cantidad de genes expresados de forma diferencial fue proporcional al tiempo de exposición a estrés y la mayoría de los genes que estaban regulados positivamente o negativamente en puntos temporales anteriores permanecieron altos o bajo a las 24 h,

respectivamente. Posteriormente, se examinaron los transcritos diferenciales con PageMan para calcular la sobrerrepresentación funcional de categorías MapMan (Thimm et al., 2004; Usadel et al., 2006) y se compararon con experimentos de microserie disponibles al público (véase "materiales y métodos"). Para explicar las reducidas tasas de proliferación celular, los genes del ciclo celular estaban entre los sospechosos principales. De hecho, varios transcritos que codifican ciclinas de tipo A, B y D, CDKB, proteínas relacionadas con SIAMESE y un factor de transcripción MYB3R4 estaban significativamente regulados negativamente (Figura 6A). La comparación con los datos de expresión obtenidos de cultivos celulares sincronizados (Menges et al., 2003) reveló una sobrerrepresentación significativa de genes mitóticos entre los transcritos regulados negativamente, tales como las quinasas *AURORA* y la quinesina *HINKEL* que están implicadas en citoquinesis (véase la Figura 6A). Sorprendentemente, la magnitud del cambio para todos los genes del ciclo celular mencionados anteriormente fue similar (aproximadamente del 30%) y sucedió solamente a las 24 h (Figura 6A). Además de los transcritos relacionados con el ciclo celular, se puso interés particularmente en genes relacionados con la señalización hormonal. Tanto la comparación con experimentos de adición de hormonas disponibles al público (Goda et al., 2008) como el análisis PageMan reveló cambios en la señalización de etileno. Los genes sensibles a ACC estaban enriquecidos entre los transcritos regulados positivamente en hojas en proliferación tan pronto como a las 1,5 y 3 h después de la aparición del estrés. También se indujo la expresión de genes directamente implicados en la señalización de etileno, concretamente los receptores de etileno (*ETR2* y *ESR1*), MAPK *CTR1* y *MPK3*, factores de transcripción *EIN3* y *EIL1*, *EBF1* y *EBF2* implicados en la degradación de la proteína EIN3, y varios factores de transcripción sensibles a etileno (*ERF1*, *ERF2*, *ERF5*, *ERF6*, y *ERF11*) (Figura 7A). Aunque los transcritos que codifican enzimas biosintéticas de ACC no estaban afectados, la ACC oxidasa (ACO2), que convierte ACC en etileno, estaba regulada positivamente (Figura 7A). De forma no significativa, no era evidente ninguna activación de señalización de ABA ni de jasmonato, otras dos hormonas clásicas de estrés, a partir del análisis del transcriptoma. De forma importante, la propia transferencia no afectó a la expresión de genes seleccionados del ciclo celular y el estrés, medida por PCR de transcripción inversa cuantitativa ((qRT)-PCR), que muestra adicionalmente que no hay respuesta basal a estrés en controles debido a la transferencia, que podría enmascarar las respuestas de estrés, tal como una respuesta de ABA, en plantas expuestas a manitol. En resumen, la exposición a estrés a corto plazo provocó la rápida inducción de genes implicados en la señalización de etileno. Los genes relacionados con el ciclo celular estaban regulados negativamente de forma concomitante, pero solamente 24 h después de la aparición del estrés.

5. ACC se acumula en brotes de plantas estresadas

Para descubrir si transcritos diferenciales reflejan cambios en niveles hormonales, se determinaron las concentraciones del precursor de etileno ACC en brotes completos de plantas de 9 días de edad transferidas a manitol. Ya 1 h después de la aparición del estrés, los niveles de ACC eran un 30% mayores en muestras estresadas que en las de control, aunque esto no fue significativo, y en 10 h, el aumento era mayor de 2 veces y significativo (Figura 7B). En el momento del análisis, las muestras de brotes estaban principalmente compuestas de células en expansión, lo que refleja la importancia global de la señalización de etileno para la respuesta de tejidos en crecimiento a estrés.

6. La actividad CDKA se reduce en horas de aparición del estrés

Como los transcritos de los genes del ciclo celular están regulados negativamente por el estrés de forma relativamente tardía, es improbable que los mecanismos transcripcionales contribuyan a la rápida detención del ciclo celular. Para estudiar la implicación de los mecanismos postranscripcionales, se investigó la actividad y abundancia proteica de CDKA. CDKA es una proteína no redundante situada en el corazón de la regulación del ciclo celular y promueve transiciones tanto G1-a-S como G2-a-M (Inzé y De Veylder, 2006). Aunque los niveles de transcrito y proteína de CDKA eran estable durante todo el tratamiento de estrés, la actividad CDKA disminuía tan pronto como 10 h después de la aparición del estrés y permanecía baja a las 24 h (Figura 6B). La rápida disminución en la actividad CDKA tras el estrés coincide con la detención del ciclo celular.

7. El etileno detiene el ciclo celular mitótico

El análisis del transcriptoma reveló una activación prematura dependiente de estrés de genes sensibles a etileno en primordios de la hoja. Para evaluar el papel del etileno en la regulación del ciclo celular, se analizó el efecto de ACC. Con este fin, se transfirieron plántulas a medio que contenía ACC 5 μ M (Goda et al., 2008) con el mismo sistema que el usado para los tratamientos con manitol. De forma similar al estrés osmótico, la transferencia de plántulas a ACC provocó una rápida reducción de las tasas de proliferación celular (Figura 2B) y la actividad CDKA disminuyó tan pronto como 10 h después de la transferencia (Figura 6B). Sin embargo, en contraste con el tratamiento con manitol, el análisis de ploidía reveló ausencia de cambios en la aparición de endorreduplicación (Figura 3A) y ausencia de diferencias en la expresión de los genes del ciclo celular mitótico *CDKB2;1* y *CYCB1;1*. Coherentemente, la tinción para la actividad *CYCB1;1:DBox*-GUS reveló ausencia de cambios en la cantidad de células mitóticas (Figura 3B). El índice estomático no estuvo afectado tampoco (Figura 2E). La posible implicación del etileno en la inhibición inducida por estrés de la división celular predice que mutantes insensibles a etileno estarían menos afectados por la transferencia a manitol. Para ensayar esta predicción, se seleccionaron mutantes con ninguno o poco efecto sobre el crecimiento en condiciones normales. Esta hipótesis demostró ser cierta para el

mutante receptor *etr1.3* y para *ein5.1*, deficiente en la actividad de la exorribonucleasa *XRN4* corriente arriba de las proteínas F-Box EBF1 y EBF2 (Figuras 8C y 8D). Se midió una diferencia particularmente pronunciada 72 h después de la transferencia (12 DAS); aunque la reducción en el área foliar del tipo silvestre fue de ~45%, fue solamente de ~20% y ~30% para *ein5.1* y *etr1.3*, respectivamente (Figura 8C). Una diferencia, aunque no significativa, se midió también para el mutante *mkk9*. De forma importante, la prematura aparición de endorreduplicación medida en hojas de tipo silvestre tratadas con estrés también pudo detectarse en ambos mutantes *ein5.1* y *etr1.3* (datos no mostrados) expuestos a manitol. Como se ha presentado anteriormente, cuando se dejan en medio que contiene manitol hasta 22 DAS, todos los mutantes, y particularmente *ein2.5*, desarrollaban fenotipos severos y estaban globalmente mucho más afectados por el estrés que las plantas de tipo silvestre (Skirycz et al., 2010). Además del manitol, también se ensayó el crecimiento foliar de mutantes insensibles a etileno después de la transferencia a ACC. Aunque la disminución relacionada con ACC en el área foliar en mutantes *ein3.1* y *eil1* era comparable con la del tipo silvestre, era significativamente menor en mutantes *etr1.3*, *ein5.1*, *mkk9* y *ein2.5* (Figuras 8E y 8F). Coherentemente, la actividad CDKA se redujo por tratamiento con ACC en el tipo silvestre y en el mutante *ein3.1* pero no en los mutantes *etr1.3* y *ein5.1*. En conclusión, la adición de ACC exógeno o la activación de la producción de etileno reduce la proliferación celular sin afectar significativamente a la aparición de endorreduplicación y posterior diferenciación celular de un modo independiente de EIN3.

8. Expresión de una ACC desaminasa bacteriana y de plantas bajo el control de tres promotores diferentes

En este experimento el objetivo fue una regulación negativa de la ruta de señalización de etileno solamente en células foliares en proliferación (genes quiméricos con 2 promotores meristemáticos diferentes: p4TM1 y pGR5) en comparación con una regulación negativa de la señalización de etileno en la planta completa (gen quimérico con el promotor de 335S). El transgén que se usó para la regulación negativa de la señalización de etileno fue la ACC desaminasa (una forma bacteriana y una forma vegetal), una enzima que degrada el precursor de etileno ACC. Los 6 genes quiméricos diferentes se construyeron clonando una ACC desaminasa bacteriana (bACD) o la ACC desaminasa endógena de *Arabidopsis thaliana* (AtACD1) bajo el control de los promotores de dos genes cuya expresión está principalmente limitada a células foliares en proliferación, pGRF5 y p4TM1, y bajo el control del promotor de 35S, que se expresa en la planta completa a través del desarrollo, como un control. Para cada una de estas 6 construcciones quiméricas se aisló un tipo silvestre, junto con uno a tres líneas transgénicas que mostraban una buena expresión del transgén ACC desaminasa.

Para clonar los promotores de GRF5 (derivado del gen AT3G13960) y 4TM1 (derivado del gen AT5G16250), el fragmento de 2 kb (denominado como pGRF5 y representado en la SEQ ID NO: 5) o el fragmento de 400 pb (denominado como p4TM1 y representado en la SEQ ID NO: 1) precediendo el sitio de inicio de la traducción se amplificó a partir del ADN genómico con cebadores que portaban sitios attB, permitiendo la recombinación de acceso en vectores pDONR-P4-P1R. La ACC desaminasa bacteriana (la secuencia de nucleótidos está representada en la SEQ ID NO: 7), aislada de *Pseudomonas putida* UW4, se obtuvo del Prof. B.R. Glick (Shah et al. (1998) Can. J. of Microbiol. 44:833-843). La secuencia codificante de AtACD1 (gen indicado AT1G48420) se amplificó a partir del ADNc, y ambas secuencias codificantes se recombinaron en el vector pDONR221, la secuencia de nucleótidos de AtACD1 está representada en la SEQ ID NO: 8. Estos vectores de entrada después se recombinaron usando acceso en múltiples sitios en pK7m34GW-FAST, y los vectores de expresión resultantes se transformaron en *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 pMP90, que se usó para transformar *Arabidopsis thaliana* acceso Col-0. Para cada construcción se seleccionaron varias líneas T2 de un locus que portaban una inserción de ADN T homocigótica o sin inserción (controles de tipo silvestre).

Todas las líneas se cultivaron *in vitro* en placas ½ MS con sacarosa al 1%, y todas las líneas transgénicas se cultivaron en la misma placa con el correspondiente control de tipo silvestre. Para cada línea, se recogieron 5 brotes y se combinaron, y se extrajo el ARN usando Trizol seguido de tratamiento con DNasa sin RNasa y se limpió con el kit Qiagen RNeasy Plant Mini. Empezando de 1 ug de ARN, se sintetizó ADNc usando el kit de síntesis de ADNc Bio-Rad iScript. Por PCR se amplificó un fragmento específico tanto de la ACC desaminasa bacteriana como de la ACC desaminasa endógena, junto con el gen de referencia PP2AA3 (AT1G13320), cuya expresión se informó que era muy estable (Czechowski et al. (2005) Plant Physiology 139: 5-17). Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 2%. El resultado del análisis de expresión se representa en la Figura 10.

Las plantas se transfirieron a placas que contenían manitol 25 mM, exponiéndolas de ese modo a estrés leve de manitol, en una fase donde la tercera hoja está en plena proliferación, lo que permite estudiar la respuesta las células foliares en proliferación al estrés. Después de 48 horas en estrés leve de manitol, la hoja 3 se microdisecionó y se midió su tamaño para calcular el grado de inhibición del crecimiento. WT y las diferentes líneas transgénicas se cultivaron cada vez en la misma placa para permitir la comparación.

El efecto sobre el estrés abiótico leve de la expresión de los genes de ACC desaminasa en plantas se estudió con la transformación de seis genes quiméricos diferentes en plantas de *Arabidopsis* y se analiza más adelante:

1) Gen quimérico donde la ACC desaminasa bacteriana está bajo el control del promotor pGRF5 (pGRF5::bACD)
Los datos muestran (véase la Figura 11) que el tipo silvestre estaba inhibido solamente en aproximadamente un 10% en estrés abiótico. La línea transgénica 2 funciona claramente mejor en estrés abiótico. Ambas líneas

transgénicas eran, sin embargo, claramente más pequeñas que el WT, lo que indica un efecto negativo de la expresión del transgén de la ACC desaminasa bacteriana en plantas expresado bajo el control del promotor de GRF5.

5 2) Gen quimérico donde la ACC desaminasa bacteriana está bajo el control del promotor p4TM1 (p4TM1::bACD)
Los datos muestran (véase la Figura 12) que la expresión de la ACC desaminasa bacteriana en líneas transgénicas, dirigida por el promotor de 4TM, anulaba casi completamente la inhibición del crecimiento por el estrés. Para la línea transgénica 1 puede observarse un pequeño efecto negativo sobre el tamaño de la hoja en condiciones de estrés abiótico. Sin embargo, este efecto negativo es ciertamente menor que cuando el transgén de la ACC desaminasa bacteriana está bajo el control del promotor de GRF5.

3) Gen quimérico donde la ACC desaminasa bacteriana está bajo el control del promotor p35S (p35S::bACD)
Los datos muestran (véase la Figura 13) una reducción del crecimiento de las plantas transgénicas (incluso en condiciones no de estrés abiótico) tras la expresión del gen quimérico.

4) Gen quimérico donde la ACC desaminasa de *Arabidopsis thaliana* está bajo el control del promotor pGRF5 (pGRF5::AtACD1)
Los datos muestran (véase la Figura 14) que similar a la ACC desaminasa bacteriana (compárense los datos de la Figura 11), que la simple expresión de la desaminasa endógena bajo el control del promotor de GRF5 inhibe el crecimiento.

5) Gen quimérico donde la ACC desaminasa de *Arabidopsis thaliana* está bajo el control del promotor p4TM1 (p4TM1::AtACD1)
Los datos muestran (véase la Figura 15) que la expresión a partir del promotor de 4TM1 en las líneas transgénicas de nuevo elimina el efecto negativo del estrés abiótico sobre el área foliar.

6) Gen quimérico donde la ACC desaminasa de *Arabidopsis thaliana* está bajo el control del promotor p35S (p35S::AtACD1)
Los datos muestran (véase la Figura 16) que se observa un patrón similar a aquel con la expresión del transgén dirigida por el promotor de GRF5 (compárense con la Figura 14). Existe un claro efecto negativo sobre el crecimiento normal (es decir, sin estrés abiótico) tras la expresión del transgén mientras la inhibición del crecimiento por estrés abiótico no está afectada.

Se concluye que la expresión de ambas ACC desaminasas tiene un efecto negativo sobre el crecimiento de la planta para genes quiméricos donde la expresión está bajo el control de los promotores p35S y pGRF5. Sin embargo, este efecto sorprendentemente no está presente cuando la expresión de la ACC desaminasa está bajo el control del promotor de 4TM1. Además, la expresión del gen quimérico que comprende el promotor de 4TM1 y la ACC desaminasa bacteriana puede superar los defectos del crecimiento debidos al estrés abiótico. Aunque sin limitar la invención a un mecanismo particular de acción, la expresión de la ACC desaminasa endógena de *A. th.* Bajo el control del promotor 4TM1 tiene menos efecto en estrés leve que la ACC desaminasa bacteriana, posiblemente debido a mecanismos de regulación postraduccional.

9. Regulación negativa específica de meristemo de la enzima ACC oxidasa en *Arabidopsis thaliana*

Se construye un gen quimérico que contiene los siguientes elementos de ADN

- promotor de 4TM1 (SEQ ID NO: 1) de *Arabidopsis thaliana*
- un ARN antisentido que codifica la ACC oxidasa de *Arabidopsis thaliana*
- Un terminador de CaMV 35S

Este gen quimérico se introduce en un vector de ADN T (pK7m24GW-FAST) en combinación con un marcador de GFP de selección. El vector de ADN T se introduce en *Agrobacterium tumefaciens* y se usa para producir *Arabidopsis* transgénica.

Se analiza el crecimiento de las hojas de las plantas transgénicas en condiciones óptimas y de estrés.

Se cultivan semillas de tipo silvestre y transgénicas *in vitro* con medio de Murashige y Skoog (MS) que contiene sacarosa al 0,5% en un fotoperíodo de 16-h/8-h. Para el estrés osmótico, semillas de tipo silvestre y transgénicas se dejan germinar durante 5-7 días y se transfieren a placas de agar que contienen manitol (Skirycz et al. 2010). Se mide el peso fresco y seco de los botes, el área foliar, la longitud y la masa de las raíces. En condiciones de suelo, se usa un sistema de control de agua completamente automatizado, de alto rendimiento, llamado WIWAM, implementado en el centro local (Skirycz et al. 2011). Este sistema posibilita mantener niveles estables de agua y es capaz de tomar imágenes digitales de plantas individuales que pueden usarse para determinar el crecimiento de la roseta, el área foliar y la forma de la hoja. Las plantas se cultivan en un régimen de control de riego hasta la fase 1,04 (aproximadamente 12-13 días de edad), después de lo cual se aplica riego controlado o limitado durante 10-12 días adicionales. Al final de experimento, se recogen las plantas y se registra la producción de brotes como una

medición de la producción.

Como alternativas para el promotor de 4TM1 también pueden usarse 4TM2 (SEQ ID NO: 2); 4TM3a (SEQ ID NO: 3) o 4TM3b (SEQ ID NO: 4) de *Arabidopsis thaliana* (o promotores ortólogos de plantas de los mismos).

5

10. Modulación de la producción de etileno en meristemas de maíz

Se construyen dos genes quiméricos diferentes que contienen los siguientes elementos de ADN:

- 10 - un promotor ortólogo de *Brachypodium distachyon* del promotor de 4TM1 de *Arabidopsis thaliana* unido de forma funcional a
 - una ACC desaminasa con sentido de *Pseudomonas putida* UW4 (SEQ ID NO: 7), y
 - un terminador de CaMV 35S
 y
 15 - un promotor ortólogo de *Brachypodium distachyon* del promotor de 4TM1 de *Arabidopsis thaliana* unido de forma funcional a
 - una ACC oxidasa antisentido de *Zea mays*, y
 - un terminador de CaMV 35S

20 Estos dos genes quiméricos diferentes 2 se introducen en los vectores de destino (pBm42GW7), que contienen el herbicida BASTA bajo el control del promotor de 35S CaMV y seguido de un terminador de nos como marcador de selección. Estas construcciones después se introducen por separado en *Agrobacterium tumefaciens* (EHA101) y se usan para transformar embriones inmaduros de maíz de B104 que se regeneran por cultivo tisular para producir 2 tipos diferentes de plantas transgénicas (es decir, plantas transgénicas de maíz que sobreexpresan una ACC desaminasa y plantas transgénicas de maíz que regulan negativamente la ACC oxidasa). Las plantas transgénicas se retrocruzan con B104, produciendo una población de trabajo que segrega en un 50% de plantas sensibles y por tanto de control y un 50% de plantas transgénicas. El crecimiento foliar de la población segregante se analiza en condiciones óptimas y de estrés por sequía. Las plantas se cultivan en el suelo y se riegan diariamente: las plantas tratadas con sequía reciben el 70% del agua que se añade a las plantas de control. El crecimiento foliar se controla midiendo diariamente la longitud de la hoja de la cuarta hoja tras su aparición, lo que proporciona datos sobre la tasa de elongación de la hoja y la longitud final de la hoja. Además, se determinará la altura final de la planta, el peso fresco y el peso seco de las plantas como una medida de la biomasa de la planta.

25

30

Materiales y métodos

35

1. Crecimiento de la planta

Se cultivaron plántulas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. ecotipo Columbia-0 (Col-0) *in vitro* en medio de Murashige y Skoog de potencia media (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con sacarosa al 1% en un régimen de 16-h de día ($110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 8-h de noche. Las placas se recubren con malla de nylon (Prosep, Zaventem, Bélgica) de 20 μm de tamaño de poro para evitar que las raíces crezcan en el medio. Dependiendo del experimento, se distribuyeron equitativamente 32 o 64 semillas en una placa de 150 mm de diámetro. Las plantas mutantes se cultivaron junto con sus controles de tipo silvestre en la misma placa.

40

2. Tratamientos de estrés y químicos

En 9 DAS, cuando la tercera hoja está en plena proliferación, las plántulas se transfirieron a placas que contenían medio de control o medio suplementado con manitol 25 mM (Sigma-Aldrich) o ACC 5 μM (Sigma-Aldrich) levantando suavemente la malla de nylon con fórceps. Para el ensayo de actividad CDKA, la transferencia se hizo en 11 DAS; en esta fase, la tercera hoja está aún en división y puede recogerse rápidamente sin la necesidad de solución RNAlater (véase a continuación) que inhibiría la actividad CDKA. Todas las transferencias se realizaron 2-3 h en el día.

50

3. Análisis del crecimiento

55 El análisis del crecimiento se realizó sobre la tercera hoja verdadera recogida en diferentes puntos temporales después de la transferencia. Después de limpiar con etanol al 70%, las hojas se montaron en ácido láctico en portaobjetos de microscopio. Para cada experimento, se fotografiaron 8-12 hojas con un binocular, y las células epidérmicas (40-300) se dibujaron para cuatro hojas representativas con un microscopio DMLB (Leica) equipado con un tubo de dibujo y un objetivo de contraste de interferencia diferencial. Las fotografías de las hojas y los esquemas se usaron para medir el área foliar y celular, respectivamente, con ImageJ v1.41o (NIH; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), a partir de lo cual se calcularon las cantidades de células. El índice estomático se definió como el porcentaje de los estomas por todas las células. Para el análisis cinemático las medias transformadas en \ln del área foliar, el tamaño de la célula y la cantidad de células se ajustaron localmente a una función cuadrática de la que se obtuvo la primera derivada como el crecimiento relativo, la expansión y la tasa de división, respectivamente (De Veylder et al., 2001).

60

65

4. Muestreo para análisis de expresión

Se recogió la hoja 3 de las plantas en 1,5, 3, 12, y 24 h. En resumen, se recogieron plántulas completas en un exceso de solución RNAlater (Ambion) y, después de almacenamiento durante una noche a 4°C, se diseccionó en un microscopio binocular o en una placa de refrigeración con microtijeras de precisión. Las hojas diseccionadas se transfirieron a un nuevo tubo, se congelaron en nitrógeno líquido, y se molieron con una máquina Retsch y bolas de metal de 3 mm. Se obtuvieron muestras de tres experimentos biológicos independientes y de múltiples placas dentro del experimento.

5. Extracción del ARN

Se extrajo el ARN con TriZol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con 4 µg de glucógeno como vehículo durante la etapa de precipitación. Las muestras de ARN se sometieron a digestión de ADN con DNasa I sin RNasa (Roche) y posteriormente se limpiaron con el kit RNeasy Mini (Qiagen).

6. Perfilado de expresión de ATH1 y análisis de datos

Las muestras de ARN se hibridaron con series individuales Affymetrix ATH1 Genome en la VIB Microarray Facility (Leuven, Bélgica). Los datos de expresión se procesaron con Robust Multichip Average (RMA) (corrección de fondo, normalización y recapitulación) implementado en BioConductor (Irizarry et al., 2003a, 2003b; Gentleman et al., 2004). Se usó un cdf alternativo ("tinesath1cdf"), en que cada sonda se asigna de forma única a un transcrito (Casneuf et al., 2007) (<http://www.bioconductor.org/packages/release/data/experiment/html/tinesath1cdf.html>). Se usó el paquete BioConductor *Limma* para identificar genes expresados de forma diferencial (Smyth, 2004). Para comparaciones de interés, se calculó la estadística t moderada usando la función eBayes y los valores P se corrigieron para múltiples ensayos para cada contraste por separado usando topTable. Se usó el valor p corregido por la tasa de falso descubrimiento (FDR) < 0,05 como punto de corte (Benjamini y Hochberg, 1995).

7. Citometría de flujo

Para el análisis de citometría de flujo, se extrajeron los núcleos troceando 4-32 hojas con una cuchilla de afeitar en 1 ml de MgCl₂ 45 mM, citrato sódico 30 mM, ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico 20 mM, pH 7 y Triton X-100 al 1% (Galbraith et al., 1983). De una reserva de 1 mg/ml de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), se añadió 1 µl al sobrenadante filtrado. Los núcleos se analizaron con un citómetro de flujo CyFlow con el Software FloMax (Partec).

8. Ensayo de actividad CDKA

Se extrajo la proteína soluble total de 50 hojas añadiendo tampón de extracción (Van Leene et al., 2007) para moler las muestras, seguido de dos etapas de congelación-descongelación y dos etapas de centrifugación (20,817 g, 10 min, 4°C), mediante lo cual se recogió el sobrenadante cada vez. Se incubaron cantidades iguales de proteína total con perlas p9^{CKS1Hs}-sepharose (De Veylder et al., 1997) y se realizaron ensayos de quinasa como se ha descrito (De Veylder et al., 1997) con histona H1 como sustrato de CDK. Para corregir la cantidad de proteína CDKA purificada por perlas p9^{CKS1Hs}-spharose, se usó una alícuota de cada muestra para el análisis de transferencia de gel de proteínas con anticuerpos primarios de conejo anti-PSTAIRE (Santa Cruz) (diluidos 1:5000) y anticuerpos secundarios de burro anti-conejo conjugados con peroxidasa de rábano rusticano (GE-Healthcare) (diluidos 1:10.000). Las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia (Western Lightning Plus ECL, PerkinElmer Life Sciences). La actividad CDK y la cantidad de CDKA se cuantificaron con ImageJ v1.41o. Las muestras de control se establecieron arbitrariamente al 100%.

9. Comparación con datos de microserie disponibles al público

Los datos de microserie disponibles al público seleccionados se agruparon de acuerdo con el tipo de experimento (tal como estrés abiótico y tratamiento hormonal). Los grupos de experimentos se procesaron por RMA y se sometieron a análisis *Limma*, como se ha descrito anteriormente. Los conjuntos de genes sensibles se delimitaron siempre con un cambio de expresión de factor 2 y puntos de corte de valor P corregido por FDR < 0,05. Aunque estos puntos de corte se eligieron de manera un poco arbitraria, se evaluó la robustez de los resultados ensayando puntos de corte más y menos rigurosos. Todos los ensayos dieron resultados muy similares. Las listas de genes sensibles se compararon con los identificados en nuestro experimento de microserie para identificar las tendencias globales en el repertorio funcional de los genes afectados que se usaron como indicios para explorar los resultados en más detalle. La sobrerepresentación se ensayó mediante ensayos exactos de Fisher seguidos de corrección de valor P de Bonferroni.

10. qRT-PCR

Para la síntesis de ADNC, se usaron de 100 ng a 2 µg de ARN con el reactivo SuperScript Reverse III (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se diseñaron cebadores con el sitio web QuantPrime (Arvidsson et al., 2008; Skirycz et al., 2010). La qRT-PCR se hizo en un LightCycler 480 (Roche Diagnostics) en placas de 384

5 pocillos con LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las curvas de fusión se analizaron para comprobar la especificidad de los cebadores. La normalización se hizo frente al promedio de los genes constitutivos *UBQ10*, *GAPDH*, y *CBP20*; $\Delta Ct = Ct(\text{gen}) - Ct(\text{media}(\text{genes constitutivos}))$ y $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{control}) - \Delta Ct(\text{manitol})$. Los valores ΔCt para las tres réplicas biológicas se usaron para el análisis estadístico. Ct se refiere a la cantidad de ciclos en que la fluorescencia de SYBR Green alcanza un valor arbitrario durante la fase exponencial de la amplificación de ADNc.

11. Nanoserie

10 Los niveles de expresión de ARNm se midieron usando un sistema de análisis nCounter (NanoString Technologies) por la VIB MicroArray Facility (www.microarrays.be) como se ha descrito (Geiss et al., 2008). Se hibridó el extracto de ARN total (100 ng). La expresión génica se midió de forma simultánea para todos los genes en reacciones combinadas. El código elaborado nCounter contenía pares de sondas para 100 genes de *Arabidopsis*. Los datos se normalizaron por un procedimiento de dos etapas con controles internos de repuntes y los tres genes de referencia más estables incluidos en el conjunto de sonda (*CDKA_1*, *UBC*, y *CBP20*).

12. Cuantificación de ACC

20 Se disolvieron muestras secadas por congelación en 500 μl de metanol, incluyendo dos compuestos de patrón interno (sulfona de metionina 4 μM usada para la compensación del área de pico después de análisis de electroforesis capilar-espectrometría de masas (CE-MS) y D4-ACC 0,2 μM para la cuantificación de ACC. Después de la adición de 500 μl de cloroformo y 200 μl de agua, la mezcla se agitó en vórtice durante 3 min y se centrifugó a 20.400 g durante 3 min a 4°C. La capa superior se evaporó durante 30 min a 45°C por un concentrador centrífugo y después se separó en dos capas. La capa superior (100-200 μl) se filtró por centrifugación a través de un filtro Millipore de 5-kD de punto de corte a 9.100 g durante 90 min. El filtrado se secó durante 120 min por un concentrador centrífugo. El residuo se disolvió en 10 μl de agua que contenía un compuesto de referencia (3-aminopirrolidina). La solución final (10 μl) se usó para cuantificar los contenidos de ACC por análisis de cationes usando CE-MS. El sistema CE-MS y las condiciones fueron como se ha descrito (Watanabe et al., 2008).

30 13. Tinción GUS

Se incubaron plántulas completas en heptano durante 10 min, se lavaron en Tris-HCl 100 mM/NaCl 50 mM (pH 7,0), y posteriormente se incubaron en tampón 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronido (X-Gluc) [tampón Tris-HCl 100 mM/NaCl 50 mM (pH 7,0), $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 2 mM y X-Gluc 4 mM] a 37°C durante 24 h. Las plántulas se lavaron en Tris-HCl 100 mM/NaCl 50 mM (pH 7,0) y se limpiaron durante una noche en ácido láctico al 90%. Las muestras se fotografiaron con un microscopio de contraste de interferencia diferencial (Leica).

14. Mediciones de actividad de división meristemoide

40 La hoja 3 se cortó de plantas CYCB1;1:DBox-GUS en varios puntos temporales en tres réplicas biológicas independientes y se tiñeron como se ha descrito anteriormente. Usando un microscopio de contraste de interferencia diferencial (Leica), los meristemoides teñidos se contaron en un área fija cerca de la punta de la hoja, donde toda la proliferación celular normal había cesado, para 6-12 hojas por experimento. Los valores relativos (en comparación con muestras de control) se calcularon para cada experimento por separado y se promediaron sobre las réplicas.

45 15. Líneas transgénicas y mutantes

Las semillas de líneas de sobreexpresión inducible por *ACS5* las proporcionó amablemente J. Ecker (SALK Institute, CA, EE. UU.). las plantas que sobreexpresan *EBF1* fueron donaciones de T. Potuschak (CNRS, Strasbourg, Francia). Se obtuvieron mutantes insensibles a etileno del *Arabidopsis* Seed Stock Center (*ein2.5* [N8844], *ein3.1* [N8052], *etr1.3* [N3070] y *ein5.1* [N8053; previamente indicado como *ein4*]). Todas las líneas transgénicas y mutantes son en un fondo Col-0.

16. Números de acceso

55 Los datos de microserie está depositados en la base de datos GEO (GSE22107).

17. Mediciones de área foliar

60 El sistema de crecimiento y estrés de la planta fue el mismo que el descrito previamente (Skiryycz et al. (2011) Plant Cell 23: 1876-1888). En resumen, las plantas se cultivaron sobre mallas de nylon que recubrían placas de control, y en 9 DAS las mallas se transfirieron a placas de control (como control de transferencia) o a placas que contenían manitol 25 mM. A las 48 horas después de la aparición del estrés la hoja 3 se microdisecionó, se aclaró en etanol y se montó en ácido láctico sobre un portaobjetos de vidrio. Los portaobjetos se fotografiaron y se midió el área foliar usando ImageJ 1.41o.

65

Referencias

- 5 Aguirrezabal, L., Bouchier-Combaud, S., Radziejowski, A., Dauzat, M., Cookson, S.J., y Granier, C. (2006). Plasticity to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana*: dissection of leaf development into underlying growth dynamic and cellular variables reveals invisible phenotypes. *Plant Cell Environ.* 29: 2216-2227.
- Arvidsson, S., Kwasniewski, M., Riaño-Pachón, D.M., y Mueller-Roeber, B. (2008). QuantPrime -- a flexible tool for reliable high-throughput primer design for quantitative PCR. *BMC Bioinformatics* 9: 465.1-465.15.
- 10 Beemster, G.T.S., De Veylder, L., Vercruyse, S., West, G., Rombaut, D., Van Hummelen, P., Galichet, A., Gruissem, W., Inzé, D., y Vuylsteke, M. (2005). Genome-wide analysis of gene expression profiles associated with cell cycle transitions in growing organs of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 138: 734-743.
- 15 Benjamini, Y., y Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing *J. R. Stat. Soc. B-Methodol.*, 57: 289-300.
- Bergmann, D.C., y Sack, F.D. (2007). Stomatal development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 163-181.
- 20 Binder, B.M., Mortimore, L.A., Stepanova, A.N., Ecker, J.R., y Bleecker, A.B. (2004). Short-term growth responses to ethylene in *Arabidopsis* seedlings are EIN3/EIL1 independent. *Plant Physiol.* 136: 2921-2927.
- Burssens, S., Himanen, K., van de Cotte, B., Beeckman, T., Van Montagu, M., Inzé, D., y Verbruggen, N. (2000). Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 211: 632-640.
- 25 Casneuf, T., Van de Peer, Y., y Huber, W. (2007). In situ analysis of cross-hybridisation on microarrays and the inference of expression correlation. *BMC Bioinformatics* 8: 461.1-461.13.
- 30 Churchman, M.L., Brown, M.L., Kato, N., Kirik, V., Hülskamp, M., Inzé, D., De Veylder, L., Walker, J.D., Zheng, Z., Oppenheimer, D.G., Gwin, T., Churchman, J., y Larkin, J.C. (2006). SIAMESE, a plant-specific cell cycle regulator, controls endoreplication onset in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 18: 3145-3157.
- Colón-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T., y Doerner, P. (1999). Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J.* 20: 503-508.
- 35 De Veylder, L., Segers, G., Glab, N., Casteels, P., Van Montagu, M., e Inzé, D. (1997). The *Arabidopsis* Cks1At protein binds the cyclin-dependent kinases Cdc2aAt and Cdc2bAt. *FEBS Lett.* 412: 446-452.
- 40 De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T.S., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., Van Der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M., e Inzé, D. (2001). Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 1653-1667.
- Donnelly, P.M., Bonetta, D., Tsukaya, H., Dengler, R.E., y Dengler, N.G. (1999). Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of *Arabidopsis*. *Dev. Biol.* 215: 407-419.
- 45 Fricke, W., Akhiyarova, G., Wei, W., Alexandersson, E., Miller, A., Kjellbom, P.O., Richardson, A., Wojciechowski, T., Schreiber, L., Veselov, D., Kudoyarova, G., y Volkov, V. (2006). The short-term growth response to salt of the developing barley leaf. *J. Exp. Bot.* 57: 1079-1095.
- 50 Fujita, M., Mizukado, S., Fujita, Y., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Seki, M., Matsui, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., y Shinozaki, K. (2007). Identification of stress-tolerance-related transcription-factor genes via mini-scale Full-length cDNA Over-eXpressor (FOX) gene hunting system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364: 250-257.
- Galbraith, D.W., Harkins, K.R., Maddox, J.M., Ayres, N.M., Sharma, D.P., y Firoozabady, E. (1983). Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220: 1049-1051.
- 55 Geiss, G.K., Bumgarner, R.E., Birditt, B., Dahl, T., Dowidar, N., Dunaway, D.L., Fell, H.P., Ferree, S., George, R.D., Grogan, T., James, J.J., Maysuria, M., Mitton, J.D., Oliveri, P., Osborn, J.L., Peng, T., Ratcliffe, A.L., Webster, P.J., Davidson, E.H., Hood, L., y Dimitrov, K. (2008). Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat. Biotechnol.* 26: 317-325 [Err. *Nat. Biotechnol.* 26, 709].
- 60 Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A.J., Sawitzki, G., Smith, C., Smyth, G., Tierney, L., Yang, J.Y.H., y Zhang, J. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 5: R80.1-R80.16.
- 65

- 5 Goda, H., Sasaki, E., Akiyama, K., Maruyama-Nakashita, A., Nakabayashi, K., Li, W., Ogawa, M., Yamauchi, Y., Preston, J., Aoki, K., Kiba, T., Takatsuto, S., Fujioka, S., Asami, T., Nakano, T., Kato, H., Mizuno, T., Sakakibara, H., Yamaguchi, S., Nambara, E., Kamiya, Y., Takahashi, H., Hirai, M.Y., Sakurai, T., Shinosaki, K., Saito, K., Yoshida, S., y Shimada, Y. (2008). The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. *Plant J.* 55: 526-542.
- Granier, C., y Tardieu, F. (1999). Water deficit and spatial pattern of leaf development. Variability in responses can be simulated using a simple model of leaf development. *Plant Physiol.* 119: 609-619.
- 10 Granier, C., Inzé, D., y Tardieu, F. (2000). Spatial distribution of cell division rate can be deduced from that of p34cdc2 kinase activity in maize leaves grown at contrasting temperatures and soil water conditions. *Plant Physiol.* 124: 1393-1402.
- 15 Hacham, Y., Holland, N., Butterfield, C., Ubeda-Tomas, S., Bennett, M.J., Chory J., y Savaldi-Goldstein, S. (2011). Brassinosteroid perception in the epidermis controls root meristem size. *Development*: in press (doi:10.1242/dev/061804).
- Hahn, A., y Harter, K. (2009). Mitogen-activated protein kinase cascades and ethylene: signaling, biosynthesis, or both? *Plant Physiol.* 149: 1207-1210.
- 20 Hsiao, T.C., y Xu, L.-K. (2000). Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *J. Exp. Bot.* 51: 1595-1616.
- Inzé, D., y De Veylder, L. (2006). Cell cycle regulation in plant development. *Annu. Rev. Genet.* 40: 77-105.
- 25 Irizarry, R.A., Bolstad, B.M., Collin, F., Cope, L.M., Hobbs, B., y Speed, T.P. (2003a). Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* 31: e15.
- 30 Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U., y Speed, T.P. (2003b). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4: 249-264.
- Kalantari, K.M., Smith, A.R., y Hall, M.A. (2000). The effect of water stress on 1-(malonylamino)cyclopropane-l-carboxylic acid concentration in plant tissues. *Plant Growth Regul.* 31: 183-193.
- 35 Kant, P., Kant, S., Gordon, M., Shaked, R., y Barak, S. (2007). STRESS RESPONSE SUPPRESSOR1 and STRESS RESPONSE SUPPRESSOR2, two DEAD-box RNA helicases that attenuate Arabidopsis responses to multiple abiotic stresses. *Plant Physiol.* 145: 814-830.
- 40 Marcotrigiano, M. (2010). A role for leaf epidermis in the control of leaf size and the rate and extent of mesophyll cell division. *Am. J. Bot.* 97: 224-233.
- Menges, M., Hennig, L., Gruißem, W., y Murray, J.A.H. (2003). Genome-wide gene expression in an Arabidopsis cell suspension. *Plant Mol. Biol.* 53: 423-442.
- 45 Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- 50 Olmedo, G., Guo, H., Gregory, B.D., Nourizadeh, S.D., Aguilar-Henonin, L., Li, H., An, F., Guzman, P., y Ecker, J.R. (2006). ETHYLENE-INSENSITIVE5 encodes a 5'→3' exoribonuclease required for regulation of the EIN3-targeting F-box proteins EBF1/2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 13286-13293.
- Papdi, C., Ábráham, E., Prathiba Joseph, M., Popescu, C., Koncz, C., y Szabados, L. (2008). Functional identification of Arabidopsis stress regulatory genes using the controlled cDNA overexpression system. *Plant Physiol.* 147: 528-542.
- 55 Peres, A., Churchman, M.L., Hariharan, S., Himanen, K., Verkest, A., Vandepoele, K., Magyar, Z., Hatzfeld, Y., Van Der Schueren, E., Beemster, G.T.S., Frankard, V., Larkin, J.C., Inzé, D., y De Veylder, L. (2007). Novel plant-specific cyclin-dependent kinase inhibitors induced by biotic and abiotic stresses. *J. Biol. Chem.* 282: 25588-25596.
- 60 Pettkó-Szandtner, A., Mészáros, T., Horváth, G.V., Bakó, L., Csordás-Tóth, E., Blastyák, A., Zhiponova, M., Miskolczi, P., y Dudits, D. (2006). Activation of an alfalfa cyclin-dependent kinase inhibitor by calmodulin-like domain protein kinase. *Plant J.* 46: 111-123.
- 65 Pierik, R., Tholen, D., Poorter, H., Visser, E.J.W., y Voeseenek, L.A.C.J. (2006). The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends Plant Sci.* 11: 176-183.

- Pillitteri, L.J., Sloan, D.B., Bogenschutz, N.L., y Torii, K.U. (2007). Termination of asymmetric cell division and differentiation of stomata. *Nature* 445: 501-505.
- 5 Poiré, R., Wiese-Klinkenberg, A., Parent, B., Mielewczik, M., Schurr, U., Tardieu, F., y Walter, A. (2010). Diel time-courses of leaf growth in monocot and dicot species: endogenous rhythms and temperature effects. *J. Exp. Bot.* 61: 1751-1759.
- Potuschak, T., Vansiri, A., Binder, B.M., Lechner, E., Vierstra, R.D., y Genschik, P. (2006). The exoribonuclease XRN4 is a component of the ethylene response pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* 18: 3047-3057.
- 10 Rymen, B., Fiorani, F., Kartal, F., Vandepoele, K., Inzé, D., y Beemster, G.T.S. (2007). Cold nights impair leaf growth and cell cycle progression in maize through transcriptional changes of cell cycle genes. *Plant Physiol.* 143: 1429-1438.
- 15 Savaldi-Goldstein, S., Peto, C., y Chory, J. (2007). The epidermis both drives and restricts plant shoot growth. *Nature* 446: 199-202.
- Schuppler, U., He, P.-H., John, P.C.L., y Munns, R. (1998). Effect of water stress on Cdc2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves. *Plant Physiol.* 117: 667-678 [Err. *Plant Physiol.* 117, 1528].
- 20 Sharp, R.E., y LeNoble, M.E. (2002). ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *J. Exp. Bot.* 53: 33-37.
- 25 Skirydz, A., e Inzé, D. (2010). More from less: plant growth under limited water. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21: 197-203.
- Skirydz, A., De Bodt, S., Obata, T., De Clercq, I., Claeys, H., De Rycke, R., Andrianakaja, M., Van Aken, O., Van Breusegem, F., Fernie, A.R., e Inzé, D. (2010). Developmental stage specificity and the role of mitochondrial metabolism in the response of Arabidopsis leaves to prolonged mild osmotic stress. *Plant Physiol.* 152: 226-244.
- 30 Smyth, G.K. (2004). Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* 3: Article 3 (<http://www.bepress.com/sagmb/vol3/iss1/art3>).
- Sobeih, W.Y., Dodd, I.C., Bacon, M.A., Grierson, D., y Davies, W.J. (2004). Long-distance signals regulating stomatal conductance and leaf growth in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants subjected to partial root-zone drying. *J. Exp. Bot.* 55: 2353-2363.
- 35 Tardieu, F. (2003). Virtual plants: modelling as a tool for the genomics of tolerance to water deficit. *Trends Plant Sci.* 8: 9-14.
- 40 Tardieu, F., Reymond, M., Hamard, H., Granier, C., y Muller, B. (2000). Spatial distributions of expansion rate, cell division rate and cell size in maize leaves: a synthesis of the effects of soil water status, evaporative demand and temperature. *J. Exp. Bot.* 51: 1505-1514.
- 45 Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L.A., Rhee, S.Y., y Stitt, M. (2004). MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J.* 37: 914-939.
- 50 Usadel, B., Nagel, A., Steinhauser, D., Gibon, Y., Bläsing, O.E., Redestig, H., Sreenivasulu, N., Krall, L., Hannah, M.A., Poree, F., Fernie, A.R., y Stitt, M. (2006). PageMan: an interactive ontology tool to generate, display, and annotate overview graphs for profiling experiments. *BMC Bioinformatics* 7: 535.1-535.8.
- 55 Van Leene, J., Stals, H., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Van Isterdael, G., De Clercq, A., Bonnet, E., Laukens, K., Remmerie, N., Henderickx, K., De Vijlder, T., Abdelkrim, A., Pharazyn, A., Van Onckelen, H., Inzé, D., Witters, E., y De Jaeger, G. (2007). A tandem affinity purification-based technology platform to study the cell cycle interactome in Arabidopsis thaliana. *Mol. Cell. Proteomics* 6: 1226-1238.
- Veselov, D.S., Mustafina, A.R., Sabirjanova, I.B., Akhmyarova, G.R., Dedov, A.V., Veselov, S.U., y Kudoyarova, G.R. (2002). Effect of PEG-treatment on the leaf growth response and auxin content in shoots of wheat seedlings. *Plant Growth Regul.* 38: 191-194.
- 60 Wang, H., Qi, Q., Schorr, P., Cutler, A.J., Crosby, W.L., y Fowke, L.C. (1998). ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from Arabidopsis thaliana interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J.* 15: 501-510.
- 65 Watanabe, M., Kusano, M., Oikawa, A., Fukushima, A., Noji, N., y Saito, K. (2008). Physiological roles of the β -

substituted alanine synthase gene family in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 146: 310-320.

West, G., Inzé, D., y Beemster, G.T.S. (2004). Cell cycle modulation in the response of the primary root of Arabidopsis to salt stress. *Plant Physiol.* 135: 1050-1058.

- 5 Xu, J., Li, Y., Wang, Y., Liu, H., Lei, L., Yang, H., Liu, G., y Ren, D. (2008). Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 283: 26996-27006.
- 10 Yoo, S.-D., Cho, Y.-H., Tena, G., Xiong, Y., y Sheen, J. (2008). Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C₂H₄ signalling. *Nature* 451: 789-795.

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> VIB VZW UNIVERSITEIT GENT	
	<120> Métodos y medios para producir plantas tolerantes a estrés abiótico	
	<130> DI/ETHY/372	
10	<150> US 61/517.622	
	<151> 22-04-2011	
	<150> GB 1106845.9	
	<151> 26-04-2011	
15	<160> 8	
	<170> PatentIn versión 3.5	
20	<210> 1	
	<211> 391	
	<212> ADN	
	<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>	
25	<400> 1	
	cgtatccttg tctcggataa acatgaatca aatacacggc ccattaggcc ccactatagt	60
	tattactact acagtatatt atacccgat aaacatgacc aatacacggc ccactaggcc	120
	caccttataa ttattatatt ataatcaatc attgggocca ccttattaaa atcaaactag	180
	ccgttacaaa aacagccggt ccagattcaa caacggcat atttagaac ttaccttct	240
	acaatctctc tcttactaa cttctacata acaaaactcg ttgogctctt ctcaattcca	300
	cgaatcacac actcttcttc ttcttctggt catcaaagaa aacgaaacc atttctcaa	360
	atccaaaatt ttcaaaaact caaaactcat c	391
30	<210> 2	
	<211> 649	
	<212> ADN	
	<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>	
35	<400> 2	
	ggttcttaaa ttttagaagc agctcaagat cttggatcga atcattcttc ttctttcaat	60
	ctgagagtaa agaagagaag aagaaacagt tttgtccta tttgcagtta tggtttcac	120
	aagactttac tctgtttcaa tggattgaa acggccttca agtttcatct tgaataaact	180
	gtgtgaaccg aattaaagat tcacaattcg tttttttgt tcatcaata attagttcgg	240
	ttggaatgag tcggttcaat ttaagcagac gaaaacacac aagacataaa cttatatttg	300
	cttcgtaagg ataacatatc cgtgttcagg ataaaaatat ccttgtctcg gacaaacaag	360
	aacccaactt ggcccattgg gcttgccagt cttgttctgg aacaaaggaa tagcaaaaa	420
	cactagccgt tacacacaca acaacaactc actctgtcgg tgatctgtcc ttcacttctg	480
	taaagcctca acggtcatat ttggaaaatc agaccgttta aatcgctctc tacataaacc	540
	caaattcata actcaccxaa tcacaattcg caagctatct tcctttcttc ttcgcaatct	600
	caaatccaa aattttctgc aaccggaatc agaaacctcc aacatcgtc	649

<210> 3
 <211> 3618
 <212> ADN

5 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 3

```

aacttaataa atatgcaaaa taatatatat gtgtttotta tatgtgaaaa aataatatat      60
aatgtaagta tgtatcttta atcaatatac taatttctcg aaattatfff atttatacta      120
atcaaattga catggaaaaa tgggtgagaag tataatcacc taattaaaaa aaaaatcata      180
aaatcgaata ttgttctcat catctctcta catcaatggt tagatcattt ttttaatctc      240
ttgctaaaac tagtccaatt tgttcactac cgaatcatta atttataggt ttgctcttta      300
caattccgta taaatgatta gaaatgattg tgaaagagta gagcaatata gagttatcta      360
aaaatgtfff tgtcacttgc tcataacaat aacatfffvg tgctacgaat gtcaaaatff      420
caggatttvt tagttagagt attagagagg atgaattgvt tttaaaaaaa attgtfffvc      480
ttgtfffvtg tfffvtgfff ttgtfffvtg tttctfffvt tfffvtaatag aattvtaatag      540
ttgatvtatt gcccagvtgag ccaaaaaatta tvtatatatt taagaaagat attatvttagt      600
tagtttatga atatatfffvt aaactvtaggvt caatgatvca aaaaatgaaa cttgatvtvtg      660
aagvatgvtc attgatvtaa atttatvtvg atcacacvct tfffvtacata caaagvtgfff      720
tccactgaat tcattcttaa aacttcatca tatactagat gatfffvtgagv aaagatvtga      780
gggaaaaaatt agcaaatgvgv ttgtvatvat tataacvga aagcaaaaga tggvttatvtg      840
tgtatacata caactgfffvt acccaacvga agaaacaagc tcavatvca cattvgctff      900
tttagvtgct gctaatctvt ctttattaat gaaatvagcv tttaatatga agaaaacatc      960
ggactfffvt ccatgaaata aaagactvtg aaactacvat tttaaagvat aacaaagaca      1020
tttacatvta actvcatvta tvtatvtaat atvtaagaaa atatvgctact caaaatvgcv      1080
tcagvtaagc attacagvta agccactaat tctcgtvttat tgvttvtgaa cctvtgatvta      1140
tgvcaagvcac aatvtgfffvt tvacvgtvtga gactvtvact cttfffvtctt tfffvtfffvt      1200
tvatatvga cttacaactv caatvtgact taactvtgvat ttatattvat tvtvatgact      1260
gtaaatfffvt ggaacaat acatvtaata tttaacvca aaaaatctga vtctvtaaca      1320
aaatagvtgag cvcvctfffvt tctattatat aaatfffvtgag ttatvataac aaaacataat      1380
aaaatagata gtttatcttc ttagvata agvatcaag vatcvgtvt tcatatattc      1440
ttgtaaaaaat aatvatgatta ttagvtatvt aatatvtata taataagata atatvtctag      1500
tttaaaatta aatattagvc tttaacaaaa cvatvtvcac atfffvtctt ttaaaatvtg      1560
    
```

10

ES 2 607 984 T3

tatcataaat ttttaagttat acttttaatt tcaatttgca tagttgatgc ttaagaaaat 1620
 ttccaattga tctatttggt tagaaaat aagaaaatat cattattgtg gtgtgtgatg 1680
 gatcatggta gtgtttgatg aatatttttg tttagttatt gtaaggaaat atgtgattgt 1740
 gtgaatgatt tattattcac tatgaatttg ataacagaaa agtgtgggta cgatataatcg 1800
 gatataatc ttatatctat tatatattga agagaaatat aagtgtcagt caaattaaat 1860
 ttattaaaat ctgagttttt ttctattaat ttaattttta atatttttca atccctaaat 1920
 gggcttggaa tcctctaaaa aatagatgt ttgaatcctc ataacaaaat ctgaattgga 1980
 atcctcataa caaataaat gttttcccaa actatatata aagcttattg atgtgaaggg 2040
 acttccacta cgctttctag tcagtttgaa gatctctctt tcccttattg ctcttgtttc 2100
 tagccatggt tagtttaggg gagtcttcta tatcaagtta atttcataac attgcctaaa 2160
 gtttcaccgc ttaaggattt agtgatgatt tgatcctcaa atgtgatgc ttccatattt 2220
 tttagccttt ttaggattta ctttgtaatc tctgaatcat tcatttcttg aatgatatt 2280
 tacattotta tcaaaacaaa tctacatata aagcttacat acctttatct tctttgtagc 2340
 cttgtaggta atggcgactt aatacgttca ctttgtagct agctatgggt ttttatatgt 2400
 ttgcttgtaa cttaatccct tctggggata tggatatata tagtgtcaa ccacgaattt 2460
 taatgtgta aaaagagttt taatttatac taaataattt taaaacatct caaattgat 2520
 ttaaattaat atttggtagt tagttcgtgt attacattg tatatttatt aaaataatga 2580
 aataagtatg actagtatat atttttataa taatattaag gatttattgg tagtttatct 2640
 tgaaaaatta aattttgtga atttagtcaa aattcatgca tcaaatgggt ttatttgact 2700
 aacatgtttt taattacttt atcactacaa gatataccat tttttaaaag tcatagcata 2760
 gttttttttt ttttaattta tatacaaaat actgttatta aaaactgttt gttacgtttg 2820
 attgtatatt agatctttaa ttataagaca taaagatatt tttaaaaaat cattaggagg 2880
 atgttacaaa atattcaatt tatatccata atcatttaca tttttaaaga tgtccccggt 2940
 accaaatgcy atgtgtgtcc gttcccatat gaaacaagac atttttgtcg aaatttgat 3000
 tggcaataat atctcacatt tgtaaaactt tgtattgttg aatttcaatt tcaaatggcg 3060
 ttttctacaa ctctttttaga atattaacc gctattctta acattttaaac taatgtgacc 3120
 attctaaaat tgatattccc tttacgtgtt ggactttatt aataaactga ttaacaata 3180
 aagtgtatta tttatcatca taatatattt agcaaaactca atttcttatc aattgtgtct 3240
 acccaataaa ctaattttta taaatctcat tttatgaaac aaattagtgt cttcagtggg 3300
 acatccgaca ttcacatagt tgaccttaa acttacaaaa ccatactatt aaaaaccaat 3360
 taaaaaaca gattaaaaag ttatcgagcc gttacacctt aattgaatta ttctgtcttc 3420
 gtccttaagt cataacggtc atattttcaa aaacaaaaac gaccgttaat cccaacaaaa 3480
 tctctacttt ctcttacctc aactttgttt cttatgtatg catataaacc ccaaatcaaa 3540
 gtgaacttat caagaaacac aaaaacaaac atcaaaacc caaaaaaaaa ccaaagttct 3600
 cttcttgaat tcgagaaa 3618

5 <210> 4
 <211> 1997

ES 2 607 984 T3

<212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 4

5

```

tccaattgat ctatttgttt agaaatttta agaaaatatac attattgtgg tgtgtgatgg      60
atcatggtag tgtttgatga atatTTTTgt ttagttattg taaggaaata tgtgattgtg      120
tgaatgattt attattcact atgaatttga taacagaaaa gtgtgggtac gatataatcg      180
atatatatct tataatctatt atatattgaa gagaaatata agtgtcagtc aaattaaatt      240
tattaaaaac tgagtttttt tctattaatt taatTTTTaa tatttttcaa tccctaaatg      300
ggcttogaat cctctaaaaa aatagatggt tgaatcctca taacaaaatc tgaattggaa      360
tcctcataac aaaataaatg ttttcccaa ctatatataa agcttattga tgtgaaggg      420
cttccactac gctttctagt cagtttgaag atctctcttt cccttattgc tcttgtttct      480
agccatgttt agtttagggg agtcttctat atcaagtaa tttcataaca ttgcctaaag      540
tttcccgct taaggattta gtgatgattt gatcctcaa tgtgtatgct tccatatttt      600
ttagcctttt taggatttac tttgtaatct ctgaatcatt catttcttga aatgatattt      660
acattcttat caaaacaaat ctacatataa agcttacata cctttatctt cttttagacc      720
ttgtaggtaa tggcgactta atacgttcac tttgtagcta gctatggttt tttatatggt      780
tgcttgtaac ttaatccctt ctggggatat ggatatatat agtgtccaac cacgaatttt      840
aatgtgtaa aaagagtttt aatttatact aaataatttt aaaacatctc aaaattgatt      900
taaattaata tttggtagtt agttcgtgta ttacatttgt atatttatta aaataatgaa      960
ataagtatga ctagtatata tttttataat aatattaagg atttattggt agtttatctt     1020
gaaaaattaa attttgtgaa tttagtcaa attcatgcat caaatggttt tatttgacta     1080
acatgttttt aattacttta tcaactacaag atataccatt ttttaaaagt catagcatag     1140
tttttttttt ttttaattat atacaaatta ctgttattaa aaactgtttg ttacgtttga     1200
ttgtatatta gatctttaat tataagacat aaagatattt ttaaaaaatc attaggagga     1260
tgttacaaaa tattcaattt atatccataa tcatttacat ttttaaatgat gtccccgta     1320
ccaaatgcca tgtgtgtccg ttcccatatg aaacaagaca tttttgtcga aatttattt     1380
ggcaataata tctcacattt gtaaaacttt gtattgttga atttcaattt caaatggcgt     1440

```

ES 2 607 984 T3

tttctacaac tcttttagaa tattaaccog ctattottaa catttaaact aatgtgacca 1500
 ttctaaaatt gatattccct ttacgtgttg gactttatta ataaactgat taacaataa 1560
 agtgtattat ttatcatcat aatatattta gcaaaactcaa tttcttatca attgtgtcta 1620
 cccaataaac taatttttat aaatctcatt ttatgaaaca aattagtgtc ttcagtggga 1680
 catccgacat tcacatagtt gaccttaaaa cttacaaaac catactatta aaaaccaatt 1740
 aaaaaacaag attaaaaagt tatcgagcgg ttacacctta attgaattat tctgtcttgg 1800
 tccttaagtc ataacgggtca tattttcaaa aacaaaaacg accgttaatc ccaacaaaat 1860
 ctctactttc tcttacctca actttgtttc ttatgtatgc atataaacc ccaatcaag 1920
 tgaacttatc aagaaacaca aaaacaaaca tcaaaacccc aaaaaaaaaac caaagttctc 1980
 ttcttgaatt cgagaaa 1997

<210> 5
 <211> 2019
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

5

<400> 5

cgtggtcacc gcaaggtaac catctttatt ttcttgggtt gatcttcact agctatatat 60
 taaccaatta catatgtatt atttgtact gaagaagga tataatttgt aatcgccaaa 120
 tgattgaatt agtatgtct aattacaaaa atttgtagaa atcgcgataa ttatcaactt 180
 ttttactata tcccatcatt ctactattac gcaatgttat caattgtact agtttgtttc 240
 atccactatg taaaatcatt caaacctaa agtcgatgct catcagctca tgtatatgta 300
 tgtatcatgt atatgtacat aagatataaa acctttatag atgtgcatgt aaaagaatgg 360
 tagatagtag tagtaggtgt gtaaggagaa agatctaggg gcttcaaaaa aaggagagaa 420
 aaggacagag catgtgaaaa gagacagaga acaaacaga ggagtgaaca gtcttactct 480
 ttttttttc tatgcactta atgaacccaa ccctctctgt atatttctga ttcttccat 540
 gtcttctct tcttttttat tccgaaaact tttcttcagt aaaaaccaat gccgaaaaaa 600
 atacataata aaaacgacaa aatatctaac attttttata taaaaggac aaaagtactt 660
 tcacttcaat tgcaacccaa caaacctagt cccttcttt atccaatgt ctctcccctg 720
 ctctctattt ctcatctaaa caccctttc tttctttctt atttaccatt ttgccaactt 780
 atgtaaaaga tgttaagaag aaaatgtgaa aatttagtaa aaatctctct tttgtattgt 840
 cgtcagaaac tgtaaaataa tcttactctt tttcaagtca gcatataagt ttggtttctt 900
 ctcccagatc agagattcgt gcagtgatga tacaagaagc ttattccgaa ttcttttcat 960
 aaatactcgt atttcttct tctttttttt tttctttttt ttaacatcta tctgttcttc 1020
 ttgcatctat ctgattttcc tctgtctttt agacagtaat aacagagctc actaaatgta 1080

10

ES 2 607 984 T3

ataaataaaa aaatgagctc aataaaaaagg taaatggcac tcatttttag gccatcaagt 1140
 gttgggatac agctgaaatt aaaaaggcgt cagctcaaag gaaaaataa ataaaaaaga 1200
 ttccccaaaa tcaatgcaact tttatagaaa aaaatacaca taatttcaaa aaataacttaa 1260
 attttgaaaa ataagatgaa gaaaggattg agaagagagg aaagagtagt cagagagaca 1320
 ggagcatcaa gtgctgcaga agaagcaaca ggaacactgg gcctgagtct cttcagattt 1380
 gccagtcttt ataggaccac actcttcttc ttcaccccc ttacatacat tttatctatt 1440
 tttacatttt acaatattgg atattttaat gttgttttga ttttacta catggcaaaa 1500
 ctcttaaaa gctcttctcc tgatgtgatt ctttttctt ttcaacactg tctaaatctc 1560
 tctctcttct ttgtgatcac tctttgattt attaactttc tgattaccat tcccccaaa 1620
 ataaacccta ctagagtgtg actaattgta tagtaatctc tattgtgtaa taatctttaa 1680
 tctttctca atacaaaaaa gtagggtata tatataaaag agggagtggc ctctgttaga 1740
 gaaagaacct agctagtgtt catgcaattt gcatctgagg aatatatgct tagaaagaga 1800
 gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagata tcaaaccaga ggaaaagagt 1860
 gacagagaaa gtggtcatct ttgtctgtct ctgtccgaaa ctcaggagcc ctaatctctg 1920
 aatccatcaa gaaagctctt tctcttctt cttttatgct tctgaatttg ctacatatat 1980
 aaactatctg aagaaagcta gagaataaga tgatgagtc 2019

<210> 6

<211> 1119

5 <212> ADN

<213> virus del mosaico de la coliflor

<400> 6

atthaggtga cactatagaa tactcaagct atgcatcaa cgcggtggga gctctcccat 60
 atggctgaga tctcctttgc cccggagatc accatggacg actttcteta tctctacgat 120
 ctaggaagaa agttcgacgg agaaggtgac gataccatgt tcaccaccga taatgagaag 180
 attagcctct tcaatttcag aaagaatgct gaccacaga tggttagaga ggcctacgcg 240
 gcaggtctca tcaagacgat ctaccgagt aataatctcc aggagatcaa ataccttccc 300
 aagaaggtta aagatgcagt caaaagattc aggactaact gcatcaagaa cacagagaaa 360
 gatataattc tcaagatcag aagtactatt ccagtatgga cgattcaagg cttgcttcat 420
 aaaccaaggc aagtaataga gattggagtc tctaagaaag tagttcctac tgaatcaaag 480
 gccatggagt caaaaattca gatcgaggat ctaacagaac tcgccgtgaa gactggcgaa 540
 cagttcatatc agagtctttt acgactcaat gacaagaaga aaatcttctg caacatggtg 600
 gagcacgaca ctctcgtcta ctccaagaat atcaaagata cagtctcaga agaccaaagg 660
 gctattgaga cttttcaaca aagggttaata tcgggaaacc tcctcggatt ccattgccc 720

10

ES 2 607 984 T3

gctatctgtc acttcatcaa aaggacagta gaaaaggaag gtggcaccta caaatgccat 780
 cattgcgata aaggaaaggc tatcgttcaa gatgcctctg ccgacagtgg tcccaaagat 840
 ggacccccac ccacgaggag catcgtggaa aaagaagacg ttccaaccac gtcttcaaag 900
 caagtggatt gatgtgatat ctccactgac gtaagggatg acgcacaatc ccactatcct 960
 tgcgaagacc cttcctctat ataaggaagt tcatttcatt tggagaggac tgcaggacga 1020
 tccgtatddd tacaacaatt accacaacaa aacaacaac aaacaacatt acaatttact 1080
 attctagtcg acctgcaggc ggccgcacta gtgatatca 1119

<210> 7

<211> 1083

5 <212> ADN

<213> *Pseudomonas putida*

<400> 7

atgaacctga atcgtdttga acgttatccg ttgaccttcg gtccatcccc catcactccc 60
 ttgaaacgcc tcacgagca cctgggaggc aagtggaac tgtatgcaa gcgtgaagac 120
 tgcaatagcg gcctggcctt cggcgggaa aaaacggca agctcgaata tctgattccc 180
 gaggccatcg agcaaggctg cgacacctg gtgtccatcg gcggtatcca gtcgaaccag 240
 acccggcagg tcgctgcggt cgccgccac ttgggtatga agtgtgtgct tgtgcaggaa 300
 aactgggtga actactccga cgctgtatat gaccgcgctg gcaacatcga gatgtcgcgg 360
 atcatgggag cggatgtgcg gcttcatgct gcaggtttcg acattggaat tcggccgagc 420
 tgggaaaagg ccatgagcga tgtcgtggag cgcggcggca aaccgtttcc aattccggcg 480
 ggctgttccg agcatcccta tggagggtc gggtttgtcg gcttcgctga ggaagtgcgg 540
 cagcaggaaa aggagttggg cttcaagttt gactacatcg tggctctgctc ggtgaccggc 600
 agtaccacgg ccggcatggt cgtcggtttc gcggtgacg gtcgctcga aaacgtgatc 660
 ggggtcgatg cttcggcga accggagcaa accaaggcgc agatcctgcg tatcgcctga 720
 cataccgctg aactgggtga gctggggcgc gaaatcactg aagaggatgt ggtgctcgat 780
 acgcgtttcg cctatccgga atatggcttg cccaacgaag ggacgctgga agcgattcgc 840
 ctgtgcggca gtcttgaggg ggtgttgacc gatccggtct acgagggcaa atccatgcac 900
 ggcatgattg aaatggtacg ccgcggggaa ttccctgacg gctccaaagt tctttatgcc 960
 cacctgggcg gcgcacctgc gttgaacgcc tacagcttct tgtttcga cggctgaaat 1020
 tgggtcccga tggatgtttc agaatccggt ccaagaaaag atggtgttgg gaaaatgttc 1080
 10 tag 1083

<210> 8

<211> 1206

15 <212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 8

ES 2 607 984 T3

atgagaggac gaagcttgac actctcaaga gtaaagctcg agcttgcgag aagaagcatg	60
tctgcaacat cegtaccttc aatggcggat tttctcacca aaaaacctta ctctcctcct	120
tcttgggctt ctcatcttcg tccgcttctt tctcacactt tctccctcgc tcaccttctt	180
actccgatcc atcgatggaa tcttcctggt cttcctaata gcacagaact ctggatcaag	240
cgagatgatt tcaccggaat ggaattgagt ggaacaaaag tacgaaaact cgaattctta	300
atggcgggag ctgttgatca acacgctgat actgtaatca ctatcggcgg tattcagagc	360
aatcattgtc gtgctacagc cactgcatct aactatctta atctcaattc tcattctatt	420
ctccgtactt ccaagcttct tgctgatgaa gatcctggat tggttgggaa tctccttgtc	480
gagcgtctcg ttggagctaa tgttcatcta atctctaaag aagagtattc ttccattggg	540
agtgaggctc ttactaatgc tctgaaagag aaactggaaa aagaaggaaa gaaaccctat	600
gttattccag tcgggtggac gaactctttg ggaacttggg gttatataga agcagcaagg	660
gaaattgagg agcagctgaa ttatagacct gatgacctga aatttgatga tattgtggta	720
gcatgtggca gtgggtggac aattgctggt atttcattgg ggtcttggtt gggagctcta	780
aaagccaagg ttcattgctt ctcggtttgc gatgatoctg attacttcta tgactttgtc	840
caaggccttc tggatggact tcacgctggt gttaaactctc gtgatatcgt caacatccac	900
aatgccaaag gaaaaggata tgccatgaac acgtcagagg agcttgagtt tgtaaagaaa	960
gtagcaagtt caactggtgt tattcttgat ccggtttaca gtgggaaagc tgcgatgggt	1020
ttgataaatg agatcaccaa agatcccaaa tgttgggagg gaaggaagat attgttcata	1080
cacactggtg ggcttcttgg gttgtatgat aaggttgatc aaatggcatc tctgatgggt	1140
aattggtccc ggatggatgt ttcagaatcc gttccaagaa aagatggtgt tgggaaaatg	1200
ttctag	1206

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para producir una planta tolerante a estrés abiótico respecto a una planta de control, disminuyendo la ruta de transducción de señales de etileno en dicha planta durante el periodo of estrés abiótico impuesta sobre dichas plantas, que comprende introducir y expresar en dicha planta un gen quimérico que comprende un promotor de 4TM de plantas seleccionado de la lista que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, o un promotor de 4TM de plantas ortólogo funcionalmente equivalente de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, en el que dicho promotor está unido de forma funcional a un gen o fragmento génico derivado de la ruta de transducción de señales de etileno.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la expresión de dicho gen quimérico en dicha planta conduce a una regulación negativa de al menos un gen de la siguiente lista: ACO1, ACO2, ETR2, ETR1, CTR1, MKK9, MKK7, EIN3, EIN5 o EIL1.
- 15 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la expresión de dicho gen quimérico en dicha planta conduce a una regulación positiva de al menos un gen de la siguiente lista: EBF1, EBF2, ACC desaminasa, un receptor de etileno negativo dominante o un factor de transcripción negativo dominante EIN3 o EIL1.
- 20 4. Un gen quimérico que comprende los siguientes elementos de ADN unidos de forma funcional: a) un promotor de 4TM de plantas seleccionado de la lista que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, o un promotor de 4TM de plantas ortólogo funcionalmente equivalente de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, b) una región de ADN que cuando se transcribe produce una molécula de ARN bicatenaria capaz de reducir la expresión de un gen de la siguiente lista: ACO1, ACO2, ETR2, ESR1, CTR1, MKK9, MKK7, EIN3, EIN5 o EIL1 y c) una región final 3' que comprende señales de terminación de la transcripción y de poliadenilación que funcionan en células de dicha planta.
- 25 5. Un gen quimérico que comprende los siguientes elementos de ADN unidos de forma funcional: a) un promotor de 4TM de plantas seleccionado de la lista que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, o un promotor de 4TM de plantas ortólogo funcionalmente equivalente de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, b) una región de ADN que codifica un gen de la siguiente lista: EBF1, EBF2, ACC desaminasa, un receptor de etileno negativo dominante o un factor de transcripción negativo dominante EIN3 o EIL1 y c) una región final 3' que comprende señales de terminación de la transcripción y de poliadenilación que funcionan en células de dicha planta.
- 30 6. Una planta transgénica o una semilla transgénica o una célula de planta transgénica que comprende un gen quimérico de acuerdo con la reivindicación 4 o de acuerdo con la reivindicación 5.
- 35 7. Una planta transgénica o semilla transgénica o célula de planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dicha planta, semilla o célula es una planta de cultivo o una monocotiledónea o un cereal tal como arroz, trigo, maíz, cebada, mijo, centeno, triticale, sorgo farro, espelta, secale, escanda, tef, adaza y avena.
- 40

Figura 1

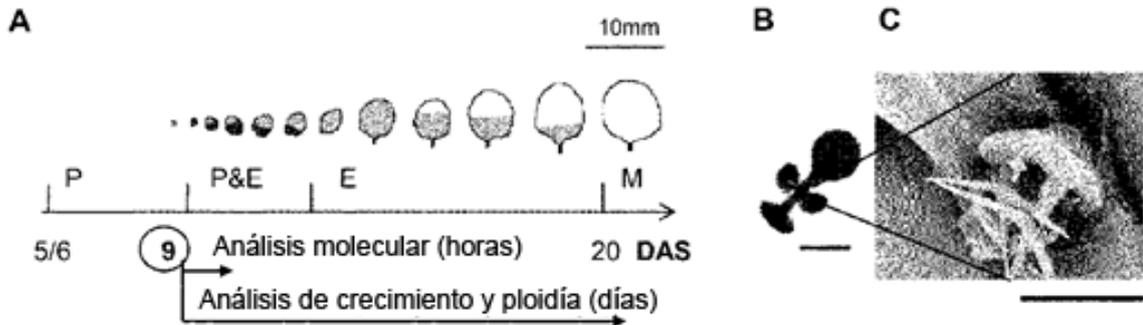


Figura 2

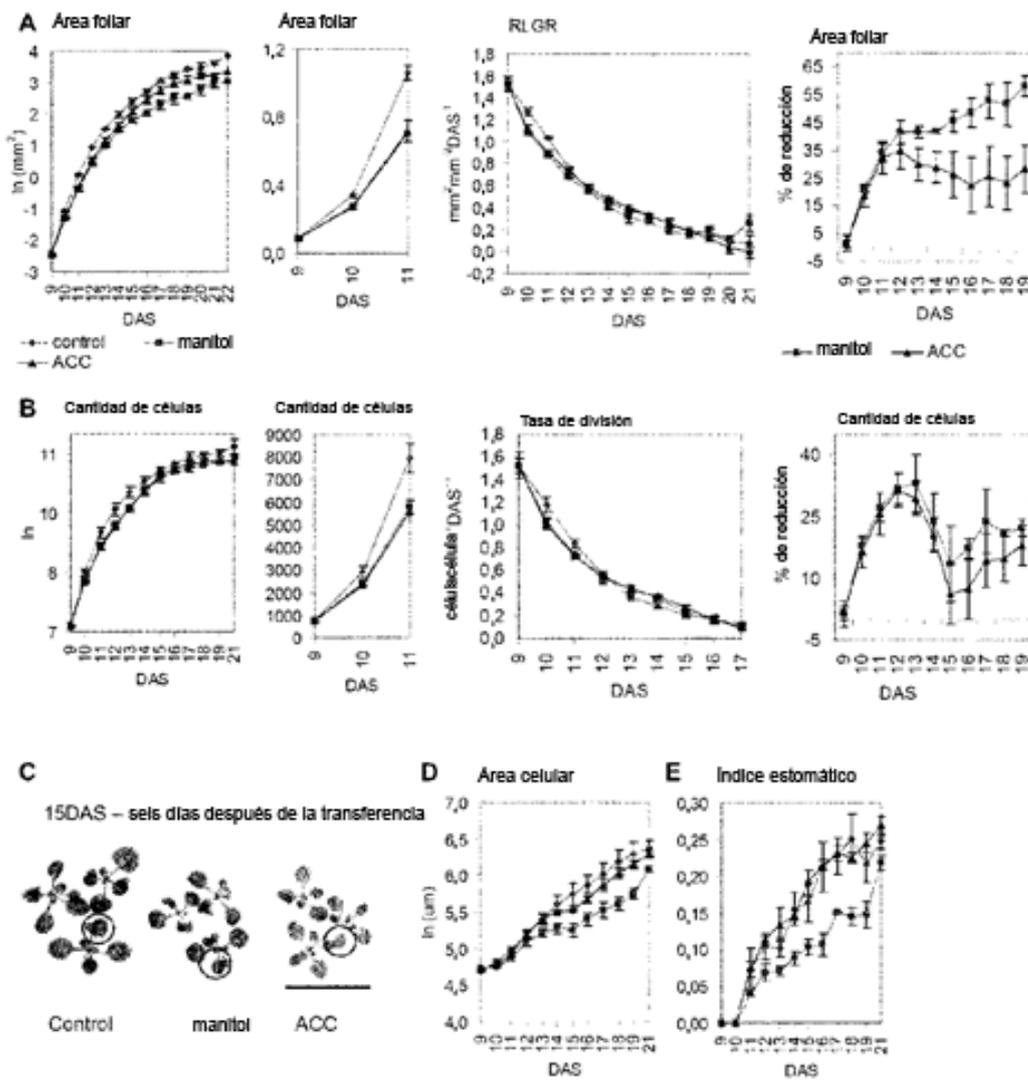
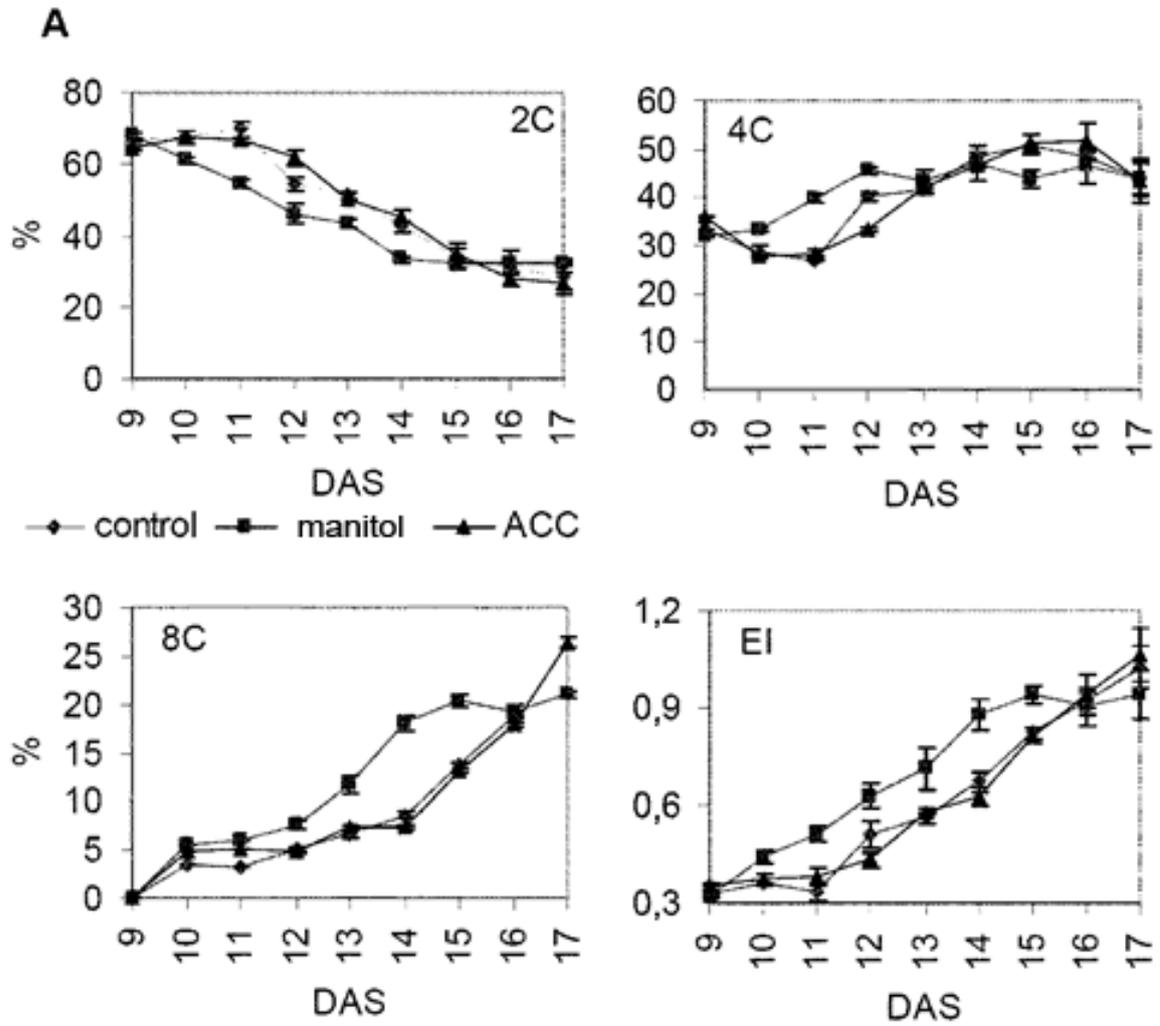


Figura 3



B *CYCB1;1:Dbox-GUS* 11DAS (48h después de la transferencia)

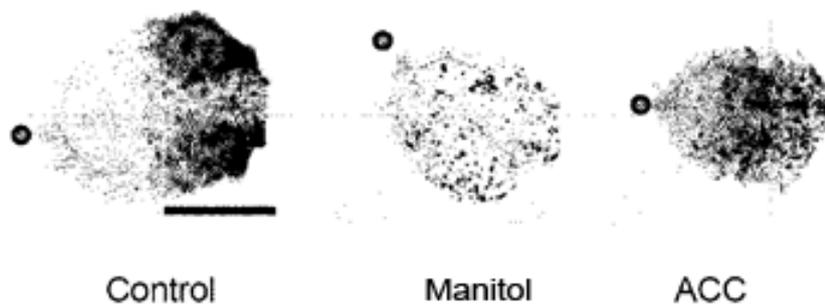


Figura 4

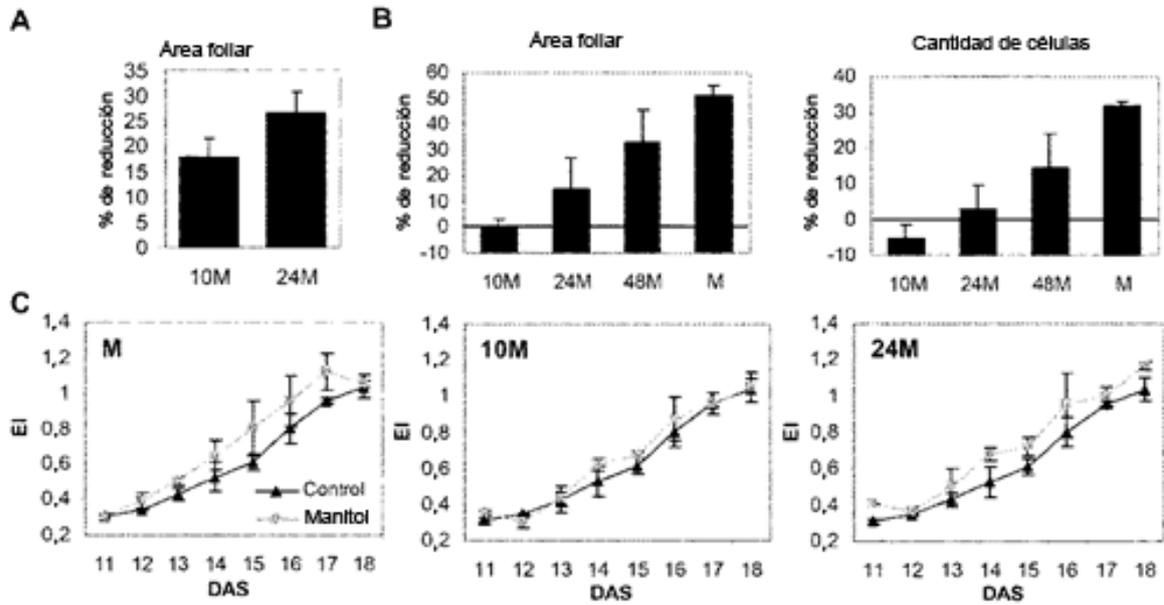


Figura 5

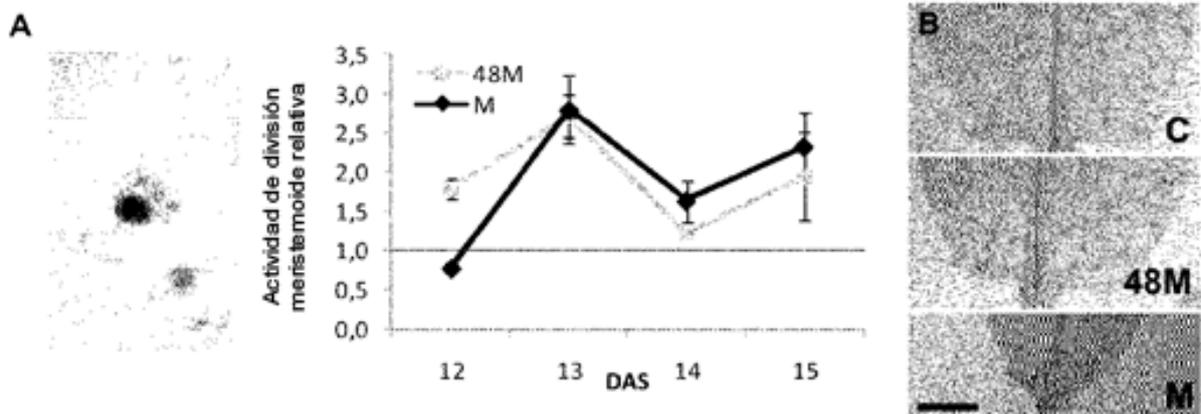


Figura 6

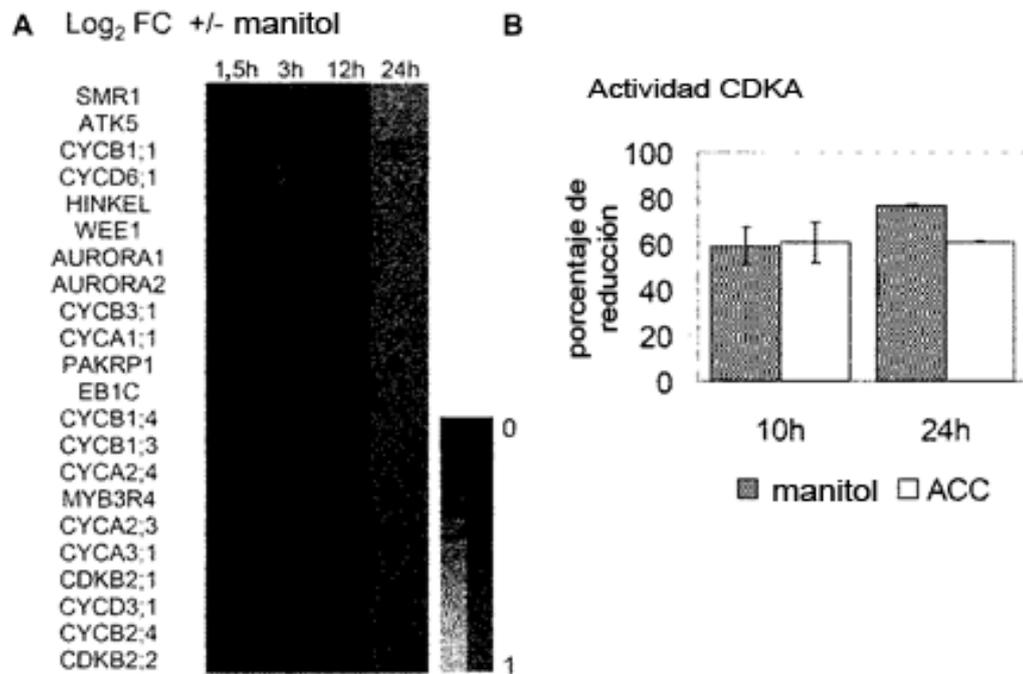


Figura 7

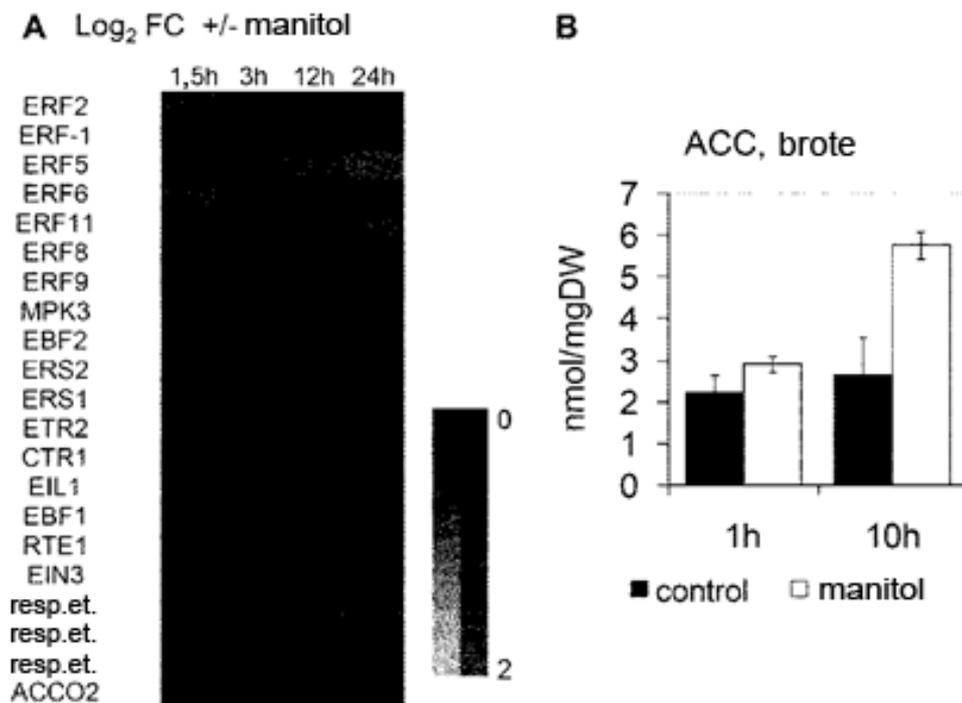


Figura 8

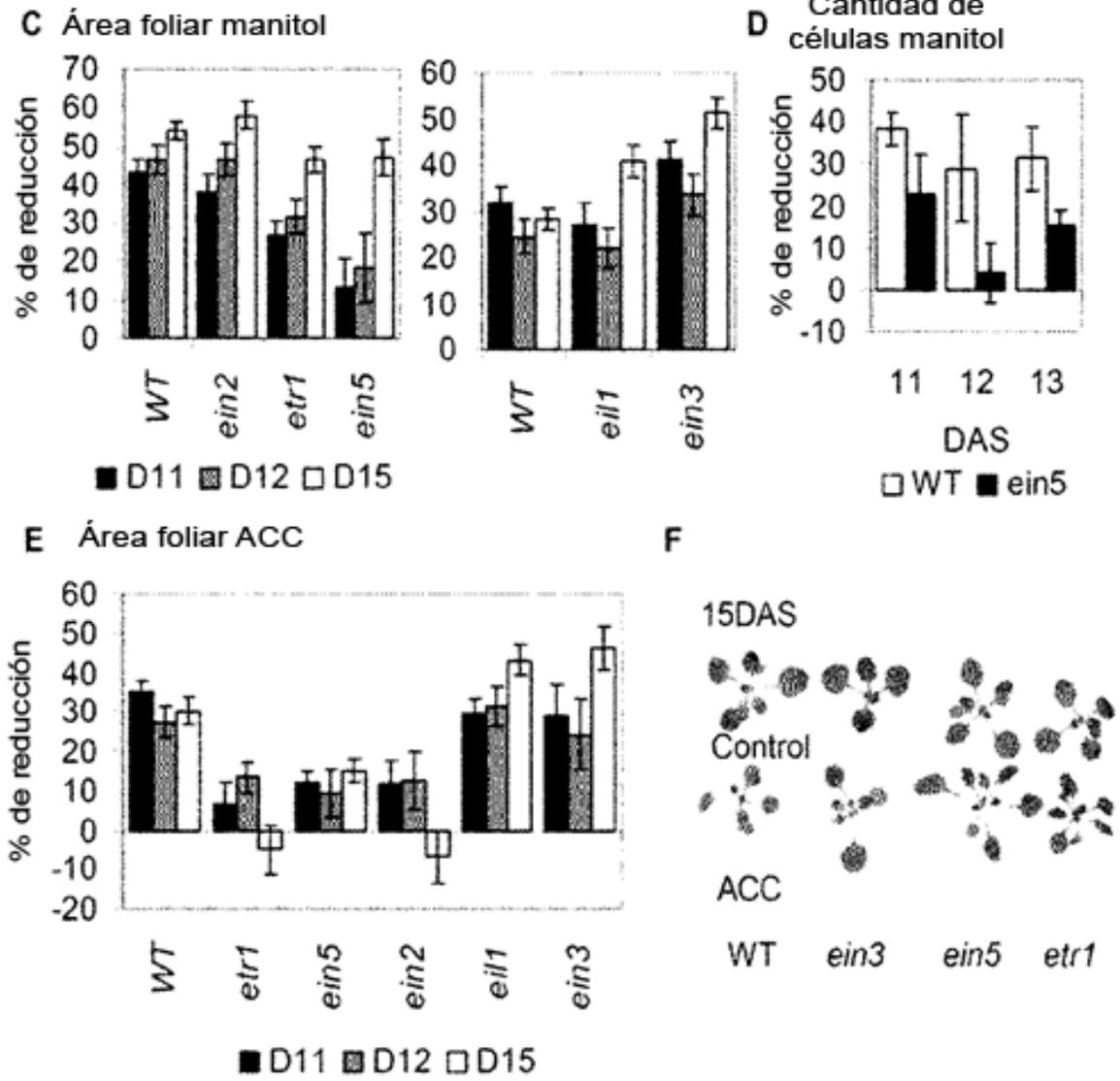


Figura 9

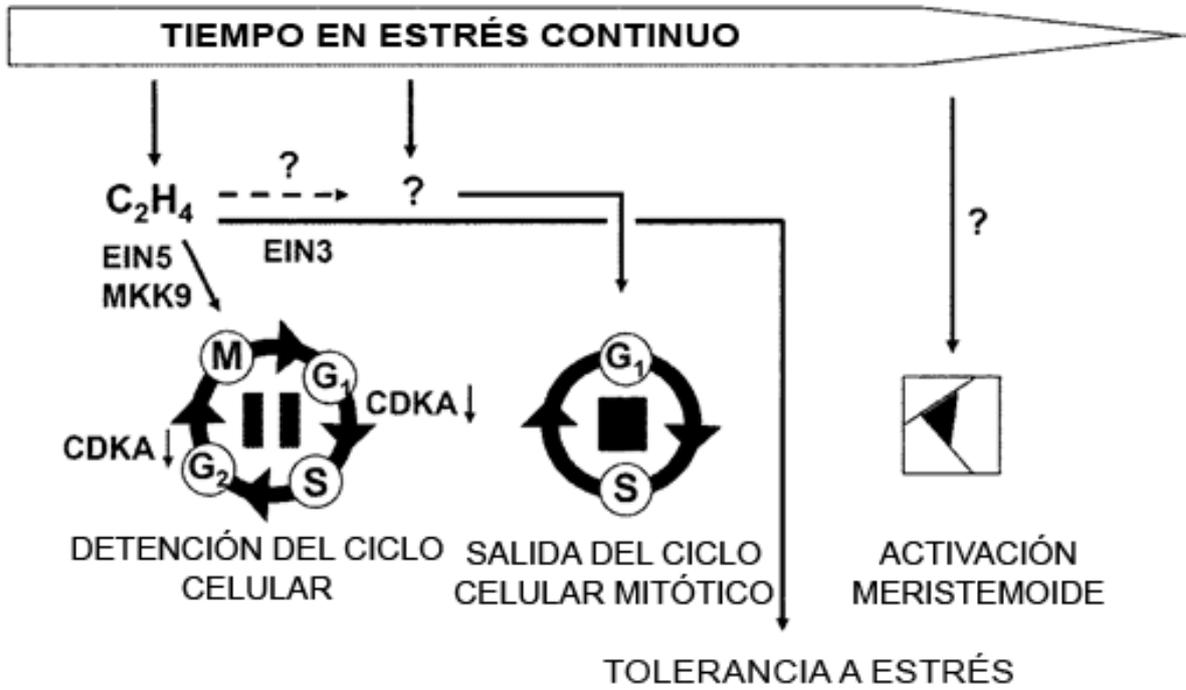


Figura 10:

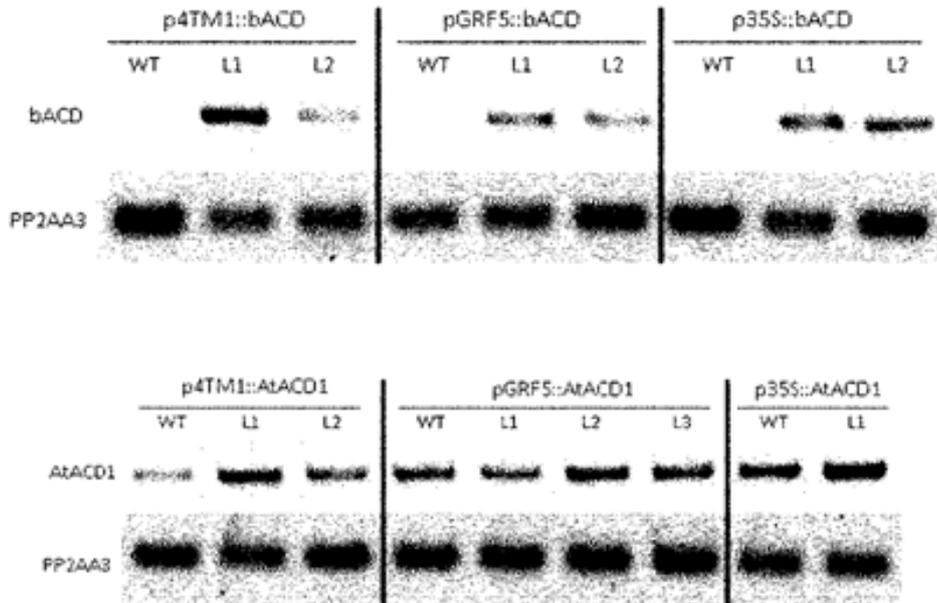


Figura 11

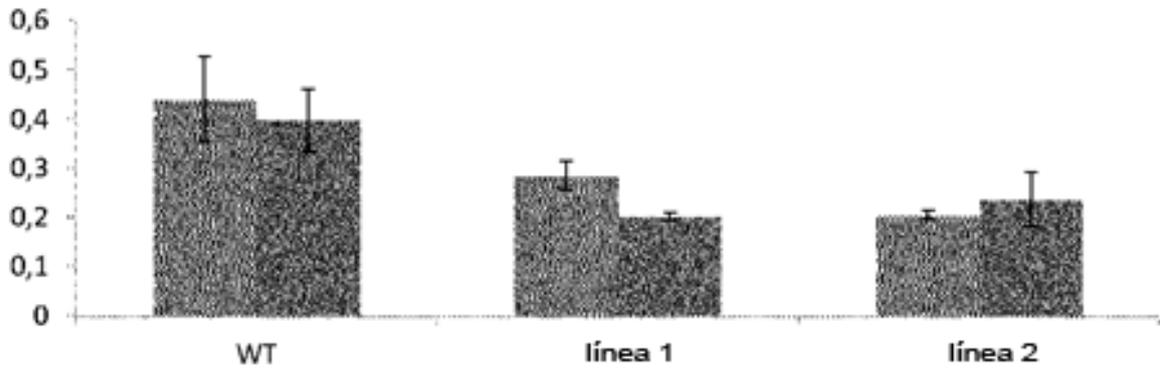


Figura 12

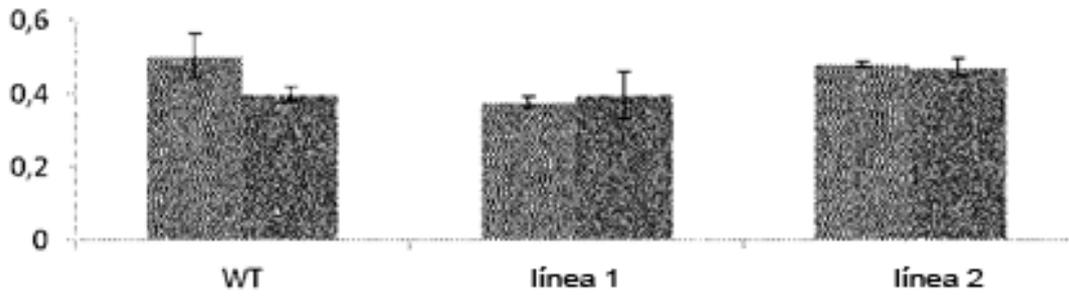


Figura 13:

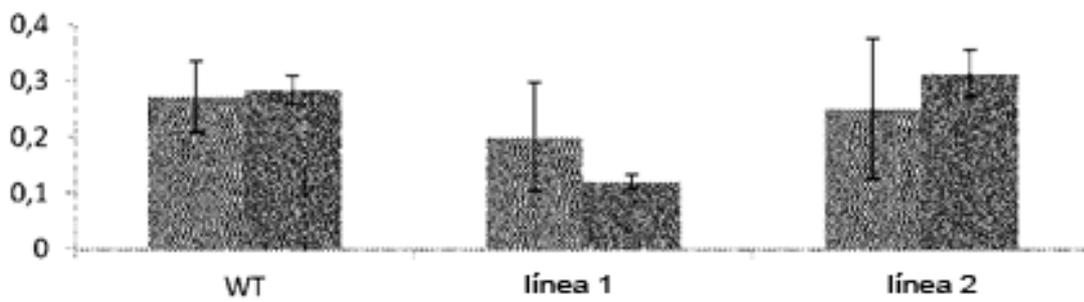


Figura 14:

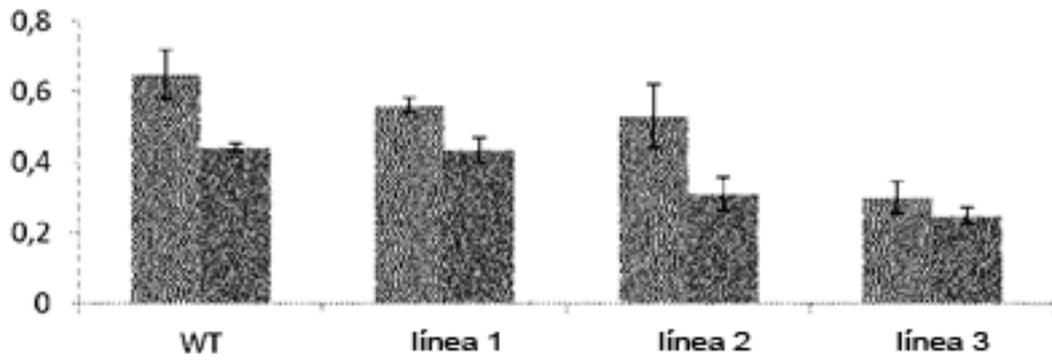


Figura 15:

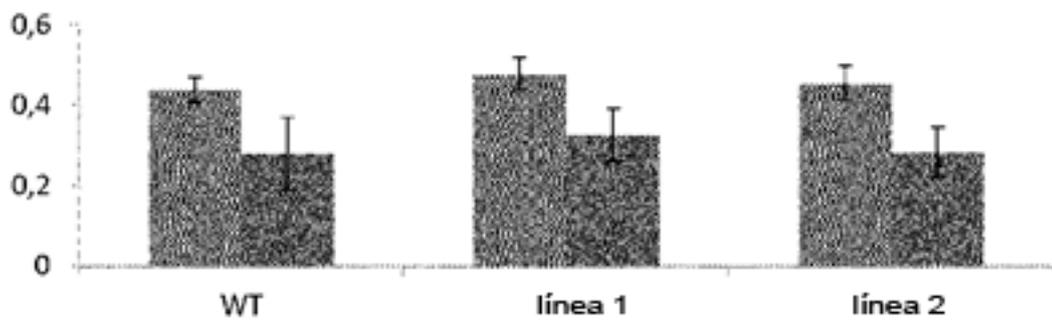


Figura 16:

