

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 998**

51 Int. Cl.:

C12N 15/29 (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 5/14 (2006.01)
A01H 4/00 (2006.01)
A01H 5/00 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.08.2009 PCT/IN2009/000444**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2010 WO10018598**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2009 E 09806540 (2)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2350284**

54 Título: **Gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado a partir de arroz índica IR64**

30 Prioridad:

11.08.2008 IN DE18962008

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

23.05.2018

73 Titular/es:

PAREEK, ASHWANI (100.0%)
Stress Physiology and Molecular Biology Lab
School of Life Sciences Jawaharlal Nehru
University (JNU)
New Delhi 110 067, IN

72 Inventor/es:

KARAN, RATNA;
ROY, GAUTAM KUMAR y
SINGLA-PAREEK, SNEH LATA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 668 998 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

Gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado a partir de arroz indica IR64

Campo de la invención:

5 La presente invención desvela un gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz indica IR64 y clones producidos de este modo.

10 En particular, la presente invención desvela un gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz indica IR64 que se ha descubierto que es capaz de ser osmosensible e inducible por múltiples tensiones, y se ha descubierto que es capaz de mejorar la tolerancia al estrés múltiple de las plantas de cultivo de tal manera que las plantas de cultivo producidas de este modo son capaces de hacer frente a más de una condición de estrés abiótico ambiental y, de este modo, se ha descubierto que las plantas de cultivo tienen un valor económico aumentado mientras se mantiene el rendimiento de las mismas.

La presente invención también desvela un procedimiento de aislamiento del gen de histidina quinasa de tipo híbrido a partir del arroz indica IR64, y su listado de secuencias y su procedimiento de clonación, al menos, con vector de expresión de levaduras y vector de expresión de plantas.

15 La presente invención también desvela clones producidos por clonación del gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz indica IR64 con vector de expresión de levaduras y vector de expresión de plantas.

La presente invención también desvela un procedimiento para mejorar la tolerancia al estrés múltiple de las plantas de cultivo empleando el gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz indica IR64 y plantas de cultivo que tienen una tolerancia al estrés múltiple mejorada.

20 La presente invención también desvela el uso del gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz indica IR64 que mejora la tolerancia al estrés múltiple de las plantas de cultivo.

La presente invención también desvela características funcionales del gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz indica IR64.

Antecedentes de la invención:

25 El arroz es un cultivo básico importante para el consumo humano a nivel mundial. El tamaño del genoma del arroz es de aproximadamente 430 Mb, que es comparativamente más pequeño que otros diversos cultivos de cereales, y varía de aproximadamente 430 Mb a aproximadamente 17000 Mb, por ejemplo, el tamaño del genoma del trigo harinero es de aproximadamente 16.900 Mb, el del maíz es de aproximadamente 2.600 Mb, y el del sorgo es de aproximadamente 735 Mb, lo que hace que el arroz sea el cultivo de cereales modelo ideal.

30 Se observa que las tensiones ambientales son causadas debido a factores bióticos, por ejemplo los virus, bacterias, hongos, insectos o nemátodos; o debido a factores abióticos, por ejemplo, los extremos de disponibilidad de agua, es decir, inundaciones y/o extremos de la condición salina, es decir, mayor salinidad y/o escasez extrema de agua, es decir, sequía y/o temperaturas extremas, es decir, la temperatura es muy alta o muy baja. En conjunto, estos factores afectan al rendimiento potencial de las plantas de cultivo. Además, las condiciones climáticas cambiantes y el calentamiento global se han percibido como amenazas potenciales a la autosuficiencia alimentaria. Debido al impresionante progreso realizado en la comprensión de las interacciones planta-patógeno, las plantas transgénicas que son capaces de sobrevivir mejor bajo el ataque de insectos, que es un factor biótico, son ahora una realidad. Los ejemplos comunes de tales variedades son algodón Bt y berenjena Bt.

40 Sin embargo, las plantas de cultivo que pueden soportar las tensiones abióticas aún no están disponibles, principalmente, porque las tensiones abióticas son de naturaleza multigénica.

Por lo tanto, existe una necesidad urgente de modificar las plantas de cultivo para que puedan sobrevivir y mantener un alto rendimiento en condiciones extremas de estrés abiótico ambiental y, por lo tanto, dar lugar a plantas tolerantes al estrés, es decir, existe una necesidad urgente de mejorar la tolerancia al estrés múltiple de plantas de cultivo para que puedan superar los problemas causados por tensiones ambientales.

45 Una de las formas posibles en que se puede potenciar la capacidad de tolerancia al estrés de los cultivos es a través de ingeniería genética en la que uno o más genes se diseñan para proporcionar el rasgo deseado. Con estos objetos en mente, se han modificado varias plantas en el pasado reciente. Un ejemplo de este tipo implica genes que pueden sintetizar osmolitos para mantener el potencial hídrico de la célula en condiciones de estrés osmótico. Otras categorías incluyen la modificación de genes, que son capaces de bombear selectivamente los iones de sodio tóxicos a la vacuola, y por lo tanto son capaces de mantener el citoplasma libre de toxicidad.

50 Sin embargo, no se entiende mucho ni se dispone de mucho en lo que se refiere a la maquinaria de detección asociada con las tensiones osmóticas.

5 En organismos inferiores, por ejemplo las levaduras, la osmosensibilidad se entiende mucho mejor, y por lo tanto, la complementación funcional de los mutantes osmosensibles de levaduras con el gen diana procedente de plantas de cultivo sería una forma posible de validar funcionalmente nuevos genes para funciones similares. La modificación genética de las plantas de cultivo con respecto a su maquinaria osmosensora sería altamente deseable ya que daría como resultado una tolerancia potenciada frente a las tensiones osmóticas.

Se han realizado varios intentos para las plantas transgénicas en los que el rendimiento se ha potenciado bajo un estrés específico, por ejemplo, salinidad o sequía o cualquier otro estrés abiótico. Estas plantas transgénicas han estado utilizando, hasta ahora, genes que se inducen bajo un único estrés específico.

10 Sin embargo, hasta ahora, no se ha puesto a disposición ninguna planta transgénica que utilice el gen que se induce bajo múltiples tensiones, y por lo tanto, tales genes son altamente deseables y ventajosos, y por lo tanto, la necesidad actual es tener un gen que pueda soportar múltiples tensiones para que la planta que utiliza tal gen pueda soportar múltiples tensiones mientras mantiene su rendimiento potencial.

Necesidad de la invención:

15 Por lo tanto, existe una necesidad urgente de tener un gen que sea capaz de ser osmosensible y ser inducible por múltiples tensiones y sea capaz de mejorar la tolerancia al estrés múltiple de las plantas de cultivo, particularmente de las plantas transgénicas para hacer que las plantas sean capaces de hacer frente a más de una condición de estrés abiótico ambiental, y por lo tanto, aumentar su valor económico mientras se mantiene el rendimiento de las mismas y de un procedimiento de aislamiento del mismo y del listado de secuencias del mismo y del procedimiento de clonación de tal gen, al menos, con vector de expresión de levaduras y vector de expresión de plantas y de clones producidos de ese modo en la clonación con vector de expresión de levaduras y vector de expresión de plantas. También existe una necesidad urgente de tener un procedimiento para mejorar la tolerancia al estrés múltiple de las plantas de cultivo y de las plantas de cultivo que tienen una tolerancia al estrés múltiple mejorada. Además, también existe una necesidad urgente de tener características funcionales de tal gen.

Problemas a resolver por la invención:

25 La presente invención, por lo tanto, tiene como objetivo resolver problemas de baja tolerancia al estrés de las plantas de cultivo al proporcionar un gen que debe ser capaz de ser osmosensible e inducible por múltiples tensiones y ser capaz de mejorar la tolerancia al estrés múltiple de las plantas de cultivo, particularmente de plantas transgénicas para que las plantas sean capaces de hacer frente a más de una condición de estrés abiótico ambiental y el procedimiento de aislamiento de tal gen de arroz indica IR64 y el procedimiento para mejorar la tolerancia al estrés múltiple de las plantas de cultivo.

Objetos de la invención:

35 Por consiguiente, la presente invención desvela un gen de histidina quinasa de tipo híbrido que se aísla de arroz indica IR64 y es capaz de ser osmosensible e inducible por múltiples tensiones, y por lo tanto, es capaz de mejorar la tolerancia a múltiples tensiones de las plantas de cultivo con el fin de hacer que las plantas sean capaces de hacer frente a más de una condición de estrés abiótico ambiental y, por lo tanto, aumentar el valor económico de las plantas de cultivo mientras se mantiene el rendimiento potencial de las mismas.

También, la presente invención desvela un procedimiento de aislamiento del gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz indica IR64.

40 También, la presente invención desvela un listado de secuencias del gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz indica IR64.

También, la presente invención desvela un procedimiento de clonación del gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz indica IR64, al menos, con vector de expresión de levaduras y vector de expresión de plantas.

También, la presente invención desvela clones producidos por clonación del gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz indica IR64 con vector de expresión de levaduras y vector de expresión de plantas.

45 También, la presente invención desvela características funcionales del gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz indica IR64.

También, la presente invención desvela un procedimiento para mejorar la tolerancia al estrés múltiple de las plantas de cultivo empleando el gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz indica IR64.

También, la presente invención desvela plantas de cultivo que tienen tolerancia a estrés múltiple mejorada.

50 La presente invención también desvela el uso del gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz indica IR64 para mejorar la tolerancia al estrés múltiple de las plantas de cultivo.

Breve descripción de las figuras adjuntas de la invención:

La figura 1A ilustra secuencias de cebadores usadas para el aislamiento del gen de arroz indica IR64 de acuerdo con la realización más preferida de la presente invención.

5 La figura 1B ilustra diversas condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el aislamiento del gen de arroz indica IR64 y la clonación del mismo de acuerdo con la realización más preferida de la presente invención.

10 La figura 1C ilustra la electroforesis en gel de agarosa del producto de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que muestra un producto de amplificación de un tamaño de aproximadamente 2,6 Kb, más precisamente del tamaño de aproximadamente 2598 pb del gen aislado de arroz indica IR64 de acuerdo con la realización más preferida de la presente invención.

La figura 2A ilustra la secuencia génica completa del marco abierto de lectura [ORF] de OsHk3b de acuerdo con la realización más preferida de la presente invención.

La Figura 2B ilustra la secuencia de aminoácidos deducida completa para la proteína codificada por el ORF de OsHk3b de acuerdo con la realización más preferida de la presente invención.

15 La figura 3A ilustra la confirmación de la clonación del gen de la presente invención en el vector pYES2 de acuerdo con la realización más preferida de la presente invención.

La figura 3B ilustra la confirmación de la clonación del gen de la presente invención en el vector pCAMBIA1304 de acuerdo con la realización más preferida de la presente invención.

20 La figura 4 ilustra la complementación funcional del mutante HS13 osmosensible dependiente de la temperatura de la levadura SLN1 con el ORF de OsHK3b de arroz de acuerdo con la realización más preferida de la presente invención.

La figura 5 ilustra el histograma que muestra la capacidad de inducción de OsHK3b por diversas tensiones abióticas en arroz de acuerdo con la realización más preferida de la presente invención.

25 Figura 6 Transformación y regeneración de *Oryza sativa* cv IR64 - ilustra las semillas de arroz IR-64 etapa - [a]; formación de callos de arroz en medios de inducción de callos etapa - [b]; callo de arroz subcultivado mantenido en medios de inducción de callo durante 5-7 días etapa - [c]; coinfección de callos de arroz con la cepa LBA4404 de *Agrobacterium* que contiene la construcción OsHK3b etapa - [d]; cocultivo de callos de arroz coinfectados etapa - [e]; lavado de *Agrobacterium* sobrecultivado con cefotaxima antibiótica etapa - [f]; transferencia de callos lavados en la placa de selección etapa - [g]; callos transformados mantenido en medio de regeneración etapa - [h]; plántulas regeneradas transferidas a un medio de regeneración fresco etapa - [i]; planta completamente regenerada transferida a tubos de cultivo para el endurecimiento - [j]; la planta de la etapa -[j] se transfiere además a la maceta de barro y se guarda en el invernadero etapa -[k] de acuerdo con la realización más preferida de la presente invención.

30 La figura 7A es ilustrativa de la confirmación de la tolerancia a múltiples tensiones de hojas de plantas cultivadas en la figura 6 mediante un ensayo de disco foliar que muestra la tasa de blanqueo de diferentes muestras de hojas en condiciones de estrés control y estrés por salinidad de acuerdo con la realización más preferida de la presente invención.

La figura 7B ilustra el contenido total de clorofila de las hojas de plantas cultivadas en la figura 6 de acuerdo con la realización más preferida de la presente invención.

40 La figura 8 es ilustrativa de la confirmación de la integración exitosa del gen OsHK3b de la presente invención en el genoma de plantas transgénicas IR64 usando el plásmido pCAMBIA1304 de acuerdo con la realización más preferida de la presente invención.

45 La figura 9 es ilustrativa de la confirmación de la tolerancia al estrés múltiple de plantas T₁, en términos de germinación de semillas en condiciones salinas, cultivadas a partir de semillas de plantas cultivadas en la figura 6 de acuerdo con la realización más preferida de la presente invención.

La Figura 10 es ilustrativa de la confirmación comparativa de la tolerancia al estrés múltiple de plantas T₁ cultivadas durante 7 días en condiciones normales, y a continuación, cultivadas durante otros 10 días en condiciones salinas midiendo sus contenidos de clorofila.

Las leyendas detalladas de las figuras se han proporcionado al final de esta descripción.

50 Descripción y Realizaciones Preferidas de la Invención:

La presente invención se refiere a un procedimiento para el aislamiento del gen de histidina quinasa de tipo híbrido -

OsHK3b a partir del arroz indica IR64 para su uso en la mejora de la tolerancia a la salinidad y al estrés por sequía de las plantas de cultivo al sobreexpresar el OsHK3b, caracterizado por

- 5 (i) tratamiento de ADNc aislado de plantas de semillero IR64 con cebador directo OsHk3bF y cebador inverso OsHk3bR mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para producir el gen de histidina quinasa de tipo híbrido amplificado aislado - OsHK3b,
 (ii) clonación del gen aislado - OsHK3b en el vector TOPO-TA2.1 para producir plásmido recombinante pTOPO-OsHK3b,

10 en el que el gen de histidina quinasa de tipo híbrido - OsHK3b se aísla de su plásmido pTOPO-OSHK3b, en el que dicho cebador directo OsHk3bF se identifica como 5'ATGACGTTTCGCGAGGTACGC3', en el que dicho cebador inverso OsHk3bR se identifica como 5'CTATTCAACTTGGTCATGATTTTG3', en el que dicha PCR comprende una etapa de hibridación en PCR llevada a cabo a aproximadamente a 55 °C, en el que dicho gen - OsHK3b tiene ADNc de 2598 pb, en el que dicho gen - OsHK3b es como el proporcionado en la figura 2A, en el que dicha reacción en cadena de la polimerasa (PCR) comprende las etapas de:

- 15 i) preparación de la mezcla de reacción de ADNc y el cebador directo OsHk3bF identificado como 5'ATGACGTTTCGCGAGGTACGC3' y el cebador inverso OsHk3bR identificado como 5'CTATTCAACTTGGTCATGATTTTG3';
 ii) desnaturalización inicial de la mezcla de reacción de la etapa - i) a aproximadamente 94 °C, preferentemente durante aproximadamente 5 minutos;
 20 iii) desnaturalización de la mezcla de reacción de la etapa - ii) a aproximadamente 94 °C, preferentemente durante aproximadamente 1 minuto;
 iv) hibridación de la mezcla de reacción de la etapa - iii) a aproximadamente 55 °C, preferentemente durante aproximadamente 1 minuto;
 25 v) extensión de la mezcla de reacción de la etapa - iv) a aproximadamente 72 °C, preferentemente durante aproximadamente 3 minutos; y
 vi) extensión final de la mezcla de reacción de la etapa - v) a aproximadamente 72 °C, preferentemente durante aproximadamente 7 minutos,

en el que las etapas de la desnaturalización, la hibridación y la extensión se repiten durante aproximadamente 34 ciclos.

30 En una realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento en el que dicho ADNc se aísla de plantas de semillero de arroz cv IR64, que comprende las etapas de:

- a) aislar el ARN total del tejido foliar estresado de las plantas de semillero IR64;
 b) aislar el ARNm del ARN total empleando las perlas paramagnéticas de estreptavidina y el cebador oligo d(T)₂₀ marcado con biotina;
 35 c) sintetizar la primera cadena de ADNc a partir de ARNm empleando el kit de síntesis de primera cadena de ADNc disponible convencionalmente.

En una realización preferida, el gen de histidina quinasa de tipo híbrido, como se aisló mediante el procedimiento de la presente invención, se caracteriza porque dicho gen - OsHK3b es como se proporciona en la figura 2A.

40 En una realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento de clonación del gen de histidina quinasa de tipo híbrido - OsHk3b, como se aisló mediante el procedimiento de la presente invención en un vector de expresión de levaduras, a saber, pYES2, que comprende las etapas de:

- a) amplificación del gen - *OsHk3b* del plásmido pTOPO-OsHK3b mediante el tratamiento del plásmido pTOPO-OsHK3b con el cebador directo OsHk3bSpeI/F y el cebador inverso OsHk3bSpeI/R empleando la reacción en cadena de la polimerasa [PCR];

45 en el que el fragmento amplificado del gen OsHk3b que contiene el marco de lectura abierto completo [ORF] del gen junto con el sitio *SpeI* adicional - OsHk3b se clona en el sitio *XbaI* de pYES2.

50 En una realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento, en el que en el procedimiento de clonación del gen de histidina quinasa de tipo híbrido - OsHk3b, como se aisló mediante el procedimiento de la presente invención en un vector de expresión de levaduras, a saber, pYES2, los cebadores empleados son los mismos que los empleados en el procedimiento de aislamiento de dicho gen de la presente invención, pero los cebadores para clonar el gen aislado contienen un sitio *SpeI* adicional que es capaz de facilitar la clonación del gen OsHk3b en pYES2.

55 En una realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento, en el que en el procedimiento de clonación del gen de histidina quinasa de tipo híbrido - OsHk3b, como se aisló mediante el procedimiento de la presente invención en un vector de expresión de levaduras, a saber, pYES2, dicha reacción en cadena de la polimerasa [PCR] para amplificar el gen -OsHk3b del plásmido pTOPO-OsHK3b comprende las etapas de:

- i) preparación de la mezcla de reacción del plásmido pTOPO-OsHK3b y el cebador directo OsHk3b*Spe*/F y el cebador inverso OsHk3b*Spe*/R;
- ii) desnaturalización inicial de la mezcla de reacción de la etapa - i) a aproximadamente 94 °C, preferentemente durante aproximadamente 5 minutos;
- 5 iii) desnaturalización de la mezcla de reacción de la etapa - ii) a aproximadamente 94 °C, preferentemente durante aproximadamente 1 minuto;
- iv) hibridación de la mezcla de reacción de la etapa - iii) a aproximadamente 55 °C, preferentemente durante aproximadamente 1 minuto;
- 10 v) extensión de la mezcla de reacción de la etapa - iv) a aproximadamente 72 °C, preferentemente durante aproximadamente 3 minutos; y
- vi) extensión final de la mezcla de reacción de la etapa - v) a aproximadamente 72 °C, preferentemente durante aproximadamente 7 minutos,

en el que las etapas de la desnaturalización, la hibridación y la extensión se repiten durante aproximadamente 34 ciclos.

15 En una realización preferida, la presente invención se refiere a un clon del gen de histidina quinasa de tipo híbrido - OsHk3b como se aisló mediante el procedimiento de la presente invención en un vector de expresión de levaduras, a saber, pYES2, que se identifica como pYES2-OsHk3b.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento de clonación del gen de histidina quinasa de tipo híbrido - OsHk3b como se aisló mediante el procedimiento de la presente invención en un vector de expresión de plantas, a saber, pCAMBIA1304, que comprende las etapas de:

- 20 a) amplificación del gen - *OsHk3b* del plásmido pTOPO-OsHK3b mediante el tratamiento del plásmido pTOPO-OsHK3b con el cebador directo OsHk3b*Spe*/F y el cebador inverso OsHk3b*Spe*/R empleando la reacción en cadena de la polimerasa [PCR];

25 en el que el fragmento amplificado del gen OsHk3b que contiene el marco de lectura abierto completo [ORF] del gen junto con el sitio *Spe*I adicional - OsHk3b se clona en el sitio *Spe*I de pCAMBIA1304.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento, en el que en el procedimiento de clonación de OsHk3b en el vector de expresión de levaduras, los cebadores empleados son los mismos que los empleados en el procedimiento de aislamiento de dicho gen según la presente invención, pero los cebadores para clonar el gen aislado contienen un sitio *Spe*I adicional que es capaz de facilitar la clonación del gen OsHk3b en pCAMBIA1304.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento, en el que en el procedimiento de clonación de OsHk3b en el vector de expresión de levaduras, dicha reacción en cadena de la polimerasa [PCR] para amplificar el gen - OsHk3b del plásmido pTOPO-OsHK3b comprende las etapas de:

- 35 i) preparación de la mezcla de reacción del plásmido pTOPO-OsHK3b y el cebador directo OsHk3b*Spe*/F y el cebador inverso OsHk3b*Spe*/R;
- ii) desnaturalización inicial de la mezcla de reacción de la etapa - i) a aproximadamente 94 °C, preferentemente durante aproximadamente 5 minutos;
- iii) desnaturalización de la mezcla de reacción de la etapa - ii) a aproximadamente 94 °C, preferentemente durante aproximadamente 1 minuto;
- 40 iv) hibridación de la mezcla de reacción de la etapa - iii) a aproximadamente 55 °C, preferentemente durante aproximadamente 1 minuto;
- v) extensión de la mezcla de reacción de la etapa - iv) a aproximadamente 72 °C, preferentemente durante aproximadamente 3 minutos; y
- 45 vi) extensión final de la mezcla de reacción de la etapa - v) a aproximadamente 72 °C, preferentemente durante aproximadamente 7 minutos,

en el que las etapas de la desnaturalización, la hibridación y la extensión se repiten durante aproximadamente 34 ciclos.

50 En una realización preferida, la presente invención se refiere a un clon del gen de histidina quinasa de tipo híbrido - OsHk3b como se aisló mediante el procedimiento de la presente invención en un vector de expresión de arroz, a saber, pCAMBIA1304, que se identifica como pCAMBIA1304-OsHk3b.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento para mejorar la tolerancia al estrés por salinidad y sequía de plantas de cultivo, que comprende coinfectar callos de arroz cultivados a partir de semillas de IR64 con un medio que contiene la cepa LBA4404 de *Agrobacterium* y el gen clonado y permitir que los callos coinfectados se regeneren en plantas IR64 transgénicas completas que tienen tolerancia mejorada al estrés por salinidad y por sequía, en el que el gen clonado es pCAMBIA1304-OsHk3b.

En una realización preferida, el procedimiento de la presente invención para mejorar la tolerancia al estrés por

salinidad y por sequía de las plantas de cultivo comprende además las etapas de:

- a) coinfectar callos de arroz cultivados a partir de semillas de IR64 con dicho medio que contiene dicho gen clonado;
- 5 b) cocultivar los callos de arroz coinfectados de la etapa - a);
- c) lavar el medio sobrecultivado de callos de arroz cocultivado de la etapa - b) con antibiótico;
- d) transferir el callo lavado de la etapa - c) a una placa de selección para el crecimiento de callos transformados;
- e) tratar los callos transformados de la etapa - d) con medios de regeneración;
- 10 f) repetir la etapa del tratamiento de los callos transformados de la etapa - e) con medios de regeneración frescos hasta que forme una planta completamente regenerada;
- g) endurecer la planta completamente regenerada de la etapa - f) en un tubo de cultivo;
- h) transferir la planta endurecida de la etapa - g) a una maceta para su desarrollo en una planta transgénica IR64 completa.

15 En una realización preferida, en el procedimiento para mejorar la tolerancia al estrés por salinidad y por sequía de las plantas de cultivo de la presente invención, la etapa - b) de cocultivo se lleva a cabo manteniendo los callos de arroz coinfectados de la etapa a) en oscuridad durante aproximadamente 48 horas.

En una realización preferida, en el procedimiento para mejorar la tolerancia al estrés por salinidad y por sequía de las plantas de cultivo de la presente invención, el tubo de cultivo en la etapa - g) contiene plantas de arroz de regeneración en medios de regeneración.

20 En una realización preferida, en el procedimiento para mejorar la tolerancia al estrés por salinidad y por sequía de las plantas de cultivo de la presente invención, el antibiótico es cefotaxima.

En una realización preferida, en el procedimiento para mejorar la tolerancia al estrés por salinidad y por sequía de las plantas de cultivo de la presente invención, los medios de regeneración comprenden medios de Murashige y Skoog.

25 En una realización preferida, la presente invención se refiere a una planta de cultivo que tiene tolerancia mejorada al estrés por salinidad y por sequía producida por el procedimiento de la presente invención, en la que la planta transgénica tiene sobreexpresión del gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz indica IR64, caracterizada porque dicho gen de histidina quinasa de tipo híbrido - OsHK3b tiene la secuencia como se proporciona en la Figura 2A.

30 En una realización preferida, la presente invención se refiere a una planta de segunda generación producida a partir de semillas de plantas transgénicas de primera generación, en la que dicha planta transgénica de primera generación se cultiva empleando clones de gen de histidina quinasa de tipo híbrido - OsHk3b como se aisló mediante el procedimiento de la presente invención, en la que posteriormente las plantas transgénicas cultivadas [de segunda generación] tienen mejor tolerancia al estrés por salinidad y sequía.

35 En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso del gen de histidina quinasa de tipo híbrido OsHk3b, como se aisló mediante el procedimiento de la presente invención, para mejorar la tolerancia a estrés por salinidad y sequía de las plantas de cultivo empleando el procedimiento de la presente invención. Ahora se entiende que la técnica anterior no desvela ni enseña que el gen de histidina quinasa de tipo híbrido con capacidad de ser osmosensible e inducible por múltiples tensiones y la capacidad de mejorar la tolerancia al estrés múltiple de plantas de cultivo, particularmente de plantas transgénicas, puede aislarse a partir del arroz indica IR64.

40 Además, la técnica anterior no desvela ni enseña que el gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado a partir del arroz indica IR64 puede clonarse, al menos, con vector de expresión de levaduras y vector de expresión de plantas.

Además, la técnica anterior no desvela ni enseña que las plantas de cultivo pueden mejorarse para su tolerancia al estrés múltiple empleando tal gen aislado para hacer que las plantas sean capaces de hacer frente a más de una condición de estrés abiótico ambiental para resolver problemas de baja tolerancia al estrés de plantas de cultivo.

45 Con el fin de aislar el gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz indica IR64, los inventores han descubierto sorprendentemente que si el ADNc aislado de la plántula IR64 se trata mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebador directo OsHk3bF y cebador inverso OsHk3bR, en la que la etapa de hibridación se lleva a cabo a aproximadamente 55 °C, entonces se aísla el gen de histidina quinasa de tipo híbrido y se ha descubierto sorprendentemente que el gen aislado tiene capacidad de ser osmosensible e inducible por múltiples tensiones y la capacidad de mejorar la tolerancia múltiple de plantas de cultivo, particularmente de plantas transgénicas.

50 Con el fin de clonar el gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz indica IR64, al menos, con vector de expresión de levaduras, los inventores han descubierto sorprendentemente que ese gen aislado, al amplificarse por tratamiento con cebador directo OsHk3bSpe/F y cebador inverso OsHk3bSpe/R empleando la reacción en cadena de polimerasa (PCR), el gen de la presente invención se clona en el vector de expresión de levaduras y también en el vector de expresión de plantas.

Con el fin de mejorar la tolerancia al estrés múltiple de las plantas de cultivo, los inventores han descubierto sorprendentemente que cuando los callos cultivados a partir de semillas de IR64 están coinfectados con un medio que contiene el gen clonado, el IR64 se transforma y crece hasta convertirse en una planta transgénica IR64 completa que tiene sobreexpresión del gen de la presente invención y se ha descubierto, sorprendentemente, que tales plantas transgénicas cultivadas tienen una tolerancia al estrés múltiple mejorada frente a más de un estrés ambiental, lo que significa, por lo tanto, que se ha descubierto que tales plantas cultivadas son capaces de sobrevivir mejor en condiciones de estrés abiótico.

También se ha descubierto que las semillas de plantas transgénicas cultivadas mediante el empleo de clones del gen de la presente invención también tienen una tolerancia al estrés múltiple mejorada durante la germinación de la semilla, y tanto la raíz como el brote, de forma sorprendente, no muestran crecimiento reducido, y se ha descubierto que las plantas cultivadas a partir de ellas también han mejorado la tolerancia al estrés múltiple en comparación con la germinación de semillas de plantas de cultivo normales y plantas cultivadas a partir de las mismas. Por lo tanto, los problemas de la escasa tolerancia al estrés de las plantas de cultivo se han resuelto mediante la presente invención.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un procedimiento de aislamiento del gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz indica IR64, que comprende el tratamiento de ADNc aislado de plantas de semillero IR64 con cebador directo OsHk3bF y cebador inverso OsHk3bR mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en el que la etapa de hibridación se lleva a cabo a aproximadamente 55 °C y en el que el gen de histidina quinasa de tipo híbrido -OsHK3b se aísla de su plásmido pTOPO-OSHK3b.

De acuerdo con la presente invención, el cebador directo OsHk3bF se identifica como 5'ATGACGTTTCGCGAGGTACGC3' y el cebador inverso OsHk3bR se identifica como 5'CTATTCAACTTGGTCATGATTTTG3' (Figura 1A).

De acuerdo con la presente invención, los cebadores fueron sintetizados mediante:

- a) alineación de la secuencia de aminoácidos (proteína) del SLN1 (osmosensor) de levaduras con secuencias de aminoácidos (proteína) de 14 miembros de la familia histidina quinasa [HK] en arroz (*Oryza sativa japonica*), en la que un miembro de la familia HK - OsHk3b en arroz (*Oryza sativa japonica*) entre los 14 miembros de la familia, se ha descubierto que estaba más cerca del SLN1 (osmosensor) de la levadura;
- b) basándose en las secuencias de aminoácidos de OsHk3b de arroz (*Oryza sativa japonica*), se toma su secuencia de nucleótidos correspondiente;
- c) análisis de su ORF utilizando un software disponible comercialmente;
- d) diseño del cebador directo OsHk3bF identificado como 5'ATGACGTTTCGCGAGGTACGC3' y el cebador inverso OsHk3bR identificado como 5'CTATTCAACTTGGTCATGATTTTG3' del ORF de OsHk3b usando el software de diseño de cebadores disponible comercialmente;
- e) identificación de secuencias de nucleótidos del cebador directo y el cebador inverso; y
- f) preparación del cebador directo OsHk3bF identificado como 5'ATGACGTTTCGCGAGGTACGC3' y el cebador inverso OsHk3bR identificado como 5'CTATTCAACTTGGTCATGATTTTG3'.

De acuerdo con una de las realizaciones preferidas de la presente invención, el análisis del ORF se llevó a cabo mediante el uso de software en línea disponible comercialmente (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/).

De acuerdo con una de las realizaciones preferidas de la presente invención, el diseño del cebador directo OsHk3bF identificado como 5'ATGACGTTTCGCGAGGTACGC3' y el cebador inverso OsHk3bR identificado como 5'CTATTCAACTTGGTCATGATTTTG3' del ORF de OsHk3b se llevó a cabo usando el software de diseño de cebadores en línea disponible comercialmente (www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/).

De acuerdo con la presente invención, el ADNc se aisló de las plantas de semillero de arroz IR64, particularmente de las plantas de semillero de arroz cv IR64, que comprende las siguientes etapas:

- a) aislar el ARN total del tejido foliar estresado por salinidad de las plantas de semillero IR64;
- b) aislar el ARNm del ARN total empleando las perlas paramagnéticas de estreptavidina y el cebador oligo d(T)₂₀ marcado con biotina;
- c) sintetizar la primera cadena de ADNc a partir de ARNm empleando el kit de síntesis de primera cadena de ADNc disponible convencionalmente.

De acuerdo con la presente invención, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) comprende las etapas de:

- i) preparación de la mezcla de reacción de ADNc y el cebador directo OsHk3bF identificado como 5'ATGACGTTTCGCGAGGTACGC3' y el cebador inverso OsHk3bR identificado como 5'CTATTCAACTTGGTCATGATTTTG3';
- ii) desnaturalización inicial de la mezcla de reacción de la etapa - i) a aproximadamente 94 °C, preferentemente durante aproximadamente 5 minutos;
- iii) desnaturalización de la mezcla de reacción de la etapa - ii) durante aproximadamente 34 ciclos a aproximadamente 94 °C preferentemente durante aproximadamente 1 minuto;

- iv) hibridación de la mezcla de reacción de la etapa - iii) a aproximadamente 55 °C, preferentemente durante aproximadamente 1 minuto;
- v) extensión de la mezcla de reacción de la etapa - iv) a aproximadamente 72 °C, preferentemente durante aproximadamente 3 minutos; y
- vi) extensión final de la mezcla de reacción de la etapa - v) a aproximadamente 72 °C, preferentemente durante aproximadamente 7 minutos.

De acuerdo con la presente invención, el procedimiento de aislamiento del gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz indica IR64, comprende adicionalmente las siguientes etapas:

- 1) preparar el plásmido recombinante pTOPO-OsHK3b clonando el fragmento amplificado del gen en el vector TOPO-TA2.1;
- 2) aislar el gen - OsHK3b del plásmido recombinante pTOPO - OsHK3b usando cebadores convencionales directos e inversos M13;

en el que el aislamiento del gen - OsHK3b se confirma [identifica] por el tamaño del ADN que es aproximadamente 2,6 Kb, más precisamente aproximadamente 2598 pb.

De acuerdo con la presente invención, después de realizar la reacción en cadena de la polimerasa [PCR] con el cebador seleccionado, se fabrican muchas copias de ADN diana, que no se ven en la solución, pero cuando se ligan al vector de clonación TOPO-TA que estabiliza el ADN diana, pueden verse las colonias transformadas, sin embargo, el producto amplificado puede visualizarse mediante electroforesis en agarosa acoplada a tinción con bromuro de etidio. El TOPO-TA solamente se usa para la estabilización de productos amplificados que también facilitan la secuenciación. El gen formado significa un supuesto aislamiento. Después de la formación como en la Figura 1C, se confirma el aislamiento por secuenciación, la banda en el gel de agarosa confirma que se ha aislado.

La presente invención describe el gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz indica IR64 y se ha descubierto que el gen aislado es capaz de actuar como osmosensor y que tiene capacidad de ser osmosensible e inducible por múltiples tensiones y capacidad de mejorar la tolerancia al estrés múltiple de plantas de cultivo, particularmente de plantas transgénicas para hacer que las plantas sean capaces de hacer frente a más de una condición de estrés abiótico ambiental, y por lo tanto, de incrementar su valor económico mientras mantienen su rendimiento potencial.

La presente invención describe un listado de secuencias del gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz indica IR64, en el que el gen se secuencía después de la formación del plásmido recombinante pTOPO-OsHK3b y en el que la secuencia génica completa del marco de lectura abierto [ORF] del gen - OsHK3b es de 2598 pb y es, como se proporciona en la Figura 2A adjunta, una referencia que se extrae aquí y en el que el gen - OsHK3b de la presente invención se ha presentado al Centro Nacional de Recursos Biológicos (NCBI) - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/198387187> con el número de referencia de GenBank Bankit 1121378 FJ004641 el 7 de agosto de 2008. Se adjunta la copia del reconocimiento del Centro Nacional de Recursos Biológicos (NCBI).

La presente invención describe un gen de histidina quinasa de tipo híbrido, la secuencia génica completa del marco de lectura abierto [ORF] del mismo - OsHk3b es de 2598 pb y como se proporciona en la Figura 2A.

De acuerdo con una realización de la presente invención, el gen de histidina quinasa de tipo híbrido - OsHK3b es identificable por el número de referencia de GenBank Bankit 1121378 FJ004641 del Centro Nacional de Recursos Biológicos (NCBI).

La presente invención describe un procedimiento de clonación del gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz indica IR64 en el vector de expresión de levaduras, a saber, pYES2, que comprende las etapas de:

- a) amplificación del gen - *OsHk3b* del plásmido pTOPO-OsHK3b mediante el tratamiento del plásmido pTOPO-OsHK3b con el cebador directo *OsHk3bSpeI/F* y el cebador inverso *OsHk3bSpeI/R* empleando la reacción en cadena de la polimerasa [PCR];

en el que el fragmento amplificado del gen *OsHk3b* que contiene el marco de lectura abierto completo [ORF] del gen junto con el sitio *SpeI* adicional - *OsHk3b* se clona en el sitio *XbaI* de pYES2.

De acuerdo con la presente invención, los cebadores empleados para clonar el gen aislado son los mismos que los empleados para aislar el gen, pero los cebadores para clonar el gen aislado contienen un sitio *SpeI* adicional que facilita la clonación del gen *OsHk3b* en pYES2.

De acuerdo con la realización preferida de la presente invención, después de la reacción en cadena de la polimerasa [PCR] de *OsHk3b* con el cebador directo *OsHk3bSpeI/F* y el cebador inverso *OsHk3bSpeI/R*, se agrega pYES2.

De acuerdo con la presente invención, la reacción en cadena de la polimerasa [PCR] para amplificar el gen -*OsHk3b* del plásmido pTOPO-OsHK3b comprende las etapas de:

- i) preparación de la mezcla de reacción del plásmido pTOPO-OsHK3b y el cebador directo *OsHk3bSpeI/F* y el

cebador inverso *OsHk3bSpe/R*;

ii) desnaturalización inicial de la mezcla de reacción de la etapa - i) a aproximadamente 94 °C, preferentemente durante aproximadamente 5 minutos;

5 iii) desnaturalización de la mezcla de reacción de la etapa - ii) durante aproximadamente 34 ciclos a aproximadamente 94 °C preferentemente durante aproximadamente 1 minuto;

iv) hibridación de la mezcla de reacción de la etapa - iii) a aproximadamente 55 °C, preferentemente durante aproximadamente 1 minuto;

v) extensión de la mezcla de reacción de la etapa - iv) a aproximadamente 72 °C, preferentemente durante aproximadamente 3 minutos; y

10 vi) extensión final de la mezcla de reacción de la etapa - v) a aproximadamente 72 °C, preferentemente durante aproximadamente 7 minutos

De acuerdo con la realización preferida de la presente invención, después de la reacción en cadena de la polimerasa [PCR] de *OsHk3b* con el cebador directo *OsHk3bSpe/F* y el cebador inverso *OsHk3bSpe/R*, se agrega pYES2.

15 La presente invención desvela un procedimiento de clonación del gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz indica IR64 en el vector de expresión de levaduras, a saber, pYES2, que se identifica como pYES2-*OsHk3b*.

La presente invención desvela un procedimiento de clonación del gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz indica IR64 en vector de expresión de plantas, preferentemente en el vector de arroz, a saber, pCAMBIA1304, que comprende las etapas de:

20 a) amplificación el gen - *OsHk3b* del plásmido pTOPO-*OsHK3b* tratando el plásmido pTOPO-*OsHK3b* con el cebador directo *OsHk3bSpe/F* y el cebador inverso *OsHk3bSpe/R* empleando la reacción en cadena de la polimerasa [PCR];

en el que el fragmento amplificado del gen *OsHk3b* que contiene el marco de lectura abierto completo [ORF] del gen junto con el sitio *SpeI* adicional - *OsHk3b* se clona en el sitio *SpeI* de pCAMBIA1304.

25 De acuerdo con la presente invención, los cebadores empleados para clonar el gen aislado son los mismos que los empleados para aislar el gen, pero los cebadores para clonar el gen aislado contienen un sitio *SpeI* adicional que facilita la clonación del gen *OsHk3b* en pCAMBIA1304.

De acuerdo con la realización preferida de la presente invención, después de la reacción en cadena de la polimerasa [PCR] de *OsHk3b* con el cebador directo *OsHk3bSpe/F* y el cebador inverso *OsHk3bSpe/R*, se agrega pCAMBIA1304.

30 De acuerdo con la presente invención, la reacción en cadena de la polimerasa [PCR] para amplificar el gen -*OsHk3b* del plásmido pTOPO-*OsHK3b* comprende las etapas de:

i) preparación de la mezcla de reacción del plásmido pTOPO-*OsHK3b* y el cebador directo *OsHk3bSpe/F* y el cebador inverso *OsHk3bSpe/R*;

35 ii) desnaturalización inicial de la mezcla de reacción de la etapa - i) a aproximadamente 94 °C, preferentemente durante aproximadamente 5 minutos;

iii) desnaturalización de la mezcla de reacción de la etapa - ii) durante aproximadamente 34 ciclos a aproximadamente 94 °C preferentemente durante aproximadamente 1 minuto;

iv) hibridación de la mezcla de reacción de la etapa - iii) a aproximadamente 55 °C, preferentemente durante aproximadamente 1 minuto;

40 v) extensión de la mezcla de reacción de la etapa - iv) a aproximadamente 72 °C, preferentemente durante aproximadamente 3 minutos; y

vi) extensión final de la mezcla de reacción de la etapa - v) a aproximadamente 72 °C, preferentemente durante aproximadamente 7 minutos

45 De acuerdo con la realización preferida de la presente invención, después de la reacción en cadena de la polimerasa [PCR] de *OsHk3b* con el cebador directo *OsHk3bSpe/F* y el cebador inverso *OsHk3bSpe/R*, se agrega pCAMBIA1304.

La presente invención desvela un clon del gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz indica IR64 en el vector de expresión de arroz, a saber, pCAMBIA1304, que se identifica como pCAMBIA1304-*OsHk3b*.

50 La presente invención desvela un procedimiento para mejorar la tolerancia al estrés múltiple de plantas de cultivo, que comprende coinfectar callos de arroz cultivados a partir de semillas de IR64 con un medio que contiene un gen clonado y que permite que los callos coinfectados se transformen en una planta IR64 transgénica completa, en el que el medio es la cepa LBA4404 de *Agrobacterium* y el gen clonado es pCAMBIA1304-*OsHk3b*.

De acuerdo con la presente invención, un procedimiento para mejorar la tolerancia al estrés múltiple de las plantas de cultivo, comprende las etapas de:

- 5 a) coinfectar callos de arroz cultivados a partir de semillas de IR64 con un medio que contiene el gen clonado;
 b) cocultivar los callos de arroz coinfectados de la etapa - a);
 c) lavar el medio sobrecultivado de callos de arroz cocultivado de la etapa - b) con antibiótico;
 d) transferir el callo lavado de la etapa - c) a una placa de selección para el crecimiento de callos transformados;
 e) tratar los callos transformados de la etapa - d) con medios de regeneración;
 f) repetir la etapa del tratamiento de los callos transformados de la etapa - e) con medios de regeneración frescos hasta que forme una planta completamente regenerada;
 g) endurecer la planta completamente regenerada de la etapa - f) en un tubo de cultivo;
 10 h) transferir la planta endurecida de la etapa - g) a una maceta para su desarrollo en una planta transgénica IR64 completa;

en el que el medio es la cepa LBA4404 de *Agrobacterium* y el gen clonado es pCAMBIA1304-OsHk3b.

De acuerdo con la presente invención, la etapa - b) de cocultivo se lleva a cabo manteniendo los callos de arroz coinfectados de la etapa a) en oscuridad durante aproximadamente 48 horas.

- 15 De acuerdo con la presente invención, el tubo de cultivo en la etapa - g) contiene plantas regeneradoras de arroz en medios de regeneración.

De acuerdo con la presente invención, el antibiótico es cefotaxima y los medios de regeneración comprenden medios disponibles comercialmente de Murashige y Skoog (Sigma, India).

- 20 La presente invención describe plantas de cultivo que tienen tolerancia mejorada a estrés múltiple, tal como se produce empleando el clon del gen aislado de arroz indica IR64 de la presente invención, en el que se ha descubierto que las plantas transgénicas sobreexpresan el gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado del arroz indica IR64 y mejoran la tolerancia al estrés múltiple contra más de un estrés ambiental, lo que significa que las plantas transgénicas producidas de acuerdo con la presente invención han demostrado ser capaces de sobrevivir mejor en condiciones de estrés abiótico, y por lo tanto, superar los problemas de escasa tolerancia al estrés.

- 25 La presente invención describe plantas de segunda generación producidas a partir de semillas de plantas transgénicas de primera generación que se cultivaron empleando clones del gen de la presente invención, en las que también se ha descubierto que las plantas transgénicas cultivadas posteriormente [de segunda generación] tienen una tolerancia al estrés múltiple mejorada e incluso durante la germinación de la semilla de la primera generación de plantas transgénicas, se descubrió que la raíz y el brote, de forma sorprendente, demostraron un mejor crecimiento, al menos, no se observó que demostraran un crecimiento reducido. Al contrario, cuando se cultiva una planta a partir de plantas de semillero que no estaban infectadas con clones del gen de la presente invención, se encontró que tenían escasa tolerancia al estrés ambiental y durante la germinación adicional de semillas de estas plantas normales [control], se encontró que el crecimiento de la raíz y el brote era lento.

- 30 La presente invención describe el uso del gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz indica IR64, para mejorar la tolerancia al estrés múltiple de las plantas de cultivo.

- 35 La presente invención se describe ahora con referencia a las figuras adjuntas.

De acuerdo con la realización más preferida de la presente invención, comprende las siguientes etapas:

A] Aislamiento de un Gen de Histidina Quinasa de tipo Híbrido a partir de Arroz Índica IR64:

- 40 De acuerdo con la realización más preferida de la invención, el gen de longitud completa, es decir, un tramo de ADN que codifica una proteína de OsHK3b se aísla del arroz cv IR64 empleando esencialmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que se lleva a cabo empleando esencialmente el cebador directo OsHK3bF identificado como 5'ATGACGTTTCGCGAGGTACGC3' y el cebador inverso OsHK3bR identificado como 5'CTATTCAACTTGGTCATGATTTTG3' (Figura 1A), que han sido seleccionados de manera crítica. Se ha observado sorprendentemente que si se intenta aislar el gen deseado del arroz IR 64 empleando cualquier otro cebador, el gen deseado no se aísla.

- 45 De acuerdo con la presente invención, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se lleva a cabo en las condiciones que se ilustran en la Figura 1B que también se han seleccionado de manera crítica. Sorprendentemente, se ha observado que si se intenta llevar a cabo la reacción de PCR en condiciones diferentes a las condiciones ilustradas en la Figura 1B adjunta, el gen deseado no se aísla.

- 50 De acuerdo con la presente invención, las condiciones de PCR [Figura 1B] son - la desnaturalización inicial se lleva a cabo a aproximadamente 94 °C durante aproximadamente 5 minutos, seguida de aproximadamente 34 ciclos de desnaturalización llevados a cabo a aproximadamente 94 °C durante aproximadamente 1 minuto, la hibridación a aproximadamente 55 °C durante aproximadamente 1 minuto, la extensión a aproximadamente 72 °C durante aproximadamente 3 minutos y la extensión final a aproximadamente 72 °C durante aproximadamente 7 minutos empleando los cebadores OsHK3bF y OsHK3bR [Figura 1B].

De acuerdo con la presente invención, el ARN total se aisló del tejido foliar estresado por salinidad de las plantas de semillero IR64. Seguido por el aislamiento del ARNm del ARN total empleando las perlas paramagnéticas de estreptavidina y el cebador oligo d(T)₂₀ marcado con biotina. La primera cadena de ADNc se sintetiza a partir de ARNm empleando el kit de síntesis de primera cadena de ADNc. La reacción en cadena de la polimerasa [PCR] se lleva a cabo como se describe en el presente documento. El fragmento amplificado se clona en el vector TOPO-TA2.1 para obtener el plásmido recombinante pTOPO-OsHK3b. La Figura 1C adjunta ilustra un producto amplificado por PCR del plásmido pTOPO-OsHK3b usando cebadores convencionales M13 directo e inverso. El tamaño de este ADN como se ve en el gel (Figura 1C) es de aproximadamente 2,6 Kb, más precisamente aproximadamente 2598 pb de OsHk3b, que confirma que el gen - OsHk3b se ha aislado.

10 **B] Secuenciación de un Gen de Histidina Quinasa de tipo Híbrido a partir de Arroz Índica IR64:**

De acuerdo con la presente invención, en una realización, el gen aislado del arroz índica IR 64 se secuenció después de la formación del plásmido recombinante pTOPO-OsHK3b. La secuencia de ADN obtenida después de la secuenciación se ilustra en la Figura 2A adjunta, que ilustra la secuencia génica completa del ORF de OsHk3b que es de 2598 pb y se ha presentado al Centro Nacional de Recursos Biológicos (NCBI) con el número de referencia de GenBank Bankit 1121378 FJ004641 el 7 de agosto de 2008. Se adjunta la copia del reconocimiento del Centro Nacional de Recursos Biológicos (NCBI).

De acuerdo con la presente invención, la secuencia de ADN tal como se obtiene se analiza utilizando la búsqueda BLAST, que, sorprendentemente, se ha descubierto que es homóloga al gen conocido clasificado como el gen de histidina quinasa de tipo híbrido de otros organismos con variaciones menores que pertenecen solamente al arroz IR64. Además, se ha confirmado que el ADNc aislado tiene aproximadamente 2598 pb de longitud de ORF que es capaz de codificar un polipéptido de aproximadamente 865 restos de aminoácidos (Figura 2B). Se ha observado que la masa molecular prevista del polipéptido deducido es de aproximadamente 95,90 kDa. La proteína prevista contiene tanto un dominio transmisor como un dominio receptor. Estas son características de una histidina quinasa de tipo híbrido. También mostró un resto de histidina conservado en la posición 291 como se ilustra en la Figura 2B adjunta, mediante subrayado en la línea 6 desde arriba en el dominio transmisor y un resto de aspartato conservado en la posición 772 como se ilustra en la Figura 2B adjunta, mediante subrayado en la segunda línea desde abajo en el dominio receptor. La Figura 2B adjunta ilustra la secuencia de aminoácidos deducida completa para la proteína codificada por el ORF de OsHk3b que es de aproximadamente 95,9 kDa, en la que el dominio transmisor tiene un resto de Histidina conservado en la posición 291 (H, subrayado en la misma). El dominio receptor tiene un resto de aspartato conservado en la posición 771 (D, subrayado en la misma).

Por consiguiente, la presente invención proporciona un gen del arroz índica cv IR64 que posee todos los rasgos característicos del gen de histidina quinasa de tipo híbrido. La secuencia de ADN del gen OsHk3b aislado también se presentó en el Centro Nacional de Recursos Biológicos (NCBI) con el número de referencia bankit1121378 el 7 de agosto de 2008. Se adjunta la copia del reconocimiento del Centro Nacional de Recursos Biológicos (NCBI).

35 **C] Clonación de un gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de Arroz Índica IR64:**

C1] Clonación en el vector de expresión de levaduras - pYES2:

De acuerdo con la presente invención, el gen - *OsHk3b* de la presente invención se clona en un vector de expresión de levaduras, a saber - pYES2 mediante amplificación del gen - *OsHk3b* de pTOPO-OsHK3b empleando cebadores OsHk3b*SpeI*F y OsHk3b*SpeI*R como se ilustra en la Figura 1A adjunta, empleando la reacción en cadena de la polimerasa [PCR] en las condiciones como se ilustra en la Figura 1B adjunta, en el que el fragmento amplificado que contiene el marco abierto de lectura completo [ORF] del gen - *OsHk3b* se clona en el sitio *XbaI* de pYES2 y la clonación en marco se confirma por digestión con restricción usando *SphI* [Figura 3A], en el que la digestión con restricción del plásmido pYES2-OsHK3b con *SphI* para confirmar la orientación de OsHK3b ORF; M: escalera de ADN de 1 kb; 1, 2, 3, 4 y 5 son plásmido pYES2-OsHK3b; 6: pYES2 y 7: plásmido no digerido pYES2-OsHK3b y la representación esquemática de pYES2-OsHK3b se ha mostrado en la parte superior de la figura.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un gen - *OsHk3b* que es capaz de ser clonado en el vector de expresión de levaduras pYES2-OsHK3b y produce el clon del gen - *OsHk3b* en el vector de expresión de levaduras pYES2-OsHK3b.

C2. Clonación en el vector de expresión de plantas - pCAMBIA1304

De acuerdo con la presente invención, el gen - *OsHk3b* de la presente invención se clona en un vector de expresión de plantas, a saber, - pCAMBIA1304 mediante amplificación del gen - *OsHk3b* de pTOPO-OsHK3b empleando cebadores OsHk3b*SpeI*F y OsHk3b*SpeI*R como se ilustra en la Figura 1A adjunta, empleando la reacción en cadena de la polimerasa [PCR] en las condiciones como se ilustra en la Figura 1B adjunta, en el que el fragmento amplificado que contiene el marco abierto de lectura completo del gen - *OsHk3b* se clona en el sitio *SpeI* de pCAMBIA1304 y la clonación en marco se confirma por digestión con restricción usando *SphI* [Figura 3B], en el que la digestión con restricción del plásmido pCAMBIA1304-OsHK3b con *SphI* para confirmar la orientación de OsHK3b ORF; M: escalera de ADN de 1 kb; 1, 2, 3 y 4: plásmido pCAMBIA1304-OsHK3b; 5: pCAMBIA1304 y 6: plásmido no digerido pCAMBIA1304-OsHK3b. La representación esquemática de pCAMBIA1304-OsHK3b se ha mostrado en la

parte superior de la figura.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un gen - OsHk3b que es capaz de ser clonado en el vector de expresión de levaduras pCAMBIA1304-OsHk3b y produce el clon del gen - OsHk3b en el vector de expresión de plantas pCAMBIA1304-OsHk3b.

5 **D] Caracterización funcional [Ventajas] de un gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz IR 64:**

D1] Para establecer que el gen proporcionado actualmente - OsHk3b es capaz de funcionar como un osmosensor, es decir, su ventaja en el rescate de la mutación osmosensible en levaduras, la cepa HS13 de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) con una mutación sensible a la temperatura en el gen SLN1 se emplea para experimentos de complementación (sln-Ts) de acuerdo con la realización preferida de la presente invención. Se observa que el mutante HS 13 crece bien a 28 °C (Figura 4A) pero no crece a 37 °C (Figura 4B) en los medios YPD (medios de levaduras, peptona y Dextrosa) así como en la sal que contiene YPD (NaCl 200 mM). De acuerdo con la presente invención, el mutante HS13 se transforma con (i) pYES2-OsHk3b, (ii) vector pYES2 (vector sin OsHk3b) y (iii) gen funcional sln1 (de levaduras) para producir una cepa HS 13 modificada que se prueba adicionalmente. Además, de acuerdo con la presente invención, el HS13 que lleva pYES2 (vector sin OsHk3b) funciona como control negativo (VC) mientras que el HS13 que lleva el gen funcional sln1 funciona como control positivo (SLN1). Cuando todas estas cepas se cultivan en estrías en medios YPD y se incuban a 28 °C o a 37 °C, se observa, sorprendentemente, que después de aproximadamente 72 h de incubación, el HS13 transformado con pYES2-OsHk3b y el HS13 que lleva el gen sln1 funcional pueden crecer incluso a 37 °C (Figura 4B), mientras que el HS13 solo o el HS13 que lleva pYES2 (VC) no son capaces de crecer a 37 °C, lo que confirma que se puede conseguir la complementación de sln1 mutante con OsHk3b, lo que indica la ventaja del gen - OsHk3b en el rescate de la mutación osmosensible en levadura.

Después de haber establecido la ventaja del gen OsHk3b como osmosensor que puede usarse para mejorar la tolerancia al estrés por salinidad, se intenta descubrir el modo de acción de este gen verificando el papel de los restos de Histidina y/o Aspartato conservados del gen OsHk3b, se lleva a cabo la mutagénesis dirigida al sitio del gen *OsHk3b* para mutar el resto de Histidina conservado del dominio transmisor en Valina (HK3H*, HS13 que porta histidina mutada OSHK3H291V) y se conserva el residuo de Aspartato en Glutamato (HK3D*, HS13 que porta aspartato mutado OSHK3D772E) en la proteína OsHk3b expresada. [La mutagénesis dirigida al sitio de pYES2-OsHk3b se lleva a cabo para mutar el resto de Histidina conservado del dominio transmisor en Valina usando el cebador directo, OSHK3bHisMUTF GGCTACTGTTTCAGTTGAGATCAGAAGCTC y el cebador inverso, OSHK3bHisMUTR AGTTCTGATCTCAACTGAAACAGTAGCC; mientras el resto de Aspartato conservado pasa a Glutamato usando el cebador, OSHK3bAspMUTF GATGCTTGTTCATGCTCATACAGATGCCAG y cebador inverso, OSHK3bAspMUTR -CTGGCATCTGTATGAGCATGAAACAAGCATC usando un kit de mutagénesis dirigida de cambio rápido].

El análisis anterior confirma que la mutación en la levadura HS13, transformada con estos restos conservados de OsHk3b mutado no podría complementar el alelo mutante sln1-Ts que contiene el huésped HS13 a 37 °C (Figura 4B), lo que confirma que OsHk3b es una histidina quinasa de tipo híbrido confirmada y la Histidina y Aspartato conservados están implicados en el proceso de fosforilación para el crecimiento de HS13 a 37 °C. Además, se descubre que la levadura transformada (OsHk3b) es capaz de tolerar el estrés por salinidad hasta NaCl 200 mM (YPD que contiene NaCl 200 mM), mientras que el vector transformado (VC) o las células HS13 no transformadas no podrían sobrevivir a 37 °C (Figura 4D). Este análisis establece claramente que la proteína que codifica el gen OsHk3b es capaz de actuar como un osmosensor y puede usarse para mejorar la tolerancia al estrés por salinidad.

D2] Para establecer que el gen proporcionado actualmente - OsHk3b es inducible por diferentes tensiones abióticas, se lleva a cabo un análisis de PCR en tiempo real (qRT-PCR) para cuantificar la expresión de su ARNm. Este análisis se lleva a cabo usando diversas muestras de ADNc preparadas a partir del ARNm de plantas de semillero IR64 que están sometidas a diversas tensiones abióticas, es decir, salinidad (S), sequía (D), ABA (Ácido abscísico), Calor (42 °C) y Frío (4 °C) durante aproximadamente 8 horas y aproximadamente 24 horas. Los resultados de la amplificación por PCR en tiempo real, como se ilustra en el histograma en la Figura 5, indican, sorprendentemente, la inducibilidad de este gen por la señal ambiental diferente en forma de tensiones abióticas. Además, también se pudo ver, sorprendentemente, la regulación diferencial de los transcritos de OsHk3b en salinidad, sequía, ABA, calor y frío. La acumulación de transcritos de OsHk3b aumenta con el tiempo desde aproximadamente 8 horas a aproximadamente 24 horas en todas las condiciones de estrés tales como por salinidad (Figura 5B, C), sequía (Figura 5D, E), ABA (Figura 5F, G), calor (Figura 5H, I) y frío (Figura 5J, K), indicando, de este modo, el papel de este gen en múltiples tensiones abióticas, y por lo tanto, su ventaja en mejorar la tolerancia de las plantas a diversas tensiones especialmente, alta temperatura, baja temperatura, salinidad así como sequía, etc.

55 **E] Mejora de la tolerancia al estrés múltiple de las plantas de cultivo - Uso del gen de la histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz IR 64 en la mejora de la tolerancia al estrés múltiple de las plantas de cultivo:**

Para establecer que el gen proporcionado actualmente - OsHk3b es capaz de mejorar la tolerancia al estrés, particularmente al estrés abiótico en plantas [arroz transgénico], la planta IR64 se transforma con el gen OsHk3b bajo el control del promotor constitutivo seleccionado de manera crítica utilizando pCAMBIA1304-OsHk3b, y para

tener una comparación, la planta IR 64 también se transforma con control vectorial (VC que no tiene gen OsHk3b).

De acuerdo con la presente invención, la transformación de IR64 se logra esterilizando la superficie de las semillas de IR-64 (Figura 6a) y transfiriéndolas en los medios de inducción de callos para la formación de callo, el callo crecido (Figura 6b) se subcultiva adicionalmente y se mantiene nuevamente en los medios de inducción de callos durante aproximadamente 5-7 días (Figura 6c), estos callos se coinfectan con la cepa LBA4404 de *Agrobacterium*, que contiene pCAMBIA1304-OsHk3b (Figura 6d), los callos de arroz coinfectados se mantienen adicionalmente para el cocultivo durante aproximadamente 2-3 días (Figura 6e), el *Agrobacterium* sobrecultivado (en callos de arroz) se lava con antibiótico - cefotaxima (Figura 6f), el callo lavado se transfiere a continuación a una placa de selección para el crecimiento de los callos transformados (Figura 6g), los callos transformados se mantienen adicionalmente en los medios de regeneración (Figura 6h) y se subcultivan en medios de regeneración frescos (Figura 6i), la planta completamente regenerada se transfiere a tubos de cultivo para el endurecimiento (Figura 6j), a continuación, la planta endurecida se transfiere adicionalmente a macetas de barro y se mantiene en un invernadero para desarrollar plantas transgénicas IR64 completas (Figura 6k).

Para establecer el posible papel del gen OsHk3b en la mejora de la tolerancia al estrés en el arroz, se realiza un análisis de ensayo de disco de hoja. En este análisis, los discos de hoja de las diversas plantas se cortan y se incuban en una solución que contiene alta salinidad (NaCl 200 mM), y también se desarrolla un control en el que en lugar de sal, se agrega agua normal. Después de aproximadamente 96 h de incubación, se realiza la comparación de los discos y se busca su viabilidad general (figura 7A), también se lleva a cabo la estimación de la clorofila para estas muestras y se presentan los resultados en la figura 7B. Este análisis indica que las plantas transgénicas IR64 (que sobreexpresan OsHk3b) muestran un blanqueo relativamente menor incluso en condiciones de control (sin estrés por salinidad) en T9 (figura 7A5 T29 (figura 7A7) en comparación con IR64 no transformadas, es decir, WT (Fig. 7A1) y VC (Fig. 7A3). De manera similar, también se observa más retención de clorofila en plantas transgénicas IR64 T9 (figura 7B6) y T23 (figura 7B8) que en sus homólogas no transgénicas, WT (figura 7B2) y VC (figura 7B4) bajo el estrés por salinidad que confirma que la sobreexpresión del gen OsHk3b en plantas de arroz transgénicas les permite sobrevivir mejor bajo estrés abiótico, especialmente la salinidad.

F] Confirmación de plantas de arroz transgénicas OsHk3b:

Para confirmar la integración del gen OsHk3b en el genoma de las líneas de sobreexpresión de IR64, la PCR tisular se realizó usando el cebador directo específico del gen -OsHk3b y el cebador inverso específico del vector (pCAMBIA1304). La amplificación muestra una banda de 1.4 kb de tamaño en el carril número 4, 7, 8, 9, 10, 11, 18, 19, 23, 32, indica la integración exitosa del transgén OsHk3b en el genoma de estas plantas transgénicas IR64 (Figura 8).

G] Las Líneas de Arroz Transgénico (T₁) muestran Tolerancia al Estrés por Salinidad durante la Germinación de la Semilla:

Las semillas de tipo salvaje IR64 (WT) y la sobreexpresión de OsHk3b se mantuvieron en la placa de petri que contenía algodón saturado con ½ Yoshida que contenía NaCl 200 mM (estrés por salinidad). Los inventores han descubierto sorprendentemente que la tasa de germinación de las semillas en NaCl 200 mM es mayor en el caso de las líneas de sobreexpresión de OsHk3b en comparación con las semillas de tipo silvestre (Fig. 2A). Cuando se midieron la longitud de la raíz y el brote de las plantas de semillero germinadas después de los cuatro días de crecimiento, los inventores descubrieron sorprendentemente que tanto la longitud de la raíz como la longitud del brote eran mayores en líneas de sobreexpresión, pero menores en las de tipo salvaje (Fig. 2B). Para determinar los iones K⁺ y Na⁺ disponibles en las plantas transgénicas, los inventores han estimado la cantidad de iones disponibles mediante fotómetro de llama y han descubierto que las plantas transgénicas que sobreexpresan conservan más proporción K⁺ y Na⁺ que las plantas salvajes (Fig. 2C). Este análisis indica que la sobreexpresión de OsHk3b en el arroz proporciona tolerancia al estrés por salinidad a las semillas en germinación.

H] Las plantas de semillero Transgénicas que Sobreexpresan OsHk3b están Mejor Adaptadas al Estrés por Salinidad en Comparación con TS:

Las plantas de semillero de arroz transgénico (T₁) se usaron adicionalmente para probar la tolerancia a la salinidad. Las plantas de semillero de siete días de edad se transfirieron a NaCl 200 mM que contenía la mitad del medio Yoshida, mientras que las plantas de semillero cultivadas en ½ medio Yoshida sin NaCl se usaron como control. Las fotografías se tomaron después de diez días de estrés. Los inventores descubrieron que las plantas que sobreexpresan OsHk3b eran sorprendentemente capaces de soportar más estrés por salinidad (figura 3B) y retener más clorofila (figura 3C) que las plantas de tipo salvaje en condiciones de estrés por salinidad. Incluso en condiciones sin estrés, se descubrió que el crecimiento de las plantas de sobreexpresión de OsHk3b era mayor que el de las líneas de tipo salvaje de OsHk3b (Fig. 3A). Este análisis indica que la sobreexpresión de OsHk3b en el arroz proporciona tolerancia al estrés por salinidad de las semillas.

Las leyendas detalladas de las figuras acompañantes:

Figura 1A: Secuencias de cebador utilizadas para el aislamiento del gen OsHk3b

Figura 1B: Condiciones para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Figura 1C: Electroforesis en gel de agarosa del producto de reacción en cadena de la polimerasa que muestra un producto de amplificación de tamaño 2,6 Kb (precisamente 2598 pb) de OsHk3b.

5 Figura 2A: La secuencia completa de genes del ORF de OsHk3b que es de 2598 pb (presentada a NCBI con el número de referencia de GenBank Bankit 1121378 FJ004641).

10 Figura 2B: La secuencia de aminoácidos deducida completa para la proteína codificada por ORF de OsHk3b que es de 95,9 kDa. El dominio transmisor tiene un resto de Histidina conservado en la posición 291 (H, se muestra en rojo). El dominio receptor tiene un resto de Aspartato conservado en la posición 771 (D, que se muestra en azul). Se ha presentado la secuencia a NCBI con el número de referencia de GenBank Bankit 1121378 FJ004641).

15 Figura 3A: Confirmación de la clonación de OsHk3b en el vector pYES2: Digestión por restricción del plásmido pYES2-OsHk3b con *SphI* para confirmar la orientación del ORF de OsHk3b; M: escalera de ADN de 1 kb; 1, 2, 3, 4 y 5 son plásmido pYES2-OsHk3b; 6: pYES2 y 7: plásmido no digerido pYES2-OsHk3b. La representación esquemática de pYES2-OsHk3b se ha mostrado en la parte superior de la figura.

20 Figura 3B: Confirmación de la clonación de OsHk3b en el vector pCAMBIA1304: Digestión por restricción del plásmido pCAMBIA1304-OsHk3b con *SphI* para confirmar la orientación del ORF de OsHk3b; M: escalera de ADN de 1 kb; 1, 2, 3 y 4: plásmido pCAMBIA1304-OsHk3b; 5: pCAMBIA1304 y 6: plásmido no digerido pCAMBIA1304-OsHk3b. La representación esquemática de pCAMBIA1304-OsHk3b se ha mostrado en la parte superior de la figura.

25 Figura 4: Complementación funcional de la levadura SLN1 sensible a la temperatura de un mutante osmosensible HS13 con el ORF de OsHk3b de arroz. Complementación de la mutación por expresión del ORF de *OSHK3B*; Sensibilidad de cepas de levaduras cultivadas a 28 °C, 37 °C durante tres días en medio YPD normal e YPD con NaCl 200 mM (medio salino).
Cepas usadas en este experimento:

30 WT, levadura Fc de tipo salvaje;
HS13, mutante de *sln1-ts*;
VC, HS13 que lleva solamente el vector (pYES2);
OSHK3a y OSHK3b, HS13 que porta pYES2-OsHk3b de expresión;
35 *SLN1*, HS13 que lleva el alelo *sln1* de expresión de tipo salvaje;
HK3H*, HS13 que porta histidina mutada pYES2-OsHk3b (OsHk3H291V) y HK3D*, HS 13 que porta aspartato mutado pYES2-OsHk3b (OsHk3D772E)
4A: Incubación de diferentes cepas de levaduras en medio YPD a 28 °C 4B: Incubación de diferentes cepas de levaduras en medio YPD a 28 °C
4C: Incubación de diferentes cepas de levaduras en medio de estrés por salinidad (YPD que contiene NaCl 200 mM) a 28 °C;
4D: Incubación de diferentes cepas de levaduras en medio de estrés por salinidad (YPD que contiene NaCl 200 mM) a 28 °C;
4E: Representación esquemática de diferentes cepas de levaduras usadas para sembrar en estrías en 4A, 4B, 4C y 4D.

40 Figura 5: El histograma que muestra la inducibilidad de OsHk3b por diversas tensiones abióticas en el arroz. El eje X tiene diferentes muestras; El eje Y muestra la expresión relativa del ARNm. El análisis qRT-PCR se llevó a cabo utilizando ADNc sintetizado a partir de ARNm de IR64 (IR) en S (NaCl 200 mM), D (deshidratación), ABA (Ácido abscísico 100 µM), Calor (42 °C) y Frío (4 °C) a las 8(h) y 24 (24 h) de estrés junto con muestras de C (control).

45 Figura 6: Transformación y regeneración de *Oryza sativa* cv IR64. a. Semillas de arroz IR-64; b. Formación de callos de arroz en medios de inducción de callos; c. callo de arroz subcultivado mantenido en medios de inducción de callo durante 5-7 días; d. coinfección de callos de arroz con la cepa LBA4404 de *Agrobacterium* que contiene la construcción pCAMBIA1304-OsHk3b; e. cocultivo de callos de arroz coinfectados; f. lavado de *Agrobacterium* sobrecultivado con cefotaxima antibiótica; g. transferencia de callos lavados en la placa de selección; h. el callo transformado se mantuvo en medio de regeneración; i. las plántulas regeneradas se transfirieron a un medio de regeneración fresco; j. la planta completamente regenerada se transfirió a tubos de cultivo para el endurecimiento; k. la planta de la etapa j se transfiere además a la maceta de barro y se guarda en el invernadero

55 Figura 7A: Ensayo de disco de hoja. Mostrando la tasa de blanqueo de diferentes muestras de hojas bajo estrés de control y estrés por salinidad.

Figura 7B: Contenido total de clorofila. Eje X: diferentes muestras, eje Y: contenido total de clorofila en µg por gramo de peso fresco de las hojas

WT, IR64

VC, IR64 transformado con vector sin el gen OsHK3b;

T9, IR64 transformado con vector con el gen OsHK3b (planta número 9);

T23, IR64 transformado con vector con el gen OsHK3b (planta número 23).

- 5 Figura 8: ilustra la confirmación de las plantas regeneradas IR64-OsHk3b mediante PCR tisular. (A) La amplificación por PCR se realizó usando el tejido de plántulas regeneradas como molde y cebadores directos específicos de vector y cebadores inversos específicos de genes. M: marcador de ADN; 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 19, 23, 32 son las diferentes plántulas transgénicas OsHk3b utilizadas para la PCR tisular, IR: IR64 no transformado, es decir, plantas de tipo silvestre y +ve: pCAMBIA-OsHk3b utilizado como molde.
- 10 Figura 9: ilustra la confirmación de la tolerancia al estrés múltiple mediante la prueba de germinación para semillas transgénicas IR64-OsHk3b (T_1) en presencia de NaCl 200 mM. (A) Semillas de WT: de tipo salvaje; OE1: sobreexpresión de la línea OsHk3b, se mantuvieron en NaCl 200 mM que contenía $\frac{1}{2}$ medio Yoshida; (B) Medida de la longitud del brote; (C) Medida de la longitud de la raíz; (E) Medida de la relación K^+/Na^+ . Los datos se tomaron después de 96 h de estrés por salinidad.
- 15 Figura 10: ilustra el crecimiento de plantas de semillero transgénicas IR64-OsHk3b (T_1) bajo control (sin salinidad) y en condiciones de estrés por salinidad y su medición de clorofila. (A) en $\frac{1}{2}$ medio Yoshida normal (B) en NaCl (200 mM) complementado con $\frac{1}{2}$ medio Yoshida. WT: IR64 de tipo salvaje, OE1: sobreexpresión de la línea UsHK3b. (C) Medida de la clorofila a partir de plantas de semillero control estresadas por salinidad. Las plantas de semillero de 7 días de edad cultivadas en condiciones de control se sometieron a estrés por salinidad (NaCl 200 mM) durante 10 días después de tomarse la fotografía.
- 20

LOCUS bankit1121378 FJ004641 2598 pb ADN lineal PLN 07-AUG-2008

DEFINICIÓN *Oryza sativa* (grupo de cultivo de índica) ARNm de histidina quinasa de tipo híbrido, cds completos.

REFERENCIA 1121378

VERSIÓN

25 PALABRAS CLAVE.

FUENTE *Oryza sativa*

ORGANISMO *Oryza sativa*

Eucariota; Viridiplantae; Streptopfitas; Embriófita; Tracheofita; Spermatofita; Magnoliofita; Liliopsida; Poales; Poaceae; clado de BEP; Ehrhartoideae; Oryzaceae; *Oryza*.

30 REFERENCIA 1 (bases 1 a 2598)

AUTORES Karan,R., Singla-Pareek,S.L. and Pareek,A.

TÍTULO Una histidina quinasa de tipo híbrido inducible por estrés múltiple (OsHk3b) de *Oryza sativa* L. cv. IR64

JOURNAL Sin publicar

REFERENCIA 2 (bases 1 a 2598)

35 AUTORES Karan,R., Singla-Pareek,S.L. and Pareek,A.

TÍTULO Presentación directa

JOURNAL Presentada (el 07 de agosto de 2008) Escuela de Ciencias de la Vida, Universidad de Jawaharlal Nehru, New Mehrauli Road, Nueva Delhi, Delhi 110067, India

COMENTARIO Comentario de Bankit: spmbsls@gmail.com.

40 CARACTERÍSTICAS Ubicación/Clasificadores

fuelle 1..2598

/organismo= "Oryza sativa"

/moltype="ARNm"

/cultivar="IR64"

45 /db_xref= "taxón: 4530"

CDS 1..2598

/codón_inicio=1

/product= "histidina quinasa de tipo híbrido"

/traducción= "MTFARYAVRTAFERPLTSGVAYAVRVTHGEREHFERQQGWTIKK"

ES 2 668 998 T3

MYSSSNKKQSSSGPGGDAVAEIREPÄEYAPVIFAQDAYKHVISFDMLSGNEDRKN
ILYSRKSGKGVLTAPFKLLNNRLGVISTYTVYKSEL PANARPHERIQA AIGYLG GID
IQALVEKLLKQLASQESIMVNVYDTTNNENPISMYGDDTGSGMCHVSVLNFDP SRKHE
MHCRFEKKPPWPWLAITSSFGTLVIALLTGHIFQATVHRIAKVEDDFHKMSELKKRAE
DADVAKSQFLATVSHEIRTPMNGVLGMLQMLMDTDLDTTQQDYVRTAQASGKALVSLI
NEVLDQAKIESGKLELETVPFDLRTVCDDILSLFCGKAQEKGLELAVYVSDQVPQILI
GDPGRIRQIITNLVGNISIKFTERGHIYLTVHVVEEVMSCLEVETGIQNTNTLSGYPVA
NRRCSWESIRLNFRELHSSEKSFAPIASDSISLVISVEDTGVGIPFEAQRSVFTPFMQ
VGPSIARIHGGTGIGLSISKCLVGLMKGEIGFASKPHVGTFTFTAVLMRAHCKGNDI
KSSEFKGINALVVDHRPVRRAKVTKYHLQRLGVKTELTAELNQFISKLN SGLTAKLVL
IDKETWLKESHCTPLLVNKL RNNDKPDSPKFLGSSASSPKGSDTSREHNLNVIMK
PLRASMLQVSLRRALGGVDKVHCRNGVGNSTLGSLLHKKQIIVDDNIVNLKVAGAL
KKYGAEVTCADSGKAITLLKPPHNFACFMDIQMPEMDGFATRIRV MERDLNERI
ERGEAPPECASIQRWRTPIAMTADVIQATHEECLKSEMDGYVSKPFEGEQLYSEVAR
FFQNHDQVE"

RECUENTO DE BASE 721a 566c 686g 625t
ORIGEN

1 atgacgttcg cgaggtacgc ggtgaggacg gcgttcgagc ggccgctgac gagcggggg
61 gcgtacgcgg tgcgggtgac gcacggcgag cgggagcatt tcgagcggca gcaggggtg
121 acgatcaaga agatgtactc ctctccaac aagaagcagt cgtcgtcggg gccggggccg
181 ggggacgccg ccgtcgcgga gatccgggag cccgccgagg agtaccccc ggtcatctc
241 gcccaggacg cctacaagca cgtcatctcc ttcgacatgc tctccgggaa tgaggatcgg
301 aaaaacatac tatactctag gaaatctggc aaggggtgac tgactgctcc ttcaagcta
361 ctgaataatc gcctcggagt aatctcgaca tacactgttt ataagtctga gctccctgca
421 aatgccaggc cacatgaacg catccaagcc gcgattggct atttggcgcg catatttgac
481 atacaagcac tcgtcgaaaa gttgctcaaa caactcgcga gccaggaatc catcatggg
541 aatgtgtatg atacgaccaa cgagaacccg atcagtatgt acgggtgatga tactgggagt
601 ggcattgtcc atgtcagcgt gctcaacttt ggtgatccat cgagaaagca tgagatgcat
661 tgcaggttcg aaaaaagcc accatggcca tggctggcaa taacgtcacc gtttgaact
721 ctgtgattg ctttactgac tggtcacata ttcaagcta ctgtccatcg gattgctaaa
781 gttgaagatg atttccacaa gatgagcgaa ctcaagaagc gtgcagaaga tgcagacgt
841 gcaaagtcac agttcttggc tactgttca catgagatca gaactccaat gaatgggtt
901 ctagggatgc tccaaatgct catggatact gatttgaca cgacgcagca ggactatgt
961 agaactgccc aagctagtgg aaaagctttg gtctctctca tcaatgagg tcttgatcag
1021 gcaaagattg agtctggtaa acttgagctc gagacgggtc ccttgatct tagaacagtt
1081 tgtgacgaca tttatctct gtttggggg aaagctcagg agaaaggact ggagttagca
1141 gtgatgtct cggatcaagt tccacagata cttattggcg atcctggcag gataagacaa
1201 atcattacga atctgtcgg gaactccata aagttcacag agagagggca tatatactg
1261 acagttcatg tagttgaaga ggtcatgagt tgttggagg tagagacagg aattcagaac
1321 acaaacactt taagtggcta tccagtagcc aacagaagat gtatctggga gagcattcgg
1381 ctttcaaca gagaattaca ctcatctgag aagtctttg cggccatcgc atctgattca
1441 ataagcttg itatatctgt tgaagatact ggcgtcggca tccatttga agcccaatcc
1501 cgtgtgttca ccccttcat gcaggtagg ccatccattg cccgatcca tgggggcact
1561 ggcattgat taagcatcag caagtgttg gttggtcca tgaagggaga aatcggttt
1621 gcaagtaagc cccatgttg ttctacttc acctcaccg cgggtctat gagggcacac

ES 2 668 998 T3

1681 tgcaaaggaa atgacatcaa atcatcagaa tttaaagga tcaatgcatt ggttggtgat
1741 catagggcag tccgtgcaaa ggtaccaag taccactgc aaagactgg agttaagacc
1801 gaactgacag ctgagctaaa tcagttcatt tctaaattaa actctggatc actgactgca
1861 aagctagtgc taatagacaa ggaaacctgg ctaaggaat cccattgcac gcctctctg
1921 gtaacaaat tgaggaataa tgacaagcca gactctcta agttattct ttggggagc
1981 tctgaagtt ctccaaggc cggttcagat acatccaggg aacataact gaatgtaata
2041 atgaagccgc ttcgtgcaag catgctcag gtctcactac gacgagcact aggtggggtc
2101 gataagggtc actgcaggaa tgagtagtt ggcaattcaa cattgggcag cctctcac
2161 aagaagcaaa tcattgtgt cgacgacaat atcgttaacc tgaaggtggc tgggtctct
2221 aagaagtatg gtgccgaagt tactgtgca gacagcggga aaaaagcaat cacattgcta
2281 aaacccccgc acaatttga tgctgttc atggacatac agatgccaga aatggatgg
2341 ttgaagcca ctagaaggat tagagtatg gaaagagatc taaatgagcg aatagaacgc
2401 ggagaggggc caccagaatg tgctagtatt cagaggtggc gaactcctat attggcgatg
2461 acggcggatg ttatacaggc aacacagag gaggcctga aaagcgaat ggatggctat
2521 gtctccaagc cattgaagg ggagcagctg tacagcgaag tagcgcggtt ttccaaat
2581 catgaccaag ttgaatag

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para el aislamiento del gen de histidina quinasa de tipo híbrido - OsHK3b a partir de arroz indica IR64 para su uso en la mejora de la tolerancia al estrés por salinidad y al estrés por sequía de las plantas de cultivo mediante la sobreexpresión del OsHK3b, **caracterizado por**
- 5 (i) tratamiento de ADNc aislado de plantas de semillero IR64 con cebador directo OsHk3bF y cebador inverso OsHk3bR mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para producir el gen de histidina quinasa de tipo híbrido amplificado aislado - OsHK3b,
(ii) clonación del gen aislado - OsHK3b en el vector TOPO-TA2.1 para producir plásmido recombinante pTOPO-OsHK3b,
- 10 en el que el gen de histidina quinasa de tipo híbrido - OsHK3b se aísla de su plásmido pTOPO-OSHK3b, en el que dicho cebador directo OsHk3bF se identifica como 5'ATGACGTTTCGCGAGGTACGC3', en el que dicho cebador inverso OsHk3bR se identifica como 5'CTATTCAACTTGGTCATGATTTTG3', en el que dicha PCR comprende una etapa de hibridación en PCR llevada a cabo a aproximadamente a 55 °C, en el que dicho gen - OsHK3b tiene ADNc de 2598 pb,
- 15 en el que dicho gen - OsHK3b es como el proporcionado en la figura 2A, en el que dicha reacción en cadena de la polimerasa (PCR) comprende las etapas de:
- i) preparación de la mezcla de reacción de ADNc y el cebador directo OsHk3bF identificado como 5'ATGACGTTTCGCGAGGTACGC3' y el cebador inverso OsHk3bR identificado como 5'CTATTCAACTTGGTCATGATTTTG3';
- 20 ii) desnaturalización inicial de la mezcla de reacción de la etapa - i) a aproximadamente 94 °C, preferentemente durante aproximadamente 5 minutos;
- iii) desnaturalización de la mezcla de reacción de la etapa - ii) a aproximadamente 94 °C, preferentemente durante aproximadamente 1 minuto;
- 25 iv) hibridación de la mezcla de reacción de la etapa - iii) a aproximadamente 55 °C, preferentemente durante aproximadamente 1 minuto;
- v) extensión de la mezcla de reacción de la etapa - iv) a aproximadamente 72 °C, preferentemente durante aproximadamente 3 minutos; y
- vi) extensión final de la mezcla de reacción de la etapa - v) a aproximadamente 72 °C, preferentemente durante aproximadamente 7 minutos,
- 30 en el que las etapas de la desnaturalización, la hibridación y la extensión se repiten durante aproximadamente 34 ciclos.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho ADNc se aísla de plantas de semillero de arroz cv IR64, que comprende las etapas de:
- 35 a) aislar el ARN total del tejido foliar estresado de las plantas de semillero IR64;
- b) aislar el ARNm del ARN total empleando las perlas paramagnéticas de estreptavidina y el cebador oligo d(T)₂₀ marcado con biotina;
- c) sintetizar la primera cadena de ADNc a partir de ARNm empleando el kit de síntesis de primera cadena de ADNc disponible convencionalmente.
3. Un gen de histidina quinasa de tipo híbrido como el aislado por el procedimiento de la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** dicho gen - OsHK3b es como se proporciona en la Figura 2A.
4. Un procedimiento de clonación del gen de histidina quinasa de tipo híbrido - OsHk3b como el aislado mediante el procedimiento de la reivindicación 1 o 2 en un vector de expresión de levaduras, a saber - pYES2, que comprende las etapas de:
- 45 a) amplificación del gen - OsHk3b del plásmido pTOPO-OsHK3b mediante el tratamiento del plásmido pTOPO-OsHK3b con el cebador directo OsHk3bSpeI/F y el cebador inverso OsHk3bSpeI/R empleando la reacción en cadena de la polimerasa [PCR];
- en el que el fragmento amplificado del gen OsHk3b que contiene el marco de lectura abierto completo [ORF] del gen junto con el sitio SpeI adicional - OsHk3b se clona en el sitio XbaI de pYES2.
5. Un procedimiento de acuerdo con la **reivindicación 4**, en el que los cebadores empleados son los mismos que los empleados en el procedimiento de aislamiento de dicho gen de acuerdo con la **reivindicación 1**, pero los cebadores para clonar el gen aislado contienen un sitio SpeI adicional que es capaz de facilitar la clonación del gen OsHk3b en pYES2.
6. Un procedimiento de acuerdo con la **reivindicación 4 o 5**, en el que dicha reacción en cadena de la polimerasa [PCR] para amplificar el gen - OsHk3b del plásmido pTOPO-OsHK3b comprende las etapas de:

- i) preparación de la mezcla de reacción del plásmido pTOPO-OsHK3b y el cebador directo OsHk3b*Spe*/F y el cebador inverso OsHk3b*Spe*/R;
- ii) desnaturalización inicial de la mezcla de reacción de la etapa - i) a aproximadamente 94 °C, preferentemente durante aproximadamente 5 minutos;
- 5 iii) desnaturalización de la mezcla de reacción de la etapa - ii) a aproximadamente 94 °C, preferentemente durante aproximadamente 1 minuto;
- iv) hibridación de la mezcla de reacción de la etapa - iii) a aproximadamente 55 °C, preferentemente durante aproximadamente 1 minuto;
- 10 v) extensión de la mezcla de reacción de la etapa - iv) a aproximadamente 72 °C, preferentemente durante aproximadamente 3 minutos; y
- vi) extensión final de la mezcla de reacción de la etapa - v) a aproximadamente 72 °C, preferentemente durante aproximadamente 7 minutos,

en el que las etapas de la desnaturalización, la hibridación y la extensión se repiten durante aproximadamente 34 ciclos.

- 15 7. Un clon del gen de histidina quinasa de tipo híbrido - OsHk3b como el aislado mediante el procedimiento de la reivindicación 1 o 2 en un vector de expresión de levaduras, a saber - pYES2, que se identifica como pYES2-OsHk3b.

8. Un procedimiento de clonación del gen de histidina quinasa de tipo híbrido - OsHk3b como el aislado mediante el procedimiento de la **reivindicación 1 o 2** en el vector de expresión de levaduras, a saber - pCAMBIA1304, que comprende las etapas de:
- 20

- a) amplificar el gen - OsHk3b del plásmido pTOPO-OsHK3b tratando el plásmido pTOPO-OsHK3b con el cebador directo OsHk3b*Spe*/F y el cebador inverso OsHk3b*Spe*/R empleando la reacción en cadena de la polimerasa [PCR];

25 en el que el fragmento amplificado del gen OsHk3b que contiene el marco de lectura abierto completo [ORF] del gen junto con el sitio *SpeI* adicional - OsHk3b se clona en el sitio *SpeI* de pCAMBIA1304.

9. Un procedimiento de acuerdo con la **reivindicación 8**, en el que los cebadores empleados son los mismos que los empleados en el procedimiento de aislamiento de dicho gen de acuerdo con la **reivindicación 1**, pero los cebadores para clonar el gen aislado contienen un sitio *SpeI* adicional que es capaz de facilitar la clonación del gen OsHk3b en pCAMBIA1304.

- 30 10. Un procedimiento de acuerdo con la **reivindicación 8 o 9**, en el que dicha reacción en cadena de la polimerasa [PCR] para amplificar el gen - OsHk3b del plásmido pTOPO-OsHK3b comprende las etapas de:

- i) preparación de la mezcla de reacción del plásmido pTOPO-OsHK3b y el cebador directo OsHk3b*Spe*/F y el cebador inverso OsHk3b*Spe*/R;
- 35 ii) desnaturalización inicial de la mezcla de reacción de la etapa - i) a aproximadamente 94 °C, preferentemente durante aproximadamente 5 minutos;
- iii) desnaturalización de la mezcla de reacción de la etapa - ii) a aproximadamente 94 °C, preferentemente durante aproximadamente 1 minuto;
- 40 iv) hibridación de la mezcla de reacción de la etapa - iii) a aproximadamente 55 °C, preferentemente durante aproximadamente 1 minuto;
- v) extensión de la mezcla de reacción de la etapa - iv) a aproximadamente 72 °C, preferentemente durante aproximadamente 3 minutos; y
- vi) extensión final de la mezcla de reacción de la etapa - v) a aproximadamente 72 °C, preferentemente durante aproximadamente 7 minutos,

45 en el que las etapas de la desnaturalización, la hibridación y la extensión se repiten durante aproximadamente 34 ciclos.

11. Un clon del gen de histidina quinasa de tipo híbrido - OsHk3b como el aislado mediante el procedimiento de la **reivindicación 1 o 2** en el vector de expresión de arroz, a saber - pCAMBIA1304, que se identifica como pCAMBIA1304-OsHk3b.

- 50 12. Un procedimiento para mejorar la tolerancia al estrés por salinidad y sequía de plantas de cultivo, que comprende coinfectar callos de arroz cultivados a partir de semillas de IR64 con un medio que contiene la cepa LBA4404 de *Agrobacterium* y el gen clonado y permitir que los callos coinfectados se regeneren en plantas IR64 transgénicas completas que tienen tolerancia mejorada al estrés por salinidad y por sequía, en el que el gen clonado es pCAMBIA1304-OsHk3b de la **reivindicación 11**.

13. Un procedimiento de acuerdo con la **reivindicación 12**, que comprende además las etapas de:

- 55 a) coinfectar callos de arroz cultivados a partir de semillas de IR64 con dicho medio que contiene dicho gen

- clonado;
- b) cocultivar los callos de arroz coinfectados de la etapa - a);
- c) lavar el medio sobrecultivado de callos de arroz cocultivado de la etapa - b) con antibiótico;
- 5 d) transferir el callo lavado de la etapa - c) a una placa de selección para el crecimiento de callos transformados;
- e) tratar los callos transformados de la etapa - d) con medios de regeneración;
- f) repetir la etapa del tratamiento de los callos transformados de la etapa - e) con medios de regeneración frescos hasta que forme una planta completamente regenerada;
- g) endurecer la planta completamente regenerada de la etapa - f) en un tubo de cultivo;
- 10 h) transferir la planta endurecida de la etapa - g) a una maceta para su desarrollo en una planta transgénica IR64 completa.
14. Un procedimiento de acuerdo con la **reivindicación 13**, en el que la etapa - b) de cocultivo se lleva a cabo manteniendo los callos de arroz coinfectados de la etapa a) en oscuridad durante aproximadamente 48 horas.
15. Un procedimiento de acuerdo con la **reivindicación 13**, en el que el tubo de cultivo en la etapa - g) contiene plantas de arroz de regeneración en medios de regeneración.
- 15 16. Un procedimiento de acuerdo con la **reivindicación 13**, en el que el antibiótico es cefotaxima.
17. Un procedimiento de acuerdo con la **reivindicación 13**, en el que los medios de regeneración comprenden medios de Murashige y Skoog.
18. Una planta de cultivo que tiene tolerancia mejorada al estrés por salinidad y por sequía producida por el procedimiento reivindicado en las **reivindicaciones 12 a 17**, en el que la planta transgénica tiene sobreexpresión de gen de histidina quinasa de tipo híbrido aislado de arroz indica IR64, **caracterizada porque** dicho gen de histidina quinasa de tipo híbrido - OsHK3b tiene la secuencia como se proporciona en la Figura 2A.
- 20 19. Una planta de segunda generación producida a partir de semillas de plantas transgénicas de primera generación, en la que dicha planta transgénica de primera generación se cultiva empleando clones de gen de histidina quinasa de tipo híbrido - OsHK3b como el aislado mediante el procedimiento de la **reivindicación 1 o 2**, en la que posteriormente las plantas transgénicas cultivadas [de segunda generación] tienen mejor tolerancia al estrés por salinidad y sequía.
- 25 20. Uso de gen de histidina quinasa de tipo híbrido OsHK3b como el aislado mediante el procedimiento de la **reivindicación 1 o 2** para mejorar la tolerancia al estrés por salinidad y por sequía de las plantas de cultivo empleando el procedimiento de una cualquiera de las **reivindicaciones 12 a 17**.

30

Nombre de los cebadores	Secuencias de los cebadores
OsHk3bF	5'ATGACGTTGCGAGGTACGC3'
OsHk3bR	5'CTATTCAACTGGTCATGATTTTG3'

Figura 1A

Etapas	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5 min	1
Desnaturalización	94°C	1 min	34
Hibridación	55°C	1 min	
Extensión	72°C	3 min	
Extensión final	72°C	7 min	1

Figura 1B

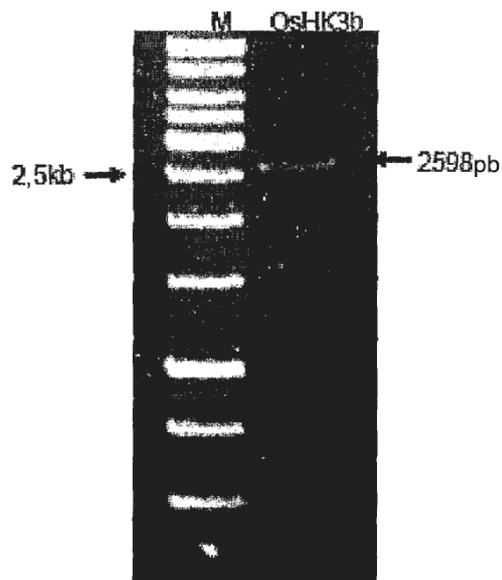


Figura 1C

ATGACGTTGCGGAGGTACGCGGTGAGGACGGCGTTGAGCGGGCCGCTGACGAGCGG
 GGTGGGTACGGGTGCGGGTGACGCACGGCGAGCGGGAGCATTTCGAGCGGCAGC
 AGGGGTGGACGATCAAGAAGATGTACTCTCCTCCAACAAGAAGCAGTCGTCGTCG
 GGGCCGGGGCCGGGGACCGCCCGTCCGGGAGATCCGGGAGCCCGCCGAGGAGTA
 CGCCCGGTTCATCTTCGCCAGGACGCCCTACAAGCACGTCATCTCCTTCGACATGCTC
 TCCGGGAATGAGGATCGGAAAAACATACTATACTCTAGGAAAATCTGGCAAGGGTGT
 CCTGACTGCTCCTTTCAAGCTACTGAATAATCGCCTCGGAGTAACTCTCGACATACACT
 GTTTATAAGTCTGAGCTCCCTGCAAATGCCAGGCCACATGAACGCATCCAAGCCGCG
 ATTGGCTATTTGGGCGGCATATTTGACATACAAGCACTCGTCGAAAAGTTGCTCAA
 CAACTCGCGAGCCAGGAATCCATCATGGTGAATGTGTATGATACGACCAAAGAGAA
 CCGGATCAGTATGTACGGTGTATGATACTGGGAGTGGCATGTGCCATGTGAGCGTGTCT
 CAACCTTGGTGTATCCATCGAGAAAAGCATGAGATGCATTGCAGGTTTCGAAAAAAGCC
 ACCATGGCCATGGCTGGCAATAACGTCATCGTTTGGAACTCTTGTGATTGCTTTACTG
 ACTGGTCACATATTTCAAGCTACTGTCCATCGGATTCCTAAAGTTGAAGATGATTTCC
 ACAAGATGAGCGAACTCAAGAAGCGTGCAGAAGATGCAGACGTCGCAAAGTCACAG
 TTCTTGGCTACTGTTTACATGAGATCAGAACTCCAATGAATGGTGTCTTAGGGATGC
 TCCAAATGCTCATGGATACTGATTTGGACACGACGCAGCAGGACTATGTTAGAACTG
 CCCAAGCTAGTGGAAAAGCTTTGGTCTCTCTCATCAATGAGGTTCTTGTAGACGGGAA
 AGATTGAGTCTGGTAAACTTGAGCTCGAGACGGTCCCTTTGATCTTAGAACAGTTT
 GTGACGACATTTTATCTCTGTTTTGTGGGAAAGCTCAGGAGAAAAGGACTGGAGTTAG
 CAGTGTATGTCTCGGATCAAGTTCACAGATACTTATTGGCGATCCTGCCAGGATAA
 GACAAATCATTACGAATCTTGTCCGGAACCTCCATAAAGTTTACAGAGAGAGGGCATA
 IATCCTGACAGTTCATGTAGTTGAAGAGTTCATGAGTTGTTGGAGGTAGAGACAG
 GAATTCAGAACACAAACACTTTAAGTGGCTATCCAGTAGCCAACAGAAAGATGTAGCT
 GGGAGAGCATTCGGCTTTTCAACAGAGAAATTAACACTCATCTGAGAAAGTCTTTTGGC
 CCATCGCATCTGATTCATAAAGCTTGGTTATATCTGTTGAAGATACTGGCGTCGGCAT
 CCCATTTGAAGCCCAATCCCGTGTGTTACCCCTTTCATGCAGGTAGGTCCATCCATT
 GCCCGCATCCATGGGGGCACTGGCATTGGATTAAGCATCAGCAAGTGTGTTGGTTGGT
 CTCATGAAGGGAGAAAATCGGTTTTGCAAGTAAGCCCCATGTTGGTTCTACTTTCACCT
 TCACCGCGGTGCTTATGAGGGCACACTGCAAAGGAAATGACATCAAATCATCAGAAT
 TTAAAGGGATCAATGCATTGGTTGTTGATCATAGGCCAGTCCGTGCAAAGGTTACCA
 AGTATCACTTGGAAAGACTTGGAGTTAAGACC GAACTGACAGCTGAGCTAAATCAGT
 TCATTTCTAAATTAACCTCTGGATCACTGACTGCAAAGCTAGTGCTAATAGACAAGG
 AAACCTGGCTTAAGGAATCCCATTCACCGCCICTTCTGGTTAACAAATGAGGAATA
 ATGACAAGCCAGACTCTCCTAAGTTATTCTTTTGGGGAGCTCTGCAAGTCTOCCAA
 GGGCGGTTTCAGATACATCCAGGGAACATAACTTGAATGTAATAATGAAGCCGCTTCG
 TGCAAGCATGCTTCAGGCTCACTACGACGAGCACTAGGTGGGGTCGATAAGGTGCA
 CTGCAGGAATGGAGTAGTTGGCAATCAACATTGGGCAGCCTTCTTACAAGAAGCA
 AATCATTGTGTGACGACACAATATCGTTAACCTGAAGGTGGCTGGTGTCTTTAAGAA
 GTATGGTGCCGAAGTTACTTGTGCAGACAGCGGAAAAAAGCAATCACATTGCTAA
 AACCCCGCACAATTTTGTGCTTGTTCATGGACATACAGATGCCAGAAATGGATG
 GGTTTGAAGCCACTAGAAGGATTAGAGTGTGGAAAGAGATCTAAATGAGCGAATA
 GAACCGGAGAGGGCCACCAGAATGTGCTAGTATTTCAGAGGTGGCGAACTCCTAT
 ATTGGCGATGACGGCGGATGTTATACAGGCAACACACAGGAGTGCCTGAAAAGCG
 AAATGGATGGCTATGTCTCAAGCCATTTGAAGGGGAGCAGCTGTACAGCGAAGTA
 CGCGGTTTTTCCAAAATCATGACCAAGTTGAATAG

Figura 2A

MTFARYAVRTAFERPLTSGVAYAVRVTHGEREHFERQQGWTIKKMYSSSNKK
QSSSGPGPGDAAVAEIREPAEEYAPVIFAQDAYKHVISFDMLSGNEDRKNILYS
RKSGKGVLTAPFKLLNNRLGVISTYTVYKSEL PANARPHERIAAIGYLGIFDIQ
ALVEKLLKQLASQESIMVNVYDTTNNENPISMYGDDTGSGMCHVSVLNFGDPSR
KHEMHCRFEKPPWPWLAITSSFGTLVIALLTGHIFQATVHRIAKVEDDFHKMS
ELKKRAEDADVAKSQFLATVSH EIRTPMNGVLGMLQMLMDTDLDTTQQDYVRT
AQASGKALVSLINEVLDQAKIESGKLELETVPFDLRTVCDDILSLFCGKAQEKGL
ELAVYVSDQVPQILIGDPGRIRQIITNLVGNISIKFTERGHIYLVHVVEEVMSCLE
VETGIQNTNLSGYPVANRRCSWESIRLFNRELHSSEKSFAPIASDSISLVISVED
TGVGIPFEAQSRVFTPFMQVGPSIARIHGGTGIGLSISKCLVGLMKGEIGFASKP
HVGSTFTTAVLMRAHCKGNDIKSSEFKGINALV DHRPVRAKVTKYHLQRLGV
KTELTAELNQFISKLNSSLTAKLVLDKETWLKESHCTPLLVNKLRNNDKPDSP
KLFLLGSSASSPKGGSDTSREHNLNVIMKPLRASMLQVSLRRALGGVDKVVHCR
NGVVGNSTLGSLLHKQIIVDDNIVNLKVAGALKKYGAEVTCADSGKKAITLLK
PPHNFDA CFMDIQMPEMDGFEATRIRV MERDLNERIERGEAPPECASIQRWR
TPILAMTADVIQATHEECLKSEMDGYVSKPFEGEQLYSEVARFFONHDQVE

Figura 2B

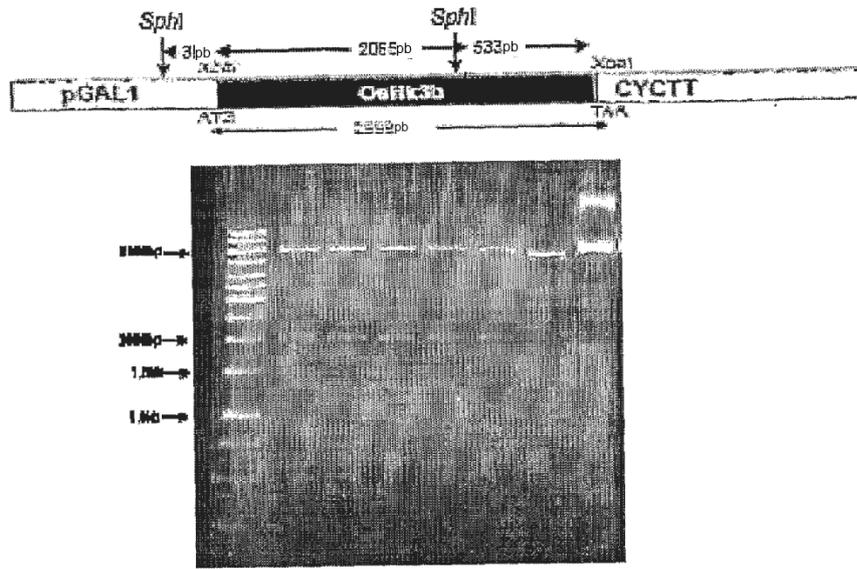


Figura 3A

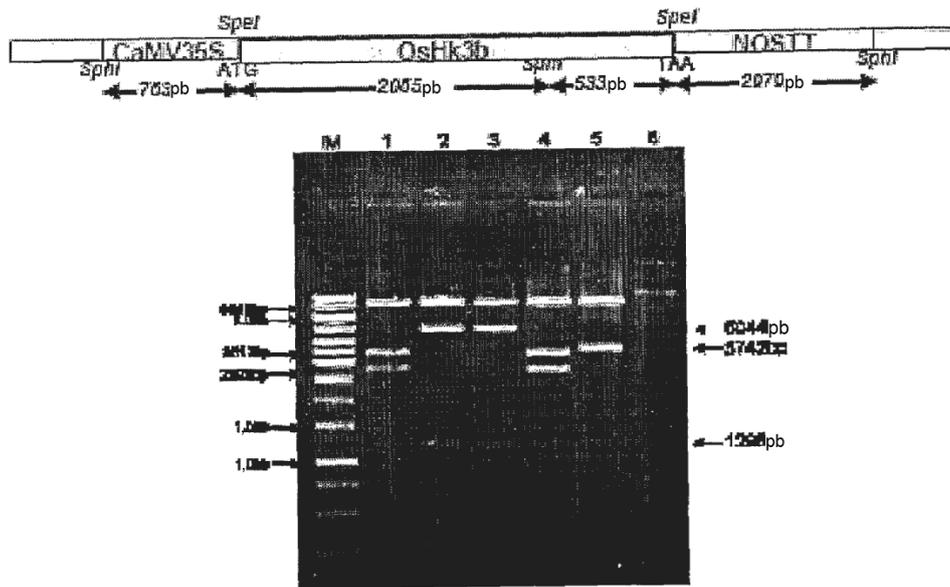


Figura 3B

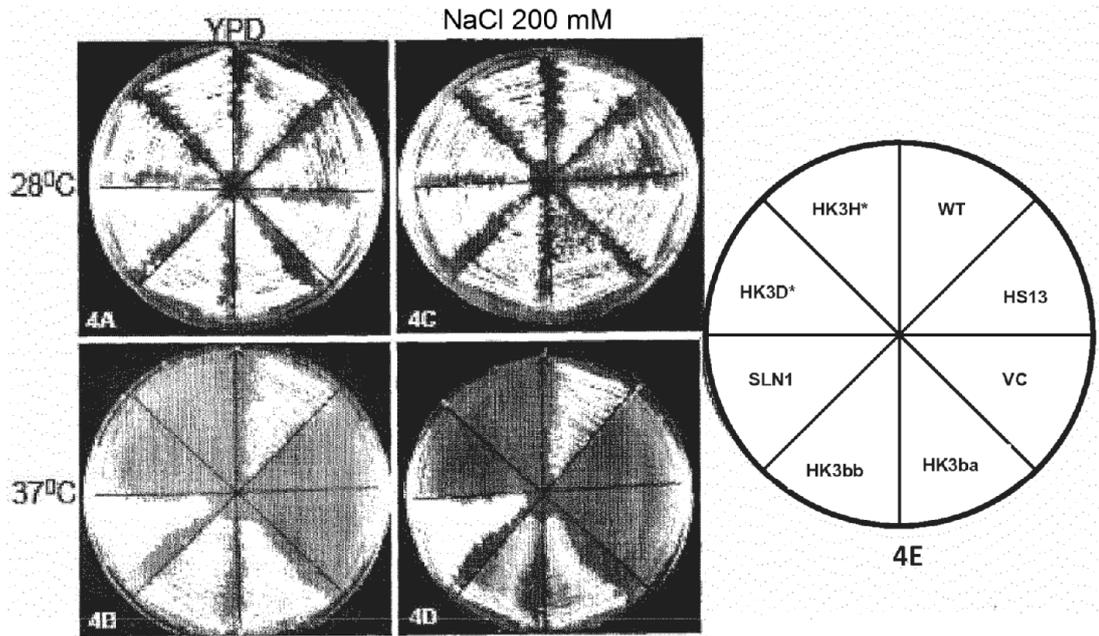


Figura 4

Hoja modificada

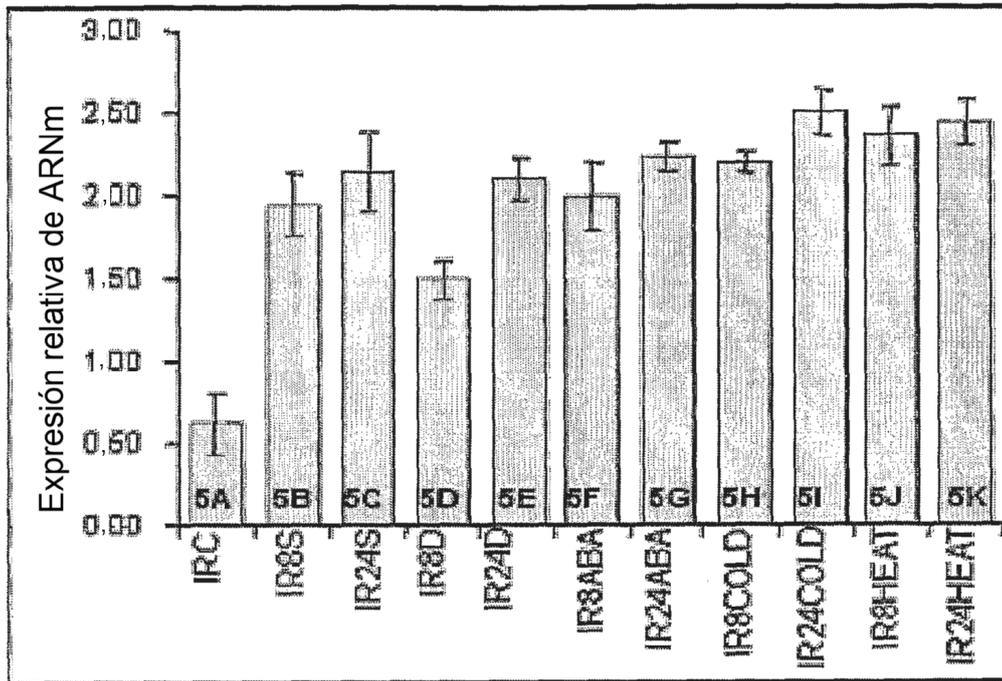


Figura 5

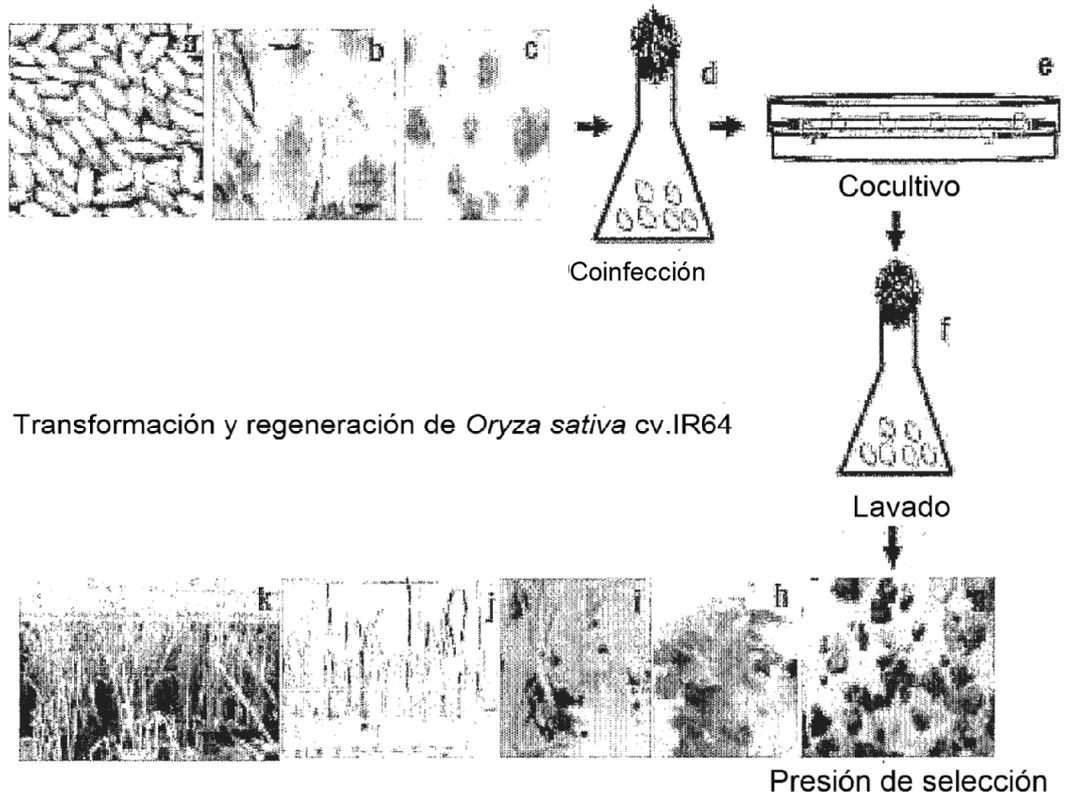


Figura 6

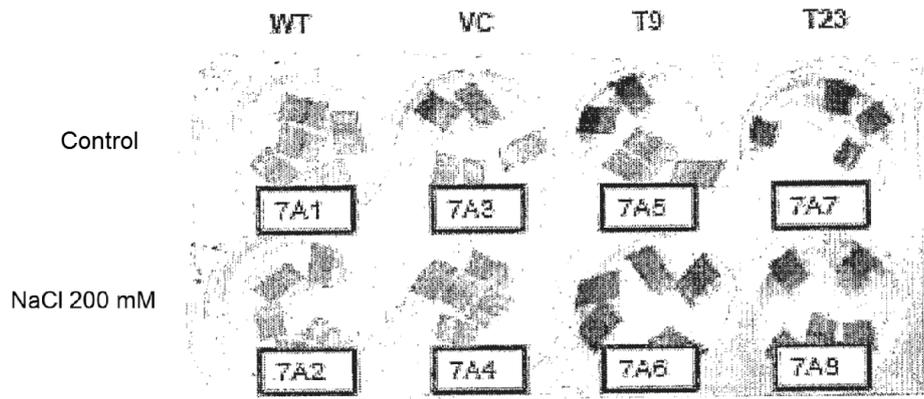


Figura 7A

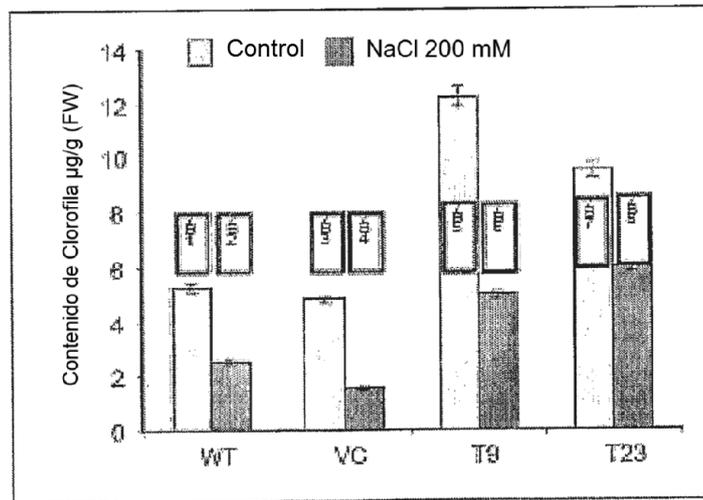


Figura 7B

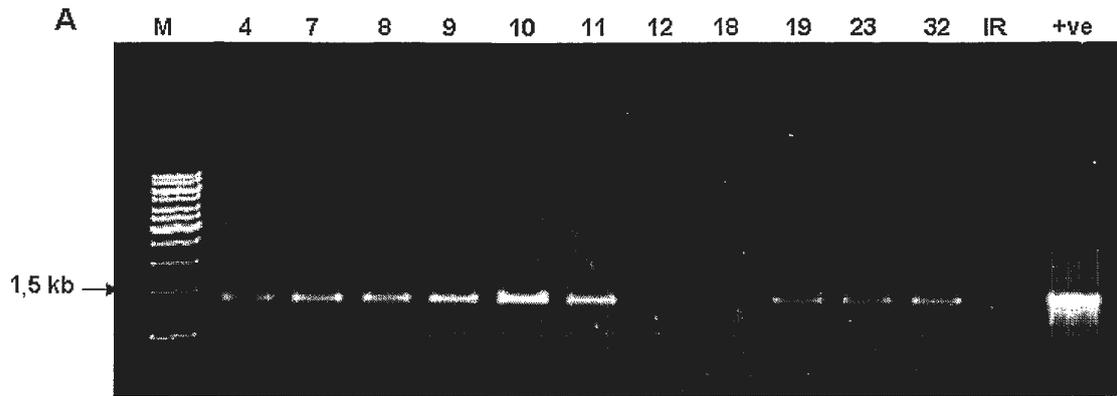


Figura 8

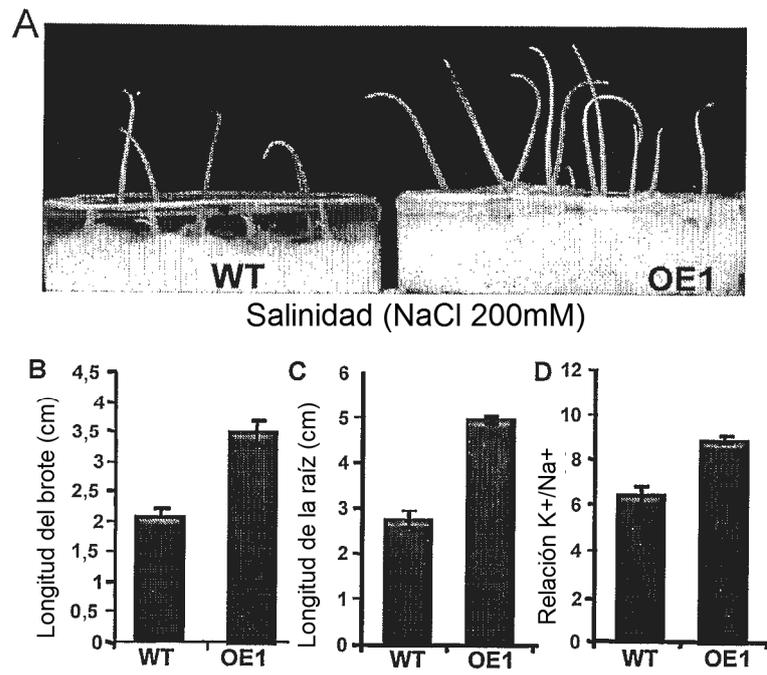


Figura 9

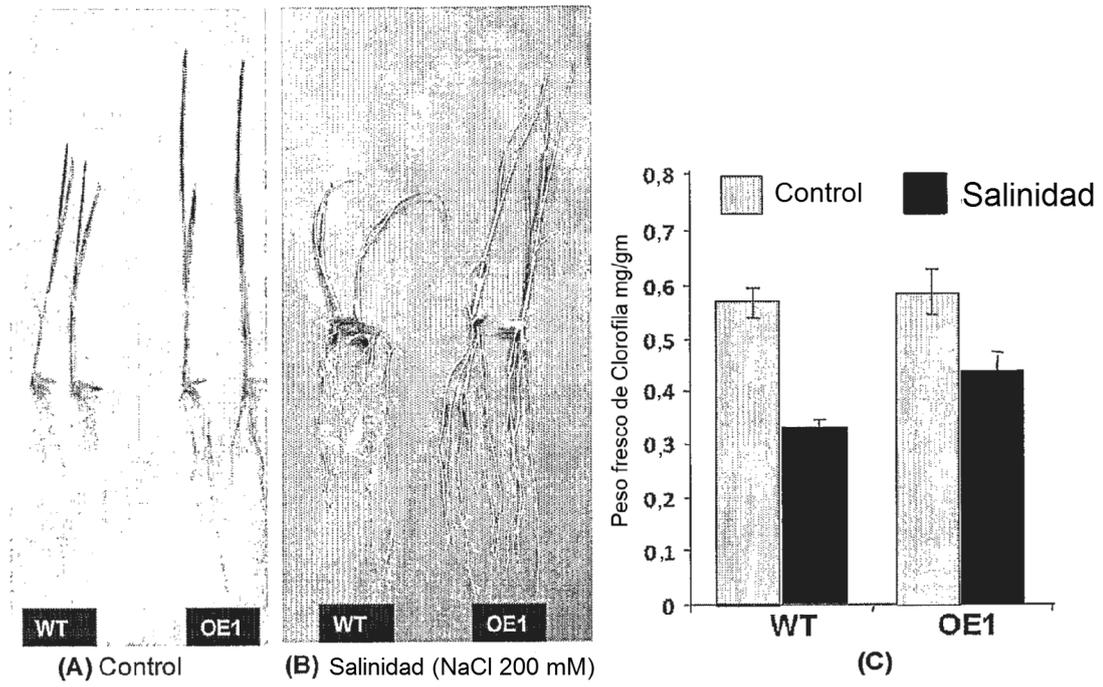


Figura 10