



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 344 877**

② Número de solicitud: 200802145

⑤ Int. Cl.:  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**A01H 5/00** (2006.01)  
**C12N 9/88** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **11.07.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **08.09.2010**

Fecha de la concesión: **16.06.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **29.06.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**29.06.2011**

⑰ Titular/es: **Universidad de Barcelona  
Centro de Patentes de la UB. Baldiri Reixac, 4  
08028 Barcelona, ES  
Universitat de València**

⑱ Inventor/es: **Altabella Artigas, Teresa;  
Ferrando Monleón, Alejandro y  
Fernández Tiburcio, Antonio**

⑲ Agente: **Segura Cámara, Pascual**

⑳ Título: **Planta con resistencia a estrés por bajas temperaturas y método de producción de la misma.**

㉑ Resumen:

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

La presente invención está relacionada con un método de producción de plantas con resistencia mejorada a estrés por bajas temperaturas, comprendiendo la etapa de transformación de células de una planta con una secuencia del gen exógeno ADC1 de la arginina descarboxilasa bajo el control de un promotor capaz de funcionar en la planta. Las plantas así obtenidas muestran resistencia a estrés por bajas temperaturas sin ser afectado el fenotipo cuando se compara con el fenotipo de las plantas de tipo silvestre.

ES 2 344 877 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

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

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

### Estado de la técnica

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### Explicación de la invención

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### 45 **Breve descripción de los dibujos**

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

50 Fig. 2: Niveles relativos de transcrito del gen de la biosíntesis de putrescina *ADC1* en plantas transgénicas (I11, I7, I9) y control (wt).

55 Fig. 3: Niveles de poliaminas en plantas de *Arabidopsis* de tipo silvestre (wt) y transgénicas sobreexpresoras de *ADC1* (I11, I7, I9).

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

#### **Descripción detallada de las realizaciones particulares**

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

Como se usa aquí, “exógeno”, indica que no es intrínseco a la planta sino que se ha introducido externamente. De este modo, una “secuencia exógena del gen *ADC1*” puede ser un gen que codifica la enzima *ADC1* homólogo a la

## ES 2 344 877 B1

planta huésped (es decir, derivado de la planta huésped) que se introduce externamente por manipulación genética. El uso de un gen derivado del huésped que codifica la enzima ADC1 es preferible al considerar la identidad del uso de codones.

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

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

La secuencia codificante del gen *ADC1* de la arginina descarboxilasa de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 1) está disponible en la base de datos GenBank. Su número de acceso es NM\_127204.

15 La secuencia de aminoácidos de la arginina descarboxilasa ADC1 (SEQ ID NO: 2) está disponible en la base de datos GenBank. Su número de acceso es Q9SI64.

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

30 La secuencia exógena del gen *ADC1* puede ser introducida en las células por cualquier método de ingeniería genética. Ejemplos incluyen fusión de protoplastos con células vegetales heterólogas que tienen la secuencia del gen ADC1, infección con virus de plantas con el genoma viral manipulado genéticamente para expresar el gen que codifica la enzima ADC1, o transformación de células de la planta huésped usando un vector de expresión que contiene el gen que codifica la enzima ADC1.

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

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

50 Cuando la secuencia del gen exógeno ADC1 se introduce por infección con *Agrobacterium tumefaciens*, el casete de expresión que incluye el gen que codifica la enzima ADC1 puede insertarse en la región T-DNA (región que se transfiere al cromosoma de la planta) en un plásmido Ti o Ri de las células. En la actualidad se utilizan sistemas de vectores binarios en los métodos de transformación estándar con *Agrobacterium*. Ejemplos de vectores binarios comerciales incluyen los plásmidos pBI101 y pBI121 (ambos comercializados por Clontech). La región Vir implicada en la incorporación del T-DNA tiene acción en trans en el plásmido Ti (o Ri), en un vector conocido como plásmido de ayuda o "helper".

55 Para la transformación de plantas pueden utilizarse varios métodos conocidos convencionales. Ejemplos incluyen el método del PEG, en el que los protoplastos se aíslan de células vegetales por tratamiento con un enzima que degrada la pared celular como la celulasa o la hemicelulasa, y se añade el polietilenglicol a una suspensión de protoplastos junto a un vector de expresión que contiene el casete de expresión del gen que codifica la enzima ADC1 mencionado antes, para incorporar el vector de expresión en los protoplastos por un proceso como la endocitosis; el método de liposomas en el que un vector de expresión se introduce por tratamiento de ultrasonidos o similar en vesículas de membranas lipídicas como fosfatidilcolina, y las vesículas se fusionan con los protoplastos en presencia de PEG; métodos de fusión en un proceso similar utilizando micelas; y por electroporación, en el que se aplican pulsos eléctricos a una suspensión de protoplastos y un vector de expresión para incorporar los vectores que se encuentran en la solución externa en los protoplastos. Sin embargo, estos métodos son complejos puesto que requieren técnicas de cultivo para la re-diferenciación de los protoplastos en plantas. Procesos para introducir el gen de interés en células intactas con pared celular incluyen la inyección directa como la microinyección en la que una micropipeta se inserta en las células para inyectar el DNA del vector por presión a gas o hidráulica, o el método del cañón de partículas en el que se aceleran micropartículas de metal cubiertas con DNA por la detonación de un explosivo o presión gaseosa y de esta

forma se introducen en las células, y métodos que emplean la infección con *Agrobacterium*. Los inconvenientes de la microinyección son la necesidad de una experiencia considerable y el pequeño número de células que se manipulan. Por ello es más aconsejable transformar plantas con métodos más prácticos tales como el método *Agrobacterium* y el método del cañón de partículas. En el método del cañón de partículas, bolas diminutas de metal (normalmente oro) cubiertas con el DNA de interés se disparan directamente sobre la célula vegetal. El método del cañón de partículas es útil ya que los genes pueden ser introducidos directamente en el meristemo apical de las plantas mientras son cultivadas. *Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria del suelo que contiene, además de su cromosoma, un minicromosoma extra circular denominado plásmido inductor de tumores (Ti). Parte del plásmido Ti se transfiere a los cromosomas de la planta huésped donde queda integrado (T-DNA). Varios loci génicos del cromosoma bacteriano y un grupo de genes de virulencia (*vir*) localizados en el plásmido Ti codifican para funciones que intervienen en el reconocimiento de la célula vegetal y su unión, así como en la excisión, transferencia e integración del T-DNA en el genoma de la planta. En general el método de *Agrobacterium* está más aceptado que el cañón de partículas por la mayor frecuencia de inserciones únicas en el DNA foráneo, siendo más fácil su monitorización.

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

Ejemplos de plantas que pueden ser transformadas con el procedimiento de acuerdo con el primer aspecto de la invención incluyen, pero no están limitadas a, dicotiledóneas, monocotiledóneas, plantas herbáceas y arbustos. Ejemplos incluyen patatas dulces, tomates, pepinos, calabaza, melones, sandías, tabaco (*Nicotinia tabacum*), *Arabidopsis thaliana*, pimientos, berenjena, judías, taro, espinaca, zanahorias, fresas, patatas blancas, arroz, maíz, alfalfa, trigo, cebada, soja, colza, sorgo, Eucaliptos, olmo, kenaf, *Eucommia ulmoides*, caña de azúcar, remolacha, cassaya, cica, *Chenopodium album*, lirios, orquídeas, claveles, rosas, crisantemo, petunias, *Torenia fournieri*, antirrhinum, ciclamen, gypsophila, geranio, girasol, *Zoysia japonica*, algodón, hongos matsutake, hongos shiitake, champiñones, ginseng, frutos cítricos, bananas y kiwi.

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

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

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### *Obtención de plantas transgénicas de Arabidopsis*

##### A. Construcción del Plásmido

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

##### B. Transformación de *Arabidopsis thaliana*

Plantas de *Arabidopsis thaliana* Col0 se transformaron con *A. tumefaciens*, que contenía la construcción pBI121-*ADC1* por inmersión floral (cfr. Clough S. J. *et al.*, “Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*”, Plant J., 1998, v. 16, p. 735-743). Las semillas producidas por estas plantas se recolectaron y se seleccionaron en medio de cultivo de Murashige and Skoog, abreviado a partir de ahora como “MS” (cfr. Murashige T. *et al.*, “A revised médium for rapid growth and bioassays with tobáceo tissue culture”,

Physiol. Plant., 1962, v. 15, p. 473-497), que contenía 50 mg/l de kanamicina como antibiótico para la selección de los transformantes. La progenie de las plantas resistentes a kanamicina se analizó para la segregación de resistencia a kanamicina. Las semillas de las plantas con una proporción de segregación 3:1 se cultivaron de nuevo y la progenie resultante se analizó de nuevo para la segregación de resistencia a kanamicina para identificar plantas homocigotas para el T-DNA insertado. Se seleccionaron tres líneas homocigotas (I7, I9 e I11) para posteriores análisis.

### C. Caracterización de las plantas transgénicas

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

El RNA total se obtuvo de toda la parte aérea de plantas de *Arabidopsis thaliana* de 4 semanas no transformadas (wt) y transformadas con el plásmido pBI121*ADC1* (I7, I9, I11) utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Un microgramo de RNA total se trató con DNasa de grado amplificación (Invitrogen) para eliminar la contaminación con DNA genómico. La hebra complementaria de cDNA se obtuvo con hexámeros degenerados utilizando el sistema de retrotranscripción SuperScript III (Invitrogen), siguiendo las especificaciones del fabricante. La RT-PCR a tiempo real con el método de tinte SYBR Green I se llevó a cabo utilizando la primera hebra de cDNA como molde en un sistema detector de secuencias (modelo 7700; Applied Biosystems, Foster, CA). La eficiencia de la amplificación de cada muestra analizada se determinó utilizando la hoja de cálculo DART-PCR (cfr. Peirson S. N. *et al.* "Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis", *Nucleic Acids Res.*, 2003, v. 31, e73), que utiliza un algoritmo simple (cfr. Tichopad A. *et al.*, "Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up", *Nucleic Acids Res.*, 2003, v. 31, e122.) y los datos de fluorescencia sin tratar, lo cual permite obtener resultados comparables sin necesidad de curvas de calibración con patrones. Las eficiencias de amplificación se calcularon para cada reacción individual a partir de su perfil de amplificación y se comprobaron por ANOVA para detectar muestras anómalas (outliers) y diferencias entre grupos (equivalencia de amplificación) utilizando la misma hoja de cálculo DART-PCR. La media de fluorescencia inicial ( $R_0$ ) obtenida a partir de la eficiencia media se normalizó utilizando RNAm de *Actina2* como control interno en cada experimento. Estos análisis se llevaron a cabo dos veces en experimentos independientes con resultados muy similares. Se utilizaron los siguientes juegos de cebadores específicos para cada gen: *ADC1* (sentido directo: 5'-GTGGTGATAAGGGGAACGA CA-3' (SEQ ID NO: 5), sentido inverso: 5'-CAACCGAAATAAGACCA-ATTCTCAT-3' (SEQ ID NO: 6)), y *Actina2* (sentido directo: 5'-GATTCAGATGCCAGAAAGTCTTGT-3' (SEQ ID NO: 7), sentido inverso: 5'-TGGATTCCAG CAGCTT-CCAT-3' (SEQ ID NO: 8).

Como se puede comprobar en la Fig. 2, los niveles relativos de transcrito de *ADC1* en las líneas transgénicas I11, I7 e I9, fueron significativamente superiores en relación con el control (wt).

#### C.2. Análisis de poliaminas

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

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

#### C.3. Ensayos de congelación

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

Los tratamientos a bajas temperaturas se llevaron a cabo transfiriendo las plantas a cámaras de crecimiento programadas a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  durante diferentes períodos de tiempo en las condiciones de luz y fotoperíodo descritas más arriba.

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

Como se deduce de los resultados obtenidos (ver Fig. 4), las plantas transgénicas que sobreexpresan el gen exógeno *ADC1* son más resistentes a estrés por bajas temperaturas mostrando, al mismo tiempo, las mismas características fenotípicas que las plantas de tipo silvestre.

Ejemplo 2

*Obtención de plantas transgénicas de tabaco*

5 Discos de hojas de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Burley 21) se transforman con *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 portador de la construcción de interés tal como se describe en Horsch *et al.* (cfr. R.B. Horsch *et al.*,  
10 “A simple and general method for transferring genes into plants” Science 1985, vol. 227, pp. 1229-1231). El medio para el desarrollo de yemas contiene sales minerales MS (Duchefa, ND), vitaminas B5 Gamborg (Duchefa), 1 mg/l de benziladenina (BA, Sigma), 0.1 mg/l de ácido naftalenacético (NAA, Sigma), 50 mg/l de kanamicina como antibiótico para la selección de células transformadas y 100 mg/l de Claforan para evitar el crecimiento de *A. tumefaciens*. Tras 6-7 semanas en este medio, se obtienen yemas del tamaño adecuado para ser transferidas a medio de enraizamiento.

15 Las yemas regeneradas se separan y se transfieren a medio de enraizamiento: MS con 50 mg/l kanamicina pero sin hormonas (BA, NAA). Las plantas resistentes a kanamicina (3-10 cm alto) se transfieren a substrato con abono y se cultivan en invernadero. Después de 3 meses las plantas están floreciendo y se consigue la autopolinización cubriendo una inflorescencia entera y las yemas con una bolsa de papel. Normalmente, un mes más tarde las semillas están maduras y pueden utilizarse para germinación. Estas semillas se analizan para segregación por resistencia a kanamicina, y las plantas que son capaces de crecer en presencia de kanamicina se utilizan para posteriores análisis.

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

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

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

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

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

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

20 a) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1;

15 b) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia SEQ ID NO: 2;

20 c) una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína con actividad arginina descarboxilasa, que comprende la secuencia (a) con una o más bases delecionadas, sustituidas, insertadas o añadidas.

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

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el nivel de putrescina se incrementa en las células transformadas.

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

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

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

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

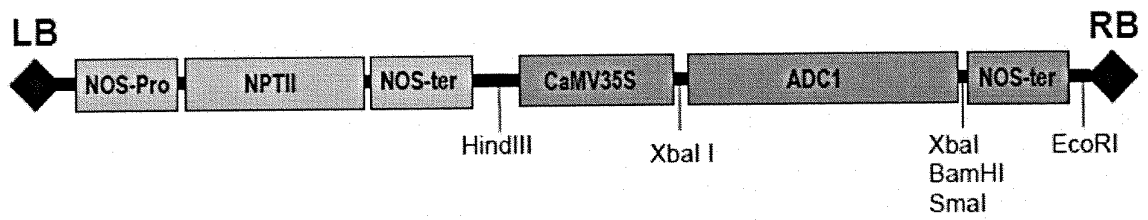
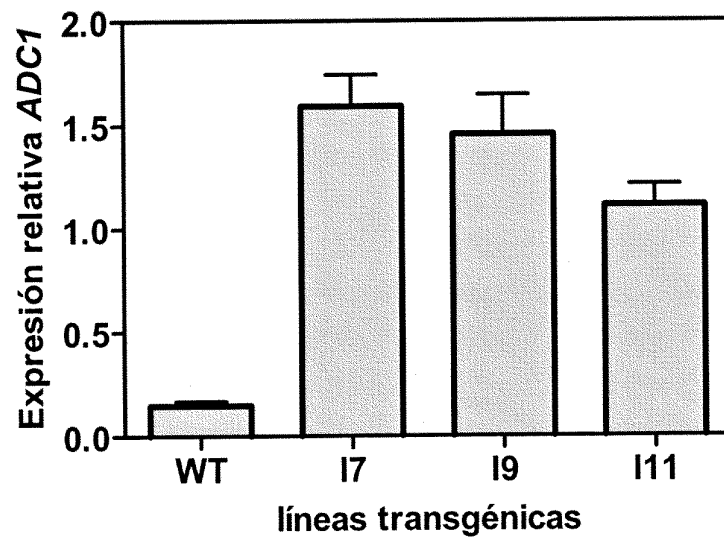
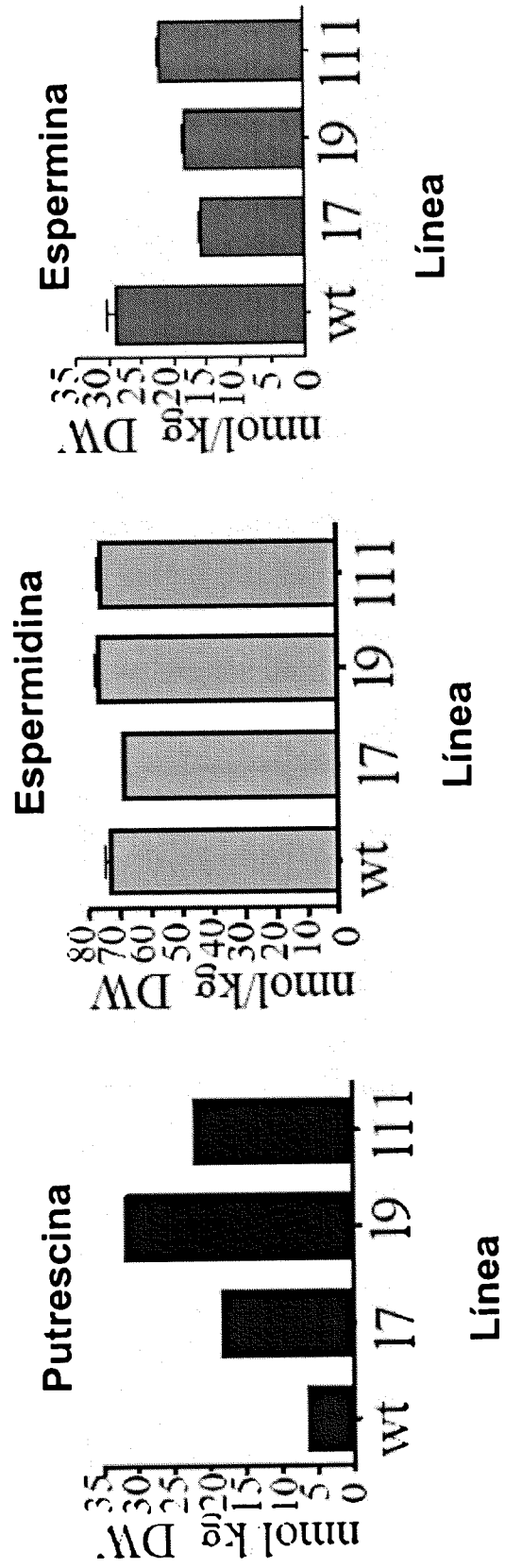


FIG. 2

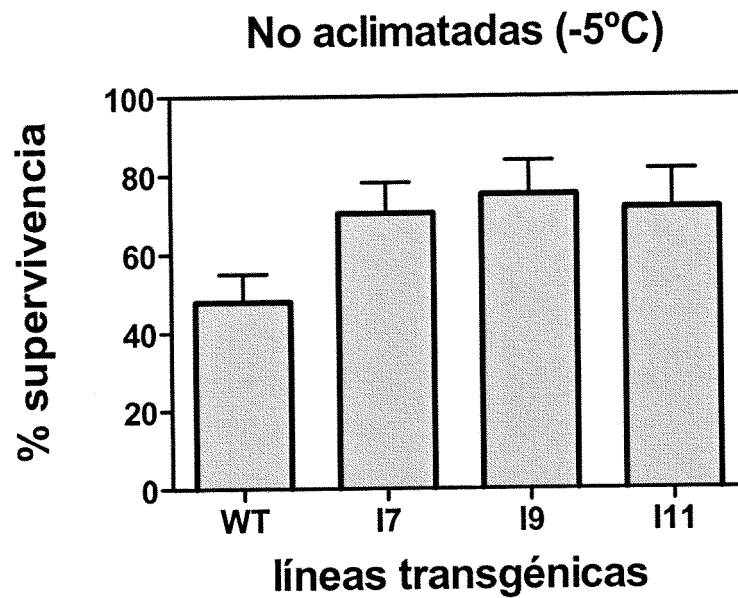


**FIG. 3**

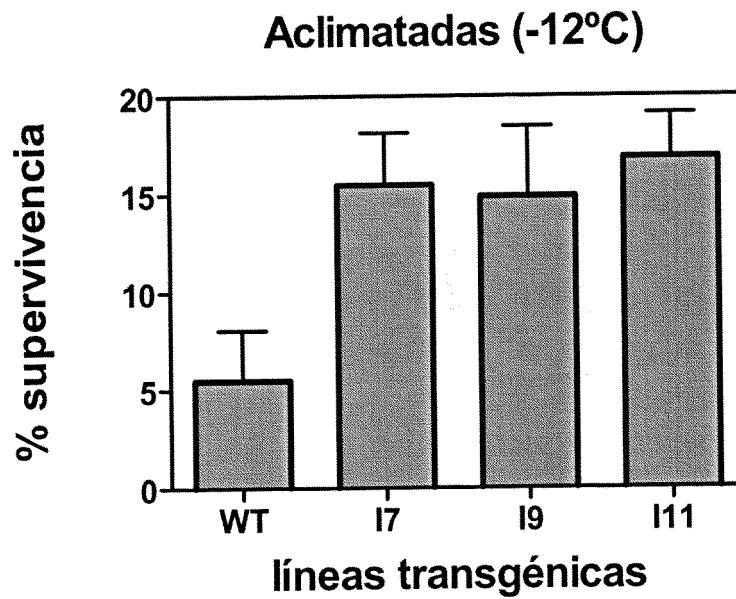


**FIG. 4**

**A)**



**B)**



# ES 2 344 877 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110>	Universidad de Barcelona Universitat de València	
5		
<120>	Planta que presenta resistencia al estrés por frío y procedimiento de producción de la misma	
<130>	B536ES00/AVCRI051	
10		
<160>	8	
<170>	PatentIn version 3.5	
15		
<210>	1	
<211>	2109	
<212>	DNA	
20	<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>	
<400>	1	
25	atgcctgctc tagcttttgt tgatactccc atcgatacct tttccagtat ctttacaccg	60
	tcgtctgttt ccaccgccgt tgttgacggg tcctgccatt ggtctccgct cctctcctcc	120
	tctctttacc gtatcgacgg atggggagct ccgtatttcg cagcgaattc ctccgggaac	180
30	atctctgttc gtcctcatgg ctcaaact ttacctcacc aagacatcga tctgatgaaa	240
	gttgtgaaga aagttacaga tccgagtggt ttaggattac agcttccgct tattgttcgt	300
35	ttccctgatg ttctgaagaa tcgtcttgag tgtcttcaat ccgcgtttga ttacgcgatt	360
	cagagtcaag gatatgattc tcattaccaa ggtgtgtatc ctgtgaaatg taatcaagat	420
40	cggtttatca tcgaagatat tgtcgaattc ggatccggtt ttcgattcgg tttagaagct	480
	ggttccaagc ctgagattct tcttgctatg agttgtttgt gtaaaggtaa tcctgaagct	540
	tttcttggtg gtaatggttt taaagactct gagtataatc cattggcttt gtttgggagg	600
45	aaacttgaat tgaatactgt tattgttctt gagcaagaag aagagcttga tttggttatt	660
	gatttgagcc agaagatgaa tgtaggcct gttattgggt taagagctaa gcttagaact	720
50	aaacattctg gtcatttttg ttctacttct ggtgagaagg ggaagtttg tttgactacg	780
	gttcagattc ttcgtgtggg gaggaagctg agtcaagttg gtatgcttga ttgtctccag	840
55	cttctgcatt ttcacattgg ttcacagatt ccgtccacgg ctttgctttc cgacggtgtg	900
	gctgaggctg cgcagcttta ctgtgagctt gtccgtcttg gtgctcatat gaaggtgatt	960
	gatattgggt gtgggttggg gattgattac gacgggtcta aatcggggga gtcggatctc	1020
60	tctgttgctt atagtctcga ggagtatgct gcagctgttg tggcttcggt taggtttggt	1080
	tgtgatcaga agtctgtgaa gcatccggtg atttgcagcg agagcggctg agccattgtg	1140
65	tctcatcact cgggtgtgat ctttgaagct gtctcagctg gtcaacaaca tgagaccct	1200

## ES 2 344 877 B1

```

actgatcatc agtttatgct tgaagggtag tctgaggaag ttcgaggaga ttacgagaat      1260
ctttatgggtg ctgctatgcg tggatgatcgt gaaagctgct tgctttatgt tgatcagctg      1320
5 aagcagagat gtgttgaagg gttcaagaa ggttccttgg gcattgaaca gtttagctggt      1380
gttgatggat tatgagagtg ggtgattaag gcgattgggtg catcggatcc ggttcttact      1440
10 taccatgtca atctatcggg tttcacttcg attcctgatt tctgggggat tgatcagctg      1500
tttctatttg ttccaatcca taaacttgac caaaggcctg ccgagagagg gatcttatcg      1560
15 gatttgacgt gtgacagcga cggaaagatc aacaagttca taggcggaga atcagagcttg      1620
ccattgcacg agatggacaa caatggctgc agcggggggc ggtactatctt gggaatgttc      1680
ctaggtggag cttatgagga agctctcggg ggagtcacaca atctgttcgg tggaccaagc      1740
20 gtgggttcgag tattgcagag cgatggacct cacggattcg cagtgaccgg tgctgtgatg      1800
ggccaatcct ctgcagatgt cctcagagca atgcagcatg agcctgagct catgtttcag      1860
25 actcttaaac accgagccga ggagccgagg aacaacaaca acaaagcttg tggtgataag      1920
gggaacgaca aactagtagt cgcacgtgtg cttgctaagt cattcaacaa catgccttat      1980
30 ctttccatgg aaacgtcaac aaacgctctc accgcagcgg tcaataacct tggcgtttac      2040
tactgagatg aagctgcagc tgggtggcggc ggcaagggca aagatgagaa ttggtcttat      2100
ttcgggttga      2109

```

<210> 2

<211> 702

<212> PRT

40 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 2

```

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

Ile Phe Thr Pro Ser Ser Val Ser Thr Ala Val Val Asp Gly Ser Cys
50           20           25           30

His Trp Ser Pro Ser Leu Ser Ser Ser Leu Tyr Arg Ile Asp Gly Trp
55           35           40           45

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

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

```

65

# ES 2 344 877 B1

Val Val Lys Lys Val Thr Asp Pro Ser Gly Leu Gly Leu Gln Leu Pro  
 85 90 95  
 5  
 Leu Ile Val Arg Phe Pro Asp Val Leu Lys Asn Arg Leu Glu Cys Leu  
 100 105 110  
 10  
 Gln Ser Ala Phe Asp Tyr Ala Ile Gln Ser Gln Gly Tyr Asp Ser His  
 115 120 125  
 15  
 Tyr Gln Gly Val Tyr Pro Val Lys Cys Asn Gln Asp Arg Phe Ile Ile  
 130 135 140  
 20  
 Glu Asp Ile Val Glu Phe Gly Ser Gly Phe Arg Phe Gly Leu Glu Ala  
 145 150 155 160  
 25  
 Gly Ser Lys Pro Glu Ile Leu Leu Ala Met Ser Cys Leu Cys Lys Gly  
 165 170 175  
 30  
 Asn Pro Glu Ala Phe Leu Val Cys Asn Gly Phe Lys Asp Ser Glu Tyr  
 180 185 190  
 35  
 Ile Ser Leu Ala Leu Phe Gly Arg Lys Leu Glu Leu Asn Thr Val Ile  
 195 200 205  
 40  
 Val Leu Glu Gln Glu Glu Glu Leu Asp Leu Val Ile Asp Leu Ser Gln  
 210 215 220  
 45  
 Lys Met Asn Val Arg Pro Val Ile Gly Leu Arg Ala Lys Leu Arg Thr  
 225 230 235 240  
 50  
 Lys His Ser Gly His Phe Gly Ser Thr Ser Gly Glu Lys Gly Lys Phe  
 245 250 255  
 55  
 Gly Leu Thr Thr Val Gln Ile Leu Arg Val Val Arg Lys Leu Ser Gln  
 260 265 270  
 60  
 Val Gly Met Leu Asp Cys Leu Gln Leu Leu His Phe His Ile Gly Ser  
 275 280 285  
 65  
 Gln Ile Pro Ser Thr Ala Leu Leu Ser Asp Gly Val Ala Glu Ala Ala  
 290 295 300  
 Gln Leu Tyr Cys Glu Leu Val Arg Leu Gly Ala His Met Lys Val Ile  
 305 310 315 320

## ES 2 344 877 B1

	Asp	Ile	Gly	Gly	Gly	Leu	Gly	Ile	Asp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly
				325						330					335	
5	Glu	Ser	Asp	Leu	Ser	Val	Ala	Tyr	Ser	Leu	Glu	Glu	Tyr	Ala	Ala	Ala
				340					345					350		
10	Val	Val	Ala	Ser	Val	Arg	Phe	Val	Cys	Asp	Gln	Lys	Ser	Val	Lys	His
			355					360					365			
15	Pro	Val	Ile	Cys	Ser	Glu	Ser	Gly	Arg	Ala	Ile	Val	Ser	His	His	Ser
		370					375					380				
20	Val	Leu	Ile	Phe	Glu	Ala	Val	Ser	Ala	Gly	Gln	Gln	His	Glu	Thr	Pro
	385					390					395					400
25	Thr	Asp	His	Gln	Phe	Met	Leu	Glu	Gly	Tyr	Ser	Glu	Glu	Val	Arg	Gly
				405						410					415	
30	Asp	Tyr	Glu	Asn	Leu	Tyr	Gly	Ala	Ala	Met	Arg	Gly	Asp	Arg	Glu	Ser
				420					425					430		
35	Cys	Leu	Leu	Tyr	Val	Asp	Gln	Leu	Lys	Gln	Arg	Cys	Val	Glu	Gly	Phe
			435					440					445			
40	Lys	Glu	Gly	Ser	Leu	Gly	Ile	Glu	Gln	Leu	Ala	Gly	Val	Asp	Gly	Leu
	450					455						460				
45	Cys	Glu	Trp	Val	Ile	Lys	Ala	Ile	Gly	Ala	Ser	Asp	Pro	Val	Leu	Thr
	465					470					475					480
50	Tyr	His	Val	Asn	Leu	Ser	Val	Phe	Thr	Ser	Ile	Pro	Asp	Phe	Trp	Gly
				485						490					495	
55	Ile	Asp	Gln	Leu	Phe	Pro	Ile	Val	Pro	Ile	His	Lys	Leu	Asp	Gln	Arg
			500						505					510		
60	Pro	Ala	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Ser	Asp	Leu	Thr	Cys	Asp	Ser	Asp	Gly
			515					520					525			
65	Lys	Ile	Asn	Lys	Phe	Ile	Gly	Gly	Glu	Ser	Ser	Leu	Pro	Leu	His	Glu
	530						535					540				
70	Met	Asp	Asn	Asn	Gly	Cys	Ser	Gly	Gly	Arg	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Met	Phe
	545					550					555					560



## ES 2 344 877 B1

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

<220>  
<223> cebador sentido directo para determinar la cantidad de ARNm de ADC1  
10  
<400> 5

gtggtgataa ggggaacgac a 21

15  
<210> 6  
<211> 25  
<212> DNA  
20 <213> Artificial

<220>  
<223> cebador sentido inverso para determinar la cantidad de ARNm de ADC1  
25  
<400> 6

caaccgaaat aagaccaatt ctcac 25

30  
<210> 7  
<211> 24  
<212> DNA  
35 <213> Artificial

<220>  
<223> cebador sentido directo para determinar la cantidad de ARNm de Actin2  
40  
<400> 7

gattcagatg cccagaagtc ttgt 24

45  
<210> 8  
<211> 20  
<212> DNA  
50 <213> Artificial

<220>  
<223> cebador sentido inverso para determinar la cantidad de ARNm de Actin2  
55  
<400> 8

tggattccag cagettccac 20

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 344 877

② Nº de solicitud: 200802145

③ Fecha de presentación de la solicitud: 11.07.2008

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	HUMMEL, I., BOURDAIS, G., GOUESBET, G. et al. Differential gene expression of ARGININE DECARBOXYLASE ADC1 and ADC2 in <i>Arabidopsis thaliana</i> : characterization of transcriptional regulation during seed germination and seedling development. <i>New Phytologist</i> . Septiembre 2004, Vol. 163, Nº 3, páginas 519-531. ISSN 0028-646X. <Doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01128.x>.	1-8
A	WO 2001011062 A2 (JOHN INNES CENTRE) 15.02.2001, página 2, línea 21 - página 3, línea 8; página 15, línea 8 - página 16, línea 21; ejemplo 1.	1-8
A	WO 2001009358 A1 (E.I. DUPONT DE NEMOURS AND COMPANY & DUPONT (UK) LIMITED) 08.02.2001, página 4, líneas 7-15; páginas 7-8; ejemplos 1,7.	1-8
A	ALCÁZAR, R., GARCÍA-MARTÍNEZ, J. L., CUEVAS, J. C. et al. Overexpression of ADC2 in <i>Arabidopsis</i> induces dwarfism and late-flowering through GA deficiency. <i>The Plant Journal</i> . Agosto 2005, Vol. 43, Nº 3, páginas 425-436. ISSN 0960-7412. <Doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02465.x>.	1-8
A	HUMMEL, I., GOUESBET, G., EL AMRANI, A. et al. Characterization of the two arginine decarboxylase (polyamine biosynthesis) paralogues of the endemic subantarctic cruciferous species <i>Pringlea antiscorbutica</i> and analysis of their differential expression during development and response to environmental stress. <i>Gene</i> . Noviembre 2004, Vol. 342, Nº 2, páginas 199-209. ISSN 0378-1119. <Doi: 10.1016/j.gene.2004.08.024>.	1-8

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

24.08.2010

Examinador

E. Relaño Reyes

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N 15/82** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

**C12N 9/88** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A01H

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, , WPI, XPESP, XPOAC, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL, UNIPROT, aaGENESEQ, EURO PATENTS, JAPAN PATENTS, US PATENS, KOREA PATENTS, EMBL All, naGENESEQ

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.08.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-8	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-8	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	HUMMEL, I. et al. New Phytologist. Septiembre 2004, Vol. 163, N° 3, páginas 519-531.	09-2004
D02	WO 2001/011062 A2	15-02-2001
D03	WO 2001/009358 A1	08-02-2001
D04	ALCÁZAR, R. et al. The Plant Journal. Agosto 2005, Vol. 43, N° 3, páginas 425-436.	08-2005
D05	HUMMEL, I. et al. Gene. Noviembre 2004, Vol. 342, N° 2, páginas 199-209.	11-2004

**Observaciones sobre documentos:**

D01 muestra un estudio sobre la activación de los promotores de ADC1 y ADC2 de *A. thaliana*. Estos promotores responden de manera distinta entre sí cuando son sometidos a diferentes estímulos. Así, parece que el promotor de ADC2 se activa en la germinación y desarrollo de las plántulas, mientras que el de ADC1 en condiciones de frío. De hecho, si la germinación y el desarrollo de la planta se produce en condiciones de frío, la actividad del promotor de ADC2 disminuye en raíz y hojas y la de ADC1 se induce en raíz y aumenta en las hojas. Por lo tanto, en *Arabidopsis*, la respuesta de las poliaminas frente al frío está relacionada con la activación del promotor de ADC1. Cabe resaltar que en este documento señalan que aunque ADC1 y 2 presentan un alto grado de homología, puede que haya diferencias en términos de especificidad de sustrato o regulación enzimática. Incluso se piensa que pueden tener localizaciones subcelulares diferentes.

En D02 se divulga la obtención de plantas transgénicas que sobreexpresan el gen ADC de avena. Tanto en el caso del tabaco como en el del arroz, se han conseguido distintos resultados dependiendo del promotor utilizado, alterándose la producción de poliaminas de diferente manera y presentando en algunos casos alteraciones fenotípicas visibles. En este ejemplo concreto, los autores presentan una planta transgénica de arroz sin alteraciones fenotípicas aparentes, utilizando el promotor constitutivo de la ubiquitina 1 de maíz, mientras que el uso de otro promotor constitutivo (CaMV 35S) producía arroz con alteraciones fenotípicas.

D03 anticipa el hecho de que plantas de arroz y tabaco transgénicas con el gen ADC presentan alteraciones fenotípicas, parece que debido a un incremento en la concentración de putrescina. Sin embargo, en este documento se desarrolla trigo transgénico que sobreexpresa ADC y que no tiene este problema. Esto se consiguió mediante la elección del promotor 1Dx5 del gen Glu-1D-1 de trigo cv. Cheyenne, que solo se expresa en la semilla. Así, se obtuvo trigo transgénico de las variedades cadenza e imp, detectándose en ambos casos un aumento de la concentración de putrescina, aunque tan solo en la variedad imp se vio un aumento de espermina y espermidina.

En D04 se consigue una planta transgénica de *A. thaliana* que sobreexpresa ADC2. Esta planta tiene la concentración de putrescina aumentada, manteniéndose los niveles de espermina y espermidina inalterados. Dichas plantas presentan enanismo y retraso en la floración, aparentemente debido al incremento en la concentración de putrescina.

En D05 se investiga el patrón de expresión de ADC1 y 2 de *Pringlea antiscorbutica*. En esta planta, los patrones de expresión de ambos genes difieren mucho de los encontrados en *A. thaliana*, siendo ADC2 el que se activa en respuesta a las bajas temperaturas. Por lo tanto, se concluye que el sistema de ADC duplicado no es idéntico en todas las especies de la familia Brassicaceae en términos de posible función y regulación, lo que implica que habrá que hacer estudios individualizados en las diferentes especies de interés.

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El problema que pretende resolver la presente solicitud, es el desarrollo de plantas más resistentes al estrés por bajas temperaturas. Con tal fin, los solicitantes han obtenido plantas transgénicas que sobreexpresan el gen ADC1 (arginina descarboxilasa 1) de *Arabidopsis thaliana*. Estas plantas no tienen alteraciones fenotípicas visibles, y según la especie modificada, presentan:

Hoja adicional

acumulación de putrescina, el nivel de espermidina inalterado y un descenso en la concentración de espermina, en el caso de *Arabidopsis thaliana*; o un incremento en el nivel de putrescina y la concentración de espermina y espermidina inalterada, en *Nicotiana tabacum*. Por lo tanto, es objeto de la presente solicitud, un método de obtención de plantas resistentes al estrés por bajas temperaturas, que comprende transformar células de la planta con el gen ADC1 de *A. thaliana* de secuencia SEQ. ID. NO. 1, aumentándose de este modo la expresión de ADC1 (reivindicaciones de la 1 a la 6). También se reivindica una planta transformada obtenible por dicho método (reivindicación 7) y el uso del gen ADC1 de *A. thaliana*, para conferir resistencia al estrés por bajas temperaturas a una planta (reivindicación 8).

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y 8.1 LP)

#### 1. REIVINDICACIONES DE LA 1 A LA 6

El objeto de la presente solicitud, según la reivindicación 1, es un método para obtener plantas con resistencia mejorada al estrés por bajas temperaturas, que comprende transformar células de una planta con la secuencia del gen ADC1 de *A. thaliana*.

D01 anticipa la posible relación entre la sobreexpresión de ADC1 y la resistencia al frío de *Arabidopsis*, ya que su promotor se sobreexpresa en condiciones de baja temperatura.

D02 y D03 presentan plantas transgénicas que sobreexpresan ADC de avena. Aunque consiguen arroz y trigo transgénico con fenotipos inalterados, en ambos documentos se divulga el hecho de que, con frecuencia, la sobreexpresión de ADC conlleva plantas con alteraciones fenotípicas visibles. Por otro lado, en D04 se anticipa *A. thaliana* transgénicas que sobreexpresan ADC2 de *Arabidopsis*, y que presentan enanismo y retraso en la floración.

Aunque parece evidente la relación de ADC1 de *A. thaliana* con la respuesta al frío en la planta, la obtención de una planta transgénica con éxito no es evidente. Esto es debido a que los intentos de obtención de plantas transgénicas que sobreexpresen proteínas de la misma familia que ADC1 y que actúan sobre el mismo punto de la ruta metabólica, han tenido resultados dispares, tal y como se muestra en los documentos D02, D03 y D04. Parece que la elección de uno u otro tipo de promotor o de una variedad u otra dentro de la misma especie, podrían influir en la obtención de plantas fenotípicamente normales. Además, no se deduce de manera evidente si este problema es debido a un determinado patrón en la concentración de las poliaminas, ya que mientras que en D04 se opina que los problemas de desarrollo pueden ser debidos al incremento de putrescina, en D03 se consiguen variedades de trigo en las que solo hay un aumento de putrescina y que no tienen problemas fenotípicos. Sin embargo, la presente solicitud consigue transformar plantas de *A. thaliana*, *Nicotiana tabacum* y *Lycopersicon esculentum* con ADC1 de *A. thaliana* bajo el control del promotor CaMV35S (cuyo uso produjo problemas en D02) y que conservan inalterado su fenotipo.

En consecuencia, se considera que la reivindicación 1 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva.

Las reivindicaciones de la 2 a la 6 son dependientes de la reivindicación 1, y como ella también son nuevas y tienen actividad inventiva.

#### 2. REIVINDICACIÓN 7

La reivindicación 7 tiene por objeto una planta obtenida mediante la transformación con el gen ADC1 de *A. thaliana*.

Dados los argumentos desarrollados en el punto 1, la reivindicación 7 presenta novedad y actividad inventiva.

#### 3. REIVINDICACIÓN 8

El objeto de la reivindicación 8, es el uso de ADC1 de *A. thaliana* para conferir resistencia al estrés por bajas temperaturas a una planta.

En vista de los razonamientos del apartado 1, la reivindicación 8 también cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva.