



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 314 131**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02801941 .2**

96 Fecha de presentación : **10.10.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1442127**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.08.2004**

54 Título: **Plantas tolerantes al estrés.**

30 Prioridad: **24.10.2001 GB 0125522**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2009

73 Titular/es: **Plant Bioscience Limited**
Norwich Research Park, Colney Lane
Norwich, Norfolk NR4 7UH, GB

72 Inventor/es: **Palatnik, Javier, Fernando;**
Fillat-Castejón, María, Francisca;
Carrillo, Néstor;
Valle, Estela, Marta y
Tognetti, Vanessa, Beatriz

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

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

DESCRIPCIÓN

Plantas tolerantes al estrés.

5 La presente invención se refiere a procedimientos para mejorar la tolerancia al estrés ambiental de plantas y a plantas con dicha tolerancia al estrés mejorada. Más particularmente, la invención se refiere al descubrimiento de que la expresión de una flavoproteína tal como flavodoxina en el interior de células vegetales es beneficiosa para las plantas que están sometidas a estrés ambiental.

10 El estrés ambiental es un factor limitante principal para la productividad vegetal y el rendimiento de cultivos. Muchos de los procesos perjudiciales que experimentan plantas expuestas a condiciones ambientales adversas están mediados por especies de oxígeno reactivo (ROS) que se generan en los cloroplastos a través del funcionamiento defectuoso del aparato fotosintético (Foyer, C. H. *et al.* (1994) *Plant Cell Environ.* 17, 507-523, Hammond-Kosack, K. E. y Jones, J. D. G. (1996) *Plant Cell* 8, 1773-1791, Allen, R. (1995) *Plant Physiol.* 107, 1049-1054).

15 La autooxidación de componentes de la cadena de transporte de electrones fotosintética conduce a la formación de radicales superóxido y sus derivados, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo. Estos compuestos reaccionan con una amplia diversidad de biomoléculas (de forma más ostensible con ADN), causando estasis celular y muerte.

20 Para hacer frente a los efectos perjudiciales de las especies de oxígeno reactivo (ROS), los organismos aerobios han desarrollado sistemas de defensa antioxidante muy eficaces que están constituidos por constituyentes tanto enzimáticos como no enzimáticos. En diferentes tejidos y órganos, los antioxidantes desempeñan funciones protectoras diferentes y a menudo complementarias, tales como eliminación directa de ROS, reemplazo de biomoléculas sensibles a oxidantes dañadas y actividades de reparación de ADN (Fridovich, I. (1997). *J. Biol. Chem.* 272, 1851-1857). Al menos parte de la respuesta celular frente al estrés oxidativo es de una naturaleza adaptativa e implica la síntesis *de novo* de miembros obligados de la barrera antioxidante. Se han reconocido diversas respuestas multigénicas en la bacteria aerobia facultativa *Escherichia coli*, incluyendo las moduladas por los regulones *soxRS* y *oxyR* (Hidalgo, E. y Demple, B. (1996). In *Regulation of Gene Expression in Escherichia coli*, Molecular Biology Intelligence Unit Series (E. C. C. Lin y A. S. Lynch, eds.), págs. 434-452, Austin, TX: R. G. Landis).

30 La respuesta *soxRS* parece estar específicamente adaptada para enfrentarse a los desafíos impuestos por la exposición de las células a radicales superóxido o a óxido nítrico. Se han identificado muchos componentes diferentes de la respuesta, incluyendo dos flavoproteínas solubles: ferredoxina-NADP⁺ reductasa (FNR) que contiene FAD y su sustrato asociado en la cadena de electrones flavodoxina (Liochev *et al.* (1994) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 1328-1331, Zheng, M. *et al* (1999) *J. Bacteriol.* 181, 4639-4643).

35 Las flavodoxinas son pequeñas proteínas monoméricas (Pm 18.800) que contienen una molécula de FMN unido no covalentemente (Razquin, P. *et al* (1988) *J. Bacteriol.* 176, 7409-7411). La FNR es capaz de usar, con eficacias aproximadamente similares, tanto la flavodoxina como la proteína de hierro-azufre ferredoxina como sustratos para su actividad NADP(H) oxidoreductasa. En cianobacterias, la expresión de flavodoxina se induce en condiciones de privación de hierro, cuando no puede sintetizarse ferredoxina.

40 Como parte de la respuesta *soxRS* de *E. coli*, tanto los niveles de FNR como de flavodoxina aumentan más de veinte veces tras el tratamiento de la bacteria con compuestos de propagación de superóxido tales como el herbicida de ciclado redox metil viológeno (MV), mientras que no se afectan las cantidades de ferredoxina (Rodríguez, R. E. *et al* (1998) *Microbiology* 144, 2375-2376). A diferencia de la FNR y ferredoxinas, que están ampliamente distribuidas entre plastos, mitocondrias y bacterias, la aparición de flavodoxina parece estar restringida en gran medida a bacterias. No se han aislado flavodoxinas de tejidos vegetales y no se ha reconocido ningún homólogo de flavodoxina en el genoma de *Arabidopsis thaliana* (The Arabidopsis Genome Initiative (2000) *Nature* 408, 796-815).

50 La presente invención se refiere al descubrimiento de que líneas vegetales que se han modificado por ingeniería genética para expresar un polipéptido de flavodoxina, presentan una tolerancia muy aumentada en comparación con plantas de control sin tratar cuando se exponen a una plétora de condiciones ambientales adversas.

55 En diversos aspectos, la presente invención proporciona ácidos nucleicos y vectores adecuados para el uso en procedimientos de producción de plantas tolerantes al estrés. En realizaciones preferidas, dichos ácidos nucleicos y vectores proporcionan la acumulación de polipéptido flavodoxina en el interior de los cloroplastos de células vegetales transformadas con los mismos. En algunas realizaciones de la invención, la acumulación en el interior de los cloroplastos se consigue por fusión del polipéptido flavodoxina con un polipéptido de dirección al cloroplasto heterólogo.

60 Un primer aspecto de la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de fusión que comprende un polipéptido de flavodoxina y un péptido de dirección al cloroplasto heterólogo.

65 Un polipéptido de flavodoxina puede ser un polipéptido de flavodoxina bacteriano, por ejemplo, un polipéptido de flavodoxina de cianobacterias, tal como la flavodoxina de la cianobacteria *Anabaena PCC7119* (Fillat M. *et al* (1991) *Biochem J.* 280 187-191). Otros polipéptidos de flavodoxina adecuados incluyen flavodoxinas de bacterias anoxigénicas fotosintéticas, enterobacterias, diazotrofas y algas. Se ejemplifican en la Tabla 1 ejemplos de polipéptidos de flavodoxina adecuados para el uso de acuerdo con la presente invención. Aunque se prefiere un polipéptido de

flavodoxina de tipo salvaje, un polipéptido de flavodoxina puede ser también un fragmento, mutante, derivado, variante o alelo de dicha secuencia de tipo salvaje.

Son fragmentos, mutantes, derivados, variantes y alelos adecuados los que codifican una proteína que conserva las características funcionales del polipéptido codificado por el gen de flavodoxina de tipo salvaje, especialmente la capacidad para actuar como un antioxidante. Los cambios en una secuencia para producir un mutante, variante o derivado pueden ser por uno o más de adición, inserción, delección o sustitución de uno o más nucleótidos en el ácido nucleico, conduciendo a la adición, inserción, delección o sustitución de uno o más aminoácidos en el polipéptido codificado. Por supuesto, se incluyen cambios en el ácido nucleico que no generan diferencias en la secuencia de aminoácidos codificada.

Los polipéptidos de flavodoxina son flavoproteínas hidrófilas monoméricas de una masa molecular de menos de 20 kDa, que contienen un mol de mononucleótidos de flavina unidos no covalentemente (FMN) por molécula de apoproteína. El grupo flavina puede disociarse de forma reversible mediante un tratamiento ácido suave.

Los polipéptidos de flavodoxina se involucran en reacciones de transferencia de un electrón con varios asociados en la cadena de electrones tales como FNR, piruvato-flavodoxina reductasa y fotosistemas, que reemplazan a la ferredoxina en la mayoría de sus actividades. A pesar de que en principio la flavodoxina puede intercambiar dos electrones, se comporta como un transportador de un electrón obligatorio. Al contrario que otras flavoproteínas, la semiquinona semirreducida y la hidroquinona completamente reducida son las especies más estables, y éstas son las formas relevantes para las funciones de la flavodoxina.

Un polipéptido que es un miembro de la familia de la flavodoxina o que es una variante de secuencia de aminoácidos, alelo, derivado o mutante del mismo puede comprender una secuencia de aminoácidos que comparte una identidad de secuencia superior a aproximadamente el 30% con la secuencia de la flavodoxina de *Anabaena* PCC7119, superior a aproximadamente el 35%, superior a aproximadamente el 40%, superior a aproximadamente el 45%, superior a aproximadamente el 55%, superior a aproximadamente el 65%, superior a aproximadamente el 70%, superior a aproximadamente el 80%, superior a aproximadamente el 90% o superior a aproximadamente el 95%. La secuencia puede compartir una similitud superior a aproximadamente el 30% con la flavodoxina de *Anabaena* PCC7119, una similitud superior a aproximadamente el 40%, una similitud superior a aproximadamente el 50%, una similitud superior a aproximadamente el 60%, una similitud superior a aproximadamente el 70%, una similitud superior a aproximadamente el 80% o una similitud superior a aproximadamente el 90%.

En ciertas realizaciones, un polipéptido de flavodoxina puede demostrar una escasa homología global, digamos de aproximadamente el 20%, o de aproximadamente el 25%, o de aproximadamente el 30%, o de aproximadamente el 35%, o de aproximadamente el 40%, o de aproximadamente el 45% con la secuencia de flavodoxina de *Anabaena* PCC7119, a pesar de que posea la misma actividad antioxidante. Sin embargo, en dominios o regiones funcionalmente significativas, la homología de aminoácidos puede ser mucho mayor. Por ejemplo, un polipéptido de flavodoxina comprende un dominio de unión a FMN que tiene una homología elevada con el dominio de unión a FMN de la flavodoxina (un dominio similar a flavodoxina). Pueden identificarse dominios o regiones funcionalmente significativas supuestas usando procesos de bioinformática, incluyendo la comparación de las secuencias de homólogos.

La similitud y la identidad de secuencia se definen comúnmente con respecto al algoritmo GAP (Genetics Computer Group, Madison, WI). GAP usa el algoritmo de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias completas que maximiza el número de emparejamientos y minimiza el número de huecos. Generalmente se usan los parámetros por defecto, con una penalización por creación de huecos = 12 y una penalización por extensión de huecos = 4.

Puede preferirse el uso de GAP, pero pueden usarse otros algoritmos, por ejemplo, BLAST (que usa el procedimiento de Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 405-410), FASTA (que usa el procedimiento de Pearson y Lipman (1988) *PNAS USA* 85: 2444-2448), o el algoritmo de Smith-Waterman (Smith y Waterman (1981) *J. Mol. Biol.* 147: 195-197) o el programa TBLASTN de Altschul *et al.* (1990) anteriormente, empleando por lo general los parámetros por defecto. En particular, puede usarse el algoritmo psi-Blast (*Nucl. Acids Res.* (1997) 25 3389-3402).

La similitud permite una "variación conservativa", es decir, la sustitución de un resto hidrófobo tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, o la sustitución de un resto polar por otro, tal como arginina en lugar de lisina, glutámico en lugar de ácido aspártico o glutamina en lugar de asparagina. Las variantes de secuencia de aminoácidos particulares pueden diferir de una secuencia polipeptídica de flavodoxina conocida, como se describe en este documento, por inserción, adición, sustitución o delección de 1 aminoácido, 2, 3, 4, 5-10, 10-20, 20-30, 30-50 o más de 50 aminoácidos.

Puede realizarse una comparación de secuencias sobre la longitud completa de la secuencia pertinente descrita en este documento o, más preferiblemente, puede ser sobre una secuencia contigua de aproximadamente o de más de aproximadamente 20, 25, 30, 33, 40, 50, 70, 120, 170 o más aminoácidos o tripletes de nucleótidos en comparación con la secuencia de aminoácidos o con la secuencia de nucleótidos pertinente, según el caso.

Se conocen bien en la técnica otros procedimientos adecuados para el uso en la identificación de polipéptidos de flavodoxina.

Un péptido de dirección al cloroplasto adecuado para el uso de acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención puede ser cualquier secuencia peptídica que dirija a un polipéptido al cloroplasto de una célula vegetal. Pueden identificarse fácilmente péptidos adecuados por un especialista y se muestran algunos ejemplos en la Tabla 2. Pueden encontrarse otros ejemplos en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>). En algunas realizaciones preferidas, un péptido puede tener el polipéptido de tránsito al cloroplasto de la FNR del guisante, que tiene la secuencia que se muestra en la Figura 6.

En otras realizaciones de la presente invención, el polipéptido de flavodoxina puede acumularse en el interior de los cloroplastos como resultado de la expresión dentro del cloroplasto del ácido nucleico que codifica el polipéptido después de la transformación directa del cloroplasto. No existe la necesidad de un péptido de dirección o de tránsito en dichas realizaciones.

Son particularmente adecuados para la transformación directa de cloroplastos procedimientos de bombardeo de partículas (Ruf, S. *et al.* (2201) *Nature Biotechnol.* 19, 870-875). Con elementos reguladores de plantas adecuados, el ADN transformado puede transcribirse en el interior del plasto y traducirse en un polipéptido en los ribosomas del estroma.

Un ácido nucleico, que codifica cualquier polipéptido de flavodoxina como se ha definido anteriormente, puede usarse de acuerdo con la presente invención con cualquier péptido de dirección al cloroplasto adecuado, como se ha definido anteriormente. La selección particular de polipéptido de flavodoxina y péptido de dirección no es crítica para la práctica de la presente invención. Preferiblemente, el polipéptido de flavodoxina no se fusiona con un péptido de dirección con el que se asocia de forma natural, es decir, se fusiona con un polipéptido de dirección heterólogo. Los polipéptidos de flavodoxina, que no se encuentran en plantas, no están asociados de forma natural con señales de dirección al cloroplasto.

En algunas realizaciones preferidas, un polipéptido de fusión que comprende un polipéptido de flavodoxina y un péptido de dirección al cloroplasto heterólogo pueden tener la secuencia que se muestra en la Figura 4. Una molécula de ácido nucleico adecuada que codifica dicho polipéptido de fusión puede tener la secuencia que se muestra en la Figura 3.

La presente invención también proporciona una construcción o vector de ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión, que comprende un polipéptido de flavodoxina y un péptido de dirección al cloroplasto heterólogo, preferiblemente, una construcción o vector a partir del cual puede expresarse el polipéptido de fusión codificado por la secuencia de ácido nucleico. Preferiblemente, la construcción o vector es adecuado para la transformación y/o la expresión en el interior de una célula vegetal.

Una construcción o vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con este aspecto de la presente invención no necesita incluir un promotor u otra secuencia reguladora, particularmente si el vector se va a usar para introducir el ácido nucleico en células para la recombinación en el genoma.

Sin embargo, una construcción de ácido nucleico puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de flavodoxina unido operativamente a una secuencia reguladora específica de plantas, tal como un promotor. Dichas construcciones son particularmente útiles en realizaciones en las que los cloroplastos se transforman directamente con ácido nucleico, que posteriormente se expresa en los mismos bajo el control del elemento regulador específico de plantas.

Una secuencia o elemento regulador específico de plantas es una secuencia que dirige de forma preferencial la expresión (es decir, la transcripción) de un ácido nucleico en el interior de una célula vegetal con respecto a otros tipos celulares. Por ejemplo, la expresión de dichas secuencia se reduce o suprime en células no vegetales, tales como células bacterianas o de mamíferos. Una secuencia reguladora adecuada puede proceder, por ejemplo, de un virus de plantas tal como del 35S del virus del mosaico de la coliflor. Una secuencia reguladora puede ser inducible, como se describe adicionalmente a continuación. Los vectores de acuerdo con la presente invención pueden comprender dicha secuencia de ácido nucleico.

Otros aspecto de la presente invención proporciona el uso de un ácido nucleico como se describe en este documento en la producción de una planta transgénica. Dicho procedimiento puede ser para mejorar la tolerancia de una planta al estrés, en particular un estrés ambiental, tal como estrés oxidativo. Dicho estrés puede ser de naturaleza biótica, abiótica o xenobiótica y puede incluir la exposición a herbicidas, radiación ultravioleta AB, temperaturas extremas, infección, por ejemplo, con un patógeno necrotizante tal como una bacteria u hongo y/o altas dosis de irradiación.

Por supuesto, el ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario, ADNc o ADN genómico o ARN. El ácido nucleico puede ser totalmente o parcialmente sintético dependiendo del diseño. Naturalmente, el especialista entenderá que cuando el ácido nucleico de acuerdo con la invención incluye ARN, las referencias a la secuencia mostrada deben interpretarse como referencias al equivalente de ARN, con las T sustituidas por U. La presente invención también incluye el producto de expresión de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico descritas y procedimientos de generación del producto de expresión mediante la expresión a partir del ácido nucleico codificante, por lo tanto, en condiciones adecuadas en células hospedadoras adecuadas.

Los especialistas en la técnica son muy capaces de construir vectores y diseñar protocolos para la expresión de genes recombinantes, por ejemplo, en una célula microbiana o vegetal. Pueden seleccionarse o construirse vectores adecuados que contienen las secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, fragmentos de terminación, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias, según sea apropiado. Para detalles adicionales véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 2ª edición, Sambrook *et al*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión de genes y análisis de proteínas se describen en detalle en *Protocols in Molecular Biology*, Segunda edición, Ausubel *et al*. Eds., John Wiley & Sons, 1992. Se describen procedimientos y vectores específicos usados anteriormente con gran éxito en plantas por Bevan, *Nucl. Acids Res.* (1984) 12, 8711-8721 y Guerineau y Mullineaux, (1993) *Plant transformation and expression vectors*. En: *Plant Molecular Biology Labfax* (Croy RRD ed) Oxford, BIOS Scientific Publishers, págs. 121-148.

Una secuencia de ácido nucleico como se describe en este documento, por ejemplo, una secuencia que codifica un polipéptido de flavodoxina, puede estar bajo el control operativo de una secuencia reguladora activa en plantas para el control de la expresión. De hecho, se prefiere que la secuencia codificante esté unida operativamente a una o más secuencias reguladoras que pueden ser heterólogas o extrañas para el gen (es decir, una secuencia no bacteriana), por ejemplo, una secuencia reguladora de plantas. Dichas secuencias reguladoras pueden proporcionar una expresión eficaz en el interior de una célula vegetal.

El término “heterólogo” puede usarse para indicar que el gen o la secuencia de nucleótidos en cuestión se ha introducido en dichas células de la planta, o de un antecesor de la misma, usando medios recombinantes o de ingeniería genética, es decir, por intervención humana. Las secuencias de nucleótidos heterólogas, o exógenas o extrañas para una célula vegetal pueden ser de origen no natural en células de este tipo, variedad o especie. Por ejemplo, no existen informes de flavodoxinas en células vegetales y, por lo tanto, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de flavodoxina es “heterólogo” para una célula vegetal transformada con el mismo.

Una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de flavodoxina puede incluir un promotor inducible unido operativamente a la secuencia del ácido nucleico. Dicho promotor puede ser un promotor inducible por estrés. Como se ha analizado, esto permite el control de la expresión, por ejemplo, en respuesta a un estrés ambiental. La invención también proporciona plantas transformadas con dicha construcción génica y procedimientos que incluyen la introducción de dicha construcción en una célula vegetal y/o la inducción de la expresión de una construcción en el interior de una célula vegetal, por ejemplo, por aplicación de un estímulo adecuado que puede ser un estímulo de estrés ambiental, tal como un cambio en las condiciones externas.

El término “inducible”, como se aplica a un promotor, se entiende bien por los especialistas en la técnica. En esencia, la expresión bajo el control de un promotor inducible “conecta” o aumenta en respuesta a un estímulo aplicado (que puede generarse en el interior de una célula o proporcionarse exógenamente). La naturaleza del estímulo varía entre promotores. Cualquiera que sea el nivel de expresión en ausencia del estímulo, la expresión de cualquier promotor inducible se aumenta en presencia del estímulo correcto. La situación preferible es cuando el nivel de expresión aumenta tras la presencia del estímulo pertinente en una cantidad eficaz para alterar una característica fenotípica, es decir, para mejorar la tolerancia al estrés. Por lo tanto, puede usarse un promotor inducible (o “conectable”) que provoca un nivel básico de expresión en ausencia del estímulo cuyo nivel es demasiado bajo para ocasionar el fenotipo tolerante al estrés deseado (y, de hecho, puede ser cero). Tras la aplicación del estímulo, que puede ser, por ejemplo, un aumento en el estrés ambiental, la expresión se aumenta (o se conecta) hasta un nivel que provoca una tolerancia al estrés aumentada.

Se conocerán muchos ejemplos de promotores inducibles por los especialistas en la técnica.

Otros promotores adecuados pueden incluir el promotor del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S) que se expresa a un nivel elevado en prácticamente todos los tejidos vegetales (Benfey *et al*, (1990) *EMBO J* 9: 1677-1684); el promotor de meri-5 de la coliflor, que se expresa en el meristemo apical vegetativo, así como en varias posiciones bien localizadas en el cuerpo de la planta, por ejemplo, floema interno, primordio de la flor, puntos de ramificación de raíces y del vástago (Medford, J. I. (1992) *Plant Cell* 4, 1029-1039; Medford *et al*, (1991) *Plant Cell* 3, 359-370) y el promotor LEAFY de *Arabidopsis thaliana*, que se expresa muy temprano en el desarrollo de la flor (Weigel *et al*, (1992) *Cell* 69, 843-859).

Las construcciones y vectores pueden comprender además marcadores genéticos de selección que consisten en genes quiméricos que confieren fenotipos seleccionables, tales como resistencia a antibióticos tales como kanamicina, higromicina, fosfotricina, clorsulfurón, metotrexato, gentamicina, espectinomicina, imidazolinonas y glifosato.

Cuando se introduce una construcción génica seleccionada en una célula, deben tenerse en cuenta ciertas consideraciones bien conocidas por los especialistas en la técnica. El ácido nucleico que se va a insertar debería ensamblarse dentro de una construcción que contiene elementos reguladores eficaces que dirigirán la transcripción. Debe estar disponible un procedimiento de transporte de la construcción hacia el interior de la célula. Una vez que la construcción está en el interior de la membrana celular, la integración en el material cromosómico endógeno puede producirse o

no. Por último, en lo que se refiere a las plantas, el tipo celular diana debe ser tal que las células puedan regenerarse en plantas completas. Pueden usarse procedimientos bien conocidos por los especialistas en la técnica para introducir construcciones y vectores de ácidos nucleicos en células vegetales para producir plantas transgénicas del fenotipo tolerante al estrés apropiado.

La transformación con *Agrobacterium* es un procedimiento ampliamente usado por los especialistas en la técnica para transformar especies de dicotiledóneas. Actualmente también es rutinaria la producción de plantas transgénicas estables y fértiles en casi todas las plantas monocotiledóneas económicamente relevantes: (Toriyama, *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6, 1072-1074; Zhang, *et al.* (1988) *Plant Cell Rep.* 7, 379-384; Zhang, *et al.* (1988) *Theor Appl Genet* 76, 835-840; Shimamoto, *et al.* (1989) *Nature* 338, 274-276; Datta, *et al.* (1990) *Bio/Technology* 8, 736-740; Christou, *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9, 957-962; Peng, *et al.* (1991) International Rice Research Institute, Manila, Filipinas 563-574; Cao, *et al.* (1992) *Plant Cell Rep.* 11, 585-591; Li *et al.* (1993) *Plant Cell Rep.* 12, 250-255; Rathore, *et al.* (1993) *Plant Molecular Biology* 21, 871-884; Fromm, *et al.* (1990) *Bio/Technology* 8, 833-839; Gordon-Kamm, *et al.* (1990) *Plant Cell* 2, 603-618; D'Halluin, *et al.* (1992) *Plant Cell*, 4, 1495-1505; Walters, *et al.* (1992) *Plant Molecular Biology* 18, 189-200; Kozziel, *et al.* (1993) *Biotechnology* 11, 194-200; Vasil, I. K. (1994) *Plant Molecular Biology* 25, 925-937; Weeks, *et al.* (1993) *Plant Physiology* 102, 1077-1084; Somers, *et al.* (1992) *Bio/Technology* 10, 1589-1594; documento WO92/14828). En particular, actualmente la transformación mediada por *Agrobacterium* es un procedimiento de transformación alternativo muy eficaz en monocotiledóneas (Hiei *et al.* (1994) *The Plant Journal* 6, 271-282).

La generación de plantas transgénicas fértiles se ha conseguido en los cereales arroz, maíz, trigo, avena y cebada (revisado en Shimamoto, K. (1994) *Current Opinion in Biotechnology* 5, 158-162.; Vasil, *et al.* (1992) *Bio/Technology* 10, 667-674; Vain *et al.*, 1995, *Biotechnology Advances* 13 (4): 653-671; Vasil, 1996, *Nature Biotechnology* 14 página 702). Wan y Lemaux (1994) *Plant Physiol.* 104: 37-48 describen técnicas para la generación de grandes cantidades de plantas de cebada fértiles transformadas de forma independiente.

Puedan preferirse otros procedimientos, tales como el bombardeo de partículas o microproyectiles (documentos US5100792, EP-A-444882, EP-A-434616), electroporación (documentos EP 290395, WO 8706614), microinyección (documentos WO 92/09696, WO 94/00583, EP 331083, EP 175966, Green *et al.* (1987) *Plant Tissue and Cell Culture*, Academic Press), captación directa de ADN (documentos DE 4005152, WO 9012096, US 4684611), captación de ADN mediada por liposomas (por ejemplo, Freeman *et al.* *Plant Cell Physiol.* 29: 1353 (1984)) o el procedimiento de agitación vorticial (por ejemplo, Kindle, *PNAS U.S.A.* 87: 1228 (1990d) cuando la transformación con *Agrobacterium* sea ineficiente o ineficaz.

Se revisan procedimientos físicos para la transformación de células vegetales en Oard, 1991. *Biotech. Adv.* 9: 1-11.

Como alternativa, puede emplearse una combinación de técnicas diferentes para mejorar la eficacia del proceso de transformación, por ejemplo, bombardeo con micropartículas recubiertas con *Agrobacterium* (documento EP-A-486234) o bombardeo de microproyectiles para inducir lesiones seguido de cocultivo con *Agrobacterium* (documento EP-A-486233).

Después de la transformación, una planta puede regenerarse, por ejemplo, a partir de células individuales, tejido calloso o discos de hojas, como es convencional en la técnica. Casi cualquier planta puede regenerarse completamente a partir de células, tejidos y órganos de la planta. Se revisan técnicas disponibles en Vasil *et al.*, *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol I, II y III, Laboratory Procedures and Their Applications, Academic Press, 1984, y Weissbach y Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, 1989.

La selección particular de una tecnología de transformación se determinará por su eficacia para transformar ciertas especies vegetales, así como por la experiencia y preferencia de la persona que practique la invención con una metodología particular de elección. Será evidente para el especialista que la elección particular de un sistema de transformación para introducir un ácido nucleico en células vegetales no es esencial para ni una limitación de la invención, ni lo es la elección de la técnica para la regeneración de plantas.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un procedimiento de producción de una célula que incluye incorporar una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de flavodoxina, o un vector de ácido nucleico que comprende dicha secuencia, en la célula por medio de transformación. Dicho procedimiento de producción de una célula puede incluir recombinar el ácido nucleico con el ácido nucleico del genoma celular, de tal modo que se incorpore de forma estable en el mismo. Una planta puede regenerarse a partir de una o más células transformadas, como se ha descrito.

El polipéptido de flavodoxina, el ácido nucleico codificante y/o el vector que comprende el ácido nucleico son preferiblemente heterogéneos, es decir, exógenos o extraños para la célula vegetal transformada con los mismos.

Un procedimiento de producción de una célula vegetal puede incluir expresar el ácido nucleico y provocar o permitir la acumulación de polipéptido de flavodoxina expresado por el mismo en el cloroplasto de dicha célula vegetal.

Un procedimiento de generación de dicha célula vegetal puede incluir la introducción de dicha secuencia de nucleótidos o de un vector adecuado que incluye la secuencia en una célula vegetal y provocar o permitir la recombinación entre el vector y el genoma de la célula vegetal, para introducir la secuencia de ácido nucleico en el genoma.

Un procedimiento puede incluir además la propagación sexual o asexual o el crecimiento de prole o de un descendiente de la planta regenerada a partir de dicha célula vegetal.

La invención incluye además una célula hospedadora transformada con una secuencia de ácido nucleico o vector como se ha expuesto anteriormente, es decir, que contiene un ácido nucleico o vector como se ha descrito anteriormente, especialmente una célula vegetal, por ejemplo, una célula de una planta superior o una célula microbiana. Por lo tanto, se proporciona una célula hospedadora, tal como una célula vegetal, que incluye una secuencia de nucleótidos como se ha indicado en este documento. Dentro de la célula, la secuencia de nucleótidos puede incorporarse en el interior del cromosoma o puede ser extracromosómica. Puede haber más de una secuencia de nucleótidos heteróloga por genoma haploide. Esto permite, por ejemplo, una expresión aumentada del producto génico en comparación con los niveles endógenos, como se analiza a continuación. Una secuencia de ácido nucleico comprendida en el interior de una célula vegetal puede colocarse bajo el control de un promotor génico inducible externamente, ya sea para situar la expresión bajo el control del usuario o para proporcionar la expresión en respuesta al estrés.

Un ácido nucleico que se incorpora de forma estable en el genoma de una planta se pasa de generación en generación a los descendientes de la planta, pudiendo expresar las células de dichos descendientes el polipéptido de flavodoxina codificado y pudiendo así tener una tolerancia al estrés o a patógenos aumentada.

Una célula vegetal puede contener una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica un polipéptido de flavodoxina como resultado de la producción de la secuencia de ácido nucleico en una célula antecesora.

En algunas realizaciones, el polipéptido de flavodoxina puede expresarse en el interior de la célula vegetal como parte de un polipéptido de fusión que también comprende un péptido de dirección al cloroplasto heterólogo.

Una célula vegetal, como se describe en este documento, puede estar comprendida en una planta, una parte de planta o un propágulo de planta, o un extracto o derivado de una planta como se describe a continuación.

También se proporcionan plantas que incluyen una célula vegetal como se describe en este documento, junto con cualquier parte o propágulo de las mismas, semilla, progenie de autopolinización o híbrida y descendientes. Se proporcionan particularmente plantas superiores transgénicas, especialmente plantas de cultivo, que se han modificado por ingeniería genética para llevar genes identificados, como se ha indicado anteriormente. Los ejemplos de plantas adecuadas incluyen tabaco, calabazas, zanahoria, crucíferas vegetales, melones, pimientos, vides, lechuga, fresa, colza, remolacha azucarera, trigo, cebada, maíz, arroz, soja, guisantes, sorgo, girasol, tomate, patata, pimienta, crisantemo, clavel, álamo, eucalipto y pino.

Una planta de acuerdo con la presente invención puede ser una que no presente una reproducción pura en una o más propiedades. Pueden excluirse variedades de plantas, particularmente variedades de plantas registrables, de acuerdo con los derechos de criadores de plantas. Se señala que no es necesario que una planta se considere una “variedad vegetal” simplemente porque contenga de forma estable dentro de su genoma un transgén introducido en una célula de la planta o de un antecesor de la misma.

Además de una planta, la presente invención proporciona cualquier clon de dicha planta, semilla, progenie de autopolinización o híbrida y descendientes, y cualquier parte o propágulo de cualquiera de éstas, tal como esquejes y semillas, que pueden usarse en la reproducción o propagación sexual o asexual. También se incluyen en la invención una planta que es una prole, clon o descendiente propagado sexualmente o asexualmente de dicha planta, o cualquier parte o propágulo de dicha planta, prole, clon o descendiente.

La presente invención también incluye el producto de expresión polipeptídico de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, como se describe en este documento. Dicho polipéptido aislado puede consistir en un polipéptido de fusión que comprende o consiste en un polipéptido de flavodoxina y un péptido de dirección al cloroplasto heterólogo. El péptido de dirección al cloroplasto puede ser heterólogo a, es decir, extraño o normalmente o naturalmente no asociado con el polipéptido de flavodoxina.

Un polipéptido preferido incluye la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Figura 4. Dicho polipéptido de fusión puede estar codificado por una secuencia de ácido nucleico como se describe en este documento, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la Figura 3.

También se proporcionan procedimientos de generación de dicho producto de expresión mediante la expresión a partir de una secuencia de nucleótidos codificante, por lo tanto, en condiciones adecuadas en células hospedadoras adecuadas, por ejemplo, *E. coli*. Los especialistas en la técnica son muy capaces de construir vectores y diseñar protocolos y sistemas para la expresión y recuperación de productos de expresión de genes recombinantes.

La invención proporciona además un procedimiento de potenciación, mejora o aumento de la tolerancia al estrés de una planta, que incluye expresar una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica un polipéptido de flavodoxina (es decir, provocar o permitir la transcripción a partir de un ácido nucleico) en el interior de células de la planta.

La tolerancia al estrés mejorada puede incluir una tolerancia mejorada o aumentada al estrés ambiental tal como radiación ultravioleta UV, temperaturas extremas, irradiación y/o infección por patógenos, por ejemplo, infección bacteriana o fúngica, en particular patógenos necrotizantes, con respecto a plantas normales sin tratar.

La capacidad de una planta para tolerar estrés puede aumentarse mediante la expresión de una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica un polipéptido de flavodoxina en el interior de células de una planta (produciendo de este modo el polipéptido codificado), después de una etapa más temprana de introducción de la secuencia de nucleótidos en una célula de la planta o de un antecesor de la misma. Dicho procedimiento puede aumentar la tolerancia de plantas al estrés y/o la resistencia a patógenos.

Preferiblemente, dicho procedimiento incluye provocar o permitir la acumulación del polipéptido de flavodoxina en el interior de los cloroplastos de dichas células, por ejemplo, por expresión del ácido nucleico en el interior de los cloroplastos de dichas células, o proporcionar el transporte de la proteína expresada hacia el interior de los cloroplastos. El nivel de polipéptido de flavodoxina en los cloroplastos se aumenta o potencia por encima de los niveles normales endógenos del polipéptido de flavodoxina como resultado de dicha expresión.

En algunas realizaciones, la acumulación en cloroplastos se consigue mediante la expresión de una proteína de fusión que comprende el polipéptido de flavodoxina y un péptido de dirección al cloroplasto heterólogo.

Pueden realizarse experimentos de control según sea apropiado en los procedimientos descritos en este documento. El funcionamiento de controles adecuados está bien dentro de la competencia y la capacidad de un especialista en el campo.

Diversos aspectos y realizaciones adicionales de la presente invención serán evidentes para los especialistas en la técnica en vista de la presente descripción.

Ciertos aspectos y realizaciones de la invención se ilustrarán a continuación a modo de ejemplo y con respecto a las figuras que se describen a continuación.

Breve descripción de las figuras y tablas

La Figura 1 muestra que la expresión de flavodoxina aumenta la resistencia a la toxicidad del metil viológeno en plantas de tabaco transgénicas.

La Figura 2 muestra un esquema del vector binario pCAMBIA2200 que contiene un fragmento de la fusión en la fase de lectura abierta entre las secuencias que codifican el péptido de tránsito de la FNR del guisante y el gen de flavodoxina. El casete insertado en el sitio Eco RI de pCAMBIA2200 se construyó previamente en *pDH51*. Este fragmento de Eco RI contenía el promotor 35S de CaMV, el gen quimérico de flavodoxina y la señal de poliadenilación de CaMV35S.

La Figura 3 muestra la secuencia de nucleótidos de las fusiones en la fase de lectura abierta del péptido de tránsito de la FNR del guisante con el gen de flavodoxina. El codón de inicio (ATG) del péptido de tránsito y el codón de inicio de la flavodoxina (ATG) se indican en negrita y el codón de terminación (TAA) está subrayado.

La Figura 4 muestra la secuencia proteica predicha del péptido de tránsito y de la proteína flavodoxina.

La Figura 5 muestra la secuencia de amino ácidos del péptido de tránsito al cloroplasto de la FNR del guisante.

La Figura 6 muestra la secuencia de ácido nucleico del péptido de tránsito al cloroplasto de la FNR del guisante.

La Tabla 1 muestra los detalles de las bases de datos de genes de flavodoxina conocidos de una diversidad de microbios.

La Tabla 2 muestra los detalles de las bases de datos de péptidos de dirección al cloroplasto conocidos.

Parte experimental

Materiales y procedimientos

Construcción de vectores Ti para la expresión de flavodoxina

Se obtuvo un fragmento de ADN que codifica la flavodoxina de *Anabaena* PCC7119 mediante amplificación por PCR del gen clonado (Fillat, M. F. *et al* (1991) *Biochem. J.* 280, 187-191) a partir de los cebadores 5'-GACGAGCTCT

CATAATGTCAAAG-3' y; 5'-ACTGTCGACTTTTACAAACCAAAT-3', complementarios a las posiciones -14 a 9 y 515 a 540, respectivamente.

Para facilitar manipulaciones adicionales, se introdujo un sitio de reconocimiento para *SacI* (GAGCTC) en el cebador del extremo 5' y un sitio *SalI* (GTCGAC) en el cebador del extremo 3'. Las condiciones de PCR eran de 30 ciclos de 60 s a 94°C, 90 s a 52°C y 90 s a 72°C, usando 1 ng de ADN molde y 50 pmol de cada cebador en un medio que contenía Tris-HCl 10 mM a pH 8,4, KCl 5 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP y 5 unidades de Taq ADN polimerasa. Después de completarse los 30 ciclos, las reacciones se incubaron a 72°C durante 10 min. Se digirió un fragmento de PCR purificado de la longitud predicha (540 pb) con *SacI* y *SalI*. El fragmento se clonó en sitios compatibles de un plásmido recombinante derivado de pUC9 que codifica el precursor de FNR completo (Ceccarelli, E. A. *et al* (1991) J. Biol. Chem. 266, 14283-14287) entre los sitios de restricción para *BamHI* y *SalI* y del que se había eliminado un fragmento de ADN que codifica la región madura de la FNR del guisante por digestión con *SacI* y *SalI*. Esto generaba una fusión en la fase de lectura abierta del péptido de tránsito al cloroplasto procedente de la FNR con la proteína flavodoxina.

La secuencia del gen quimérico se determinó en ambas cadenas y se escindió del plásmido correspondiente por digestión con *BamHI* y *SalI*. Después, el fragmento de 710 pb se clonó entre el promotor 35S de CaMV y las regiones de poliadenilación de pDH51 (Pietrzak, M. *et al* (1986) Nucleic Acids Res. 14, 5857-5868). El casete completo se aisló adicionalmente como un fragmento *EcoRI* y se insertó en el sitio *EcoRI* del vector binario pCambia2200 (Hajdukiewicz, P. *et al* (1994) Plant Mol. Biol. 25, 989-994). La construcción se movilizó por último a la cepa LBA 4404 de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación (Ausubel, F. M. *et al* (1987) Current Protocols in Molecular Cloning. Nueva York, NY: John Wiley and Sons).

Transformación de plantas y caracterización

Se llevó a cabo la transformación de discos de hojas de tabaco usando técnicas convencionales (Gallois, P. y Marinho, P. (1995) Plant gene transfer and expression protocols. En Methods in Molecular Biology (H. Jones, ed.), vol. 49, págs. 39-49. Humana Press Inc., Totowa, NJ) y se analizaron adicionalmente las progenies de los transformantes resistentes a kanamicina. La presencia del gen de flavodoxina en las líneas transgénicas se evaluó mediante hibridación por transferencia de Southern usando procedimientos convencionales. Se autopolinizaron transformantes primarios que expresaban niveles elevados de flavodoxina bacteriana, según se evaluaron por SDS-PAGE e inmunotransferencia (Krapp, A. R. *et al* (1997) Eur. J. Biochem. 249, 556-563), y todos los experimentos posteriores se llevaron a cabo con la progenie homocigota.

Se germinaron semillas de plantas de control y transgénicas en medio sólido de Murashige-Skoog (MS) suplementado con sacarosa al 2% (p/v) y, en el caso de los transformantes, kanamicina 100 µg ml⁻¹. Después de dos semanas a 25°C y 200 µmol quanta m⁻² s⁻¹ (14 h de luz/10 h de oscuridad) se transplantaron almácigos a medio MS fresco en recipientes Magenta. Cuando fue necesario, se sembraron plántulas de cuatro semanas de edad en el suelo o se cultivaron hidropónicamente en medio de nutrientes (Geiger, M. *et al*. (1999) Plant Cell Environ. 22, 1177-1199). Se incluyó MV en la solución de riego. Se troquelaron discos de hojas de 12 mm de diámetro a partir de hojas jóvenes completamente expandidas de plantas de tabaco de dos meses de edad cultivadas en el suelo. Los discos se pesaron y se pusieron en flotación individualmente boca arriba en 1 ml de agua destilada estéril que contenía las cantidades indicadas de MV en placas de 24 pocillos, se infiltraron al vacío y se incubaron en la oscuridad durante 2 h a 25°C para permitir la difusión del MV hacia la hoja. Los pocillos se iluminaron con una fuente de luz blanca a 500 µmol quanta m⁻² s⁻¹. Los controles se mantuvieron en la oscuridad. Se midió la pérdida de electrolitos de los discos de hojas durante el estrés por MV como la conductividad del medio con un medidor de conductividad Horiba modelo B-173.

Para evaluar la tolerancia de los transformantes que expresaban flavodoxina a temperaturas extremas, se expusieron plántulas de dos semanas de edad a 500 µmol quanta m⁻² s⁻¹ plántulas a 8°C o 40°C durante 12 h. Los tratamientos con luz se llevaron a cabo en plantas de cuatro semanas de edad, por concentración de un haz de luz (8 cm de diámetro) de 2000 µmol quanta m⁻² s⁻¹ en la superficie superior de la tercera o cuarta hoja completamente expandida con la ayuda de un cañón de luz durante 18 h a 25°C. Se ensayó la tolerancia a la radiación ultravioleta AB por exposición de plantas de cuatro semanas de edad a una combinación de UV-A (315-400 nm a 2,2 W m⁻²), UV-B (250-315 nm a 1,0 W m⁻²) y radiación fotosintética activa (67 µmol quanta m⁻² s⁻¹) durante 24 h a 25°C. Las lámparas UV se envolvieron en papel de acetato de celulosa (0,076 mm de grosor) para filtrar cualquier radiación UV-C (<280 nm). Se midieron las intensidades UV con un radiómetro UV-AB (Macam photometrics LTD, Escocia).

Exposición a patógenos de plantas

Se cultivaron células de *X. campestris* pv. *vesicatoria* a DO₆₀₀ 1,3 en medio PYDAC (Vernière, C. *et al* (1991) Fruits 46, 162-170). La tercera y cuarta hojas por encima del hipocótilo de plantas de tabaco de control y transgénicas de ocho semanas de edad se inocularon con una suspensión de estas bacterias en NaCl al 0,85% (p/v).

Se cultivaron aislados de la cepa CEREMIC 1333 de *Alternaria alternata* durante seis días en agar dextrosa de patata. La exposición de hojas de tabaco al patógeno se llevó a cabo usando dos procedimientos diferentes. En uno de los procedimientos, se escindieron discos de 7 mm a partir de cultivos fúngicos y se colocaron en capas sobre la superficie de hojas cortadas colocadas en agar al 1,5% (p/v) en placas de Petri. Las placas se incubaron a 25°C esencialmente como se describe por Deák, *et al*. (Deák, M. *et al*. (1999) Nature Biotechnol. 17, 192-196). Como

alternativa, se resuspendieron conidios de un cultivo saturado en 500 μl de agua destilada estéril y se infiltraron en la superficie superior de las hojas correspondientes con ayuda de una jeringa sin aguja.

En todos los casos, se evaluaron los síntomas por estimación de los diámetros de las áreas de hojas necrotizadas.

Procedimientos analíticos

Se midió la asimilación de dióxido de carbono en respuesta a cambios en la PPFD incidente en la segunda hoja completamente expandida de 4 plantas transgénicas y de control de cuatro semanas de edad usando un analizador de gases por infrarrojos Qubit Systems Inc. (IRGA) Package (Kingston, Canadá). Se determinó el contenido de clorofila en hojas y plastos usando procedimientos convencionales (Lichtenthaler, H. K. (1987) *Methods Enzymol*, 148, 350-382).

Resultados

Expresión de flavodoxina de Anabaena PCC 7119 en cloroplastos de tabaco transgénico

Para expresar la flavodoxina de cianobacterias en plastos de tabaco, se preparó un gen quimérico en el que se fusionaba la región codificante de la flavodoxina (Fillat, M. F. *et al* (1991) *Biochem. J.* 280, 187-191)) en la fase de lectura abierta con la secuencia de ADN que codifica el péptido de tránsito al cloroplasto de la FNR del guisante (Newman, B. J. y Gray, J. C. (1988) *Plant Mol. Biol.* 10, 511-520) (para detalles, véanse los Métodos). La construcción se clonó en un vector binario de *Agrobacterium* bajo el control del promotor constitutivo del gen 35S de CaMV y se administró a células de tabaco a través de la transformación de discos de hojas mediada por *Agrobacterium*.

Se recuperaron las plantas resistentes a kanamicina a partir de cultivo tisular y se evaluaron para determinar la acumulación de flavodoxina por inmunotransferencia.

Las proteínas extraídas a partir de transformantes primarios muestreados (pf15-pf12) o partir de una muestra de tabaco de tipo salvaje (PH) se resolvieron por SDS-PAGE y se tiñeron con azul brillante de Coomassie o se transfirieron sobre membranas de nitrocelulosa y se sondaron con antisueros generados contra la flavodoxina de *Anabaena PCC7119* usando técnicas convencionales (Krapp, A. R. *et al.* (1997), anteriormente). Se cargaron las proteínas correspondientes a 16 mm² de tejido foliar en cada carril del gel. Se reconocieron plantas homocigotas (pf15-8 y pf15-6), heterocigotas (pf15-7) y segregantes (pf15-22) típicas en base a sus contenidos de flavodoxina.

Una banda reactiva de tamaño maduro podía detectarse a diversos niveles en extractos de hojas obtenidos de varios transformantes, sugiriendo la importación de plastos y el procesamiento de la flavoproteína expresada. La inmunodetección de la flavodoxina en fracciones de cloroplastos purificados a partir de plantas transformadas confirmó que la proteína bacteriana se dirigía a los plastos.

Se autopolinizaron transformantes primarios que presentaban niveles elevados de expresión de flavodoxina y que contenían un solo locus de inserción del transgén por genoma, según se evaluó por hibridación de transferencia de Southern, y se seleccionaron adicionalmente líneas homocigotas por dosificación de la flavodoxina.

La flavodoxina bacteriana dirigida al cloroplasto promueve una tolerancia a la toxicidad del metil viológeno en tabaco transgénico

Se cultivaron plántulas transgénicas (pf15-8) o de tipo salvaje (PH) de dos semanas de edad en caldo de agar MS que contenía MV 15 μM o 30 μM y se iluminaron a 300 μmol quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 24 h a 25°C. Se expusieron plantas de cuatro semanas de edad cultivadas bajo condiciones hidropónicas a MV 30 μM en la solución de nutrientes, usando el tiempo de incubación y el régimen de luz descrito anteriormente.

Se observó que las plántulas de dos semanas de edad que expresaban flavodoxina sobrevivían al tratamiento con 30-50 μM del propagador de radicales superóxido MV en placas de agar iluminadas, mientras que los controles de tabaco sin transformar se decoloraban ampliamente en las mismas condiciones. Las plantas de cuatro semanas de edad eran más tolerantes al MV, pero todavía eran evidentes diferencias significativas entre plantas transgénicas y los descendientes de las mismas plantas parentales de tipo salvaje (Figura 1).

Se realizaron experimentos para demostrar la tolerancia de discos de hojas competentes para flavodoxina a MV, como se ha descrito anteriormente. Se percibía visualmente una decoloración del tejido de las hojas en los discos de control, reflejando una degradación de la clorofila aumentada. Los valores de conductancia se corrigieron por la pérdida de iones que se producía en la oscuridad en las mismas condiciones. Los valores de la pérdida de iones de cada muestra se expresaron como porcentaje del contenido iónico total (valor máximo obtenido después del autoclavado de los discos de hojas al final del tratamiento con MV). Los contenidos de clorofila se expresaron como la fracción del contenido de clorofila total de discos de hojas incubados en las mismas condiciones en ausencia de MV. Las alturas de las barras verticales representan las medias de cuatro experimentos con un ET inferior al 15% (Figura 1).

Se observó que una superproducción de flavodoxina proporcionaba protección frente a la pérdida de iones inducida por MV (que es indicativa del deterioro de la membrana celular) y la decoloración de discos de hojas de plantas de dos

meses de edad. En todos los casos, el grado de daño disminuía a medida que se aumentaban los niveles del flavodoxina cloroplástica.

La flavodoxina protege a la plantas de tabaco frente a temperaturas extremas e irradiación

Se expusieron transformantes de la generación F₁ (pfl5-8) y los descendientes de las mismas plantas parentales de tipo salvaje (PH) a 40°C, tasas de fluencia elevada o radiación ultravioleta UV-AB, como se describe en los Métodos. Se usaron plantas de cuatro semanas de edad en todos los casos, excepto para los experimentos de calentamiento, en los que se emplearon muestras de dos semanas de edad.

Para investigar las diferencias en la sensibilidad a la refrigeración en plantas de tabaco de tipo salvaje y que expresan flavodoxina, se germinaron semillas de planta de control y transgénicas en medio sólido MS suplementado con sacarosa al 2% (p/v) durante dos semanas a 25°C y 200 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (14 h de luz/10 h de oscuridad). Se transfirieron almácigos a 9°C en el mismo régimen de luz durante otras dos semanas, permitiendo que las plantas se aclimataran. Después de eso, se iluminaron de forma continua (500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante una semana más a 9°C.

Para investigar la tolerancia a un déficit de agua de tabaco transgénico que expresa flavodoxina, se cultivaron plantas durante dos semanas en MS, como se ha descrito anteriormente, y después se transfirieron al suelo y se regaron diariamente con solución de nutrientes. El estrés por déficit de agua se aplicó a plantas de dos meses de edad por negación de agua durante hasta 3 días. Todas las demás condiciones de cultivo eran las mismas que las descritas en los Métodos.

Los transformantes presentaban una tolerancia aumentada a este régimen de sequía, mientras que los daños en las plantas de control se reflejaban por un abrasamiento y/o decoloración de las hojas generalizado, con disminuciones concomitantes en los contenidos de clorofila y en las capacidades fotosintéticas.

Se descubrió que las plántulas de tabaco jóvenes que acumulaban flavodoxina sobrevivían a una iluminación prolongada (500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 12 h) a 40°C y presentaban una tolerancia aumentada a la refrigeración. En condiciones similares, almácigos de control de tipo salvaje se dañaron seriamente.

La exposición de las plantas a radicación ultravioleta AB (UV-AB), intensidades de luz extremadamente elevadas o deficiencia de agua produjo esencialmente los mismos resultados que anteriormente.

Los daños causados por estos tratamientos en plantas de tabaco de control se reflejaban por una decoloración generalizada del tejido de la hoja, con disminuciones concomitantes en los contenidos de clorofila y en las capacidades fotosintéticas.

Daños reducidos en transformantes de tabaco que expresan flavodoxina expuestas a patógenos necrotróficos

Se inocularon plantas de tabaco de control y que expresaban flavodoxina cultivadas en el invernadero durante ocho semanas con una suspensión de la bacteria patógena *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, que se sabe que induce una respuesta hipersensible en tabaco (Baker, C. J. y Orlandi, E. W. (1995) Ann. Rev. Phytopathol. 33, 299-321). El número de síntomas necróticos se redujo drásticamente en los transformantes que expresaban la proteína de cianobacterias, con una correlación negativa entre el grado de daños y los niveles de flavodoxina acumulados en el tejido correspondiente.

Se realizó una infección fúngica con *A. alternata* usando dos procedimientos diferentes. En primer lugar, se colocaron en capas discos de 7 mm escindidos de cultivos fúngicos sobre la superficie de hojas cortadas colocadas en agar al 1,5% (p/v) en placas de Petri. Las placas se incubaron a 25°C esencialmente como se describe por Deák *et al* (Deák *et al* (1999) anteriormente) durante 10 días. En segundo lugar, se colocó un disco de papel de filtro embebido en conidios de un cultivo saturado (aproximadamente 20.000 conidios) sobre la superficie superior de las hojas correspondientes. Se observaron los síntomas en las hojas después de 18 días de infección fúngica.

Se observó que las plantas transgénicas eran más tolerantes que los descendientes de las mismas plantas parentales de tipo salvaje a la necrosis inducida por infección con el hongo patógeno *Alternaria alternata*.

Para investigar la necrotización de hojas de tipo salvaje y transgénicas de tabaco después de la infección por virus necrótico del tabaco, se plantaron plantas en el suelo y se cultivaron durante tres semanas a 25°C y 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con 14 h de luz/10 h de oscuridad, como se describe en los Métodos. Las hojas en la tercera posición por encima del hipocótilo se inocularon con una suspensión del virus necrótico del tabaco, con un abrasivo y se mantuvieron en las mismas condiciones de cultivo. Se examinaron las lesiones después de una semana desde la inoculación.

Se observó que las plantas transgénicas eran más tolerantes que los descendientes de las mismas plantas parentales de tipo salvaje a la necrosis inducida por infección con el virus necrótico del tabaco.

Por lo tanto, se observó que la expresión de flavodoxina en células vegetales protegía a las plantas transgénicas frente a patógenos que causan lesiones necróticas.

ES 2 314 131 T3

TABLA 1

Nº de acceso		Gen	Especie
NP_358768	gil15903218	Flavodoxina	Streptococcus pneumoniae R6
NP_345761	gil15901157	Flavodoxina	Streptococcus pneumoniae TIGR4
NP_311794	gil15833021	flavodoxina 2	Escherichia coli 0157:H7]
NP_311593	gil15832820	flavodoxina supuesta	Escherichia coli 0157:H7
NP_308742	gil15829969	flavodoxina 1	Escherichia coli O157:H
CAC92877	gil15980620	flavodoxina 1	Yersinia pestis
CAC89737	gil15978964	flavodoxina 2	Yersinia pestis
NP_350007	gil15896658	Flavodoxina	Clostridium acetobutylicum
NP_349066	gil15895717	Flavodoxina	Clostridium acetobutylicum
NP_347225	gil15893876	Flavodoxina	Clostridium acetobutylicum
NP_346845	gil15893496	Flavodoxina	Clostridium acetobutylicum
NP_348645	gil15895296	Flavodoxina predicha	Clostridium acetobutylicum
NP_347225	gil15893876	Flavodoxina	Clostridium acetobutylicum
NP_346845	gil15893496	Flavodoxina	Clostridium acetobutylicum
NP_282528	gil15792705	Flavodoxina	Campylobacter jejuni
AAK28628	gil13507531	Flavodoxina	Aeromonas hydrophila
NP_268951	gil15674777	Flavodoxina supuesta	Streptococcus pyogenes
NP_266764	gil15672590	Flavodoxina	Lactococcus lactis subespecie lactis
NP_207952	gil15645775	flavodoxina (fldA)	Helicobacter pylori 26695
NP_232050	gil15642417	flavodoxina 2	Vibrio cholerae
NP_231731	gil15642099	flavodoxina 1	Vibrio cholerae
NP_219360	gil15639910	Flavodoxina	Treponema pallidum
NP_24012	gil15616909	Flavodoxina 1	Buchnerasp. APS
NP_214435	gil15607053	Flavodoxina	Aquifex aeolicus
FXAVEP	gil1625194	flavodoxina	Azotobacter vinelandii
S38632	gil481443	flavodoxina	-Synechocystis sp. (cepa PCC 6803)
FXDV	gil1476442	flavodoxina	Desulfovibrio vulgaris
A34640	gil97369	flavodoxina	Desulfovibrio salexigens
S24311	gil97368	flavodoxina	Desulfovibrio gigas (ATCC 19364)
A37319	gil95841	flavodoxina A	Escherichia coli

ES 2 314 131 T3

Nº de acceso		Gen	Especie
S06648	gil81145	flavodoxina	Alga roja (Chondrus crispus)
S04600	gil79771	flavodoxina	Anabaena variabilis
A28670	gil79632	flavodoxina	Synechococcus sp
S02511	gil78953	flavodoxina	Klebsiella pneumoniae
FXDVD	gil65884	flavodoxina	Desulfovibrio desulfuricans (ATCC 29577)
FXCLEX	gil65882	flavodoxina	Clostridium sp
FXME	gil65881	flavodoxina	Megasphaera elsdenii
NP_071157	gil11499913	flavodoxina, supuesta	Archaeoglobus fulgidus
BAA17947	gil1653030	flavodoxina	Synechocystis sp. PCC 6803
BAB61723	gil14587807	flavodoxina 2	Vibrio fischeri
BAB61721	gil14587804	flavodoxina 1	Vibrio fischeri
AAK66769	gil14538018	flavodoxina	Histophilus ovis
P57385	gil11132294	FLAVODOXINA	
AAC7593	gil789262	flavodoxina 2	Escherichia coli K12
AAC73778	gil786900	flavodoxina 1	Escherichia coli K12
AAC75752	gil789064	flavodoxina supuesta	Escherichia coli K12
F69821	gil7429905	homólogo de flavodoxina yhcB	Bacillus subtilis
QQKBFP	gil2144338	piruvato (flavodoxina) deshidrogenasa nifJ	Klebsiella pneumoniae
S16929	gil95027	flavodoxina A	Azotobacter chroococcum
F71263	gil7430914	flavodoxina probable	Syphilis spirochete
A64665	gil7430911	flavodoxina	Helicobacter pylori(cepa 26695
JE0109	gil7430907	flavodoxina	Desulfovibrio vulgaris
S42570	gil628879	flavodoxina	Desulfovibrio desulfuricans (ATCC 27774)
BAB13365	gil10047146	flavodoxina	Alteromonas sp. 0-7
AAF34250	gil6978032	flavodoxina	Desulfovibrio gigas
CAB73809	gil6968816	flavodoxina	Campylobacter jejuni
D69541	gil7483302	homólogo de flavodoxina	Archaeoglobus fulgidus
F70479	gil7445354	flavodoxina	Aquifex aeolicus
S55234	gil1084290	isoforma I de flavodoxina	Chlorella fusca
S18374	gil2117434	flavodoxina	Anabaena sp. (PCC 7119)

ES 2 314 131 T3

Nº de acceso		Gen	Especie
555235	gil1084291	isoforma II de flavodoxina	Chlorella fusca
C64053	gil1074088	flavodoxina A	Haemophilus influenzae (cepa Rd KW20)
A61338	gil625362	flavodoxina	Clostridium pasteurianum
A39414	gil95560	flavodoxina	Plásmido pEA3 de Enterobacter agglomerans
AAD08207	gil2314319	flavodoxina (fldA)	Helicobacter pylori 26695
CAB37851	gil4467982	flavodoxina	Rhodobacter capsulatus
AAC65882	gil3323245	flavodoxina	Treponema pallidum
AAB88920	gil2648181	flavodoxina, supuesta	Archaeoglobus fulgidus
AAB65080	gil2289914	flavodoxina	Klebsiella pneumoniae
AAB53659	gil710356	flavoprotein	Methanothermobacter thermautotrophicus
AAB51076	gil1914879	flavodoxina	Klebsiella pneumoniae
AAB36613	gil398014	flavodoxina	Azotobacter chroococcum
AAB20462	gil239748	flavodoxina	Anabaena
AAA64735	gil142370	flavodoxina (nifF)	Azotobacter vinelandii
BAA35341	gil1651296	flavodoxina	Escherichia coli
BAA35333	gil1651291	flavodoxina	Escherichia coli
AAA27288	gil415254	flavodoxina	Synechocystis sp.
AAA27318	gil154528	flavodoxina	Synechococcus sp.
AAC45773	gil1916334	flavodoxina supuesta	Salmonella typhimurium
AAC07825	gil2984302	flavodoxina	Aquifex aeolicus
AAC02683	gil2B65512	flavodoxina	Trichodesmium erythraeum

ES 2 314 131 T3

TABLA 2

Nº de Acceso		Gen	Especie
P32260	gil12644209	CISTEÍNA SINTASA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Spinacia oleracea
AAG599 96	gil12658639	ferredoxina:sulfito reductasa precursora	Glycine max
S10200	gil100078	carbonato deshidratasa precursora	Pisum sativum
CAB892 87	gil7672161	proteína similar a FtsZ del cloroplasto	Nicotiana tabacum
P17067	gil115471	ANHIDRASA CARBÓNICA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO (CARBONATO DESHIDRATASA)	Pisum sativum
AAD221 09	gil4530595	hemooxigenasa 2	Arabidopsis thaliana
AAD221 08	gil4530593	hemooxigenasa 1	Arabidopsis thaliana
AAC500 35	gil450235	APS quinasa	Arabidopsis thaliana
AAC128 46	gil1051180	fitoeno desaturasa	Zea mays
AAB875 73	gil2645999	proteína de unión a clorofila a/b de la LHCII de tipo I precursora	Panax ginseng
CAA473 29	gil312944	cisteína sintasa	Spinacia oleracea
CAA311 37	gil41201	O-acetilserina sulfhidrilasa	Escherichia coli
AAA820 68	gil1079732	cpFtsZ	Arabidopsis thaliana
T06368	gil7489040	proteína 1 precursora del complejo de desprendimiento de oxígeno del fotosistema II	Lycopersicon esculentum
S71750	gil7488813	proteína precursora de 100 K asociada a intermedio de importación	Pisum sativum
S71749	gil7459239	proteína precursora de DCL, cloroplasto	Lycopersicon esculentum
1582588 3	Gil1582588 3	Cadena B, estructura de la treonina sintasa	Arabidopsis thaliana
1582588 2	gil15825882	Cadena A, estructura de la treonina sintasa	Arabidopsis thaliana
T09543	gil7488970	desoxixilulosa sintasa TKT2 precursora	Capsicum annuum
JC5876	gil7447856	proteína precursora temprana inducible por luz	Glycine max
P24493	gil1170215	ÁCIDO DELTA-AMINOLEVULÍNICO DESHIDRATASA PRECURSORA	Spinacia oleracea
S47966	gil076532	proteína de transferencia de lípidos probable M30 precursora	Pisum sativum
A44121	gil322404	proteína ribosómica S1 precursora	Spinacia oleracea
S01056	gil81896	proteína precursora temprana inducida por luz	Pisum sativum

ES 2 314 131 T3

Nº de Acceso		Gen	Especie
022773	gil7388292	PROTEÍNA LUMINAL DEL TILACOIDE DE 16,5 KDA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
P80470	gil6093830	PROTEÍNAS DEL COMPLEJO DEL NÚCLEO DEL FOTOSISTEMA II PBSY PRECURSORAS	Spinacia oleracea
P55195	gil709930	FOSFORRIBOSILAMINOIMIDAZOL CARBOXILASA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Vigna aconitifolia
P11970	gil1709654	PLASTOCIANINA B, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Populus nigra
P00299	gil1709651	PLASTOCIANINA A, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Populus nigra
P80484	gil1709608	PROTEÍNA 1 PRECURSORA DE PERIDININA-CLOROFILA A	Amphidinium carterae
P08823	gil134102	SUBUNIDAD ALFA DE LA PROTEÍNA DE UNIÓN A LA SUBUNIDAD DE LA RUBISCO PRECURSORA	Triticum aestivum
P04045	gil130173	ALFA-1,4-GLUCANO FOSFORILASA, L-1 ISOZIMA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Solanum tuberosum
S30897	gil7427677	3-isopropilmalato deshidrogenasa precursora	Solanum tuberosum
TXSPM	gil7427615	tiorredoxina m precursora	Spinacia oleracea
FEKM	gil7427604	ferredoxina [2Fe-2S] precursora	Chlamydomonas reinhardtii
CCKM6 R	gil2144284	citocromo c6 precursora	Chlamydomonas reinhardtii
S30145	gil419757	cetol-ácido reductoisomerasa precursora	Arabidopsis thaliana
DEMZM C	gil319840	malato deshidrogenasa (NADP+) precursora	Zea mays
S20510	gil81676	3-isopropilmalato deshidrogenasa precursora	Brassica napus
S17180	gil81509	cetol-ácido reductoisomerasa precursora	Spinacia oleracea
Q9SEL7	gil15214049	PROTEASA HHOA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
023403	gil13959580	PROTEÍNA LUMINAL DEL TILACOIDE DE 21,5 KDA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
P82281	gil12644689	L-ASCORBATO PEROXIDASA SUPUESTA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
022609	gil9910645	PROTEASA SIMILAR A DO, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
P48417	gil1352186	ALENO ÓXIDO SINTASA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Linum usitatissimum

ES 2 314 131 T3

Nº de Acceso		Gen	Especie
P49080	gil1351905	ASPARTOQUINASA BIFUNCIONAL/HOMOSERINA E DESHIDROGENASA 2, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Zea mays
P31853	gil461595	CADENA B DE LA ATP SINTASA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Spinacia oleracea
P10933	gil19905	FERREDOXINA-NADP REDUCTASA, ISOZIMA PRECURSORA DE LA HOJA	Pisum sativum
P52422	gil14917033	FOSFORRIBOSILGLICINAMIDA FORMILTRANSFERASA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
P49077	gil14917032	ASPARTATO CARBAMOILTRANSFERASA PRECURSORA	Arabidopsis thaliana
O50039	gil14917022	ORNITINA CARBAMOILTRANSFERASA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
P55229	gil14916987	SUBUNIDAD GRANDE 1 DE LA GLUCOSA-1-FOSFATO ADENILILTRANSFERASA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
Q96291	gil14916972	2-CIS PEROXIRREDOXIN BAS1, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
Q9ZT00	gil14916690	RIBULOSA BISFOSFATO CARBOXILASA/OXIGENASA ACTIVASA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Zea mays
Q9LZX6	gil14547977	DIHIDRODIPICOLINATO SINTASA 1, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
064903	gil12644076	NUCLEÓSIDO DIFOSFATO QUINASA II, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
O04130	gil3122858	D-3-FOSFOGLICERATO DESHIDROGENASA PRECURSORA	Arabidopsis thaliana
O24364	gil3121825	2-CIS PEROXIRREDOXIN BAS1, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Spinacia oleracea
P49107	gil1709825	SUBUNIDAD N DEL CENTRO DE REACCIÓN DEL FOTOSISTEMA I PRECURSORA	Arabidopsis thaliana
P49132	gil1352199	TRANSLOCALIZADORA DE TRIOSA FOSFATO/FOSFATO, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Flaveriatriinervia
P37107	gil586038	PROTEÍNA DE 54 KDA DE PARTÍCULA DE RECONOCIMIENTO DE SEÑAL, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
Q04836	gil464662	RIBONUCLEOPROTEÍNA DE 31 KDA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
Q01909	gil461551	CADENA GAMMA 2 DE LA ATP SINTASA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
P14671	gil136251	CADENA BETA 1 DE LA TRIPTOFANO SINTASA PRECURSORA	Arabidopsis thaliana

ES 2 314 131 T3

Nº de Acceso		Gen	Especie
P07089	gil132144	CADENA PEQUEÑA DE LA RIBULOSA BISFOSFATO CARBOXILASA PRECURSORA	Flaveria trinervia
P22221	gil130384	PIRUVATO FOSFATO DIQUINASA PRECURSORA	Flaveria trinervia
P22178	gil126736	ENZIMA MÁLICA DEPENDIENTE DE NADP, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Flaveria trinervia
P26259	gil118241	DIHIDRODIPICOLINATO SINTASA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Zea mays
P23577	gil118044	APOCITOCROMO F PRECURSOR	Chlamydomonas reinhardtii
Q42522	gil14195661	GLUTAMATO-1-SEMIALDEHÍDO 2,1-AMINOMUTASA 2 PRECURSORA	Arabidopsis thaliana
Q96242	gil13878924	ALENO ÓXIDO SINTASA PRECURSORA	Arabidopsis thaliana
P46312	gil13432148	DESATURASA DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA-6, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
P34802	gil13432144	GERANILGERANIL PIROFOSFATO SINTETASA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
P50318	gil12644295	FOSFOGLICERATO QUINASA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
P46309	gil12644273	GLUTAMATO-CISTEÍNA LIGASA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
P21276	gil12644157	SUPERÓXIDO DISMUTASA [FE], PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
O23787	gil6094476	ENZIMA BIOSINTÉTICA DE TIAZOL, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Citrus sinensis
P93407	gil3915008	SUPERÓXIDO DISMUTASA [CU-ZN], PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Oryza sativa
Q96255	gil3914996	FOSFOSERINA AMINOTRANSFERASA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
O24600	gil3914826	ARN POLIMERASA DIRIGADA POR ADN, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
O49937	gil3914665	PROTEÍNA RIBOSÓMICA 50S L4, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Spinacia oleracea
O42915	gil3914608	CADENA PEQUEÑA DE LA RIBULOSA BIFOSFATO CARBOXILASA PRECURSORA	Manihot esculenta
O39199	gil2500098	PROTEÍNA DE REPARACIÓN DE ADN RECA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
O96529	gil2500026	ADENILOSUCCINATO SINTETASA PRECURSORA	Arabidopsis thaliana
P55826	gil2495184	PROTOPORFIRINÓGENO OXIDASA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana

Nº de Acceso		Gen	Especie
Q42496	gil2493687	SUBUNIDAD DE 4 KDA DEL COMPLEJO DEL CITOCROMO B6-F, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Chlamydomonas reinhardtii
P52424	gil1709925	FOSFORRIBOSILFORMILGLICINAMIDINA CICLO-LIGASA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Vigna unguiculata
P49572	gil1351303	INDOL-3-GLICEROL FOSFATO SINTASA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
P48496	gil1351271	TRIOSEFOSFATO ISOMERASA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Spinacia oleracea
P25269	gil1174779	CADENA BETA 2 DE LA TRIPTÓFANO SINTASA PRECURSORA	Arabidopsis thaliana
P46225	gil1174745	TRIOSAFOSFATO ISOMERASA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Secale cereale
P46283	gil1173345	SEDOHEPTULOSA-1,7-BISFOSFATASA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
P32069	gil418134	COMPONENTE I-2 DE LA ANTRANILATO SINTASA PRECURSORA	Arabidopsis thaliana
P29450	gil267120	TIORREDOXINA DE TIPO F, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Pisum sativum
Q9ZTN9	gil13878459	FITOENO DESHIDROGENASA PRECURSORA	Oryza sativa
Q9SHI1	gil13627881	FACTOR DE INICIO DE LA TRADUCCIÓN IF-2, PRECURSOR DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
Q9LR75	gil13431553	COPROPORFIRINÓGENO III OXIDASA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
Q9ZNZ7	gil12643970	GLUTAMATO SINTASA 1 DEPENDIENTE DE FERREDOXINA 1, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
Q9SZ30	gil12643854	PROTEÍNA DE BIOSÍNTESIS DE HISTIDINA BIFUNCIONAL HISHF, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
Q9SJE1	gil12643848	SUBUNIDAD CHLD DE LA MAGNESIO-QUELATASA PRECURSORA	Arabidopsis thaliana
Q42624	gil12643761	GLUTAMINA SINTETASA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Brassica napus
Q38933	gil12643749	LICOPENO BETA CICLASA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Arabidopsis thaliana
Q42435	gil12643508	CAPSANTINA/CAPSORRUBINA SINTASA, PRECURSORA DEL CLOROPLASTO	Capsicum annuum

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 9214828 A [0043]
- EP 331083 A [0045]
- US 5100792 A [0045]
- EP 175966 A [0045]

ES 2 314 131 T3

- EP 444882 A [0045]
- DE 4005152 [0045]
- EP 434616 A [0045]
- WO 9012096 A [0045]
- 5 • EP 290395 A [0045]
- US 4684611 A [0045]
- WO 8706614 A [0045]
- EP 486234 A [0047]
- WO 9209696 A [0045]
- EP 486233 A [0047]
- 10 • WO 9400583 A [0045]

Bibliografía no relativa a patentes citada en la descripción

- 15 • **FOYER**, C. H. *et al.* *Plant Cell Environ.*, 1994, vol. 17, 507-523 [0002]
- **HAMMOND-KOSACK**, K. E.; **JONES**, J. D.G. *Plant Cell*, 1996, vol. 8, 1773-1791
- 20 • **ALLEN**, R. *Plant Physiol.*, 1995, vol. 107, 1049-1054 [0002]
- **FRIDOVICH**, I. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 1851-1857 [0004]
- **HIDALGO**, E.; **DEMPLE**, B. Regulation of Gen Expression in *Escherichia coli*, *Molecular Biology Intelligence Unit Series*. 1996, 434-452 [0004]
- 25 • **LIOCHEV** *et al.* *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 1328-1331 [0005]
- **ZHENG**, M. *et al.* *J. Bacteriol.*, 1999, vol. 181, 4639-4643 [0005]
- 30 • **RAZQUIN**, P. *et al.* *J. Bacteriol.*, 1988, vol. 176, 7409-7411 [0006]
- **RODRIGUEZ**, R. E. *et al.* *Microbiology*, 1998, vol. 144, 2375-2376 [0007]
- The Arabidopsis Genome Initiative. *Nature*, 2000, vol. 408, 796-815 [0007]
- 35 • **FILLAT** M. *et al.* *Biochem J.*, 1991, vol. 280, 187-191 [0011]
- **ALTSCHUL** *et al.* *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 405-410 [0018]
- 40 • **PEARSON**; **LIPMAN**. *PNAS USA*, 1988, vol. 85, 2444-2448 [0018]
- **SMITH**; **WATERMAN**. *J. Mol Biol.*, 1981, vol. 147, 195-197 [0018]
- *Nucl. Acids Res.*, 1997, vol. 25, 3389-3402 [0018]
- 45 • **RUF**, S. *et al.* *Nature Biotechnol.*, 2001, vol. 19, 870-875 [0024]
- **SAMBROOK** *et al.* *Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989 [0033]
- 50 • *Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons*, 1992 [0034]
- **BEVAN**. *Nucl. Acids Res.*, 1984, vol. 12, 8711-8721 [0034]
- 55 • **GUERINEAU**; **MULLINEAUX**. *Plant transformation and expression vectors. In: Plant Molecular Biology Labfax*, 1993, 121-148 [0034]
- **BENFEY** *et al.* *EMBO J*, 1990, vol. 9, 1677-1684 [0040]
- 60 • **MEDFORD**, J.I. *Plant Cell*, 1992, vol. 4, 1029-1039 [0040]
- **MEDFORD** *et al.* *Plant Cell*, 1991, vol. 3, 359-370 [0040]
- **WEIGEL** *et al.* *Cell*, 1992, vol. 69, 843-859 [0040]
- 65 • **TORIYAMA** *et al.* *Bio/Technology*, 1988, vol. 6, 1072-1074 [0043]
- **ZHANG** *et al.* *Plant Cell Rep.*, 1988, vol. 7, 379-384 [0043]

ES 2 314 131 T3

- **ZHANG** *et al. Theor Appl Genet*, 1988, vol. 76, 835-840 [0043]
- **SHIMAMOTO** *et al. Nature*, 1989, vol. 338, 274-276 [0043]
- 5 • **DATTA** *et al. Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 736-740 [0043]
- **CHRISTOU** *et al. Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 957-962 [0043]
- **PENG** *et al. International Rice Research Institute*, 1991, 563-574 [0043]
- 10 • **CAO** *et al. Plant Cell Rep.*, 1992, vol. 11, 585-591 [0043]
- **LI** *et al. Plant Cell Rep.*, 1993, vol. 12, 250-255 [0043]
- 15 • **RATHORE** *et al. Plant Molecular Biology*, 1993, vol. 21, 871-884 [0043]
- **FROMM** *et al. Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 833-839 [0043]
- **GORDON-KAMM** *et al. Plant Cell*, 1990, vol. 2, 603-618 [0043]
- 20 • **D'HALLUIN** *et al. Plant Cell*, 1992, vol. 4, 1495-1505 [0043]
- **WALTERS** *et al. Plant Molecular Biology*, 1992, vol. 18, 189-200 [0043]
- 25 • **KOZIEL** *et al. Biotechnology*, 1993, vol. 11, 194-200 [0043]
- **VASIL, I. K.** *Plant Molecular Biology*, 1994, vol. 25, 925-937 [0043]
- **WEEKS** *et al. Plant Physiology*, 1993, vol. 102, 1077-1084 [0043]
- 30 • **SOMERS** *et al. Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 1589-1594 [0043]
- **HIEI** *et al. The Plant Journal*, 1994, vol. 6, 271-282 [0043]
- 35 • **SHIMAMOTO, K.** *Current Opinion in Biotechnology*, 1994, vol. 5, 158-162 [0044]
- **VASIL** *et al. Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 667-674 [0044]
- **VAIN** *et al. Biotechnology Advances*, 1995, vol. 13 (4), 653-671 [0044]
- 40 • **VASIL.** *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 702 [0044]
- **WAN AND LEMAUX.** *Plant Physiol.*, 1994, vol. 104, 37-48 [0044]
- 45 • **GREEN** *et al. Plant Tissue and Cell Culture. Academic Press*, 1987 [0045]
- **FREEMAN** *et al. Plant Cell Physiol.*, 1984, vol. 29, 1353 [0045]
- **KINDLE.** *PNAS U.S.A.*, 1990, vol. 87, 1228 [0045]
- 50 • **OARD.** *Biotech. Adv.*, 1991, vol. 9, 1-11 [0046]
- Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants.
- 55 • **VASIL** *et al. Laboratory Procedures and Their Applications. Academic Press*, 1984, vol. I, II, I [0048]
- **WEISSBACH; WEISSBACH.** *Methods for Plant Molecular Biology. Academic Press*, 1989 [0048]
- **FILLAT, M. F. et al. Biochem. J.**, 1991, vol. 280, 187-191 [0075] [0085]
- 60 • **CECCARELLI, E. A. et al. J. Biol. Chem.**, 1991, vol. 266, 14283-14287
- **PIETRZCAK, M. et al. Nucleic Acids Res.**, 1986, vol. 14, 5857-5868 [0077]
- 65 • **HAJDUKIEWIEZ, P. et al. Plant Mol. Biol.**, 1994, vol. 25, 989-994 [0077]
- **AUSUBEL, F. M. et al. Current Protocols in Molecular Cloning. John Wiley and Sons**, 1987

ES 2 314 131 T3

• **GALLOIS, P.; MARINHO, P.** Plant Gen transfer and expression protocols. In *Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc*, 1995, vol. 49, 39-49 [0078]

• **KRAPP, A. R. et al.** *Eur. J. Biochem.*, 1997, vol. 249, 556-563 [0078]

• **GEIGER, M. et al.** *Plant Cell Environ.*, 1999, vol. 22, 1177-1199 [0079]

• **VERNIÈRE, C. et al.** *Fruits*, 1991, vol. 46, 162-170 [0081]

• **DEÁK, M. et al.** *Nature Biotechnol.*, 1999, vol. 17, 192-196 [0082]

• **LICHTENTHALER, H.K.** *Methods Enzymol.*, 1987, vol. 148, 350-382 [0084]

• **NEWMAN, B. J.; GRAY, J. C.** *Plant Mol. Biol.*, 1988, vol. 10, 511-520 [0085]

• **BAKER, C. J.; ORLANDI, E. W.** *Ann. Rev. Phytopathol.*, 1995, vol. 33, 299-321 [0101]

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que comprende un polipéptido de flavodoxina y un péptido de dirección al cloroplasto heterólogo.
2. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el polipéptido de flavodoxina tiene una secuencia de ácido nucleico que se muestra en la Tabla 1.
3. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el que el polipéptido de flavodoxina es una flavodoxina de cianobacterias.
4. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3 en el que el polipéptido de flavodoxina es el polipéptido de flavodoxina de *Anabaena* PC7119.
5. Un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la señal de dirección al cloroplasto es el polipéptido de tránsito al cloroplasto de la FNR del guisante.
6. Un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que codifica un polipéptido de fusión que tiene una secuencia que se muestra en la Figura 4.
7. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6 que tiene una secuencia de nucleótidos que se muestra en la Figura 3.
8. Un vector de ácido nucleico adecuado para la transformación de una célula vegetal, que comprende un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Una célula hospedadora que contiene un ácido nucleico o vector de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 9 que es microbiana.
11. Una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 9 que es una célula vegetal.
12. Una célula vegetal que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de flavodoxina.
13. Una célula vegetal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12 que tiene dicho ácido nucleico en el interior de su cromosoma.
14. Una célula vegetal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 que tiene más de uno de dichos ácidos nucleicos por genoma haploide.
15. Una célula vegetal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 que está comprendida en una planta, una parte de una planta o un propágulo de una planta o un extracto o derivado de una planta.
16. Un polipéptido aislado codificado por un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
17. Un procedimiento de producción de una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, incluyendo el procedimiento incorporar dicho ácido nucleico o vector de ácido nucleico en la célula por medio de transformación.
18. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17 que incluye recombinar el ácido nucleico con el ácido nucleico del genoma de la célula, de tal modo que se incorpore de manera estable en el mismo.
19. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17 o la reivindicación 18 que incluye regenerar una planta a partir de una o más células transformadas.
20. Una planta que comprende una célula vegetal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15.
21. Una parte o propágulo de una planta que comprende una célula vegetal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15.
22. Un procedimiento de producción de una planta, incluyendo el procedimiento incorporar un ácido nucleico que codifica un polipéptido de flavodoxina en una célula vegetal y regenerar una planta a partir de dicha célula vegetal.
23. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22 en el que el ácido nucleico es un ácido nucleico o un vector de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

ES 2 314 131 T3

24. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22 ó 23, que incluye propagar sexualmente o asexualmente o cultivar un vástago o descendiente de la planta regenerada a partir de dicha célula vegetal.

25. Un procedimiento de mejora de la tolerancia al estrés de una planta, incluyendo el procedimiento provocar o permitir la transcripción de un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de flavodoxina en el interior de células de la planta.

26. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 25 que comprende permitir la acumulación del polipéptido de flavodoxina en los cloroplastos de dichas células.

27. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26 en el que el ácido nucleico es un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

28. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27 en el que dicho estrés se selecciona del grupo que consiste en radiación ultravioleta UV, temperaturas extremas, irradiación e infección por patógenos.

29. Uso de un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la producción de una planta transgénica.

30. Uso de un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en un procedimiento de aumento de la tolerancia de una planta al estrés.

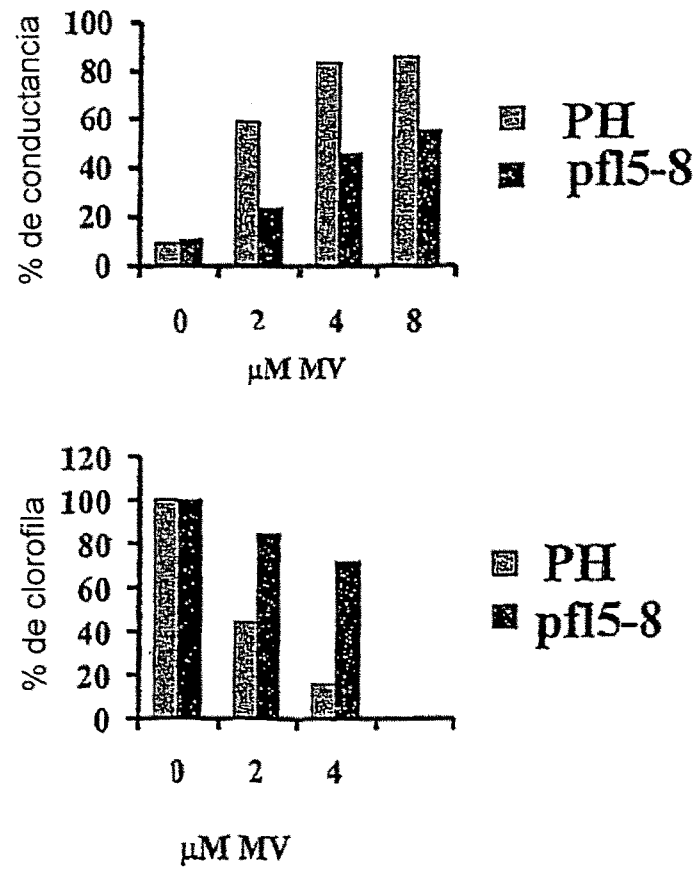


Figura 1

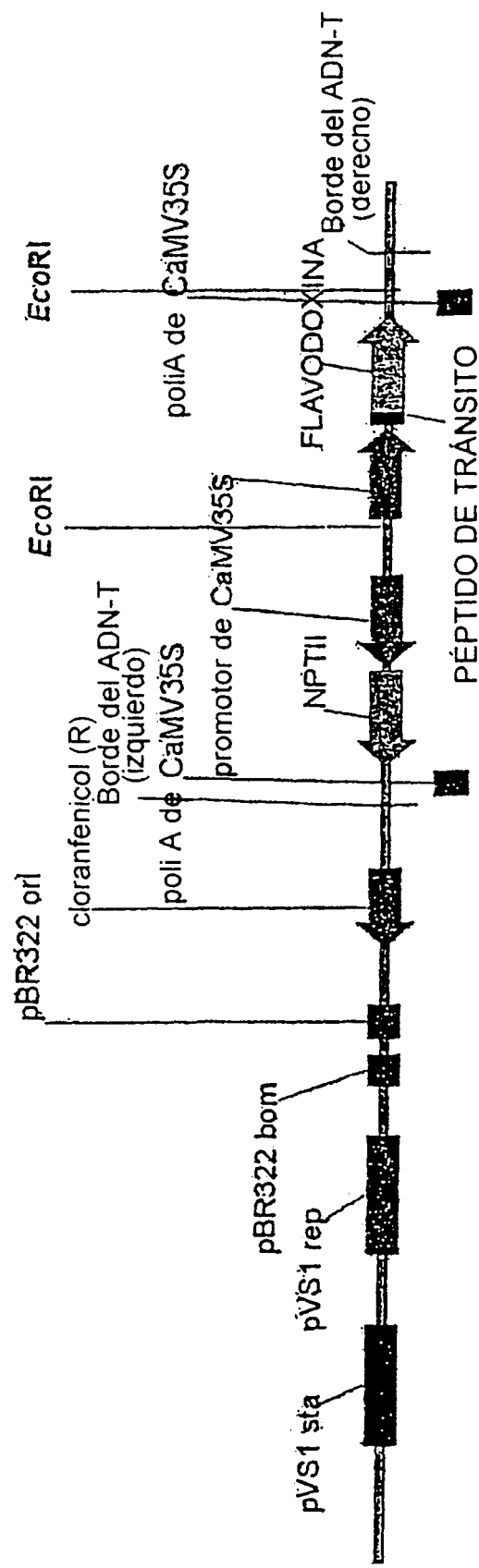


Figura 2

ES 2 314 131 T3

GGATCCATCATCAACAACAACAACAAACATGGCTGCTGCAGTAACAGCCGCAGTCTC
CTTGCCATACTCCAACCTCCACTTCCCTTCCGATCAGAACATCTATTGTTGCACCAGA
GAGACTTGTCTTCAAAAAGGTTTCATTGAACAATGTTTCTATAAGTGGAAGGGTAGG
CACCATCAGAGCTCTCATAATGTCAAAGAAAATTGGTTTATTCTACGGTACTCAAAC
TGGTAAAACTGAATCAGTAGCAGAAATCATTGAGACGAGTTTGGTAATGATGTGGT
GACATTACACGATGTTTCCCAGGCAGAAGTAACTGACTTGAATGATTATCAATATTT
GATTATTGGCTGTCCTACTTGGAAATATTGGCGAACTGCAAAGCGATTGGGAAGGACT
CTATTCAGAACTGGATGATGTAGATTTTAATGGTAAATTGGTTGCCTACTTTGGGAC
TGGTGACCAAATAGGTTACGCAGATAATTTTCAGGATGCGATCGGTATTTTGGAAGA
AAAAATTTCTCAACGTGGTGGTAAAACTGTCGGCTATTGGTCAACTGATGGATATGA
TTTTAATGATTCCAAGGCACTAAGAAATGGCAAGTTTGTAGGACTAGCTCTTGATGA
AGATAATCAATCTGACTTAACAGACGATCGCATCAAAAGTTGGGTTGCTCAATTAAA
GTCTGAATTTGGTTTGTAAAAA

Figura 3

ES 2 314 131 T3

D P S S T T T T N M A A A V T A A V S L P Y
S N S T S L P I R T S I V A P E R L V F K K
V S L N N V S I S G R V G T I R A L I M S K
K I G L F Y G T Q T G L T E S V A E I I R D
E F G N D V V T L H D V S Q A E V T D L N D
Y Q Y L I I G C P T W N I G E L Q S D W E G
L Y S E L D D V D F N G K L V A Y F G T G D
Q I G Y A D N F Q D A I G I L E E K I S Q R
G G K T V G Y W S T D G Y D F N D S K A L R
N G K F V G L A L D E D N Q S D L T D D R I
K S W V A Q L K S E F G L

Figura 4

ES 2 314 131 T3

ATGGCTGCTGCAGTAACAGCCGCAGTCTCCTTGCCATACTCCAACCTCCACTTCCCTT
CCGATCAGAACATCTATTGTTGCACCAGAGAGACTTGTCTTCAAAAAGGTTTCATTG
ACAATGTTTCTATAAGTGGAAGGGTAGGCACCATCAGAGCTCTCATA

Figura 5

ES 2 314 131 T3

M A A A V T A A V S L P Y S N S T S L P I R T S
I V A P E R L V F K K V S L N N V S I S G R V G
T I R A L I

Figura 6