

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 365 962**

21 Número de solicitud: 201030360

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

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **11.03.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **14.10.2011**

Fecha de la concesión: **03.09.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **13.09.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**13.09.2012**

73 Titular/es:  
**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y  
TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA (INIA)  
OTRI-EDIFICIO INIA AUTOVÍA A6 KM 7,5  
28040 MADRID, ES y  
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID**

72 Inventor/es:  
**LASIERRA RESA, PILAR;  
VICENTE CARBAJOSA, JESÚS y  
MEDINA ALCAZAR, JOAQUIN**

74 Agente/Representante:  
**Illescas Taboada, Manuel**

54 Título: **PLANTAS TRANSGÉNICAS QUE PRESENTAN MAYOR TOLERANCIA A ESTRÉS ABIÓTICO.**

57 Resumen:

Plantas transgénicas que presentan mayor tolerancia a estrés abiótico. La presente invención describe plantas transgénicas que han sido transformadas con un vector de expresión que codifica para el factor de transcripción CDF3. Las plantas transgénicas de la invención presentan una mayor tolerancia y/o resistencia a diferentes tipos de estrés abiótico, simultáneamente, como por ejemplo exceso de salinidad, temperaturas extremas, sequía, etc. Además, la presente invención describe el procedimiento de obtención de las plantas transgénicas que sobreexpresan el gen CDF3. La sobreexpresión del gen CDF3 en plantas transgénicas es muy útil para su utilización en la transformación de plantas de interés agronómico, mejorando así la tolerancia de los cultivos de las mismas frente a condiciones ambientales adversas.

ES 2 365 962 B1

## DESCRIPCIÓN

Plantas transgénicas que presentan mayor tolerancia a estrés abiótico.

5 **Campo de la invención**

La presente invención puede englobarse dentro del campo de la ingeniería genética y de la fisiología vegetal. Se refiere al desarrollo de nuevas herramientas genéticas para la mejora de plantas de interés agronómico frente a condiciones ambientales adversas que limitan su rendimiento. De forma más concreta esta invención se fundamenta en la utilización del factor de transcripción, CDF3, para generar plantas transgénicas que presenten mayor tolerancia simultánea a diferentes tipos de estrés abiótico.

15 **Antecedentes**

Las plantas durante su desarrollo tienen que enfrentarse a condiciones ambientales adversas que afectan negativamente tanto a su crecimiento como a su productividad, y que provocan cambios muy importantes en diferentes aspectos de las plantas: fisiológicos, morfológicos, bioquímicos y moleculares. En términos generales, los tipos de estrés abiótico más comunes, a los que se enfrentan las plantas son, las temperaturas extremas, la sequía y los suelos salinos. De hecho se estima que, a nivel global, el 22% de la tierra cultivable presenta problemas de salinidad (FAO 2004) y además en la actualidad se está observando que las áreas afectadas por la sequía y las temperaturas extremas se están expandiendo de una forma rápida y se presume que seguirán creciendo debido en parte a los efectos del cambio climático (Burke *et al* 2006). Por otro lado, el impacto de los distintos tipos de estrés abiótico sobre los cultivos de interés agronómico es muy complejo porque, a menudo, ocurren de forma simultánea varios tipos de estrés y usualmente afectan a todos los estados de desarrollo de la planta. De forma general, además, los mecanismos de resistencia de las plantas a los diferentes tipos de estrés abiótico, dependen de caracteres poligénicos (Fernández-Muñoz, 2005, Tuberosa and Salvi, 2006), lo que implica, a su vez, también una mayor complejidad a la hora de comprender los mecanismos genéticos ligados a la respuesta a dicho estrés.

Cuando una planta es sometida a un estrés de tipo abiótico, se ha observado que una gran cantidad de genes cambian sus niveles de expresión, lo que provoca, de forma general, cambios en los niveles de proteínas y metabolitos, muchos de los cuales tienen una función protectora frente al estrés (Ferne *et al* 2006; Vij and Tyagi, 2007). Estos genes se pueden catalogar, de forma general, en dos grupos: 1) genes que codifican para proteínas que están implicadas en el desarrollo de la tolerancia y 2) genes que codifican proteínas con función reguladora. Entre los primeros cabría destacar genes implicados en la biosíntesis de chaperonas y osmolitos compatibles y en la producción de compuestos con función protectora. Entre los genes que codifican proteínas de función reguladora destacan, por su abundancia y variedad, los factores de transcripción, que tienen la capacidad de controlar a grupos más o menos grandes de genes implicados directamente en la respuesta al estrés, o de actuar en la biosíntesis de moléculas reguladoras como la fitohormona ácido abscísico (ABA).

Los distintos programas para la mejora de la tolerancia de plantas de interés agronómico a diferentes tipos de estrés abióticos han tenido un éxito reducido. Esto se debe a que la tolerancia a condiciones adversas está basada en caracteres complejos, con herencia poligénica, (Fernández-Muñoz, 2005). Los intentos iniciales para desarrollar plantas de interés agronómico más tolerantes a las condiciones ambientales adversas mediante una estrategia basada en la “transformación genética”, utilizaron un procedimiento que se basa en la utilización de genes de función protectora de “acción única”, como por ejemplo genes responsables de la modificación de un metabolito que confiere resistencia a la sal o la sequía. Sin embargo, esta estrategia se está abandonando, debido a que, como numerosos programas de mejora e investigación han demostrado, la respuesta al estrés abiótico es compleja y en general involucra la acción de muchos genes al mismo tiempo (es de carácter poligénico) y que por tanto, la utilización de solo uno de ellos tiene un efecto menor (Fernández-Muñoz, 2005, Tuberosa and Salvi, 2006).

Una solución que se ha desarrollado recientemente para obtener plantas más tolerantes a las condiciones ambientales adversas, ha sido utilizar, para los programas de mejora de plantas, genes que codifiquen para proteínas con función reguladora (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 2005; Chinnusamy *et al* 2005). La utilización de este tipo de genes tiene como principal ventaja el poder regular simultáneamente la acción de muchos otros genes implicados en la resistencia al estrés y, por tanto, conseguir una eficacia mayor en el desarrollo de la tolerancia. Diferentes tipos de análisis de expresión han permitido identificar numerosos tipos de factores de transcripción cuyos niveles de expresión cambian en respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico (Riechman *et al* 2000; Chen *et al* 2002). La mayoría de ellos pertenecen a grandes familias de factores de transcripción de plantas como son el tipo bZIP, AP2/ERF, MYC, NAC, HSF, WRKY y DOF (Qu and Zhu, 2006; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2006), lo que sugiere que participan distintos mecanismos de regulación transcripcional de la respuesta al estrés mediado por la salinidad, la deshidratación y las temperaturas extremas. En este sentido, las patentes americanas US2008/0229448 y US2008/0163397 divulgan plantas transgénicas transformadas con diferentes vectores de expresión que comprenden secuencias de polinucleótidos recombinantes que codifican para un factor de transcripción mutado de tipo AP2 y para diferentes factores de transcripción que se unen a regiones CCAA, respectivamente. Las plantas transgénicas descritas en ambas patentes americanas muestran una mayor tolerancia a diferentes tipos de estrés de tipo abiótico (baja concentración de nitrógeno en el medio, sequía, desecación, salinidad, congelación y temperaturas altas y bajas) que las plantas silvestres no transformadas.

En *Arabidopsis*, se han identificado 36 factores transcripcionales del tipo “DNA-Binding with One Finger” (DOF). Éstos se han dividido en cuatro grupos (A-D) en función de su homología de secuencia (Riechmann y col., 2000; Lijavetzky y col., 2003). Distintos análisis de secuencia han puesto de manifiesto que dentro del grupo D se incluyen los denominados “Cycling Dof Factors” (CDF), llamados así porque su expresión oscila con el ritmo circadiano. Hasta el momento, la función conocida de los CDF ha sido su implicación en los procesos de floración dependientes del fotoperiodo, a través de la represión del factor de transcripción CONSTANS (CO), que promueve la floración cuando los días se hacen más largos (Imaizumi y col., 2005; Fornara y col., 2009). Por otro lado, se han descrito en otras plantas genes que codifican para ciertos factores de transcripción pertenecientes a la familia DOF cuyos niveles de expresión aumentan en respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico (factores de transcripción tipo DOF en plantas de trigo, taDof14, taDof15 y taDof1), sin embargo hasta la fecha, no se ha probado su relación funcional con la adaptación a dichas condiciones ambientales adversas (Sawh LM y col.; 2009, Yanagisawa S.; 2002).

En la presente invención se ha descubierto que la sobreexpresión en plantas del gen *CDF3* de *Arabidopsis thaliana*, que codifica para un factor de transcripción del tipo DOF, hace que dichas plantas presenten una mayor tolerancia a distintas condiciones ambientales adversas simultáneamente, tales como una mayor tolerancia a la deshidratación, al exceso de sales en el medio y a temperaturas extremas (frío y calor). Por lo tanto, estos resultados demuestran que el factor de transcripción de tipo DOF, *CDF3*, puede utilizarse como una nueva herramienta para la mejora de la tolerancia a diversos tipos de estrés a la vez. Así la presente invención describe plantas transgénicas que sobreexpresan el gen *CDF3* de *A. thaliana* y que presentan una mejora de la tolerancia a diversos tipos de estrés abiótico simultáneamente. Las plantas transgénicas pueden ser de cualquier género y especie, preferentemente que tengan interés agronómico, tales como maíz, arroz, tomate, patata, etc.

Además, en la presente invención también se describe el procedimiento para la obtención de las plantas transgénicas que sobreexpresan el gen *CDF3* de *A. thaliana*, y que presentan esa mejora en la tolerancia simultánea al estrés, que las plantas control no transformadas.

## Descripción de la invención

### Breve descripción de la invención

La presente invención describe plantas transgénicas que sobreexpresan el gen *CDF3* (Nº Acceso GenBank: AT3G47500.1) de *A. thaliana* (SEQ ID NO:4), de aquí en adelante las llamaremos plantas transgénicas de la invención, al ser transformadas con el vector de expresión CECT 7674 portador de dicha secuencia génica. El análisis detallado de la expresión del factor de transcripción *CDF3* en plantas de *Arabidopsis* no transformadas con el vector de la invención (WT), indica que sus niveles aumentan de forma destacable en respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico, tales como, la sequía, la salinidad o las temperaturas extremas (frío y calor), así como a tratamientos con la fitohormona ácido abscísico (ABA), poniendo de manifiesto que el factor de transcripción *CDF3* presenta funciones relacionadas con la tolerancia a dichos tipos de estrés (Figura 1). El análisis fenotípico de las plantas transgénicas de la invención indica que son más resistentes que las plantas control no transformadas, tanto a condiciones de deshidratación, como a condiciones extremas de temperaturas de congelación.

Además la presente invención describe el procedimiento para la obtención de dichas plantas transgénicas que sobreexpresan el gen *CDF3* (AT3G47500) de *A. thaliana* (SEQ ID NO: 4) al ser transformadas con el vector de expresión CECT 7674, que codifica para dicho factor de transcripción, y que presentan una mayor tolerancia simultánea a diferentes tipos de estrés abiótico. Cabe destacar que también entra dentro del alcance de la presente invención, cualquier secuencia génica ortóloga del gen *CDF3* de *A. thaliana*, entendiéndose por secuencia génica ortóloga, aquella/s que son semejantes en distintas especies que tienen un antepasado común.

A efectos de la presente invención se hacen constar los siguientes términos:

- Tolerancia: es la capacidad de un individuo, en la presente invención, plantas, para soportar el estrés abiótico sin apenas consecuencias para su correcto funcionamiento fisiológico (crecimiento, apariencia y rendimiento).
- *CDF3*: gen que codifica para un factor de transcripción de la familia DOF. En la presente invención se utiliza el gen *CDF3* (No de Acceso al GenBank: AT3G47500.1) de *A. thaliana*. Incluye: secuencias génicas que se produzcan por degeneración del código genético; secuencias capaces de hibridar, bajo “stringent conditions” con la secuencia de la invención, pueden ser, por ejemplo, las variantes de dicha secuencia, incluidas las variantes alélicas o empalme; secuencias que codifican genes ortólogos o genes parálogos del gen de la invención, secuencias génicas con al menos un 70% de identidad en homología con la secuencia génica de *CDF3* y que lleven a cabo idéntica función; métodos de hibridación de ácidos nucleicos se den a conocer en detalle en Kashima *et al.* (1985) y en Haymes *et al.* (1985) Numerosas variaciones conocidas para un experto medio en la materia, son posibles en las condiciones y los medios por los cuales la hibridación de ácidos nucleicos puede realizarse para aislar secuencias de polinucleótidos relacionados con similitud con secuencias conocidas en el estado de la técnica y no se limitan a mencionadas aquí.

- Stringent conditions: a los efectos de la presente invención, se refiere a las condiciones que permiten la hibridación de las cadenas de ADN cuyas secuencias son altamente complementarias.
- Genes Parálogos: a los efectos de la presente invención se refiere a genes estructuralmente relacionadas dentro de una única especie, que se derivan de un evento de duplicación.
- Genes Ortólogos: a efectos de la presente invención se refiere a genes estructuralmente relacionados, pero que provienen de especies diferentes y que se derivan de un evento de especiación.
- Homología de secuencia: a los efectos de la presente invención, se entiende como secuencias de bases que den lugar a cambios conservativos de aminoácidos.

### Descripción de las figuras

Figura 1. Análisis de expresión de *CDF3* en respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico. Análisis de expresión mediante experimentos tipo Northern. Plantas control no transformadas de *Arabidopsis thaliana* de 3 semanas crecidas en condiciones de fotoperiodo 16:8 (16 horas de luz y 6 de oscuridad), a 20°C (C). Posteriormente, dichas plantas fueron sometidas a diferentes tipos de tratamiento: 4°C durante 24 h (4°C), 38°C durante 5 h (38°C), tratamiento con 100 μM de ABA, 5 h (ABA), deshidratadas hasta una pérdida del 50% peso fresco (DH), y regadas con 250 mM NaCl durante 24 h (NaCl). Se han utilizado sondas específicas para el gen *CDF3* (SEQ ID NO:3) y para el gen *LTI78*, utilizado como control.

Figura 2. Análisis de la expresión del gen *CDF3* en plantas transformadas que sobreexpresan el gen *CDF3*. La figura muestra los resultados obtenidos mediante experimentos de Northern blot, en los que se ha utilizado hojas de plantas control que no sobreexpresan el gen *CDF3* (WT) y en tres líneas independientes de plantas transformadas que sobreexpresan el gen *CDF3* (35S::*CDF3*). Ambos grupos de plantas han sido cultivados durante 3 semanas en condiciones de fotoperiodo 16:8, a una temperatura de 20°C.

Figura 3. Tolerancia de las plantas transgénicas 35S::*CDF3* a condiciones de sequía frente a las plantas control no transformadas.

(A) Fotografía que muestra el fenotipo de plantas control no transformadas (WT) y de plantas transgénicas 35S::*CDF3*, que sobreexpresan el gen *CDF3* (35S::*CDF3*) después de crecerse durante 4 semanas en tierra bajo condiciones óptimas de riego y posteriormente ser sometidas a un déficit de riego durante 10 días.

(B) Comparación de la velocidad en la pérdida de agua de hojas de plantas control no transformadas con el gen *CDF3* (WT) (línea discontinua) y de hojas de plantas transgénicas 35S::*CDF3*, que sobreexpresan el gen *CDF3* (35S::*CDF3*) (línea continua). Las hojas de ambos grupos (WT y 35S::*CDF3*) de plantas de 4 semanas se dejaron secar al aire y se estimó el peso fresco en los tiempos indicados. La pérdida de agua se estimó como porcentaje del peso fresco inicial. En el eje de abscisas se representa el tiempo expresado en minutos y en el eje de ordenadas se representa el porcentaje de peso fresco.

Figura 4. Análisis de la conductancia estomática (A) y de la eficiencia en el uso del agua (B) en las plantas transgénicas de la invención (35S::*CDF3*) frente a las plantas control no transformadas (WT), después de crecerse durante cuatro semanas en tierra bajo condiciones óptimas de riego. La conductancia estomática se expresa como molH<sub>2</sub>O/m<sup>2</sup>s y la eficiencia en el uso del agua se expresa como μmol CO<sub>2</sub>/mmol H<sub>2</sub>O.

Figura 5. Tolerancia a las temperaturas de congelación de las plantas transgénicas 35S::*CDF3*, que sobreexpresan el gen *CDF3* (35S::*CDF3*). Plantas control no transformadas (WT) y plantas transformadas (35S::*CDF3*) de 2 semanas crecidas en condiciones de día largo (16 horas de luz/8 h de oscuridad) y a una temperatura de 20°C, fueron sometidas a diferentes temperaturas de congelación durante 6 h. La tolerancia a las temperaturas de congelación se estimó como porcentaje de supervivencia a cada temperatura específica y después de un periodo de recuperación de las plantas de 7 días. (A) Tolerancia de plantas control no transformadas (WT, barras negras) y plantas transgénicas 35S::*CDF3*, que sobreexpresan el gen *CDF3* (35S::*CDF3*, barras blancas), que no han sido sometidas a periodo previo de aclimatación, a temperaturas de -5°C y -6°C. En el eje de abscisas se representa la temperatura en °C y en el eje de ordenadas se representa el % de supervivencia. (B) Fotografía que muestra un ejemplo representativo de plantas control no transformadas (WT) y plantas transgénicas 35S::*CDF3*, que sobreexpresan el gen *CDF3* (35S::*CDF3*), 7 días después de ser expuestas a una temperatura de -6°C durante 6 h. (C) Tolerancia de plantas control no transformadas (WT, barras negras) y plantas transformadas que sobreexpresan el gen *CDF3* (35S::*CDF3*, barras blancas), después de ser sometidas a temperaturas de -9°C y -10°C, las cuales han sido sometidas a un tratamiento previo de aclimatación de 7 días a una temperatura de 4°C. En el eje de abscisas se representa la temperatura en °C y en el eje de ordenadas se representa el % de supervivencia. (D) Fotografía que muestra un ejemplo representativo de plantas control no transformadas (WT) y plantas transgénicas 35S::*CDF3*, que sobreexpresan el gen *CDF3* (35S::*CDF3*) 7 días después de ser expuestas a una temperatura de -10°C durante 6 h.

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención describe plantas transgénicas caracterizadas por haber sido transformadas con un vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para el factor de transcripción CDF3.

5

En una realización preferida, las plantas transgénicas de la invención se caracterizan porque son transformadas con el vector de expresión es *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7674.

10

En otra realización preferida, las plantas transgénicas de la invención se caracterizan porque la secuencia nucleotídica que codifica para el factor de transcripción CDF3 es la SEQ ID NO: 4, que se elige preferentemente del género *Arabidopsis*, preferentemente de la especie *A. thaliana*.

15

Las plantas transgénicas de la invención se caracterizan porque presentan mayor tolerancia a múltiples tipos de estrés abiótico simultáneamente, en comparación con las plantas control sin transformar.

20

En otra realización preferida, las plantas transgénicas de la invención se caracterizan porque el estrés abiótico se selecciona preferentemente entre: exceso de salinidad, sequía, temperaturas extremas de frío o de calor y tratamiento con fitohormonas.

25

En otra realización preferida, las plantas transgénicas de la invención se caracterizan porque se seleccionan preferentemente entre plantas del género *Arabidopsis*, preferentemente *Arabidopsis thaliana* y entre cualquier planta de interés agronómico tanto hortícolas: lechuga, pimiento, tomate, melón, patata etc.; cereales: arroz, maíz, trigo, cebada etc, frutales: melocotón, albaricoque, ciruela, cereza, pera, manzana, etc.

30

Otro objeto de la presente invención se refiere al procedimiento de obtención de las plantas transgénicas tolerantes a múltiples tipos de estrés abiótico, simultáneamente, que se caracteriza por la transformación de la planta silvestre con un vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para el factor de transcripción CDF3.

En una realización preferida, el procedimiento de la invención se caracteriza porque el vector de expresión es *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7674.

35

En otra realización preferida, el procedimiento de la invención se caracteriza porque la secuencia nucleotídica comprendida en el vector de expresión *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7674 es la SEQ ID NO: 4, que se selecciona preferentemente del género *Arabidopsis*, preferentemente de la especie *A. thaliana*.

40

Otro objeto de la presente invención se refiere al vector de expresión *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7674 caracterizado por comprender el plásmido p35S::CDF3, es cual comprende la secuencia SEQ ID NO:4, que codifica para el factor de transcripción CDF3. Dicha secuencia SEQ ID NO:4 se selecciona preferentemente del género *Arabidopsis*, preferentemente de la especie *A. thaliana*.

45

Otro objeto de la presente invención se refiere al uso del vector de expresión *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7674 para la transformación de plantas y que presenten una mayor tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico, simultáneamente, en comparación con las plantas control sin transformar.

Otro objeto de la presente invención, se refiere al uso de una secuencia nucleotídica codificante para el factor de transcripción CDF3, preferentemente SEQ ID NO:4, en la producción de plantas transgénicas tolerantes a múltiples tipos de estrés abiótico, simultáneamente.

50

*Depósito de microorganismos según el tratado de Budapest*

55

Los microorganismos utilizados en la presente invención fueron depositados el 29 de enero de 2010 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), sita en el Edificio de Investigación de la Universidad de Valencia, Campus Burjassot, Burjassot 46100 (Valencia, España), con n° de depósito:

CECT 7674: *A. tumefaciens* cepa C58C1 transformada con el plásmido p35S::CDF3, que porta la secuencia del gen CDF3.

60

Los ejemplos que se detallan a continuación tienen como objetivo ilustrar la invención sin limitar el alcance de la misma.

65

Ejemplo 1

*Clonaje del gen CDF de Arabidopsis thaliana*

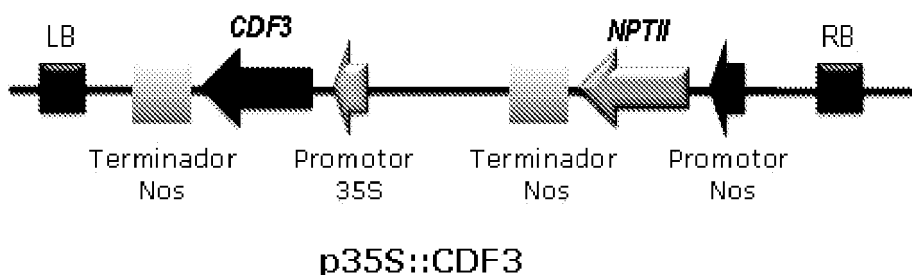
5 Mediante técnicas rutinarias de clonación y manipulación del DNA (Maniatis y cols 1989), se clonó el cDNA del gen *CDF3* de *A. thaliana* (No de Acceso al GenBank: AT3G47500.1) (SEQ ID NO:4) en el vector de expresión pROK2 (Baulcombe y cols 1986), flanqueado por el promotor del mosaico de la coliflor (CaMV) (Cauliflower Mosaic Virus) y por una secuencia de poliadenilación. El vector de expresión obtenido contiene:

- 10 a) Resistencia al antibiótico kanamicina (para seleccionar en *E. coli* y *A. tumefaciens*).
- b) Resistencia a kanamicina para selección de la línea transgénica.
- 15 c) Secuencias de T-DNA, son las secuencias que se van a transferir y se integrarán en la planta.
- d) El sitio de clonaje flanqueado por el promotor 35S de CaMV y una secuencia de poliadenilación.

20 El gen *CDF3* se amplificó mediante técnicas de PCR utilizando los cebadores específicos definidos por las secuencias SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2. El producto de PCR obtenido fue clonado en el vector pGEM-T easy (Promega) dando lugar al plásmido p35S::*CDF3* (Esquema 1). Posteriormente se secuenció el gen *CDF3* para verificar la integridad de su secuencia.

Esquema 1

*Plásmido p35S::*CDF3**



LB: Borde izquierdo; NPTII: Neomicina Fosfotransferasa II; RB: Borde derecho.

45 Obtenido el plásmido p35S::*CDF3*, se procedió a la transformación de bacterias del género *Agrobacterium tumefaciens*, cepa C58C1 con dicho plásmido. Posteriormente las bacterias transformadas se utilizaron para transformar plantas del género *Arabidopsis thaliana* mediante infiltración (Clough and Bent 1998). Las semillas de las plantas transformadas se seleccionaron en placas que contienen medio de cultivo GM (Murashige and Skoog, 1% sacarosa) y kanamicina. La selección se repitió hasta obtener plantas T3 homocigotas, correspondientes a la tercera generación después de la selección de las mismas. Se obtuvieron diferentes líneas de plantas transgénicas transformadas con el vector de expresión CECT 7674 y que sobreexpresan el gen *CDF3*.

55 Para analizar los niveles de expresión del gen *CDF3* en las líneas de plantas transgénicas transformadas con el vector CECT 7674, se realizaron ensayos de tipo Northern blot. Mediante técnicas bioquímicas convencionales se extrajo el RNA total de las distintas líneas de plantas transgénicas que sobreexpresan el gen *CDF3* (35S::*CDF3*) y de las plantas control no transformadas (WT). La sonda del gen *CDF3* utilizada para la hibridación de la membrana del Northern blot con las muestras del RNA extraído, corresponde con los últimos 150bp del cDNA del gen *CDF3* (SEQ ID NO: 3).

60 Como se observa en la figura 2 los niveles de expresión del gen *CDF3* son mucho mayores en las líneas de plantas que han sido transformadas con el plásmido 35S::*CDF3* (línea 5.4 y línea 2.1), que en las plantas control no transformadas (WT), por lo que para el resto de estudios posteriores se utilizaron plantas transformadas con el vector de expresión CECT 7674 de las líneas 5.4 y 2.1.

65

## Ejemplo 2

*Respuesta de las plantas transgénicas 35S::CDF3 que sobreexpresan el gen CDF3 frente a condiciones de deshidratación*

5

Con el objetivo de analizar si la sobreexpresión del gen *CDF3* confiere a las plantas transgénicas de la invención un aumento en la tolerancia de las mismas a condiciones de deshidratación frente a las plantas control no transformadas, se realizaron 3 tipos de ensayos:

10

a) En primer lugar, se sometieron plantas control no transformadas (WT) y plantas transgénicas 35S::CDF3, de 4 semanas a un déficit hídrico que se mantuvo durante un periodo de 10 días. En este caso, las plantas transgénicas de la invención (35S::CDF3) solo muestran leves síntomas de estrés por sequía, mientras que las plantas control no transformadas (WT) presentan severos síntomas de deshidratación (Figura 3A), demostrándose que las plantas transgénicas de la invención (35S::CDF3) muestran una tolerancia mejorada frente a la deshidratación que las plantas control no transformadas (WT).

15

20

b) En segundo lugar, se analizó la velocidad de pérdida de agua de plantas control no transformadas (WT) y de plantas transgénicas de la invención (35S::CDF3). Para lo cual se cortaron hojas de plantas transgénicas (35S::CDF3) y de plantas control (WT) de 3 semanas y se dejaron secar a una temperatura de 20°C, determinándose posteriormente el peso fresco de las mismas a diferentes intervalos de tiempo. Como se observa en la figura 3B, cuando se exponen las plantas a condiciones de deshidratación, la planta control no transformada (WT) pierde agua más rápidamente que la planta transgénica de la invención, que sobreexpresa el gen *CDF3*, lo que se traduce en que las plantas control no transformadas (WT, línea discontinua) presentan una mayor sensibilidad a la deshidratación que las plantas transgénicas de la invención (35S::CDF3, línea continua).

25

30

c) En tercer lugar, se midieron dos procesos internos de las plantas, la fotosíntesis y la conductancia estomática, tanto en plantas control no transformadas (WT), como en las plantas transgénicas de la invención (35S::CDF3). Para medir ambos parámetros se utilizó una máquina LI-COR Li-6400. Las mediciones tanto de la fotosíntesis como de la conductancia estomática, fueron realizadas entre las 10-11 horas de la mañana con unas condiciones ambientales de 400 p.p.m. CO<sub>2</sub>, una temperatura de 22°C y una humedad del 70%. Los resultados obtenidos indican que mientras la tasa de fotosíntesis de ambas líneas de plantas presenta valores similares (datos no mostrados), los valores de conductancia estomática de las plantas transformadas de la invención (35S::CDF3) son significativamente menores que los valores que presentan las plantas control no transformadas (WT) (Figura 4A). En consecuencia, la eficiencia del uso del agua es mayor en las líneas que sobreexpresan el gen *CDF3* (35S::CDF3) que en las plantas control que no sobreexpresan dicho gen (WT) (Figura 4B).

35

40

En resumen estos resultados indican que las plantas que sobreexpresan el factor de transcripción *CDF3* son más resistentes a la deshidratación. Esto es debido en parte, a que presentan menores pérdidas de agua a través de sus estomas y por tanto hacen un uso más eficiente de dicha agua.

45

## Ejemplo 3

*Respuesta de las plantas transformadas que sobreexpresan el gen CDF3 frente a tratamientos con temperaturas de congelación*

45

Para analizar la respuesta de las plantas transformadas de la invención frente a temperaturas extremas, preferentemente temperaturas de congelación, se utilizaron plantas de dos semanas, que se dividieron en dos grupos. Uno de los grupos fue sometido a un proceso previo de aclimatación a bajas temperaturas, que consistió en exponer a dicho grupo de plantas transgénicas a temperaturas de 4°C durante 7 días. Este proceso de aclimatación previo a bajas temperaturas favorece que las plantas adapten su metabolismo a esas condiciones adversas, para que posteriormente si son sometidas a condiciones más extremas, muestren una respuesta de aclimatación positiva, es decir, presenten mayor resistencia a esas condiciones adversas, que plantas que no han sido sometidas al proceso previo de aclimatación.

50

55

Los tratamientos a los que fueron sometidas las plantas transgénicas de la invención (aclimatadas o no aclimatadas) y las plantas control no transformadas, consistieron en 6 horas de exposición a diferentes temperaturas de congelación (desde -5°C hasta -10°C). Pasadas las 6 horas las plantas se sometieron a un proceso de recuperación que consistió en una semana a una temperatura de 20°C. Posteriormente se determinó el porcentaje de supervivencia a cada temperatura específica.

60

65

La comparación de los porcentajes de supervivencia de las plantas transgénicas de la invención no sometidas al proceso de aclimatación a bajas temperaturas, frente a las plantas control no transformadas ni sometidas al proceso de aclimatación previo, indica que los valores de supervivencia obtenidos para las plantas transgénicas de la invención son superiores a los valores obtenidos en las plantas control no transformadas. En la figura 5A se observa que tanto a la temperatura de -5°C como a la temperatura de -6°C, el porcentaje de supervivencia de las plantas transformadas de la invención (barras blancas) es mayor que el porcentaje de supervivencia de las plantas control no transformadas (barras negras) (98% de supervivencia de las plantas transgénicas de la invención frente a un 89% de supervivencia de las plantas control no transformadas a la temperatura de -5°C y un 63% de supervivencia de las plantas transgénicas

de la invención frente a un 46% de supervivencia de las plantas control no transformadas a la temperatura de -6°C). En la figura 5B, se muestran fotografías representativas de plantas transgénicas de la invención que sobreexpresan el gen *CDF3* (35S::*CDF3*) y plantas control no transformadas (WT), ambos grupos de plantas no fueron sometidos al proceso previo de aclimatación a bajas temperaturas. Estos resultados indican que la tolerancia intrínseca a temperaturas de congelación de las plantas transgénicas de la invención que sobreexpresan el gen *CDF3*, es superior a la tolerancia intrínseca de las plantas control no transformadas con el gen *CDF3*.

De una forma similar, se analizó la tolerancia de las plantas transgénicas de la invención y de las plantas control no transformadas, pero en este caso ambos grupos de plantas fueron aclimatados a condiciones de bajas temperaturas como se ha mencionado anteriormente. Se observa que las plantas transgénicas de la invención que sobreexpresan el gen *CDF3* (35S::*CDF3*, barras blancas), son más resistentes a temperaturas de congelación (-9°C) que las plantas control no transformadas (WT, barras negras) (Figura 5C). Cabe destacar que cuando las plantas que habían sido sometidas a un proceso previo de aclimatación son sometidas a -10°C, las plantas no transformadas (WT) no se recuperan, mientras que las plantas transgénicas de la invención (35S::*CDF3*) sobreviven alrededor de un 45% de las mismas (Figura 5C). En la figura 5D se muestran fotografías representativas de plantas aclimatadas sometidas a temperaturas de congelación. Dichas fotografías ponen de manifiesto la mayor tolerancia a las temperaturas de congelación de las plantas transgénicas de la invención (35S::*CDF3*) frente a las plantas control no transformadas. Por tanto, las plantas transgénicas que sobreexpresan el gen *CDF3* presentan una tolerancia superior a temperaturas extremas de congelación que las plantas control no transformadas, aumentando tanto la tolerancia intrínseca (plantas no aclimatadas) como la tolerancia adquirida por el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas (plantas aclimatadas).

Estos resultados demuestran que el factor de transcripción *CDF3* puede ser utilizado como una nueva herramienta para la mejora de la tolerancia simultánea a condiciones ambientales adversas tales como la deshidratación y las temperaturas extremas, preferentemente temperaturas de congelación. La aplicación más directa es su utilización para la mejora de la tolerancia simultánea a diferentes tipos de estrés de cultivos de interés agronómico. Por ello la presente invención debe cubrir cualquier planta transgénica de interés agronómico que se genere empleando el gen *CDF3* de *Arabidopsis thaliana*.

## Bibliografía

- Baulcombe, D.C., Saunders, G.R., Bevan, M.W., Mayo, M.A. and Harrison, B.D. (1986) Expression of biologically-active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature*, 321, 446-449.
- Burke EJ, Brown SJ, Christidis N. (2006) Modeling the recent evolution of global drought and projections for the twenty-first century with Hadley centre climate model. *J Hydrometeor* 7:1113-1125.
- Chen W, Provart NJ, Glazebrook J, Katagiri F, Chang HS, Eulgem T, Mauch F, Luan S, Zou G, Whitham SA, Budworth PR, Tao Y, Xie Z, Chen X, Lam S, Kreps JA, Harper JF, Si-Ammour A, Mauch-Mani B, Heinlein M, Kobayashi K, Hohn T, Dangl JL, Wang X, Zhu T. (2002) Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell*. Mar; 14(3):559-74.
- Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu JK (2004). Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J Exp Bot*. Jan; 55 (395):225-36.
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. Dec; 16(6):735-43.
- FAO (Food, Agriculture Organization of the United Nations) (2004) FAO production yearbook. FAO. Rome.
- Fernández-Muñoz, R. Y Cuartera, J. (2005) Situación actual de la Mejora Vegetal en tomate para fresco. En: El cultivo de tomate para fresco. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. Páginas: 59-76.
- Fernie A, Tadmor Y and Zamir D. (2006) Natural genetic variation for improving crop quality. *Current opinion in Plant Biology* 9:196-202.
- Fornara F, Panigrahi KC, Gissot L, Sauerbrunn N, Rühl M, Jarillo JA, Coupland G. Arabidopsis DOF transcription factors act redundantly to reduce CONSTANS expression and are essential for a photoperiodic flowering response (2009). *Dev Cell*. Jul; 17(1):75-86.
- Haymes *et al.* Hibridación de ácidos nucleicos: A Practical Approach. (1985) IRL Press, Washington, DC.
- Imaizumi T, Schultz TF, Harmon FG, A HO L, Kay S (2005). FKF1 F-Box protein mediates Cyclic degradation of a repressor of Constans in Arabidopsis. *Science* 309: 293-297.
- Kashima N, Nishi-Takaoka C, Fujita T, Taki S, Yamada G, Hamuro J, Taniguchi T. Unique structure of murine interleukin-2 as deduced from cloned cDNAs. *Nature* (1985) 313:402-404.

• **Lijavetzky D, Carbonero P, Vicente-Carbajosa (2003)**. Genome-wide comparative phylogenetic analysis of the rice and Arabidopsis Dof gene families. *BMC Evolutionary Biology* 9:1-11.

5 • **Qu LJ and Zhu YX (2006)**. Transcription factors families in Arabidopsis: major progress and outstanding issues for future research. *Current Opinión in Plant Biology* 9: 544-549.

10 • **Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang JZ, Ghandehari D, Sherman BK, Yu G. (2000)** Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*. Dec 15; 290(5499):2105-10.

• **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis (1989)** in cloning: a laboratory Manual (Cold Spring Harbor Lab Press. Cold Spring Harbor, NY) 2nd Ed.

15 • **Sawh LM et al. 2009** “Members of the Dof transcription factor family in Triticum aestivum are associated with light-mediated gene regulation”. *Funct Integr Genomics*. 9:485-98.

• **Tuberosa R and Silvio S (2006)**. Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. *Trends in Plant Science*. 11:1360-1385.

20 • **Vij S and Tyagi A (2007)** Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants. *Plant Biotechnology Journal*. 5:361-380.

• **Yanagisawa S. 2002** “The Dof family of plant transcription factors”. *Trends in Plant Science*. 12(7):555-60.

25 • **Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K (2006)**. Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold Stresses. *Annu Rev Plant Biol*. Mar 3; 781-795.

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Planta transgénica **caracterizada** por haber sido transformadas con un vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para el factor de transcripción CDF3.
2. Planta transgénica según la reivindicación 1 **caracterizada** porque el vector de expresión es *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7674.
- 10 3. Planta transgénica según la reivindicación 1 **caracterizada** porque la secuencia nucleotídica que codifica para el factor de transcripción CDF3 es la SEQ ID NO: 4.
4. Planta transgénica según la reivindicación 3 **caracterizada** porque la secuencia SEQ ID NO: 4 se selecciona preferentemente del género *Arabidopsis*, preferentemente de la especie *A. thaliana*.
- 15 5. Planta transgénica según las reivindicaciones 1 a 4 **caracterizada** por presentar mayor tolerancia, a múltiples tipos de estrés abiótico en comparación con las plantas control sin transformar.
- 20 6. Planta transgénica según la reivindicación 5 **caracterizada** porque el estrés abiótico se selecciona preferentemente entre: exceso de salinidad, sequía, temperaturas extremas de frío o calor.
7. Planta transgénica según las reivindicaciones 1 a 6 **caracterizadas** porque se selecciona preferentemente entre plantas del género *Arabidopsis*, preferentemente *Arabidopsis thaliana* y entre cualquier planta de interés agronómico, preferentemente hortícolas, cereales y frutales.
- 25 8. Procedimiento para la obtención de plantas transgénicas tolerantes a múltiples tipos de estrés abiótico **caracterizado** por la transformación de la planta silvestre con un vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para el factor de transcripción CDF3.
- 30 9. Procedimiento según la reivindicación 8 **caracterizado** porque el vector de expresión es *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7674.
10. Procedimiento según las reivindicaciones 8 o 9 **caracterizado** porque la secuencia nucleotídica comprendida en el vector de expresión utilizado para transformar la planta silvestre es la SEQ ID NO: 4.
- 35 11. Procedimiento según la reivindicación 10 **caracterizado** porque la secuencia SEQ ID NO: 4 se selecciona preferentemente del género *Arabidopsis*, preferentemente de la especie *A. thaliana*.
- 40 12. Vector de expresión *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7674 **caracterizado** por comprender el plásmido p35S::CDF3 que comprende la secuencia SEQ ID NO:4, que codifica para el factor de transcripción CDF3.
13. Vector de expresión según la reivindicación 12 **caracterizado** porque la secuencia SEQ ID NO:4 se selecciona preferentemente del género *Arabidopsis*, preferentemente de la especie *A. thaliana*.
- 45 14. Uso del vector de expresión *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7674 para la transformación de plantas y que presenten una mayor tolerancia a múltiples tipos de estrés abiótico en comparación con las plantas control sin transformar.
- 50 15. Uso de una secuencia nucleotídica codificante para el factor de transcripción CDF3, preferentemente SEQ ID NO:4, en la producción de plantas transgénicas tolerantes a múltiples tipos de estrés abiótico.

55

60

65

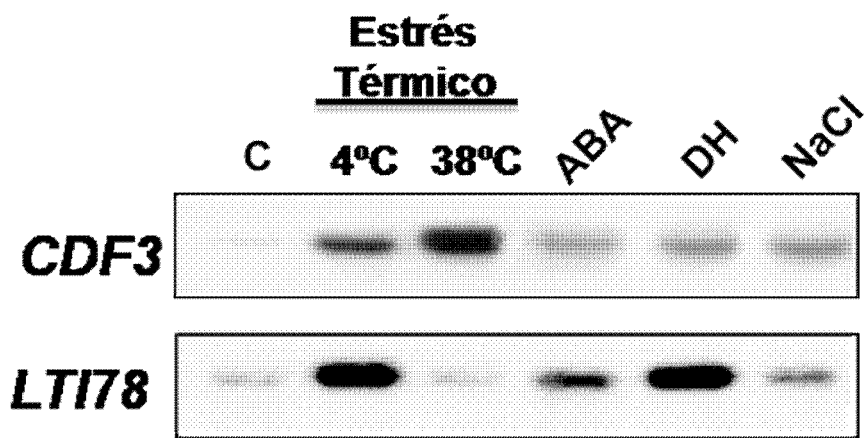


Figura 1



Figura 2

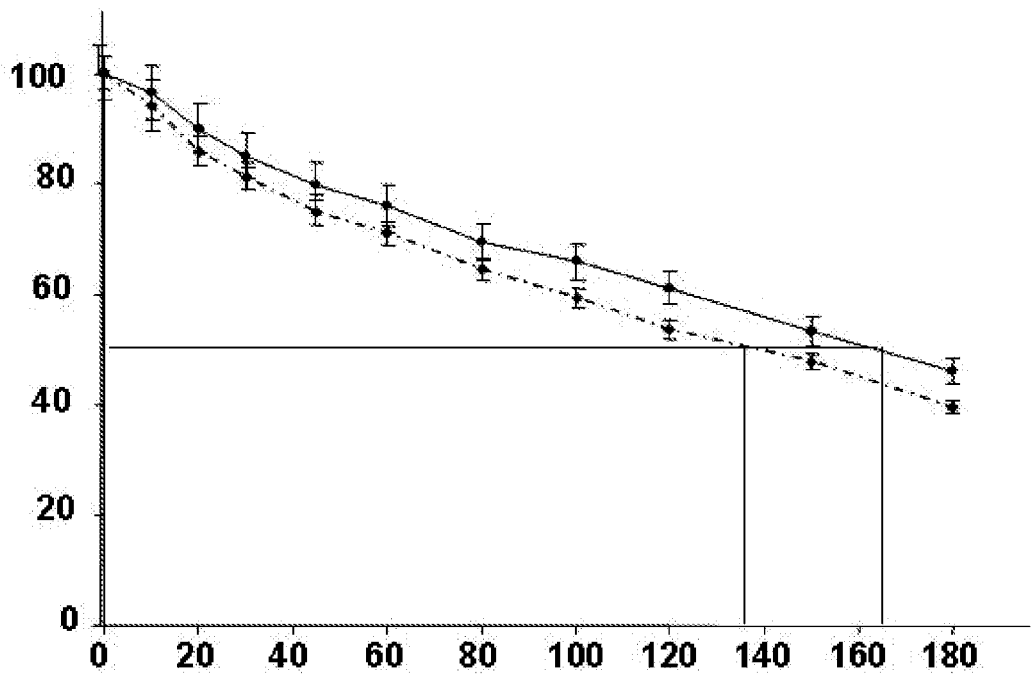
**A**

**35S::CDF3**

**WT**

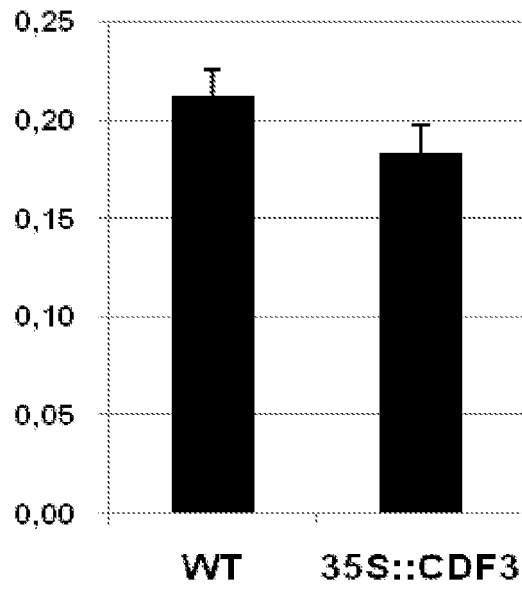


**B**

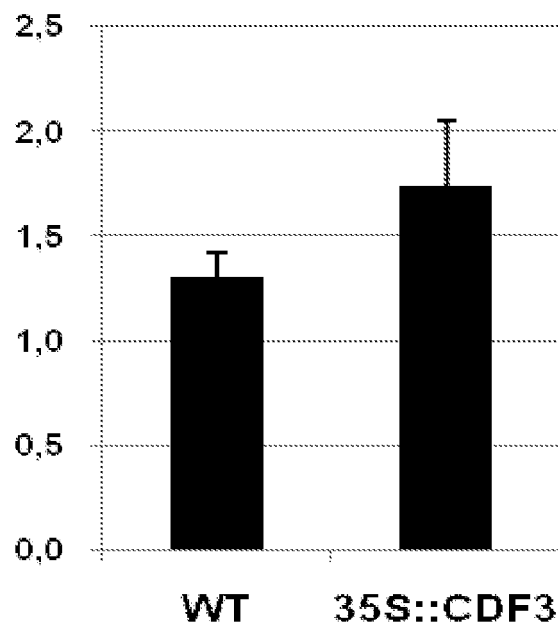


**Figura 3**

**A**



**B**



**Figura 4**

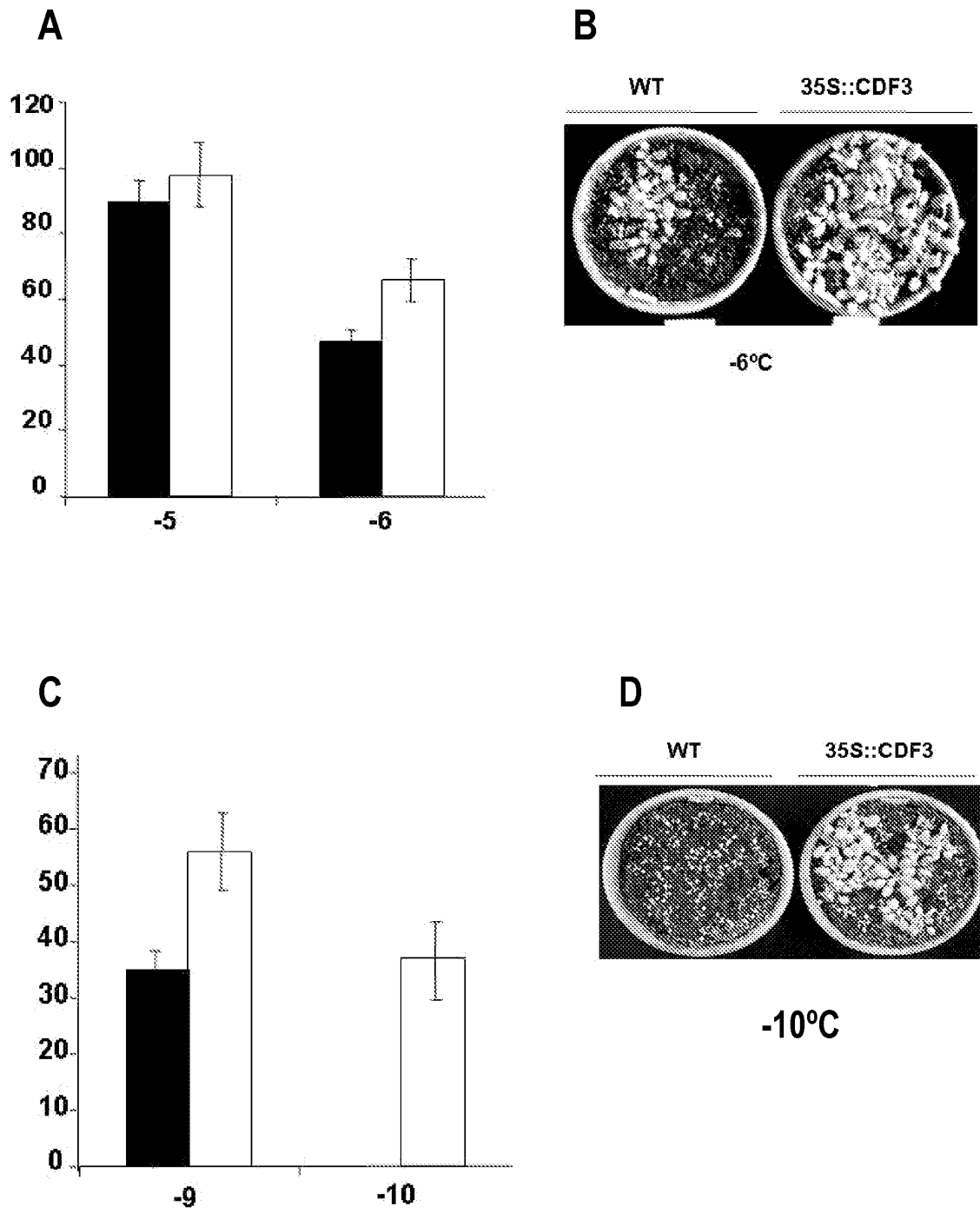


Figura 5

**LISTA DE SECUENCIAS**

|    |  |     |
|----|--|-----|
|    | <110> Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)<br>Universidad Politécnica de Madrid (UPM) |     |
| 5  |  |     |
|    | <120> PLANTAS TRANSGÉNICAS QUE PRESENTAN MAYOR TOLERANCIA A ESTRÉS ABIÓTICO  |     |
|    | <130> P-03338  |     |
| 10 |  |     |
|    | <160> 5  |     |
|    | <170> PatentIn version 3.5   |     |
| 15 |  |     |
|    | <210> 1  |     |
|    | <211> 29   |     |
|    | <212> DNA  |     |
| 20 | <213> Secuencia Artificial   |     |
|    | <220>  |     |
|    | <223> Cebador directo del gen CDF3   |     |
| 25 |  |     |
|    | <400> 1  |     |
|    | agatcttaat gatgatggag actagagat  | 29  |
| 30 |  |     |
|    | <210> 2  |     |
|    | <211> 25   |     |
|    | <212> DNA  |     |
| 35 | <213> Secuencia Artificial   |     |
|    | <220>  |     |
|    | <223> Cebador inverso del gen CDF3   |     |
| 40 |  |     |
|    | <400> 2  |     |
|    | ctcgagctaa atctgttcat cgaaa  | 25  |
| 45 |  |     |
|    | <210> 3  |     |
|    | <211> 151  |     |
|    | <212> DNA  |     |
| 50 | <213> <i>Arabidopsis thaliana</i>  |     |
|    | <220>  |     |
|    | <221> característica miscelánea  |     |
| 55 | <222> (1)..(151)   |     |
|    | <223> sonda para la hibridación del gen CDF3 en experimentos de Northern   |     |
| 60 | <400> 3  |     |
|    | gaacgaggcg atgtgcaaag ccggtggtat gttcaaaggg tttgatcata agacaaagat  | 60  |
|    | gtataacaac gacaaagctg agaactcccc tgttctttct gctaaccctg ctgctctatc  | 120 |
| 65 | aagatcacac aatttccatg aacagattta g   | 151 |

# ES 2 365 962 B1

<210> 4

<211> 1347

<212> DNA

5 <213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(1347)

<223> Secuencia codificante del gen CDF3

<400> 4

15

|  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
|  | atg | atg | atg | gag | act | aga | gat | cca | gct | att | aag | ctt | ttc | ggt | atg | aaa | 48 |
|  | Met | Met | Met | Glu | Thr | Arg | Asp | Pro | Ala | Ile | Lys | Leu | Phe | Gly | Met | Lys |    |
|  | 1   |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |    |

20

|  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
|  | atc | cct | ttt | ccg | tcg | ggt | ttt | gaa | tcg | gca | ggt | acg | gtg | gag | gat | gac | 96 |
|  | Ile | Pro | Phe | Pro | Ser | Val | Phe | Glu | Ser | Ala | Val | Thr | Val | Glu | Asp | Asp |    |
|  |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |     |    |

25

|  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | gaa | gaa | gat | gac | tgg | agc | ggc | gga | gat | gac | aaa | tca | cca | gag | aag | gta | 144 |
|  | Glu | Glu | Asp | Asp | Trp | Ser | Gly | Gly | Asp | Asp | Lys | Ser | Pro | Glu | Lys | Val |     |
|  |     |     | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |     |

30

|  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | act | cca | gag | tta | tca | gat | aag | aac | aac | aac | aac | tgt | aac | gac | aac | agt | 192 |
|  | Thr | Pro | Glu | Leu | Ser | Asp | Lys | Asn | Asn | Asn | Asn | Cys | Asn | Asp | Asn | Ser |     |
|  |     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |     |

35

|  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | ttt | aac | aat | tcg | aaa | ccc | gaa | acc | ttg | gac | aaa | gag | gaa | gcg | aca | tca | 240 |
|  | Phe | Asn | Asn | Ser | Lys | Pro | Glu | Thr | Leu | Asp | Lys | Glu | Glu | Ala | Thr | Ser |     |
|  | 65  |     |     | 70  |     |     | 75  |     |     | 80  |     |     |     |     |     |     |     |

40

|  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | act | gat | cag | ata | gag | agt | agt | gac | acg | cct | gag | gat | aat | cag | cag | acg | 288 |
|  | Thr | Asp | Gln | Ile | Glu | Ser | Ser | Asp | Thr | Pro | Glu | Asp | Asn | Gln | Gln | Thr |     |
|  |     |     |     | 85  |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |     |     |

45

|  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | aca | cct | gat | ggt | aaa | acc | cta | aag | aaa | ccg | act | aag | att | cta | ccg | tgt | 336 |
|  | Thr | Pro | Asp | Gly | Lys | Thr | Leu | Lys | Lys | Pro | Thr | Lys | Ile | Leu | Pro | Cys |     |
|  |     |     | 100 |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |     |     |     |

50

|  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | ccg | aga | tgc | aaa | agc | atg | gag | acc | aag | ttc | tgt | tat | tac | aac | aac | tac | 384 |
|  | Pro | Arg | Cys | Lys | Ser | Met | Glu | Thr | Lys | Phe | Cys | Tyr | Tyr | Asn | Asn | Tyr |     |
|  |     |     | 115 |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     |     |

55

|  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | aac | ata | aac | cag | cct | cgt | cat | ttc | tgc | aag | gct | tgt | cag | aga | tat | tgg | 432 |
|  | Asn | Ile | Asn | Gln | Pro | Arg | His | Phe | Cys | Lys | Ala | Cys | Gln | Arg | Tyr | Trp |     |
|  |     | 130 |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |     |

60

|  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | act | gct | gga | ggg | act | atg | agg | aat | ggt | cct | gtg | ggg | gca | gga | cgt | cgt | 480 |
|  | Thr | Ala | Gly | Gly | Thr | Met | Arg | Asn | Val | Pro | Val | Gly | Ala | Gly | Arg | Arg |     |
|  |     | 145 |     |     | 150 |     |     |     | 155 |     |     |     |     |     | 160 |     |     |

65

|  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | aag | aac | aaa | agc | tca | tct | tct | cat | tac | cgt | cac | atc | act | att | tcc | gag | 528 |
|  | Lys | Asn | Lys | Ser | Ser | Ser | Ser | His | Tyr | Arg | His | Ile | Thr | Ile | Ser | Glu |     |
|  |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |     |     |

ES 2 365 962 B1

|    |   |      |
|----|---|------|
|    | gct ctt gag gct gcg agg ctt gac ccg ggc tta cag gca aac aca agg | 576  |
|    | Ala Leu Glu Ala Ala Arg Leu Asp Pro Gly Leu Gln Ala Asn Thr Arg |      |
|    | 180 185 190   |      |
| 5  | gtc ttg agt ttt ggt ctc gaa gct cag cag cag cac gtt gct gct ccc | 624  |
|    | Val Leu Ser Phe Gly Leu Glu Ala Gln Gln Gln His Val Ala Ala Pro |      |
|    | 195 200 205   |      |
| 10 | atg aca cct gtg atg aag cta caa gaa gat caa aag gtc tca aac ggt | 672  |
|    | Met Thr Pro Val Met Lys Leu Gln Glu Asp Gln Lys Val Ser Asn Gly |      |
|    | 210 215 220   |      |
| 15 | gct agg aac agg ttt cac ggg tta gcg gat caa cgg ctt gta gct cgg | 720  |
|    | Ala Arg Asn Arg Phe His Gly Leu Ala Asp Gln Arg Leu Val Ala Arg |      |
|    | 225 230 235 240   |      |
| 20 | gta gag aat gga gat gat tgc tca agc gga tcc tct gtg acc acc tct | 768  |
|    | Val Glu Asn Gly Asp Asp Cys Ser Ser Gly Ser Ser Val Thr Thr Ser |      |
|    | 245 250 255   |      |
| 25 | aac aat cac tca gtg gat gaa tca aga gca caa agc ggc agt gtt gtt | 816  |
|    | Asn Asn His Ser Val Asp Glu Ser Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Val |      |
|    | 260 265 270   |      |
| 30 | gaa gca caa atg aac aac aac aac aac aat aac atg aat ggt tat gct | 864  |
|    | Glu Ala Gln Met Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Met Asn Gly Tyr Ala |      |
|    | 275 280 285   |      |
| 35 | tgc atc cca ggt gtt cca tgg cct tac acg tgg aat cca gcg atg cct | 912  |
|    | Cys Ile Pro Gly Val Pro Trp Pro Tyr Thr Trp Asn Pro Ala Met Pro |      |
|    | 290 295 300   |      |
| 40 | cca cca ggt ttt tac ccg cct cca ggg tat cca atg ccg ttt tac cct | 960  |
|    | Pro Pro Gly Phe Tyr Pro Pro Pro Gly Tyr Pro Met Pro Phe Tyr Pro |      |
|    | 305 310 315 320   |      |
| 45 | tac tgg acc atc cca atg cta cca ccg cat caa tcc tca tcg cct ata | 1008 |
|    | Tyr Trp Thr Ile Pro Met Leu Pro Pro His Gln Ser Ser Ser Pro Ile |      |
|    | 325 330 335   |      |
| 50 | agc caa aag tgt tca aat aca aac tct ccg act ctc gga aag cat ccg | 1056 |
|    | Ser Gln Lys Cys Ser Asn Thr Asn Ser Pro Thr Leu Gly Lys His Pro |      |
|    | 340 345 350   |      |
| 55 | aga gat gaa gga tca tcg aaa aag gac aac gag aca gag cga aaa cag | 1104 |
|    | Arg Asp Glu Gly Ser Ser Lys Lys Asp Asn Glu Thr Glu Arg Lys Gln |      |
|    | 355 360 365   |      |
| 60 | aag gcc ggg tgc gtt ctg gtc ccg aaa acg ttg aga ata gat gat cct | 1152 |
|    | Lys Ala Gly Cys Val Leu Val Pro Lys Thr Leu Arg Ile Asp Asp Pro |      |
|    | 370 375 380   |      |
| 65 | aac gaa gca gca aag agc tcg ata tgg aca aca ttg gga atc aag aac | 1200 |
|    | Asn Glu Ala Ala Lys Ser Ser Ile Trp Thr Thr Leu Gly Ile Lys Asn |      |
|    | 385 390 395 400   |      |
| 70 | gag gcg atg tgc aaa gcc ggt ggt atg ttc aaa ggg ttt gat cat aag | 1248 |
|    | Glu Ala Met Cys Lys Ala Gly Gly Met Phe Lys Gly Phe Asp His Lys |      |
|    | 405 410 415   |      |

# ES 2 365 962 B1

aca aag atg tat aac aac gac aaa gct gag aac tcc cct gtt ctt tct 1296  
 Thr Lys Met Tyr Asn Asn Asp Lys Ala Glu Asn Ser Pro Val Leu Ser  
                   420                                  425                                  430

5 gct aac cct gct gct cta tca aga tca cac aat ttc cat gaa cag att 1344  
 Ala Asn Pro Ala Ala Leu Ser Arg Ser His Asn Phe His Glu Gln Ile  
                   435                                  440                                  445

10 tag 1347

<210> 5

15 <211> 448

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

20 <400> 5

25 Met Met Met Glu Thr Arg Asp Pro Ala Ile Lys Leu Phe Gly Met Lys  
       1                  5                                  10                                  15

30 Ile Pro Phe Pro Ser Val Phe Glu Ser Ala Val Thr Val Glu Asp Asp  
                   20                                  25                                  30

35 Glu Glu Asp Asp Trp Ser Gly Gly Asp Asp Lys Ser Pro Glu Lys Val  
                   35                                  40                                  45

40 Thr Pro Glu Leu Ser Asp Lys Asn Asn Asn Asn Cys Asn Asp Asn Ser  
           50                                  55                                  60

45 Phe Asn Asn Ser Lys Pro Glu Thr Leu Asp Lys Glu Glu Ala Thr Ser  
       65                                  70                                  75                                  80

50 Thr Asp Gln Ile Glu Ser Ser Asp Thr Pro Glu Asp Asn Gln Gln Thr  
                   85                                  90                                  95

55 Thr Pro Asp Gly Lys Thr Leu Lys Lys Pro Thr Lys Ile Leu Pro Cys  
           100                                  105                                  110

60 Pro Arg Cys Lys Ser Met Glu Thr Lys Phe Cys Tyr Tyr Asn Asn Tyr  
           115                                  120                                  125

65 Asn Ile Asn Gln Pro Arg His Phe Cys Lys Ala Cys Gln Arg Tyr Trp  
       130                                  135                                  140

70 Thr Ala Gly Gly Thr Met Arg Asn Val Pro Val Gly Ala Gly Arg Arg  
       145                                  150                                  155                                  160

# ES 2 365 962 B1

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    | Lys | Asn | Lys | Ser | Ser | Ser | Ser | His | Tyr | Arg | His | Ile | Thr | Ile | Ser | Glu |
|    |     |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| 5  | Ala | Leu | Glu | Ala | Ala | Arg | Leu | Asp | Pro | Gly | Leu | Gln | Ala | Asn | Thr | Arg |
|    |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| 10 | Val | Leu | Ser | Phe | Gly | Leu | Glu | Ala | Gln | Gln | Gln | His | Val | Ala | Ala | Pro |
|    |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| 15 | Met | Thr | Pro | Val | Met | Lys | Leu | Gln | Glu | Asp | Gln | Lys | Val | Ser | Asn | Gly |
|    |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| 20 | Ala | Arg | Asn | Arg | Phe | His | Gly | Leu | Ala | Asp | Gln | Arg | Leu | Val | Ala | Arg |
|    | 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| 25 | Val | Glu | Asn | Gly | Asp | Asp | Cys | Ser | Ser | Gly | Ser | Ser | Val | Thr | Thr | Ser |
|    |     |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     |     | 255 |
| 30 | Asn | Asn | His | Ser | Val | Asp | Glu | Ser | Arg | Ala | Gln | Ser | Gly | Ser | Val | Val |
|    |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| 35 | Glu | Ala | Gln | Met | Asn | Asn | Asn | Asn | Asn | Asn | Asn | Met | Asn | Gly | Tyr | Ala |
|    |     |     | 275 |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| 40 | Cys | Ile | Pro | Gly | Val | Pro | Trp | Pro | Tyr | Thr | Trp | Asn | Pro | Ala | Met | Pro |
|    | 290 |     |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| 45 | Pro | Pro | Gly | Phe | Tyr | Pro | Pro | Pro | Gly | Tyr | Pro | Met | Pro | Phe | Tyr | Pro |
|    | 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     |     | 315 |     |     |     | 320 |
| 50 | Tyr | Trp | Thr | Ile | Pro | Met | Leu | Pro | Pro | His | Gln | Ser | Ser | Ser | Pro | Ile |
|    |     |     |     | 325 |     |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| 55 | Ser | Gln | Lys | Cys | Ser | Asn | Thr | Asn | Ser | Pro | Thr | Leu | Gly | Lys | His | Pro |
|    |     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| 60 | Arg | Asp | Glu | Gly | Ser | Ser | Lys | Lys | Asp | Asn | Glu | Thr | Glu | Arg | Lys | Gln |
|    |     |     | 355 |     |     |     | 360 |     |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| 65 | Lys | Ala | Gly | Cys | Val | Leu | Val | Pro | Lys | Thr | Leu | Arg | Ile | Asp | Asp | Pro |
|    |     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| 70 | Asn | Glu | Ala | Ala | Lys | Ser | Ser | Ile | Trp | Thr | Thr | Leu | Gly | Ile | Lys | Asn |
|    | 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |

# ES 2 365 962 B1

Glu Ala Met Cys Lys Ala Gly Gly Met Phe Lys Gly Phe Asp His Lys  
405 410 415

5

Thr Lys Met Tyr Asn Asn Asp Lys Ala Glu Asn Ser Pro Val Leu Ser  
420 425 430

10

Ala Asn Pro Ala Ala Leu Ser Arg Ser His Asn Phe His Glu Gln Ile  
435 440 445

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201030360

②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 11.03.2010

③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: **C12N15/82** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados  | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| X         | WO 0216655 A2 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE. SYNGENTA PARTICIPATIONS AG) 28.02.2002, páginas 559-561. | 1-15                       |
| A         | WO 2007064724 A2 (CROPDESIGN N.V. TECHNOLOGIEPARK) 07.06.2007   | 1-15                       |

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  
28.09.2011

Examinador  
I. Rueda Molins

Página  
1/4

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

C12N

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, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.09.2011

#### Declaración

|   |                                      |           |
|---|--------------------------------------|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>            | Reivindicaciones 2, 9, 12-14         | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones 1, 3-8, 10, 11 y 15 | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b> | Reivindicaciones                     | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones 1-15                | <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 se publica.

**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       | WO 0216655 A2 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE. SYNGENTA PARTICIPATIONS AG) | 28.02.2002        |
| D02       | WO 2007064724 A2 (CROPDESIGN N.V. TECHNOLOGIEPARK)                         | 07.06.2007        |

**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**

La solicitud de patente divulga plantas transgénicas con mayor tolerancia a estrés abiótico.

El documento D01, que es el que refleja el estado de la técnica más cercano, muestra plantas transgénicas que presentan una mayor tolerancia frente a determinados tipos de estrés.

**NOVEDAD (Artículo 6 LP 11/1986)**

En las reivindicaciones 1, 3 - 7 se reivindica una planta transgénica caracterizada por haber sido transformada con un vector de expresión que codifica para el factor de transcripción CDF3 (SEQ ID NO: 4) y presentar mayor tolerancia a múltiples tipos de estrés abiótico.

En las reivindicaciones 8, 10 y 11 se reivindica un procedimiento para la obtención de plantas transgénicas tolerantes a múltiples tipos de estrés abiótico caracterizado por la transformación de la planta silvestre con un vector de expresión que comprende una secuencia que codifica para el factor de transcripción CDF3 (SEQ ID NO: 4).

En la reivindicación 15 se reivindica el uso del factor de transcripción CDF3 (SEQ ID NO: 4) en la producción de plantas transgénicas tolerantes a múltiples tipos de estrés.

El documento D01 divulga (en las reivindicaciones 46, 51-54 y 64) un método para producir plantas transgénicas que presentan mayor tolerancia frente a determinados tipos de estrés que han sido transformados con la secuencia SEQ ID NO: 1489.

Teniendo en cuenta la información divulga en el documento D01 y que las secuencias SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 1489 son exactamente iguales las reivindicaciones 1, 3-8, 10, 11 y 15 no presentan novedad según lo establecido en el Artículo 6 LP 11/1986.

**ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículo 8 LP 11/1986)**

Las reivindicaciones 12 - 14 reivindican un vector de expresión *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7674 caracterizado por comprender el plásmido p35S::CDF3 que comprende la secuencia SEQ ID NO: 4. En la reivindicación 2 (dependiente de la reivindicación 1) se reivindica una planta transgénica que emplea dicho vector y en la reivindicación 9 (dependiente de la reivindicación 8) se reivindica un procedimiento que también emplea el citado vector.

Teniendo en cuenta que en el documento D01 se divulga (en las reivindicaciones 46, 51-54 y 64) la secuencia SEQ ID NO: 1489 que es exactamente igual que la secuencia SEQ ID NO: 4 para la producción de plantas transgénicas que presentan mayor tolerancia frente a determinados tipos de estrés y que el promotor empleado en la construcción de dicho vector es ampliamente conocido en el estado de la técnica, la creación del vector de expresión *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7674 no presentaría dificultad técnica para un experto en la materia y su uso para el aumento de la tolerancia frente a determinados tipos de estrés resultaría evidente a partir de la información divulgada en el documento D01. Por tanto, la reivindicaciones 2, 9 y 12 - 14 no presentan actividad inventiva según lo establecido en el Artículo 8 LP 11/1986.