



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 307 370**

⑫ Número de solicitud: 200600218

⑤① Int. Cl.:
C12N 15/29 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **01.02.2006**

⑫ Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2008**

Fecha de la concesión: **15.09.2009**

⑫ Fecha de anuncio de la concesión: **28.09.2009**

⑫ Fecha de publicación del folleto de la patente:
28.09.2009

⑦③ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad Politécnica de Valencia**

⑦② Inventor/es: **Sáez Somolinos, Ángela;
Serrano Salom, Ramón y
Rodríguez Egea, Pedro Luis**

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Plantas resistentes al estrés hídrico y salino y procedimiento para la obtención de las mismas.**

⑤⑦ Resumen:

Plantas resistentes al estrés hídrico y salino y procedimiento para la obtención de las mismas.

La presente invención proporciona una planta resistente al estrés hídrico y salino y un procedimiento para la obtención de la misma. El abordaje utilizado se basa en un reforzamiento de la respuesta a la fitohormona ABA mediante la inactivación combinada de las proteínas fosfatasa tipo 2C: ABI1 y HAB1 o de sus proteínas ortólogas. Esta inactivación se realiza mediante la pérdida de función (silenciamiento/mutagénesis insercional) de los genes que codifican dichas proteínas, generando un doble mutante hab1-1abi1-2 o hab1-abi1-3. La presente invención tiene aplicación en plantas de interés agronómico.

ES 2 307 370 B1

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

DESCRIPCIÓN

Plantas resistentes al estrés hídrico y salino y procedimiento para la obtención de las mismas.

5 Sector de la técnica

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de la biotecnología vegetal, y en concreto se refiere a un procedimiento para obtener plantas modificadas genéticamente, tolerantes a salinidad y sequía.

10 Estado de la técnica

La sequía y la salinidad representan estreses ambientales que afectan de forma crucial al crecimiento de las plantas y limitan enormemente su potencial agrícola (*Bohnert and Jensen, 1996; Flowers, 2004; Yamaguchi and Blumwald, 2005*). La explotación y el riego intensivo de los cultivos han originado importantes cambios en la composición química de los suelos agrícolas. Por ejemplo, se estima que la acumulación de NaCl afecta a casi un quinto de la tierra de regadío y millones de hectáreas cultivadas deben ser abandonadas cada año (*Flowers, 2004*). La agricultura del siglo XXI encara el problema de mantener altos rendimientos en la producción de las cosechas, lo cual es a menudo dificultado por la incidencia de plagas, enfermedades y condiciones climáticas adversas. Mientras el progreso es significativo en el control de diversas enfermedades causadas por patógenos vegetales, todavía es un desafío importante el control del estrés abiótico, fundamentalmente sequía, estrés por temperatura y salinidad (*Zhang et al., 2004*). La sequía y la salinidad ocasionan un déficit hídrico que conlleva un estrés osmótico. Adicionalmente, la toxicidad del sodio y del cloruro inhibe procesos metabólicos sensibles a estos iones y produce deficiencias en la toma de nutrientes esenciales, principalmente potasio (*Zhu, 2002*).

Diferentes mecanismos de halotolerancia y osmotolerancia están implicados en contrarrestar los efectos negativos descritos anteriormente. Por ejemplo, los mecanismos de osmotolerancia comprenden varias rutas metabólicas que bacterias, hongos, algas y plantas han desarrollado durante la lucha evolutiva por la supervivencia (*Serrano and Gaxiola, 1994; Zhu, 2002*). De este modo, una serie de rutas interconectadas permiten alcanzar el ajuste osmótico, facilitan la retención y adquisición de agua, mantienen la homeostasis iónica, palían el estrés oxidativo originado y en general protegen las funciones celulares (*Ingram and Bartels 1996; Zhu, 2002*).

El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona que desempeña un papel crucial en el desarrollo de la semilla y en la regulación de la respuesta vegetal al estrés ambiental, particularmente sequía y salinidad (*Finkelstein et al., 2002; Nambara and Marion-Poll 2005*). Durante el desarrollo de la semilla, el ABA regula la síntesis de proteínas y lípidos de reserva, promueve la tolerancia a la desecación y la dormición de la semilla. Esta hormona también ejerce un papel protector para la semilla, evitando su germinación precoz e inhibiendo la misma en condiciones de estrés osmótico (*González-Guzmán et al., 2002*). En tejido vegetativo y ante situaciones de bajo potencial hídrico, la planta produce un incremento de hasta 40 veces en los niveles de ABA, lo que conduce a una variedad de respuestas adaptativas. En particular, el cierre de estomas y la remodelación de la expresión génica en respuesta a ABA son cruciales para tolerar la situación de estrés (*Finkelstein et al., 2002*).

El ABA desencadena una cascada señalizadora en las células oclusivas de los estomas que resulta en su cierre ante situaciones de estrés hídrico (*Schroeder et al., 2001*). Adicionalmente, en respuesta a la hormona se genera un profundo cambio de la expresión génica, el cual afecta a más de 1000 genes del transcriptoma vegetal (*Takahashi et al., 2004*). Diferentes evidencias sugieren que la percepción de la hormona puede producirse tanto extra como intracelularmente (*Finkelstein et al., 2002*). No obstante, todavía no ha sido identificado un receptor primario de la hormona, pero sí se ha elucidado el papel de una amplia variedad de segundos mensajeros que contribuyen a la señalización de la misma. Entre ellos encontramos cADP-ribosa, especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico, fosfoinosítoles, ácido fosfatídico, esfingosina-1-fosfato y Ca^{2+} (*Finkelstein et al., 2002*). La señalización posterior implica una compleja red de reguladores positivos y negativos, en particular quinasas y fosfatasa, y finalmente una plétora de factores de transcripción (*Finkelstein et al., 2002*). Mutaciones en proteínas de unión a ARN (HYL1, ABH1 o SAD1) también afectan la señalización de la hormona (*Finkelstein et al., 2002*).

Los eventos de fosforilación y defosforilación desempeñan un papel crucial en la señalización del ABA, e implican diversas quinasas y fosfatasa (*Finkelstein et al., 2002*). Por ejemplo, las quinasas AAPK, OST1 o PKABA1, han sido implicadas en diversos aspectos de la señalización hormonal (*Finkelstein et al., 2002*). Además de estas quinasas (independientes de calcio), otras quinasas calcio-dependientes están implicadas en la ruta de transducción de señal. Por ejemplo, las quinasas CDPK1 y CDPK1 a que presentan un dominio tipo calmodulina, o la familia de proteinquinasas de tipo SnRK3 (PKS3, PKS18, CIPK3) que actúan en concierto con los sensores de calcio CBL y SCABP (*Finkelstein et al., 2002*).

Como contrapartida, diferentes proteínofosfatasa (PP) de serina y treonina juegan también un importante papel en la señalización del ABA, en particular PP de tipo 2A (PP2A) y 2C (PP2C). Recientemente se ha demostrado que la disrupción de una subunidad reguladora (RCN1) de la PP2A confiere insensibilidad a ABA en *Arabidopsis*. También tiene este efecto el uso de un inhibidor químico, ácido okadaico, de esta fosfatasa. Estos datos indican que RCN1 es un regulador positivo de la señal de ABA (*Kwak et al., 2002*). En el caso de la familia de PP2C, la evidencia genética implica al menos a cuatro miembros de esta familia, ABI1, ABI2, PP2CA y HAB1, como reguladores negativos de la ruta de señalización (*Gosti et al., 1999; Leonhardt et al., 2004; Merlot et al., 2001; Sáez et*

al., 2004; Tahtiharju and Palva 2001). Mientras ABI1, ABI2 y HAB1 son reguladores tanto en semillas como en tejido vegetativo, (Leonhardt et al., 2004; Leung et al., 1994; Leung et al., 1997; Meyer et al., 1994; Rodríguez et al., 1998; Sáez et al., 2004), PP2CA no parece estar implicada en la respuesta a estrés hídrico en tejido vegetativo (Tahtiharju and Palva 2001). El ABA promueve un aumento de la expresión de HAB1 y ABI1, y estas proteínas, mediante su actividad defosforilante, provocan una atenuación de la señal. Se crea de este modo un circuito de retroalimentación negativa, ya que la atenuación de la señal hormonal conduce a una disminución de la expresión de ABI1 y HAB1, restaurándose así la capacidad para responder de nuevo a la hormona.

Tanto la ruta de biosíntesis de ABA, la regulación de la actividad y expresión de los enzimas biosintéticos implicados, así como la ruta de transducción de señal han sido blancos potenciales en la investigación para la generación de variedades modificadas genéticamente con mayor tolerancia a salinidad y sequía (Finkelstein et al., 2002; Nambara and Marion-Poll 2005). En particular, la transducción de la señal de ABA puede ser modulada mediante reforzamiento de reguladores positivos de la misma o atenuación de reguladores negativos. Durante la última década han sido identificados diversos reguladores negativos de la ruta, fundamentalmente mediante técnicas de genética y biología molecular. Como se ha mencionado previamente, las proteínas fosfatasa de tipo 2C ABI1 y HAB1 representan un elemento clave en la regulación negativa de la respuesta a ABA. Puesto que estas proteínas son reguladores negativos globales de la señal de ABA, la eliminación de las mismas puede potencialmente conducir a un reforzamiento de la señal hormonal, incrementando la tolerancia de la planta a situaciones de estrés por sequía y salinidad.

Se han utilizado diversas estrategias de ingeniería genética para mejorar la tolerancia de las plantas a estrés hídrico y salino. Entre ellas cabe citar la transferencia de genes individuales requeridos para la síntesis de osmoprotectores o enzimas detoxificantes (Ingram and Bartels 1996; Bohnert and Jensen, 1996). En estos abordajes se transfiere un único gen que codifica una única proteína de respuesta a estrés, por lo que la tolerancia conferida mediante estrategias individuales es limitada.

La expresión de genes inducibles por estrés hídrico y salino implica rutas independientes y dependientes de ABA. En la ruta independiente de ABA se ha descrito una mejora de la tolerancia a sequía y salinidad mediante la transferencia del factor de transcripción DREB1A (Kasuga et al., 1999). Este factor regula la inducción de genes de respuesta a estrés de forma independiente de ABA (aunque estos genes también presentan en su promotor regiones dependientes de ABA), y su sobreexpresión de forma inducible mejora la tolerancia a estrés. No obstante, una expresión elevada de este factor de transcripción puede conducir a retraso en el crecimiento en condiciones de ausencia de estrés.

Existe la necesidad de encontrar un procedimiento para la obtención de plantas modificadas genéticamente que sean tolerantes a la salinidad y sequía, cuya modificación genética no confiera una tolerancia limitada ni interfiera negativamente con el crecimiento de la planta en condiciones de ausencia de estrés. Este ha sido el objeto de la presente invención y su novedad radica en que proporciona un procedimiento para obtener plantas modificadas genéticamente resistentes al estrés hídrico y salino mediante la inactivación combinada de proteínas fosfatasa tipo 2C, de esta manera se refuerza la ruta de transducción del ABA dando lugar a plantas que presentan una respuesta rápida a la sequía y salinidad, solucionando los problemas anteriormente expuestos.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a una técnica de mejora de la resistencia de plantas a salinidad y sequía mediante la inactivación combinada de dos proteínas pertenecientes a la familia de las proteínas fosfatasa de tipo 2C.

Un aspecto particular de la invención se refiere a una planta resistente al estrés hídrico y salino que comprende la inactivación combinada de las proteínas ABI1 y HAB1, o de sus proteínas ortólogas.

En la presente invención cuando hablamos de proteínas o genes ortólogos nos referimos a proteínas o genes que se han originado a partir de un mismo ancestro y que comparten la misma función pero que se encuentran en diferentes organismos.

En una realización particular de la invención, la inactivación combinada de las proteínas ABI1 y HAB1 se realiza mediante la inactivación de los genes que codifican dichas proteínas o sus proteínas ortólogas, particularmente la inactivación de dichos genes se realiza mediante el silenciamiento génico.

En una realización más particular de la invención, la inactivación combinada de las proteínas ABI1 y HAB1 se realiza mediante la inactivación de los genes que codifican las proteínas ABI1 y HAB1 identificadas como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 respectivamente, particularmente la inactivación de los genes que codifican dichas proteínas se realiza mediante silenciamiento génico.

En una realización particular de la presente invención, la inactivación de los genes que codifican las proteínas ABI1 y HAB1 o sus proteínas ortólogas, se lleva a cabo mediante silenciamiento génico, a través de la generación de un doble mutante. En una realización más particular, el doble mutante es el mutante hab1-labi1-2. En otra realización particular el doble mutante es el mutante hab1-labi1-3.

Otro aspecto particular de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de plantas resistentes al estrés hídrico y salino que comprenden la inactivación combinada de las proteínas ABI1 y HAB1 o de sus proteínas ortólogas.

En una realización particular, en el procedimiento de obtención de las plantas resistentes al estrés hídrico y salino, la inactivación de las proteínas se realiza mediante la inactivación de los genes que codifican las proteínas ABI1 y HAB1 o sus proteínas ortólogas, particularmente la inactivación de dichos genes se realiza mediante el silenciamiento génico.

En una realización particular, en el procedimiento de obtención de las plantas resistentes al estrés hídrico y salino, la inactivación de las proteínas se realiza mediante la inactivación de los genes que codifican las proteínas ABI1 y HAB1 identificadas como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 respectivamente, particularmente la inactivación de los genes que codifican dichas proteínas se realiza mediante silenciamiento génico.

En una realización particular, en el procedimiento de obtención de las plantas resistentes al estrés hídrico y salino, la inactivación de los genes que codifican las proteínas ABI1 y HAB1 o sus proteínas ortólogas, se lleva a cabo mediante el silenciamiento génico a partir de la generación de un doble mutante. En una realización más particular, el doble mutante es el mutante *hab1-labi1-2*. En otra realización particular el doble mutante es el mutante *hab1-labi1-3*.

Otro aspecto particular de la invención se refiere a una planta modificada genéticamente o componentes de las mismas que comprende la inactivación combinada de las proteínas ABI1 y HAB1 y ha sido obtenida según el procedimiento descrito anteriormente.

La inactivación de proteínas en la presente invención se realiza mediante la inactivación de los genes que codifican dichas proteínas mediante el silenciamiento génico a partir de la generación de un doble mutante con ADN-T, no obstante la inactivación de los genes se puede realizar mediante otras técnicas de ingeniería genética conocidas para un experto en la materia como la construcción de ARN interferente (ARNi) (Helliwell and Waterhouse 2005).

Descripción de las figuras

Figura 1. Esquema de los mutantes *hab1-1*, *abi1-2* y *abi1-3*. Análisis del ARNm de ABI1 y HAB1 en plantas silvestres, *hab1-1*, *abi1-2*, *abi1-3* y el mutante doble *hab1-labi1-2*. (a, b) Esquema del gen *HAB1* y *ABI1*, respectivamente. Localización de las inserciones de ADN-T en los mutantes *hab1-1*, *abi1-2* y *abi1-3*. La numeración comienza en el ATG iniciador. Se indica mediante flechas el borde izquierdo del ADN-T (LB) y los oligonucleótidos utilizados para localizar la inserción.

(c) Análisis Northern de plantas silvestres, *hab1-1*, *abi1-2*, *abi1-3* y el mutante doble *hab1-labi1-2*. Cada carril contiene aproximadamente 10 µg de ARN total preparado de plantas tratadas con 1 µM ABA durante 3 h. El filtro fue analizado con una sonda preparada a partir del cADN completo de ABI1 o HAB1.

Figura 2. Hipersensibilidad a la inhibición de germinación mediada por el ABA en *hab1-1*, *abi1-2*, *abi1-3* y el mutante doble *hab1-labi1-2* respecto a semillas silvestres. (a-c) Porcentaje de semillas que germinaban y desarrollaban cotiledones verdes a las concentraciones indicadas del ABA, NaCl y manitol. Aproximadamente 200 semillas de cada genotipo fueron sembradas en cada placa y su germinación fue analizada tras 10 días. Los valores son las medias ±SD de tres experimentos independientes.

Figura 3. Hipersensibilidad a la inhibición del crecimiento mediada por el ABA en *hab1-1*, *abi1-2*, *abi1-3* y el mutante doble *hab1-labi1-2* respecto a plantas silvestres.

(a) Crecimiento de los diferentes mutantes y plántulas silvestres en medio suplementado o carente de ABA. Las fotografías fueron tomadas tras 12 días de transferir plántulas de 5 días desde medio MS a placas carentes (-) o suplementadas con 10 µM ABA.

(b) Porcentaje de peso fresco de los diferentes mutantes con respecto a plantas silvestres en medio suplementado o carente de ABA. Los valores son las medias ±SE de tres experimentos independientes (n=30 en cada experimento).

Figura 4. Hipersensibilidad en el cierre de estomas inducido por el ABA en *hab1-1*, *abi1-2*, y el mutante doble *hab1-labi1-2* respecto a plantas silvestres. Tolerancia a sequía del doble mutante *hab1-labi1-2* respecto a plantas silvestres.

(a) Medidas de la apertura de estomas en plantas silvestres y los diferentes mutantes. El ratio de apertura de los estomas (anchura/longitud) se obtuvo a partir de medidas realizadas tras 2 h 30 min tras la adición de 10 o 100 nM ABA. Los valores son las medias ±SD de tres experimentos independientes (n=30 en cada experimento).

(b) Tolerancia al estrés hídrico del doble mutante *hab1-labi1-2* respecto a plantas silvestres. Las fotografías fueron tomadas tras 10 días de cesar el riego de las plantas. Para la fotografía de la parte inferior se eliminó el tallo para apreciar mejor el fenotipo en las hojas de roseta.

Figura 5. Tolerancia al NaCl del doble mutante *hab1-labi1-2* respecto a plantas silvestres. La fotografía fue tomada tras 12 días de transferir plántulas de 5 días desde medio MS a medio suplementado con 100 mM NaCl.

Figura 6: Muestra el alineamiento de la proteína ABI1 de *Arabidopsis thaliana* con sus proteínas ortólogas de la planta de la patata (*Solanum tuberosum*) (A), la planta del tomate (*Lycopersicon esculentum*) (B) y dos proteínas fosfatasa tipo 2C de la planta del arroz (*Oryza sativa*) (C).

Figura 7: Muestra el alineamiento de la proteína HAB1 de *Arabidopsis thaliana* con sus proteínas ortólogas de la planta de la patata (*Solanum tuberosum*) (A), la planta del tomate (*Lycopersicon esculentum*) (B) y dos proteínas fosfatasa tipo 2C de la planta del arroz (*Oryza sativa*) (C).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una técnica de mejora de la tolerancia de plantas a salinidad y sequía mediante la inactivación combinada de las proteínas fosfatasa de tipo 2C, ABI1 y HAB1. La técnica ha sido desarrollada en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* y puede ser aplicada a plantas de interés agronómico mediante distintas técnicas de ingeniería genética conocidas por un experto en la materia. Ello es posible porque los genes que codifican las proteínas ABI1 y HAB1 están conservados en plantas de interés agronómico y existe tecnología adecuada para su inactivación en las mismas (Helliwell and Waterhouse 2005). Por ejemplo, en la figura 6 y en la figura 7 se muestra el alineamiento de las proteínas ABI1 y HAB1 de *Arabidopsis thaliana* con sus proteínas ortólogas de la planta de la patata (*Solanum tuberosum*), la planta del tomate (*Lycopersicon esculentum*) y la planta del arroz (*Oryza sativa*).

En primer lugar se procedió a la inactivación combinada de los genes que codifican las proteínas ABI1 y HAB1 utilizando como modelo *Arabidopsis thaliana*. A continuación se realizó una caracterización fenotípica del mutante doble generado (*hab1-labi1-2*), tanto en condiciones de ausencia como de presencia de estrés salino y sequía. En condiciones de ausencia de estrés abiótico, el doble mutante generado no presentó penalización en el desarrollo vegetativo ni en la producción de semillas respecto a las plantas control. En cambio, en condiciones de sequía y estrés salino, el doble mutante presentó una notable ventaja (estadísticamente significativa) en cuanto a su crecimiento vegetativo y reproductivo.

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* se crecieron en condiciones habituales de invernadero. Para cultivo *in vitro*, las semillas fueron esterilizadas en superficie mediante tratamiento con etanol 70% y Triton X-100 0.05% durante 20 min, seguido de lavados con agua destilada estéril. Las semillas se estratificaron durante 3 días en oscuridad y a 4°C. Después se sembraron en placas de medio Murashige-Skoog (MS) (Murashige and Skoog 1962), compuesto por sales basales MS, ácido 2-[N-morpholino]etanosulfónico 0.1%, sacarosa 1%, agar 1% y pH ajustado a 5.7 con KOH antes de autoclavar. Las placas se sellaron y fueron incubadas en una cámara de crecimiento controlado a 22°C, y fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad a 80-100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$.

Para medir la sensibilidad a ABA en los ensayos de germinación y crecimiento temprano, se sembraron las semillas en placas de medio MS suplementado con las concentraciones indicadas de ABA. Para medir la sensibilidad a la inhibición de la germinación causada por estrés osmótico, el medio se suplementó con las concentraciones indicadas de NaCl o manitol. A los 7 días, se evaluó el porcentaje de semillas que germinaban y desarrollaban cotiledones verdes expandidos.

El efecto del ABA y el NaCl sobre el crecimiento se determinó pesando las plantas tras 12 días del paso de las plántulas desde medio MS a medio MS suplementado con ABA 10 μM o NaCl 100 mM, respectivamente. Se obtuvieron datos de tres experimentos independientes, cada uno hecho con 30-40 plantas.

Los ensayos de cierre de estomas inducido por ABA se realizaron en hojas de plantas de 5-6 semanas, de las cuales se obtuvo la capa epidérmica. Esta se incubó durante 2 h 30 min en una solución tampón que contenía KCl 10 mM, ácido diiminoacético 7.5 mM y MES/Tris 10 mM, pH 6.2, a 20°C. Posteriormente, la capa epidérmica se incubó durante 2 h 30 min en la misma solución suplementada o no con ABA (concentraciones de 10 y 100 nM). Los datos se expresan como la media de cuatro experimentos $\pm$ SD donde se determinó el ratio anchura/longitud para 30-40 estomas en cada experimento.

Para la realización de los ensayos de estrés hídrico, las plantas se crecieron en condiciones normales de riego durante 21 días. Posteriormente se suspendió la irrigación y se minimizó la evaporación del suelo cubriendo el mismo con plástico.

Se realizaron tres experimentos, incluyendo 10 plantas en cada uno de tipo silvestre y mutante.

Para realizar análisis de ARN, plántulas de 7 días fueron transferidas a medio suplementado o no con ABA 1 μM , el material se recogió tras tres horas de tratamiento y se congeló en nitrógeno líquido. El ARN total se extrajo mediante un Qiagen RNeasy Plant Mini Kit, se separó en geles de agarosa-formaldehído y se transfirió a una membrana de nylon, la cual fue hibridada con una sonda de ADNc marcada con ^{32}P . La sonda de ADNc contenía la secuencia codificante del gen ABI1 identificada como SEQ ID NO: 3 o la secuencia codificante del gen HAB1 identificada como SEQ ID NO: 4.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo de la misma:

Ejemplo nº 1

Obtención y caracterización de los mutantes sencillos de ADN-T hab1-1, abi1-2 y abi1-3

5 El genoma de la planta modelo *Arabidopsis* ha sido secuenciado mediante una colaboración internacional denominada AGI (iniciativa para el genoma de *Arabidopsis*, Nature, 408:796-815). La disponibilidad de la secuencia completa de este genoma (el primer genoma vegetal en ser secuenciado) ha permitido poner en marcha diversos proyectos encaminados a elucidar la función de los más de 25000 genes identificados en esta planta modelo. En particular, se ha generado una plataforma de mutantes de inserción de ADN-T (colección Alonso/Crosby/Ecker, *Alonso et al.*, 2003) que tiene como objetivo generar una colección indexada de mutaciones en el genoma de *Arabidopsis*.

Esta colección, denominada SALK, se realizó mediante la generación de inserciones de ADN-T (vehiculado por *Agrobacterium tumefaciens*) a partir del vector pROK2 (*Alonso et al.*, 2003). Para ello se utilizó el método de inserción floral (*Clough and Bent*, 1998), utilizando la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58 que contenía el vector binario pROK2 (*Alonso et al.*, 2003). Las bacterias se crecieron hasta fase estacionaria en medio de cultivo LB (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl por litro) suplementado con 25 mg/ml de kanamicina. Las células fueron recogidas mediante centrifugación y se resuspendieron en medio de infiltración (sacarosa 5% y Silwet L-77 0.05%). Plantas de *Arabidopsis* de cuatro semanas fueron invertidas y sumergidas en esta suspensión, tras lo cual se cubrieron con plástico para mantener la humedad. Tras 12-24 horas se retiró la cubierta de plástico y se devolvieron las plantas al invernadero. Tras 3-5 semanas se recogieron las semillas de las plantas así tratadas y se almacenaron durante 3-4 semanas antes de proceder a la selección de los transformantes que contenían ADN-T transferido por *Agrobacterium*. Para ello se esterilizaron las semillas en superficie como se describe en la sección anterior y se sembraron en placas de medio MS suplementado con 25 mg/ml de kanamicina. Los transformantes fueron identificados como plántulas resistentes a kanamicina que producían hojas verdes y raíces en el medio de selección. Aproximadamente 150000 plantas transformadas fueron así seleccionadas, a partir de las cuales se extrajo ADN genómico y se procedió a la identificación de mutantes mediante la secuenciación de los sitios de inserción del ADN-T. La línea SALK_21004 contenía una inserción de ADN-T en el gen HAB1 (*Sáez et al.*, 2004). Para identificar el mutante homocigoto hab1-1 se procedió al genotipado de la línea SALK_21004 utilizando los siguientes oligonucleótidos del gen HAB 1:

30 Forward hab1-1, identificado como SEQ ID NO: 5

Reverse hab1-1, identificado como SEQ ID NO: 6

35 Igualmente, dos líneas que contenían una inserción única de ADN-T en ABI1 fueron identificadas, SALK_72009 y SALK_76039. Para identificar los correspondientes mutantes homocigotos, abi1-2 y abi1-3 respectivamente, se procedió al genotipado de estas líneas utilizando los siguientes oligonucleótidos del gen ABI1:

40 Línea SALK_72009, forward abi1-2 identificado como SEQ ID NO: 7 reverse abi1-2, identificado como SEQ ID NO: 8.

Línea SALK_76039, forward abi1-3, identificado como SEQ ID NO: 9 y reverse abi1-3, identificado como SEQ ID NO: 10. Como oligonucleótido correspondiente al borde izquierdo del ADN-T del vector pROK2, se utilizó LB-newpROK2, identificado como SEQ ID NO: 11.

45 La secuenciación de la región flanqueante del ADN-T en *abi1-2* reveló que la inserción estaba localizada 2 nucleótidos antes del ATG iniciador (Figura 1a). En el caso de *abi1-3*, el inserto de ADN-T estaba localizado 546 nucleótidos después del ATG iniciador (Figura 1a). Ambas inserciones afectan la expresión de *ABI1* y el análisis tipo Northern mostró ausencia del transcrito *ABI1* en ambos mutantes (Figura 1b).

Ejemplo nº 2

Hipersensibilidad al ABA de las semillas de hab1-1, abi1-2 y abi1-3

55 La progenie de individuos homocigotos *hab1-1*, *abi1-2* y *abi1-3* fue utilizada para realizar diferentes ensayos de sensibilidad a ABA. En primer lugar se examinó la sensibilidad de los mutantes a ABA en ensayos de inhibición de la germinación (Figura 2a). En ausencia de ABA exógeno, las semillas de *hab1-1*, *abi1-2* y *abi1-3* mostraron un ratio de germinación similar a semillas control. En cambio, en presencia de ABA, los mutantes fueron hipersensibles a la inhibición de la germinación promovida por la hormona. Semillas F1 hemicigotas para la inserción de ADN-T mostraron una germinación similar a semillas silvestres en medio suplementado con 0.5 μ M ABA. La siguiente generación de semillas F2 mostró un fenotipo de hipersensibilidad a ABA en aproximadamente una proporción de 1:3 (121 hipersensible: 313 silvestre, $\chi^2=0.42$, $P>0.5$ para *abi1-2*; 112 hipersensible: 319 silvestre, $\chi^2=1.4$, $P>0.1$ para *abi1-3*). Finalmente, aquellas plántulas F2 hipersensibles al ABA mostraron cosegregación con la presencia de una inserción homocigota de ADN-T en *ABI1* (n=40). En conjunto estos datos indicaron que las mutaciones *abi1-2* y *abi1-3* fueron recesivas y se segregaron como un locus único ligado a la inserción de ADN-T en *ABI1*.

65 El ABA desempeña un papel protector en las semillas, impidiendo su germinación y desarrollo temprano en condiciones de estrés osmótico (*González-Guzmán et al.*, 2002). De hecho, mutantes hipersensibles al ABA son más sensibles a la inhibición de la germinación promovida por el estrés osmótico que semillas silvestres (*Sáez et al.*,

2004). Los mutantes *hab1-1*, *abil-2* y *abil-3* mostraron un fenotipo de hipersensibilidad al ABA en germinación (Figura 2a). A continuación se realizaron análisis tipo dosis-respuesta de germinación y crecimiento temprano en medio suplementado con NaCl (figura 2b) o manitol (figura 2c) para los mutantes. Los resultados indicaron que los mutantes fueron más sensibles que el silvestre a la inhibición de la germinación en situaciones de estrés osmótico, ejerciendo un papel preventivo y evitando la germinación ante las situaciones desfavorables que se producen en condiciones de bajo potencial hídrico (sequía, salinidad).

Ejemplo nº 3

Generación y análisis de un mutante doble *hab1-1abil-2*

Para la generación del doble mutante, se cruzó el alelo *hab1-1* con *abil-2*, mediante la transferencia de polen de plantas *abil-2* al estigma de flores emasculadas de plantas *hab1-1*. El genotipo de las plantas F2 resultantes de este cruce fue analizado mediante PCR. Para identificar individuos homocigotos en la inserción del ADN-T, se obtuvo ADN genómico y se procedió a su genotipado mediante PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos:

Gen ABI1: forward *abil-2*, identificado como SEQ ID NO: 7 y reverse *abil-2*, identificado como SEQ ID NO: 8

Gen HAB1: forward *hab1-1*, identificado como SEQ ID NO: 5 y reverse *hab1-1*, identificado como SEQ ID NO: 6

Como oligonucleótido correspondiente al borde izquierdo del ADN-T del vector pROK2, se utilizó LBnewpROK2, identificado como SEQ ID NO: 11

Se identificaron plantas F2 que fueran simultáneamente homocigotas para los alelos *hab1-1* y *abil-2*, y el genotipo de las mismas se confirmó mediante análisis Southern. El genotipado mediante PCR aquí descrito se realizó mediante dos reacciones de PCR. En primer lugar se identificaron individuos donde no se producía amplificación al utilizar los oligonucleótidos forward y reverse indicados. Estos individuos eran candidatos que presumiblemente contenían la inserción de ADN-T en homocigosis, la cual impedía obtener el producto esperado mediante la reacción de PCR. En segundo lugar, se confirmó la presencia del ADN-T mediante una reacción de PCR que utilizaba los siguientes pares de oligonucleótidos:

Alelo *hab1-1*, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 6; alelo *abil-2*, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 8.

El análisis de la población F2 resultante permitió identificar un mutante doble *hab1-1abil-2*, y su respuesta al ABA fue analizada en bioensayos de germinación, crecimiento y cierre estomático. El análisis de germinación en medio suplementado con 0.3 μ M ABA mostró una mayor respuesta a ABA en el mutante doble que en los mutantes parentales (Figura 2a). En concordancia con este resultado, el mutante doble fue particularmente sensible a la inhibición de la germinación en situaciones de estrés osmótico causado por NaCl o manitol (Figuras 2b y 2c).

El ABA tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento vegetal cuando el medio es suplementado con concentraciones micromolares de la hormona. Como se demuestra en la figura 3b, tanto *abil-2* como *abil-3* mostraron mayor sensibilidad que plantas silvestres al efecto inhibitorio del crecimiento causado por 10 μ M ABA, lo cual también ocurrió con el mutante *hab1-1*. El doble mutante *hab1-1abil-2* mostró una inhibición dramática del crecimiento en estas condiciones y este fenotipo fue mucho más acusado que el observado en los mutantes parentales (Figura 3a).

Ejemplo nº 4

Tolerancia a sequía y salinidad del mutante doble *hab1-1abil-2*

A continuación se realizaron ensayos de cierre de estomas en respuesta a ABA. Esta respuesta se ensayó tanto en los mutantes sencillos *abil-2* y *hab1-1* como en el mutante doble (Figura 4a). Las medidas de apertura de estomas indicaron que *abil-2*, *hab1-1* y el mutante doble fueron hipersensibles al ABA en un rango de 10-100 nM ABA. Es más, la respuesta del mutante doble a 10 nM ABA fue sinérgica respecto a la respuesta de los mutantes parentales (Figura 4a).

Posteriormente se realizaron ensayos de tolerancia al estrés hídrico para los diversos mutantes y plantas silvestres. Con este fin, se sometieron plantas de 21 días a estrés hídrico mediante retirada del riego en condiciones que minimizan la evaporación desde el suelo. La figura 4b muestra que tras 10 días en ausencia de riego, las plantas silvestres se marchitaron, perdieron turgencia y muchas hojas de roseta amarillaron. En cambio, las plantas *hab1-1abil-2* no mostraron síntomas de marchitamiento y mantuvieron hojas de roseta turgidas y verdes, mientras los mutantes sencillos *hab1-1*, *abil-2* y *abil-3* sólo mostraron una tolerancia limitada.

Tanto el estrés hídrico como el salino impiden/dificultan la toma de agua y generan acumulación de ABA, y esto último es un factor clave para promover las respuestas adaptativas en la planta. Por lo tanto, una mayor sensibilidad a la hormona podría causar una mayor tolerancia no sólo en situaciones de sequía sino también ante estrés salino. Se comprobó la tolerancia a sal de los mutantes aquí descritos en cultivo *in vitro* en medio suplementado con 100 mM NaCl. La figura 5 muestra que el mutante doble fue más resistente a la inhibición del crecimiento causada por el NaCl que las plantas silvestres o los mutantes parentales.

Referencias bibliográficas

1. **Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzmán P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR (2003)** Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-657.
2. **Bohnert HJ, Jensen RG (1996)** Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Tibtech* 14: 89-97.
3. **Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998)**. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735-743.
4. **Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD (2002)** Absciscic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14 Suppl: S15-S45.
5. **Flowers TJ (2004)** Improving crop salt tolerance. *J Exp Bot* 55: 307-319.
6. **González-Guzmán M, Apostolova N, Belles JM, Barrero JM, Piqueras P, Ponce MR, Micol JL, Serrano R, Rodríguez PL (2002)** The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *Plant Cell* 14: 1833-1846.
7. **Gosti F, Beaudoin N, Serizet C, Webb AA, Vartanian N, Giraudat J (1999)** ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell* 11: 1897-1910.
8. **Helliwell CA, Waterhouse PM (2005)** Constructs and methods for hairpin RNA-mediated gene silencing in plants. *Methods Enzymol* 392: 24-35.
9. **Ingram J, Bartels D (1996)**. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 377-403.
10. **Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999)** Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol* 17: 287-291.
11. **Kwak JM, Moon JH, Murata Y, Kuchitsu K, Leonhardt N, DeLong A, Schroeder JI (2002)** Disruption of a guard cell-expressed protein phosphatase 2A regulatory subunit, RCN1, confers abscisic acid insensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 2849-2861.
12. **Leonhardt N, Kwak JM, Robert N, Waner D, Leonhardt G, Schroeder JI (2004)** Microarray expression analyses of *Arabidopsis* guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *Plant Cell* 16: 596-615.
13. **Leung J, Bouvier-Durand M, Morris PC, Guerrier D, Chedford F, Giraudat J (1994)** *Arabidopsis* ABA response gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* 264: 1448-1452.
14. **Leung J, Merlot S, Giraudat J (1997)** The *Arabidopsis* ABSCISIC ACID-1-SENSITIVE2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell* 9: 759-771.
15. **Merlot S, Gosti F, Guerrier D, Vavasseur A, Giraudat J (2001)** The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant J* 25: 295-303.
16. **Meyer K, Leube MP, Grill E (1994)** A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 264: 1452-1455.
17. **Murashige T, Skoog F (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497.
18. **Nambara E, Marion-Poll A (2005)** ABSCISIC ACID BIOSYNTHESIS AND CATABOLISM. *Annu Rev Plant Biol* 56: 165-185.
19. **Rodríguez PL, Benning G, Grill E (1998)** ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 421: 185-190.
20. **Sáez A, Apostolova N, González-Guzmán M, González-García MP, Nicolas C, Lorenzo O, Rodríguez PL (2004)** Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. *Plant J* 37: 354-369.

ES 2 307 370 B1

21. **Schroeder** JI, **Allen** GJ, **Hugouvieux** V, **Kwak** JM, **Waner** D (2001) Guard cell signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 627-658.

22. **Serrano**, R., **Gaxiola**, R. (1994). Microbial models and salt stress tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13:121-138.

23. **Tahtiharju** S, **Palva** T (2001) Antisense inhibition of protein phosphatase 2C accelerates cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 26: 461-470.

24. **Takahashi** S, **Seki** M, **Ishida** J, **Satou** M, **Sakurai** T, **Narusaka** M, **Kamiya** A, **Nakajima** M, **Enju** A, **Akiyama** K, **Yamaguchi-Shinozaki** K, **Shinozaki** K (2004) Monitoring the expression profiles of genes induced by hyperosmotic, high salinity, and oxidative stress and abscisic acid treatment in *Arabidopsis* cell culture using a full-length cDNA microarray. *Plant Mol Biol* 56: 29-55.

25. **Yamaguchi** T, **Blumwald** E (2005) Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends Plant Sci* 10: 615-620

26. **Zhu** JK (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53: 247-273.

27. **Zhang** JZ, **Creelman** RA, **Zhu** JK (2004). From laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. *Plant Physiol* 135: 615-621.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Planta resistente al estrés hídrico y salino que comprende la inactivación combinada de las proteínas ABI1 y HAB1 o de sus proteínas ortólogas.
2. Planta resistente al estrés hídrico y salino según la reivindicación 1, donde la inactivación de dichas proteínas se realiza mediante el silenciamiento de los genes que codifican las proteínas ABI1 y HAB1 o sus ortólogos.
- 10 3. Planta resistente al estrés hídrico y salino según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, donde la inactivación de dichas proteínas se realiza mediante el silenciamiento de los genes que codifican las proteínas ABI 1 y HAB1 identificadas como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 respectivamente.
- 15 4. Planta resistente al estrés hídrico y salino según la reivindicación 2, donde el silenciamiento de los genes que codifican las proteínas ABI1 y HAB1 o sus ortólogos se realiza mediante la generación de un doble mutante.
5. Planta resistente al estrés hídrico y salino según la reivindicación 4, donde el doble mutante es hab1-1 abi1-2.
6. Planta resistente al estrés hídrico y salino según la reivindicación 4, donde el doble mutante es hab1-1abi1-3.
- 20 7. Procedimiento de obtención de una planta resistente al estrés hídrico y salino que comprende la inactivación combinada de las proteínas ABI1 y HAB1 o de sus proteínas ortólogas.
8. Procedimiento de obtención de una planta resistente al estrés hídrico y salino según la reivindicación 8, donde la inactivación de las proteínas ABI1 y HAB1, se realiza mediante el silenciamiento de los genes que codifican las proteínas ABI1 y HAB1 o de sus genes ortólogos.
- 25 9. Procedimiento de obtención de una planta resistente al estrés hídrico y salino según cualquiera de las reivindicaciones 8 y 9, donde la inactivación de dichas proteínas se realiza mediante el silenciamiento de los genes que codifican las proteínas ABI 1 y HAB 1, identificadas como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 respectivamente.
- 30 10. Procedimiento de obtención de una planta resistente al estrés hídrico y salino según la reivindicación 9, donde el silenciamiento de los genes que codifican las proteínas ABI1 y HAB1 o sus ortólogos se realiza mediante la generación de un doble mutante.
- 35 11. Procedimiento de obtención de una planta resistente al estrés hídrico y salino según la reivindicación 11, donde el doble mutante es hab1-1abi1-2.
- 40 12. Procedimiento de obtención de una planta resistente al estrés hídrico y salino según la reivindicación 11, donde el doble mutante es hab1-1abi1-3.
13. Planta modificada genéticamente o componentes de las mismas que comprenden la inactivación combinada de las proteínas ABI1 y HAB1 obtenida mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8-13.

FIGURA 1

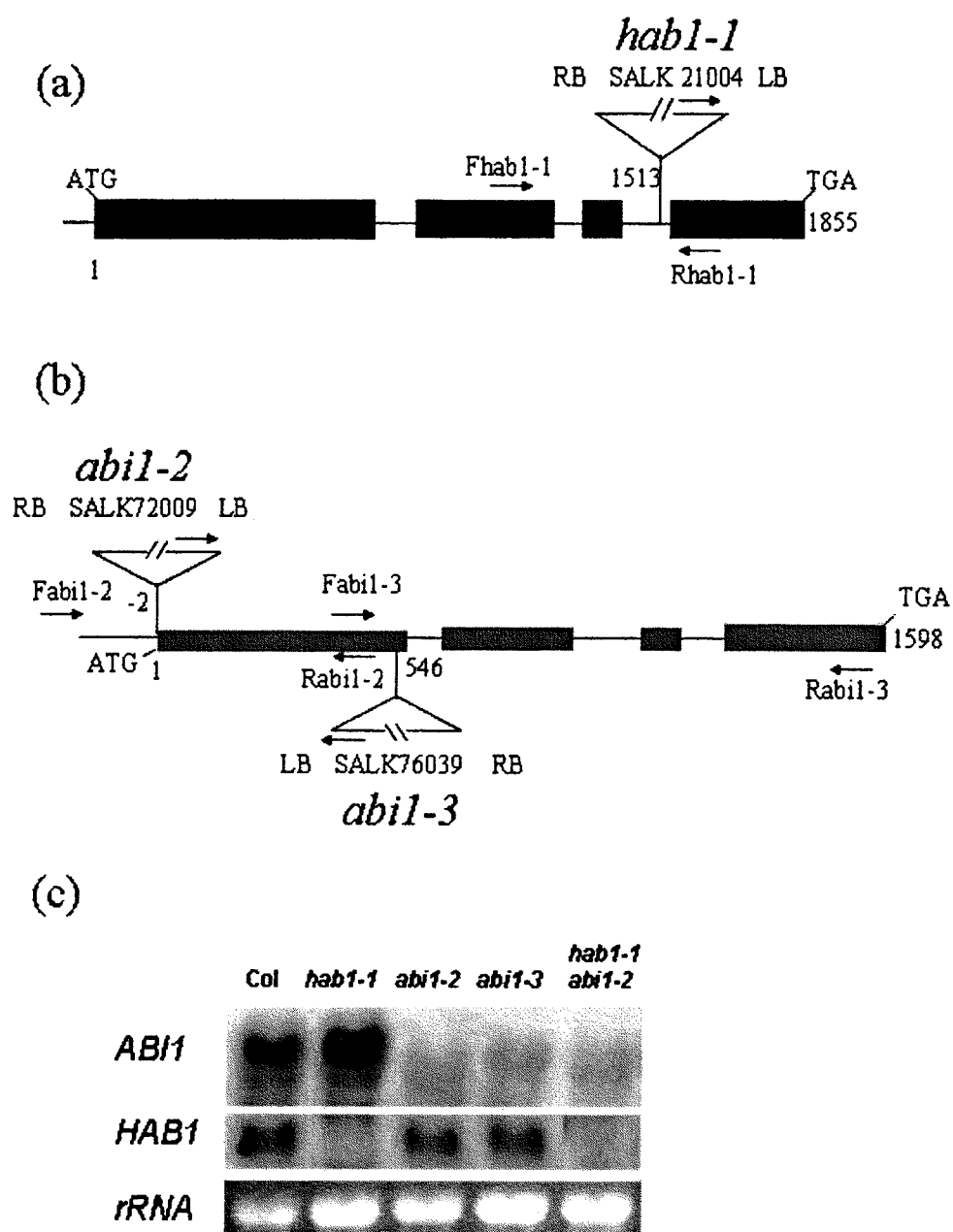
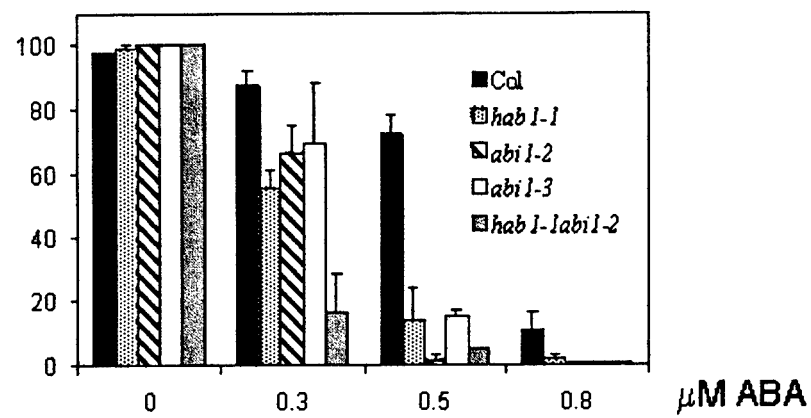
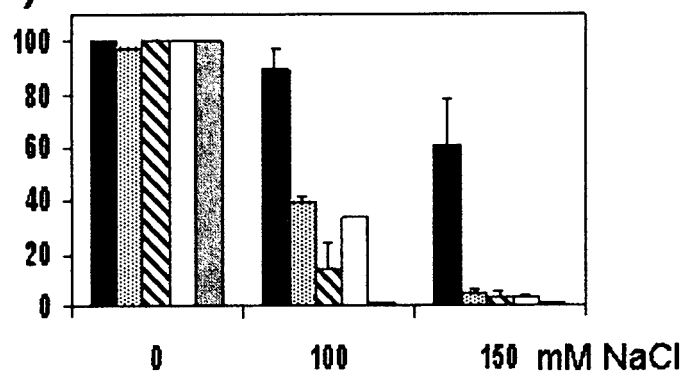


FIGURA 2

(a)



(b)



(c)

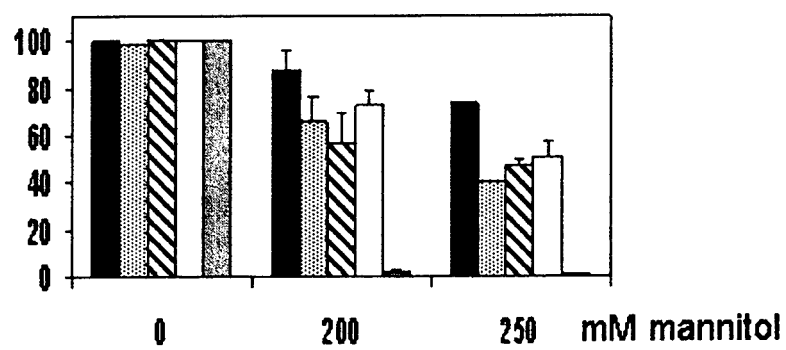


FIGURA 3

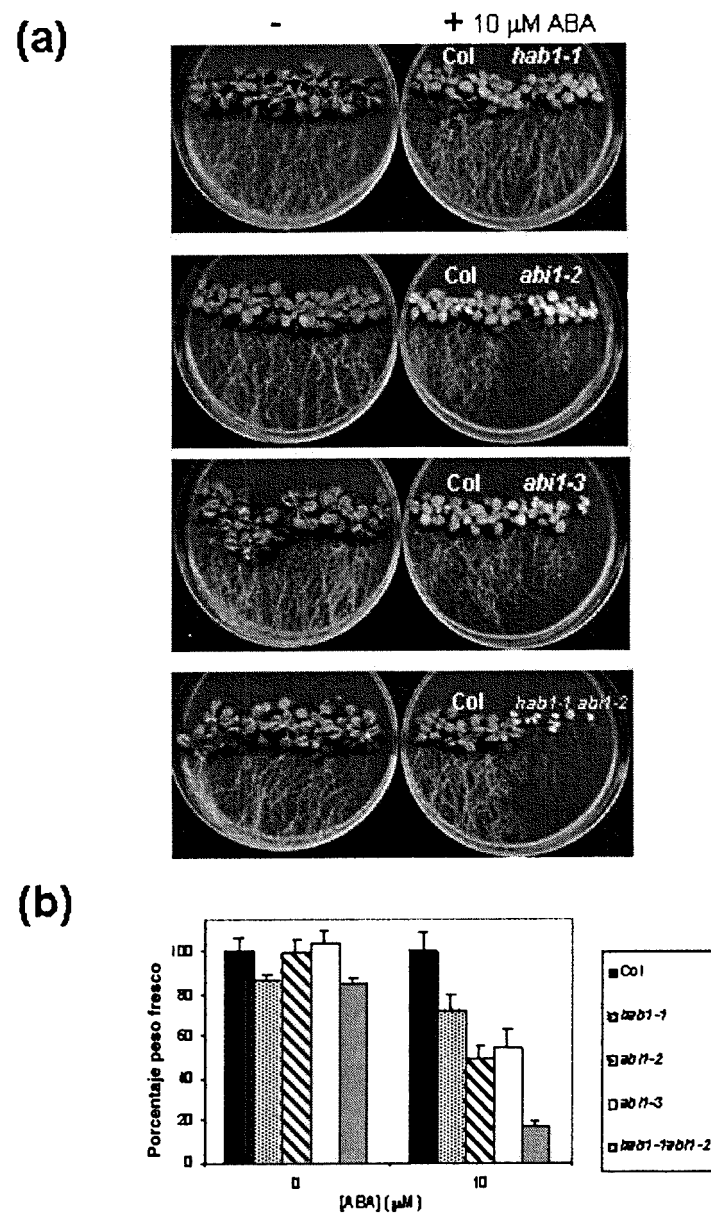
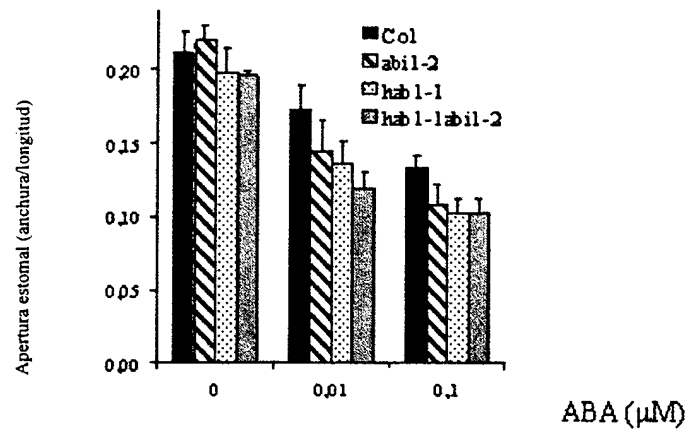


FIGURA 4

(a)



(b)

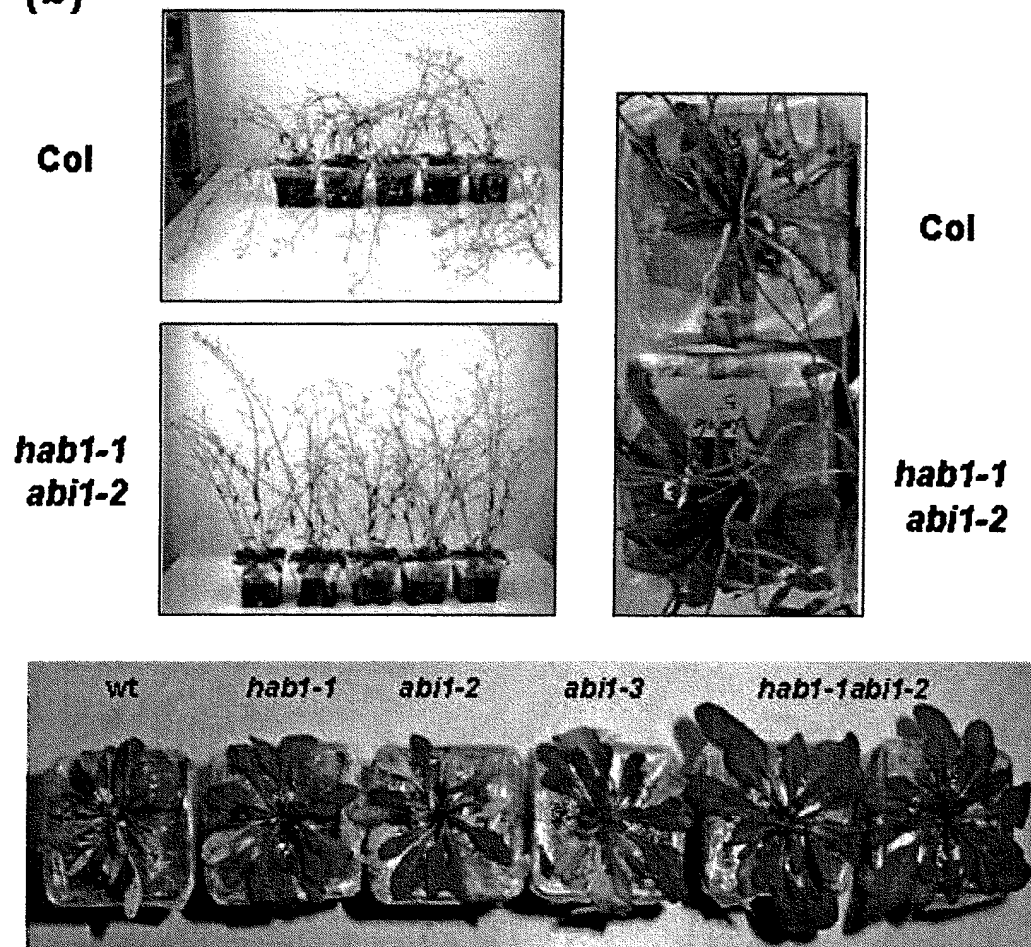


FIGURA 5

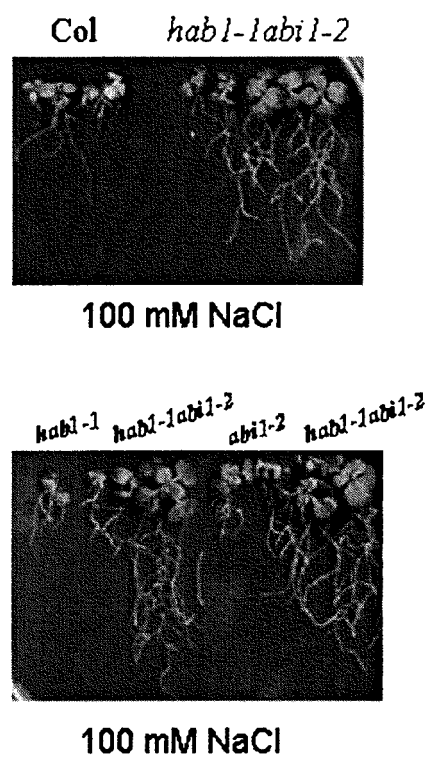


FIGURA 6

A

Sbjct= SGN-U273187 Solanum tuberosum
 ABI1 : 107 SEKKMISRTESSRLFEFKSVPLYGFTSICGRRPEMEDAVSTIPRFLQSS-----SGSMLD 161
 SEK+ + + +S+FE + VPL+G SICG+RPEMEDA+ +P F++ ++D
 Sbjct: 188 SEKEPVKESV-KSVFELECVPLWGSVSICGKRPEMEDALMAVPNFMKIPIKMFIGDRVID 364

ABI1 : 162 GRFDPQS--AAHFFGVYDGHGGSQVANYCRRMHLALAEETIAKEKPMLCDG---DTWLEK 216
 G S +HF+GVYDGHGGSQVA+YC +R+HLAL EE+ K L DG DT +
 Sbjct: 365 GLSQSLSHLTSHFYGVYDGHGGSQVADYCCRVHLALVEELKLPKHDLDVGSVRDTRQVQ 544

ABI1 : 217 WKKALFNSFLRVDSEI-----ESVAPETVGSTSVVAVVFPSSHIFV 256
 W+K N FL+VD E+ E +APETVGST+VVAV+ SHI V
 Sbjct: 545 WEKVFTNCFKLVDDDEVGGKVNIDLCDNMNTSSCTSEPIAPETVGSTAVVAVICSSHIIIV 724

ABI1 : 257 ANCGDSRAVLCRGKTALPLSVDHKKPXXXXXXXXXXXXGGKVIQWNGARVFGVLAMSRSIG 316
 ANCGDSRAVL RGK A+ LS+DHKP GGKVIQWNG RVFGVLAMSRSIG
 Sbjct: 725 ANCGDSRAVLYRGKEAVALSIDHKPSREDEYARIEASGGKVIQWNGHRVFGVLAMSRSIG 904

ABI1 : 317 DRYLKPSIIPDPEVTAVKRVKEDDCLILASDGVWDVMTDEEACEMARKRILLWHKKNAVA 376
 DRYLKP IIP+PEV V R +ED+CL+LASDG+WDVMT+EEACE+AR+RILLWHKKN
 Sbjct: 905 DRYLKPWIIPEPEVMFVPRAREDECLVLASDGLWDVMTNEEACEVARRRILLWHKKN--- 1075

ABI1 : 377 GDASLLADERRKEGKDPAAASAAEYLSKLAIQRGSKDNISVVVVD 421
 G L R +G DPAA +AAEYLS +A+Q+GSKDNISV+VVD
 Sbjct: 1076 GTNPL---PERGQGVDPAAQAAEYLSMALQKGSKDNISVIVVD 1201

B

Sbjct= SGN-U231558 Lycopersicon

ABI1 : 253 HIFVANCGDSRAVLCRGKTALPLSVDHKKPXXXXXXXXXXXXGGKVIQWNGARVFGVLAMS 312
 HI VANCGDSRAVLCRGK + LSVDHKK GGKVIQWNG RVFGVLAMS
 Sbjct: 1 HIIVANCGDSRAVLCRGKEPMALSVDHKKPNREDEYARIEAAGGKVIQWNGHRVFGVLAMS 180

ABI1 : 313 RSIGDRYLKPSIIPDPEVTAVKRVKEDDCLILASDGVWDVMTDEEACEMARKRILLWHKK 372
 RSIGDRYLKP IIPDPEV + R K+D+CLILASDG+WDVMT+EE C++ARKRILLWHKK
 Sbjct: 181 RSIGDRYLKPWIIIPDPEVMFIPRTKDDECLILASDGLWDVMTNEEVCDLARKRILLWHKK 360

ABI1 : 373 NAVAGDASLLADERRKEGKDPAAASAAEYLSKLAIQRGSKDNISVVVVD 421
 N V R +G DPAA +AAE LS A+Q+GSKDNI+V+VVD
 Sbjct: 361 NGVT-----LPSEGGQIDPAAQAAECLSNRALQKGSKDNITVIVVD 489

ES 2 307 370 B1

C

Sbjct= LOC_Os05g51510

ABI1 : 170 AHFFGVYDGHGGSQVANYCRERMHLALAEIEIAKEKPMLCDGD-TWLEK---WKKALFNSF 225
 AHFF VYDGHGG QVANYCR+R+H L EE+ + + C D + LE W+KA + F
 Sbjct: 173 AHFFAVYDGHGGVQVANYCRKRIHAVLTEELRAEDDACGSDLSGLESKKLWEKAFVDCF 232

ABI1 : 226 LRVDSEIES-----VAPETVGSTSVVAVVFP SHIFVANC GDSRAVLCRGKTALPLSV 277
 RVD+E+ VAP+TVGST+VVAVV SH+ VANC GDSRAVLCRGK LPLS+
 Sbjct: 233 SRVDAEVGGNAAGAPPVAPDTVGSTAVVAVVCSSHVIVANC GDSRAVLCRGKQPLPLSL 292

ABI1 : 278 DHKPPXXXXXXXXXXXXGGKVIQWNGARVFGVLAMSR SIGDRYLKPSIIPDPEVTAVKRVK 337
 DHKP GGKVIQWNG RV GVLAMSR SIGD+YLKP IIP PEVT V R K
 Sbjct: 293 DHKPNREDEYARIEALGGKVIQWNGYRVGLVAMSR SIGDKYLKPYIIPVPEVTVVARAK 352

ABI1 : 338 EDDCLILASDGWVDMTDEEACEMARKRILLWHKKNAVAGDASLLADERRKEGKDPAAMS 397
 +DDCLILASDG+WDM++EE C+ ARKRILLWHKKNA . AS + + + DPAA +
 Sbjct: 353 DDDCLILASDGLWDMVSNEEVCDAAARKRILLWHKKNAAT--ASTSSAQISGDSSDPAAQA 410

ABI1 : 398 AA EYLSKLAIQRGSKDNISVVVD 421
 AA+YLSKLA+Q+GSKDNI+VVV+D
 Sbjct: 411 AADYLSKLALQKGSKDNITVVVID 434

ABI1 : 107 SEKKMISRTESSLFEFKSVPLYGFTSICGRRPEMEDAVSTIPRF----LQSSSG-SMLD 161
 +E + + T +RS+F VPL+G SICGRRPEMED + +PRF L +G + +D
 Sbjct: 104 AEPRAVGAT-ARSVFAMDCVPLWGLESICGRRPEMEDDYAVVPRFFDLPLWMVAGDAAVD 162

ABI1 : 162 G--RFDPPQSAAHFFGVYDGHGGSQVANYCRERMHLALAEIEIAKEKPMLCDGD-TWLEK-- 216
 G R + AHFF VYDGHGG QVANYCR+R+H L EE+ + + C D + LE
 Sbjct: 163 GLDRASFRLPAHFFAVYDGHGGVQVANYCRKRIHAVLTEELRAEDDACGSDLSGLESKK 222

ABI1 : 217 -WKKALFNSFLRVDSEI 232
 W+KA + F RVD+E+
 Sbjct: 223 LWEKAFVDCFSRVDAEV 239

Sbjct= LOC_Os05g46040

ABI1 : 233 ESVAPETVGSTSVVAVVFP SHIFVANC GDSRAVLCRGKTALPLSV DHKPPXXXXXXXXXXXX 292
 E V E VGST+VVA+V SH+ VANC GDSR VLCRGK + LS+DHKP
 Sbjct: 192 EPVTAENVGSTAVVALVCSHVVVVANC GDSRIVLCRGKEPVALSIDHKPDRKDERARIEA 251

ABI1 : 293 XGGKVIQWNGARVFGVLAMSR SIGDRYLKPSIIPDPEVTAVKRVKEDDCLILASDGWVDV 352
 GGKVIQWNG RV G+LAMSR SIGDRYLKP +IP PEV V R K+DDCLILASDG+WVDV
 Sbjct: 252 QGGKVIQWNGYRVSGILAMSR SIGDRYLKPFVIPKPEVMVVPRAKDDCLILASDGLWVDV 311

ABI1 : 353 MTDEEACEMARKRILLWHKKNAVAGDASLLADERRKEGK-DPAAMSAAEYLSKLAIQRGS 411
 +++EEAC++AR++ILLWHK N G AS L+DE EG DPAA +AA+YL +LA+++GS
 Sbjct: 312 VSNEEACKVARRQILLWHKNN--GAASPLSDEG--EGSTDPAQAADYLMRLALKKGS 366

ABI1 : 412 KDNISVVVD 421
 +DNI+V+VVD
 Sbjct: 367 EDNITVIVVD 376

ABI1 : 104 DITSEKKMISRTESS--RSLFEFKSVPLYGFTSICGRRPEMEDAVSTIPRFLQS-----SS 156
 D+ K+ ++ + RS++ P++G S GR EMEDA + +PRF +S
 Sbjct: 34 DLGERKEAVAAAGAKRSVYLMDCAPVWGCASTRGRSAEMEDASAAVPRFADVPVRLLAS 93

ABI1 : 157 GSMLDGR-FDPQSA---AHFFGVYDGHGGSQVANYCRERMHLALAEIEIAKEKPMLCD-GD 211
 LD D + AH FGV+DGHGG++VANYCRER+H+ L+EE+ + L+G+
 Sbjct: 94 RRDLDALGLDADALRLPAHLFGVFDGHGGAEVANYCRERIHVVLSSELKRLGKNLGEEMGE 153

ABI1 : 212 TWL-EKWKALFNSFLRVDSEI 232
 + E W F RVD E+
 Sbjct: 154 VDMKEHWDDVFTKCFQRVDDEV 175

ES 2 307 370 B1

FIGURA 7

A

Sbjct= SGN-U273187 Solanum tuberosum

HAB1 : 123 EIDNGRVLATAIIVGESSIEQVPTAEVLIAGVNQDTN-----TSEVVIRLPDENS NHLVK 177
+IDNG+++A I + E S ++ + ++ ++ T+ S V + P E

Sbjct: 35 DIDNGQIVAKVISLEERSFDRKVSNTIVALPDDEITSGPTLKASVVALPPFSEKEPVKES 214

HAB1 : 178 GRSVYELDCIPLWGTVSIQGNRSEMEDAFVSPHFLKLPKMLMGDH--EGMSPSLTHLT 235
+SV+EL+C+PLWG+VSI G R EMEDA P+F+K+PIKM +GD +G+S SL+HLT

Sbjct: 215 VKSVFELECVPLWGSVSICGKRPEMEDALMAVPNFMKIPIKMFIDRVIDGLSQSLSHLT 394

HAB1 : 236 GHFFGVYDGHGGHKVADYCRDLHFALAEIERIKDELCKRNTGEGRQVQWDKVFTSCFL 295
HF+GVYDGHGG +VADYC R+H AL EE++ K +L + + RQVQW+KVFT+CFL

Sbjct: 395 SHFYGVYDGHGGSQVADYCKRVHLALVEELKLPKHDLVDGSRVDRTRQVQWEKVFTNCFL 574

HAB1 : 296 TVDGEIEGKIGRAV---VGSSDKVLEAVASETVGSTAVVALVCSSHIVVSNCGDSRAVL 351
VD E+ GK+ + + +S E +A ETVGSTAVVA++CSSHI+V+NCGDSRAVL

Sbjct: 575 KVDDEVGGKVNIDLCDNMNTSSCTSEPIAPETVGSTAVVAVICSSHIIVANCGDSRAVL 754

HAB1 : 352 FRGKEAMPLSVDHDKPDREDEYARIENAGGKVIQWQGARVFGVLAMRSRISIGDRYLKPYVIP 411
+RGKEA+ LS+DHKP REDEYARIE +GGKVIQW G RVFGVLAMRSRISIGDRYLKP++IP

Sbjct: 755 YRGKEAVALSIDHKPSREDEYARIEASGGKVIQWNGHRVFGVLAMRSRISIGDRYLKPWIIP 934

HAB1 : 412 EPEVTFMPSRREDECLILASDGLWDMNNEQVCEIARRRILMWHKNGAPPLAERGKGID 471
EPEV F+PR+REDECL+LASDGLWDM N+E CE+ARRRIL+WHKNG PL ERG+G+D

Sbjct: 935 EPEVMFVPRAREDECLVLASDGLWDMTNEEACEVARRRILLWHKNGTNPLPERGQGV 1114

HAB1 : 472 PACQAAADYLSMLALQKSKDNISIIVIDLKAQRKFKTRT 511
PA QAAA+YLS +ALQKSKDNIS+IV+DLKA RKFK+++

Sbjct: 1115 PAAQAAAEYLSSMALQKSKDNISVIVVDLKAHRKFKSKS 1234

B

Sbjct= SGN-U217609 Lycopersicon

HAB1 : 1 MEEMTPAVAMTSLAANTMCE----SSPVEITQLKNVTDADLLSD-----SENQSFCN 50
MEEM+PAVA+TSL+++ +C+ S+ VEIT+LK VTD A LLS D +E+ + +

Sbjct: 144 MEEMSPAVAVTSLSSS-ICDNPAISNHVEITRLKLVTDASLLSDPTSLHAESENTSWD 320

HAB1 : 51 GGTECTMEDVSEL-----EEVGEQDLLKTLSDTRSG---SSNVF---DEDDVLSVVEDN 98
G + DV + E G+ L +T+ +G S ++ DED++LSV ED

Sbjct: 321 GKSNGMKVDVGRVPLLTGESSGKCSLPQTVLGAENGLIVSDSIIQGSDEDEILSVGEDP 500

HAB1 : 99 SAVISEGLLVVDAGSELSLSNTAMEI---DNGRVLATAIIVGESSIEQVPTAEVLIAGVN 155
+ E LL + A +LSL A+EI DNG+++A I + E S+++ + ++ +

Sbjct: 501 CGINGEELLPLGASLQSLP-IAVEIEGIDNGQIVAKVISLEERSLDRKVSNTIVALPDD 677

HAB1 : 156 QDTN-----TSEVVIRLPDENS NHLVKGRSVYELDCIPLWGTVSIQGNRSEMEDAFVSP 210
+ T+ S V + LP E +SV+EL+C+PLWG+VSI G R EMEDA V P

Sbjct: 678 EITSGPTLKASVVALPLPSEKEPVKESVKSVELECVPLWGSVSICGKRPEMEDALVVVP 857

HAB1 : 211 HFLKLPKMLMGDH--EGMSPSLTHLTGHFFGVYDGHGGHKVADYCRDLHFALAEIER 268
+F+K+PIKM +GD +G+S SL+HLT HF+GVYDGHGG +VADYCR R+H AL EE++

Sbjct: 858 NFMKIPIKMFIDRVIDGLSQSLSHLTSHFYGVYDGHGGSQVADYCKRVHLALVEELKL 1037

HAB1 : 269 IKDELCKRNTGEGRQVQWDKVFTSCFLTVDGEIEGKIGRAV---VGSSDKVLEAVASETV 325
K +L + + RQVQW+KVFT+CFL VD E+ GK+ + +S E +A ETV

Sbjct: 1038 PKHDLVDGSRVDRTRQVQWEKVFTNCFLKVDDEVGGKVIDLCDNINASSCTSEPIAPETV 1217

HAB1 : 326 GSTAVVALVCSSHIVVSNCGDSRAVLFRGKEAMPLSVDHDKPDREDEYARIENAGGKVIQW 385
GSTAVVA +CSSHI+V+NCGDSRAVL+RGKEA+ LS+DHKP REDE+ARIE +GG+VI W

Sbjct: 1218 GSTAVVAAICSSHIIVANCGDSRAVLYRGKEAVALSIDHKPSREDEFARIEASGGEVIHW 1397

HAB1 : 386 QGARVF 391
G RVF

Sbjct: 1398 NGHRVF 1415

ES 2 307 370 B1

C

Sbjct= LOC_Os05g51510

HAB1 : 179 RSVYELDCIPLWGTVSIQGNRSEMEDAFVSPHFLKLPKMLMGDH--EGMSPSLTHLTG 236
 RSV+ +DC+PLWG SI G R EMED +AV P F LP+ M+ GD +G+ + L
 Sbjct: 114 RSVFAMDCVPLWGLESICGRRPEMEDDYAVVPRFFDLPLWMVAGDAAVDGLDRASFRLPA 173

HAB1 : 237 HFFGVYDGHGGHKVADYCRDLHFPALAEIEIERIKDELCKRN-TGEGRQVQWQDKVFTSCFL 295
 HFF VYDGHGG +VA+YCR R+H L EE+ R +D+ C + +G + W+K F CF
 Sbjct: 174 HFFAVYDGHGGVQVANYCRKRIHAVLTELRRRAEDDACGSDLSGLESKKLWEKAFVDCFS 233

HAB1 : 296 TVDGEIEGKIGRAVVGSSDKVLEAVASETVGSTAVVALVCSSHIVVSNCGDSRAVLFRGK 355
 VD E+ G G A G+ VA +TVGSTAVVA+VCSSH++V+NCGDSRAVL RGK
 Sbjct: 234 RVDAEV-G--GNAASGAPP-----VAPDTVGSTAVVAVVCSSHVIVANCGDSRAVLCRGK 285

HAB1 : 356 EAMPLSVDHKPDREDEYARIENAGGKVIQWQGARVFGVLAMRSRIGDRYLKPYVPIPEV 415
 + +PLS+DHKP+REDEYARIE GGKVIQW G RV GVLAMRSRIGD+YLKPY+IP PEV
 Sbjct: 286 QPLPLSLDHKPNREDEYARIEALGGKVIQWNGYRVGLVAMRSRIGDKYLKPYIIPVPEV 345

HAB1 : 416 TFMPRSREDECLILASDGLWDMNQEVCIEARRRILMWHKKNAGAPLAER---GKGID 471
 T + R+++D+CLILASDGLWDM+N+EVC+ AR+RIL+WHKKN A G D
 Sbjct: 346 TVVARAKDDCLILASDGLWDMVSNEEVCDAAARKRILLWHKKNAAATSTSSAQISGDSSD 405

HAB1 : 472 PACQAAADYLSMLALQKGSKDNIISIIVIDLKAQRKFKTR 510
 PA QAAADYLS LALQKGSKDNI+++VIDLKA RKFK++
 Sbjct: 406 PAAQAAADYLSKLALQKGSKDNIITVVVIDLKAHRKFKSK 444

Sbjct= LOC_Os05g46040

HAB1 : 179 RSVYELDCIPLWGTVSIQGNRSEMEDAFVSPHFLKLPKMLMG---DHEGMSPSLTHL 234
 RSVY +DC P+WG S +G +EMEDA A P F +P+++L D G+ L
 Sbjct: 50 RSVYLMDCAPVWGCASTRGRSAEMEDASAAVPRFADVPVRLLASRRDLDALGLDADALRL 109

HAB1 : 235 TGHFFGVYDGHGGHKVADYCRDLHFPALAEIEIERIKDELCKRNTGEGRQVQWQDKVFTSCF 294
 H FGV+DGHGG +VA+YCR+R+H L+EE++R+ L + + ++ WD VFT CF
 Sbjct: 110 PAHLFGVFDGHGGAEVANYCRERIHVVLEELKRLGKNLGEMGEVDMKE-HWDDVFTKCF 168

HAB1 : 295 LTVDGEIEGKIGRAVVGSSDKVLEAVASETVGSTAVVALVCSSHIVVSNCGDSRAVLFRG 354
 VD E+ G++ R V G + E V +E VGSTAVVALVCSSH+VV+NCGDSR VL RG
 Sbjct: 169 QRVDDVSGRVTRVNVNGGGEVRSEPVTAENVGSTAVVALVCSSHVVVANCGDSRIVLCRG 228

HAB1 : 355 KEAMPLSVDHKPDREDEYARIENAGGKVIQWQGARVFGVLAMRSRIGDRYLKPYVPIPEPE 414
 KE + LS+DHKPDR+DE ARIE GGKVIQW G RV G+LAMRSRIGDRYLKP+VIP+PE
 Sbjct: 229 KEPVALSIDHKPDRKDERARIEAQGGKVIQWNGYRVSGILAMRSRIGDRYLKPFVIPKPE 288

HAB1 : 415 VTFMPRSREDECLILASDGLWDMNQEVCIEARRRILMWHKKNAGAP-PLAERGKG-IDP 472
 V +PR+++D+CLILASDGLWDV++N+E C++ARR+IL+WHK NGA PL++ G+G DP
 Sbjct: 289 VMVVPRAKDDCLILASDGLWDVVSNEEACKVARRQILLWHKKNGAASPLSDEGEGSTDP 348

HAB1 : 473 ACQAAADYLSMLALQKGSKDNIISIIVIDLKAQRKFK 508
 A QAAADYL LAL+KGS+DNI++IV+DLK ++K K
 Sbjct: 349 AAQAAADYLMRLALKKGSSEDNITVIVVDLKPRKKLK 384

ES 2 307 370 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Universidad Politécnica de Valencia

5 <120> PLANTAS TOLERANTES AL ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO Y PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE LAS MISMAS

10 <130> P-INCI-N-0178

<160> 11

15 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 434

20 <212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 1

25 Met Glu Glu Val Ser Pro Ala Ile Ala Gly Pro Phe Arg Pro Phe Ser
1 5 10
30 Glu Thr Gln Met Asp Phe Thr Gly Ile Arg Leu Gly Lys Gly Tyr Cys
20 25 30
35 Asn Asn Gln Tyr Ser Asn Gln Asp Ser Glu Asn Gly Asp Leu Met Val
35 40 45
40 Ser Leu Pro Glu Thr Ser Ser Cys Ser Val Ser Gly Ser His Gly Ser
50 55 60
45 Glu Ser Arg Lys Val Leu Ile Ser Arg Ile Asn Ser Pro Asn Leu Asn
65 70 75 80
50 Met Lys Glu Ser Ala Ala Ala Asp Ile Val Val Val Asp Ile Ser Ala
85 90 95
55 Gly Asp Glu Ile Asn Gly Ser Asp Ile Thr Ser Glu Lys Lys Met Ile
100 105 110
60 Ser Arg Thr Glu Ser Arg Ser Leu Phe Glu Phe Lys Ser Val Pro Leu
115 120 125
65 Tyr Gly Phe Thr Ser Ile Cys Gly Arg Arg Pro Glu Met Glu Asp Ala
130 135 140
70 Val Ser Thr Ile Pro Arg Phe Leu Gln Ser Ser Ser Gly Ser Met Leu
145 150 155 160
75 Asp Gly Arg Phe Asp Pro Gln Ser Ala Ala His Phe Phe Gly Val Tyr
165 170 175

ES 2 307 370 B1

	Asp	Gly	His	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Ala	Asn	Tyr	Cys	Arg	Glu	Arg	Met
				180					185					190		
5	His	Leu	Ala	Leu	Ala	Glu	Glu	Ile	Ala	Lys	Glu	Lys	Pro	Met	Leu	Cys
			195					200					205			
10	Asp	Gly	Asp	Thr	Trp	Leu	Glu	Lys	Trp	Lys	Lys	Ala	Leu	Phe	Asn	Ser
		210					215					220				
15	Phe	Leu	Arg	Val	Asp	Ser	Glu	Ile	Glu	Ser	Val	Ala	Pro	Glu	Thr	Val
	225					230					235					240
20	Gly	Ser	Thr	Ser	Val	Val	Ala	Val	Val	Phe	Pro	Ser	His	Ile	Phe	Val
					245					250					255	
25	Ala	Asn	Cys	Gly	Asp	Ser	Arg	Ala	Val	Leu	Cys	Arg	Gly	Lys	Thr	Ala
				260					265					270		
30	Leu	Pro	Leu	Ser	Val	Asp	His	Lys	Pro	Asp	Arg	Glu	Asp	Glu	Ala	Ala
			275					280					285			
35	Arg	Ile	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Lys	Val	Ile	Gln	Trp	Asn	Gly	Ala	Arg
		290					295					300				
40	Val	Phe	Gly	Val	Leu	Ala	Met	Ser	Arg	Ser	Ile	Gly	Asp	Arg	Tyr	Leu
	305					310					315					320
45	Lys	Pro	Ser	Ile	Ile	Pro	Asp	Pro	Glu	Val	Thr	Ala	Val	Lys	Arg	Val
					325					330					335	
50	Lys	Glu	Asp	Asp	Cys	Leu	Ile	Leu	Ala	Ser	Asp	Gly	Val	Trp	Asp	Val
				340					345					350		
55	Met	Thr	Asp	Glu	Glu	Ala	Cys	Glu	Met	Ala	Arg	Lys	Arg	Ile	Leu	Leu
			355					360					365			
60	Trp	His	Lys	Lys	Asn	Ala	Val	Ala	Gly	Asp	Ala	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp
		370					375					380				
65	Glu	Arg	Arg	Lys	Glu	Gly	Lys	Asp	Pro	Ala	Ala	Met	Ser	Ala	Ala	Glu
	385					390					395					400
70	Tyr	Leu	Ser	Lys	Leu	Ala	Ile	Gln	Arg	Gly	Ser	Lys	Asp	Asn	Ile	Ser
					405					410					415	
75	Val	Val	Val	Val	Asp	Leu	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Leu	Lys	Ser	Lys	Pro
					420				425					430		
80	Leu	Asn														

ES 2 307 370 B1

<210> 2

<211> 511

<212> PRT

5 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 2

```

10      Met Glu Glu Met Thr Pro Ala Val Ala Met Thr Leu Ser Leu Ala Ala
      1          5          10          15
15      Asn Thr Met Cys Glu Ser Ser Pro Val Glu Ile Thr Gln Leu Lys Asn
      20          25          30
20      Val Thr Asp Ala Ala Asp Leu Leu Ser Asp Ser Glu Asn Gln Ser Phe
      35          40          45
25      Cys Asn Gly Gly Thr Glu Cys Thr Met Glu Asp Val Ser Glu Leu Glu
      50          55          60
30      Glu Val Gly Glu Gln Asp Leu Leu Lys Thr Leu Ser Asp Thr Arg Ser
      65          70          75          80
35      Gly Ser Ser Asn Val Phe Asp Glu Asp Asp Val Leu Ser Val Val Glu
      85          90          95
40      Asp Asn Ser Ala Val Ile Ser Glu Gly Leu Leu Val Val Asp Ala Gly
      100          105          110
45      Ser Glu Leu Ser Leu Ser Asn Thr Ala Met Glu Ile Asp Asn Gly Arg
      115          120          125
50      Val Leu Ala Thr Ala Ile Ile Val Gly Glu Ser Ser Ile Glu Gln Val
      130          135          140
55      Pro Thr Ala Glu Val Leu Ile Ala Gly Val Asn Gln Asp Thr Asn Thr
      145          150          155          160
60      Ser Glu Val Val Ile Arg Leu Pro Asp Glu Asn Ser Asn His Leu Val
      165          170          175
65      Lys Gly Arg Ser Val Tyr Glu Leu Asp Cys Ile Pro Leu Trp Gly Thr
      180          185          190
70      Val ser Ile Gln Gly Asn Arg Ser Glu Met Glu Asp Ala Phe Ala Val

```

ES 2 307 370 B1

	195					200					205					
5	Ser	Pro	His	Phe	Leu	Lys	Leu	Pro	Ile	Lys	Met	Leu	Met	Gly	Asp	His
		210					215					220				
10	Glu	Gly	Met	Ser	Pro	Ser	Leu	Thr	His	Leu	Thr	Gly	His	Phe	Phe	Gly
	225					230					235					240
15	Val	Tyr	Asp	Gly	His	Gly	Gly	His	Lys	Val	Ala	Asp	Tyr	Cys	Arg	Asp
					245					250					255	
20	Arg	Leu	His	Phe	Ala	Leu	Ala	Glu	Glu	Ile	Glu	Arg	Ile	Lys	Asp	Glu
				260					265					270		
25	Leu	Cys	Lys	Arg	Asn	Thr	Gly	Glu	Gly	Arg	Gln	Val	Gln	Trp	Asp	Lys
			275					280					285			
30	Val	Phe	Thr	Ser	Cys	Phe	Leu	Thr	Val	Asp	Gly	Glu	Ile	Glu	Gly	Lys
		290					295					300				
35	Ile	Gly	Arg	Ala	Val	Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Lys	Val	Leu	Glu	Ala	Val
	305					310					315					320
40	Ala	Ser	Glu	Thr	Val	Gly	Ser	Thr	Ala	Val	Val	Ala	Leu	Val	Cys	Ser
					325					330					335	
45	Ser	His	Ile	Val	Val	Ser	Asn	Cys	Gly	Asp	Ser	Arg	Ala	Val	Leu	Phe
				340					345					350		
50	Arg	Gly	Lys	Glu	Ala	Met	Pro	Leu	Ser	Val	Asp	His	Lys	Pro	Asp	Arg
			355					360					365			
55	Glu	Asp	Glu	Tyr	Ala	Arg	Ile	Glu	Asn	Ala	Gly	Gly	Lys	Val	Ile	Gln
	370						375					380				
60	Trp	Gln	Gly	Ala	Arg	Val	Phe	Gly	Val	Leu	Ala	Met	Ser	Arg	Ser	Ile
	385					390					395					400
65	Gly	Asp	Arg	Tyr	Leu	Lys	Pro	Tyr	Val	Ile	Pro	Glu	Pro	Glu	Val	Thr
					405					410					415	
70	Phe	Met	Pro	Arg	Ser	Arg	Glu	Asp	Glu	Cys	Leu	Ile	Leu	Ala	Ser	Asp
				420					425					430		
75	Gly	Leu	Trp	Asp	Val	Met	Asn	Asn	Gln	Glu	Val	Cys	Glu	Ile	Ala	Arg
			435					440					445			

ES 2 307 370 B1

	Arg	Arg	Ile	Leu	Met	Trp	His	Lys	Lys	Asn	Gly	Ala	Pro	Pro	Leu	Ala	
	450						455					460					
5	Glu	Arg	Gly	Lys	Gly	Ile	Asp	Pro	Ala	Cys	Gln	Ala	Ala	Ala	Asp	Tyr	
	465					470					475					480	
10	Leu	Ser	Met	Leu	Ala	Leu	Gln	Lys	Gly	Ser	Lys	Asp	Asn	Ile	Ser	Ile	
					485					490					495		
15	Ile	Val	Ile	Asp	Leu	Lys	Ala	Gln	Arg	Lys	Phe	Lys	Thr	Arg	Thr		
				500					505					510			
	<210> 3																
	<211> 1305																
	<212> DNA																
20	<213> Secuencia artificial																
	<220>																
25	<223> Sonda ADNc																
	<400> 3																
30	atggaggaag	tatctccggc	gatcgcaggt	cctttcaggc	cattctccga	aaccagatg											60
	gatttcaccg	ggatcagatt	gggtaaaggt	tactgcaata	accaatactc	aatcaagat											120
	tccgagaacg	gagatctaata	ggtttcgtta	ccggagactt	catcatgctc	tgtttctggg											180
35	tcacatgggt	ctgaatctag	gaaagttttg	atttctcgga	tcaattctcc	taatttaaac											240
	atgaaggaat	cagcagctgc	tgatatagtc	gtcgttgata	tctccgccgg	agatgagatc											300
40	aacgggctcag	atattactag	cgagaagaag	atgatcagca	gaacagagag	taggagtttg											360
	tttgaattca	agagtgtgcc	tttgtatggg	tttacttcga	tttgtggaag	aagacctgag											420
	atggaagatg	ctgtttcgac	tataccaaga	ttccttcaat	cttcctctgg	ttcgatgtta											480
45	gatgggtcgg	ttgatcctca	atccgccgct	catttcttcg	gtgtttacga	cggccatggc											540
	ggttctcagg	tagcgaacta	ttgtagagag	aggatgcatt	tggctttggc	ggaggagata											600
50	gctaaggaga	aaccgatgct	ctgcgatggg	gatacgtggc	tggagaagtg	gaagaaagct											660
	cttttcaact	cgttcctgag	agttgactcg	gagattgagt	cagttgcgcc	ggagacgggt											720
	gggtcaacgt	cggtgggtgc	cgttgttttc	ccgtctcaca	tcttcgtcgc	taactgcggg											780
55	gactctagag	ccgttctttg	ccgcggcaaa	actgcacttc	cattatccgt	tgaccataaa											840
	ccggatagag	aagatgaagc	tgcgaggatt	gaagccgcag	gagggaaagt	gattcagtgg											900
60	aatggagctc	gtgttttcgg	tggttctcgcc	atgtcgagat	ccattggcga	tagatacttg											960
	aaaccatcca	tcattcctga	tccggaagtg	acggctgtga	agagagtaaa	agaagatgat											1020
	tgtctgattt	tggcgagtga	cgggggtttg	gatgtaatga	cggatgaaga	agcgtgtgag											1080
65	atggcaagga	agcggattct	cttgtggcac	aagaaaaacg	cgggtggctgg	ggatgcatcg											1140

ES 2 307 370 B1

	ttgctcgcgg atgagcggag aaaggaaggg aaagatcctg cggcgatgtc cgcggtgag	1200
	tatttgtaa agctggcgat acagagagga agcaaagaca acataagtgt ggtgggtggtt	1260
5	gatttgaagc ctcggaggaa actcaagagc aaacccttga actga	1305

<210> 4

10 <211> 1536

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Sonda ADNc

<400> 4

20	atggaggagaga tgactcccg c agttgcaatg actcttagct tagcagccaa caccatgtgt	60
	gaatcatcac ctgtcgagat cactcagcta aagaacgtta ctgatgcagc tgacttggtta	120
25	tctgattctg aaaatcaaag cttttgcaac ggagggactg aatgcactat ggaagatggt	180
	tctgaactgg aagaggtagg tgaacaggat ttgttgaaaa ctttatccga tacgagaagc	240
	gggtcttcca atgtttttga tgaagacgat gtattgtctg ttgtggagga taatagtgt	300
30	gtcataagtg agggcttggt agttgttgat gcaggctctg aattaagctt gtctaataca	360
	gctatggaaa tagataacgg gcgagttctt gcaaccgcga ttatcgtagg cgaatcaagc	420
35	attgagcagg ttcccaccgc ggaagttctt atcgcggtg taaatcagga taccaatact	480
	tcggagggtg tcattagatt gccagatgaa aatagtaatc atctggtgaa agggagaagt	540
	gtttatgaac tagattgtat accgctttgg ggcacgggtt ccattcaagg gaatagatct	600
40	gagatggagg atgcttttgc cgtgtcacct ctttttctga aactacccat caaaatgctt	660
	atgggggacc atgaggggtat gagtccaagc ctcacacacc tcaccggtca ttttttcggt	720
45	gtttatgatg gtcattggagg ccataagggt gctgactatt gccgagatag actccatttt	780
	gctttggctg aagaaataga acgtataaaa gacgaattat gcaagaggaa tacaggagag	840
	ggtaggcagg tgcagtggga taaagtcttc acgagttggt ttctaactgt cgatggtgag	900
50	attgaaggaa aaattggtag agccgttggt ggttcttctg ataaggttct tgaggctggt	960
	gcgtctgaga ccgtaggata aactgctggt gttgccttgg tttgctcatc acatatagta	1020
55	gtttctaact gcggtgattc gagggcggtt ttattccgtg gcaaagaagc catgcccttg	1080
	tcagttgatc acaaaccaga tagagaggat gaatatgcaa gaatagaaaa tgctggaggc	1140
	aaagttatac aatggcaagg cgcacgtggt tttggtgttc tcgccatgtc taggtccatc	1200
60	ggtgacagat atctgaagcc atatgtgatc ccagaaccgg aagtgacatt catgcctcgg	1260
	tcaagagaag acgagtgtct catactagcc agtgacggtc tttgggatgt aatgaacaac	1320
65	caagaagtct gcgaaatagc aaggagacgg atattgatgt ggcacaagaa gaacggtgca	1380
	ccgcctctag cagagagagg caaaggaata gatccagctt gccaaagccgc agctgactac	1440

ES 2 307 370 B1

	ctctcaatgc ttgctctaca aaaaggaagt aaagacaaca tctccatcat tgtgattgac	1500
	ttgaaagctc aaagaaagtt caagaccaga acctga	1536
5	<210> 5	
	<211> 19	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
15	<400> 5	
	aactgctgtt gttgccttg	19
20	<210> 6	
	<211> 21	
	<212> DNA	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
30	<400> 6	
	ggttctggtc ttgaacttc t	21
35	<210> 7	
	<211> 21	
	<212> DNA	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
45	<400> 7	
	aggaaaccct tattgaaatt c	21
50	<210> 8	
	<211> 20	
	<212> DNA	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
60	<400> 8	
	ctctgttctg ctgatcatct	20
65	<210> 9	
	<211> 21	

ES 2 307 370 B1

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> cebador

<400> 9

10

atgacagca gaacagagag t

21

<210> 10

15 <211> 18

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Cebador

<400> 10

25

tcagttcaag ggtttgct

18

<210> 11

30 <211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> cebador

<400> 11

40

gccgatttcg gaaccacat c

21

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 307 370

⑫ Nº de solicitud: 200600218

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 01.02.2006

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: C12N 15/29 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	GOSTI F. et al., ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signalling. Plant Cell 1999, 11:1897-1910.	1-13
A	MERTLOT S. et al., The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. Plant Journal 2001, 25:295-303.	1-13
A	SAEZ A. et al., Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. Plant Journal 2004, 37:354-369.	1-13

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
17.10.2008

Examinador
I.Rueda Molins

Página
1/1