



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 400**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00990296 .6**

96 Fecha de presentación : **22.12.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1251731**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.10.2002**

54

Título: **Proteínas de proteína quinasa relacionadas con el estrés y métodos de uso en plantas.**

30

Prioridad: **22.12.1999 US 171745 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73

Titular/es: **BASF Plant Science GmbH
67056 Ludwigshafen, DE**

72

Inventor/es: **Costa e Silva, Oswaldo, da;
Ishitani, Manabu;
Henkes, Stefan;
Van Thielen, Nocha y
Chen, Ruoying**

74

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 316 400 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas de proteína quinasa relacionadas con el estrés y métodos de uso en plantas.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 Esta invención se relaciona generalmente con secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas que están asociadas con respuestas abióticas al estrés y tolerancia abiótica al estrés en plantas. En particular, esta invención se relaciona con secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas que confieren tolerancia a las plantas a la sequía, al frío y/o a la sal.

Estado del arte

15 El estrés ambiental debido a salinidad y a sequía está entre los factores más serios que limitan la productividad de los cultivos agrícolas. Se estima que de 35 a 45% de las 279 millones de hectáreas de una tierra de irrigación se encuentra actualmente afectada por alta salinidad. Esta es exclusiva de las regiones clasificadas como tierras áridas y desérticas. La consecuencia representa un factor político y económico significativo y contribuye al déficit alimentario
20 en muchos países no desarrollados. Además del estrés por salinidad, las pérdidas producidas en un cultivo debido a la sequía en cultivos tales como soja, maíz, arroz y algodón también representan un factor económico significativo. Además, la sequía es responsable también por déficits alimentarios en muchos países alrededor del mundo. El desarrollo de cultivos tolerantes a la sal y a la sequía es una estrategia que tiene potencial para aliviar algunas de estas situaciones adversas.

25 Las estrategias tradicionales de reproducción de plantas para desarrollar nuevas líneas de plantas que exhiban tolerancia a la sequía o tolerancia a la sal son relativamente lentas y requieren de líneas tolerantes específicas para cruzarlas con las líneas comerciales deseadas. Las fuentes limitadas de germoplasma y la incompatibilidad en los cruzamientos entre especies de plantas relacionadas en forma distante también representan un problema significativo que
30 se presenta en la reproducción convencional. En contraste, la transformación genética de las plantas y la disponibilidad de genes útiles sometidos a patrones específicos de expresión permiten generar plantas tolerantes al estrés utilizando aproximaciones transgénicas.

35 El estrés por sequía, frío así como por la sal tienen un importante tema en común para el crecimiento de las plantas y es la disponibilidad de agua. Las plantas están expuestas durante todo su ciclo de vida a condiciones de un reducido contenido de agua en el ambiente. La mayoría de las plantas han desarrollado estrategias para protegerse a sí mismas contra estas condiciones de sequedad. Sin embargo, si la severidad y duración de las condiciones de sequía son muy grandes, los efectos sobre el desarrollo, crecimiento y rendimiento de la mayoría de las plantas de cultivo, son profundos. Ya que un alto contenido de sal en algunos suelos resulta en menos disponibilidad de agua para absorción
40 por parte de la célula, su efecto es similar a aquellos observados bajo condiciones de sequía. Adicionalmente, bajo temperaturas de congelación, las células de la planta pierden agua como resultado de la formación de hielo que se inicia en el apoplasto y retira agua del simplasto. Comunmente, los mecanismos de respuesta molecular de una planta a cada una de estas condiciones de estrés son comunes y las proteínas quinasas juegan un papel esencial en estos mecanismos moleculares.

45 Las proteínas quinasas representan una súper familia y los miembros de esta familia catalizan la transferencia reversible de un grupo fosfato de ATP a cadenas laterales de los aminoácidos serina, treonina y tirosina sobre proteínas objetivo. Las proteínas quinasas son elementos primarios en los procesos de señalización en plantas y se ha reportado que juegan un papel crucial en la percepción y transducción de señales y que le permiten a una célula (y a la planta)
50 para responder a estímulos ambientales. En particular, las proteínas quinasas receptoras (RPK) representan un grupo de proteínas quinasas que activan una disposición compleja de rutas de señalamiento intracelular en respuesta al ambiente extracelular (Van der Gear y colaboradores, 1994, Annu. Rev. Cell Biol. 10: 251 - 337). Las RPK son proteínas transmembrana de paso individual que contienen una secuencia de señal amino-terminal, dominios extracelulares únicos para cada receptor, y un dominio citoplasmático de quinasa. El enlazamiento del ligando induce homo o hetero-
55 dimerización de las RPK, y la cercana proximidad resultante de los dominios citoplasmáticos resulta en la activación de la quinasa por medio de transfosforilación. Aunque las plantas tienen muchas proteínas similares a las RPK, no se ha identificado un ligando para esas quinasas tipo receptor (las RLK). La mayoría de las RLK de la planta que han sido identificadas pertenecen a la familia de las Serina/Treonina (ser/Thr) quinasas, y la mayoría tienen repeticiones extracelulares ricas en Leucina (Becraft, P. W., 1998, Trends Plant Sci. 3: 384 - 388).

60 Otro tipo de proteína quinasa es la proteína quinasa que depende de Ca^{+} (CDPK). Este tipo de quinasa tiene un dominio tipo calmodulina en el terminal COOH que permite la respuesta a las señales de Ca^{+} directamente sin estar presente la calmodulina. Actualmente, las CDPK son las proteínas quinasas de Ser/Thr más prevalentes encontradas en las plantas superiores. Aunque su papel fisiológico permanece sin aclarar, son inducidas por frío, sequía y ácido
65 abscísico (ABA) (Knight y colaboradores, 1991 Nature 352: 524; Schroeder, J. I. y Thuleau, P., 1991 Plant Cell 3: 555; Bush, D. S., 1995 Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol. 46: 95; Urao, T. Y colaboradores, 1994 Mol. Gen. Genet. 244: 331).

Otro tipo de mecanismo de señalización involucra a miembros de la familia de la proteína quinasa de Serina/Treonina SNF1 I. Estas quinasas juegan un papel esencial en la glucosa eucariota y en la señalización del estrés (1). Las quinasas tipo SNF-1 de la planta participan en el control de las enzimas metabólicas clave, incluyendo HMGR, nitrato reductasa, sacarosa sintasa, y sacarosa fosfato sintasa (SPS) (4). Los datos bioquímicos y genéticos indican que la regulación que depende del azúcar de las quinasas SNF1 involucra a varios otros componentes sensoriales y de señalización en levaduras, plantas y animales.

Adicionalmente, los miembros de la familia de la proteína quinasa activada por Mitógeno (MAPK) han sido implicados en las acciones de numerosos tipos de estrés ambientales en animales, levaduras y plantas. Se ha demostrado que tanto la actividad de la quinasa del tipo de la MAPK como los niveles de ARNm de los componentes de las cascadas de MAPK se incrementan en respuesta al estrés ambiental y las transducción de la señal de la hormona de la planta. Las MAP quinasas son componentes de cascadas secuenciales de quinasa, que son activadas por fosforilación de residuos de treonina y de tirosina por medio de las quinasas intermedias secuencia arriba de la MAP quinasa (las MAPKK). Las MAPKK se activan a sí mismas por medio de fosforilación de residuos de serina y de treonina por las quinasas secuencia arriba (las MAPKKK). Se han reportado una cantidad de genes para la MAP quinasa en plantas superiores.

Resumen de la invención

La presente invención provee una planta transgénica transformada por medio de un ácido nucleico que codifica a una proteína relacionada con el estrés de la proteína quinasa (PKSRP), en donde la expresión de la secuencia de ácido nucleico en la planta resulta en una mayor tolerancia al estrés ambiental en comparación con una variedad de tipo silvestre de la planta, en donde el ácido nucleico y la proteína son de *Physcomitrella patens*, y en donde la PKSRP se selecciona entre 1) la Proteína Quinasa-1(PK - 1) como se define en la SEQ ID NO: 7, 2) la Proteína Quinasa-1 (PK - 2) como se define en la SEQ ID NO: 8, y 3) la Proteína Quinasa-1 activada por Mitógeno (MPK - 1) como se define en la SEQ ID NO: 9.

La invención provee además ejemplos específicos de los ácidos nucleicos que codifican para la PKSRP, tales como 1) PK - 1; 2) PK - 2; y 3) MPK - 1.

La invención provee que la PKSRP y el ácido nucleico que la codifica son aquellos que se encuentran en miembros del género *Physcomitrella*. En otra modalidad preferida, el ácido nucleico y la proteína son de una planta de *Physcomitrella patens*. La invención provee que el estrés ambiental puede ser salinidad, sequía, temperatura, estrés por metal, químico, patógeno y oxidativo, o combinaciones de los mismos. En modalidades preferidas, el estrés ambiental puede ser salinidad y sequía, o una combinación de los mismos.

La invención provee además una semilla producida por una planta transgénica transformada por medio de un ácido nucleico que codifica para una PKSRP, en donde la planta es una reproducción verdadera para una mayor tolerancia al estrés ambiental en comparación con una variedad de tipo silvestre de la planta. La invención provee además una semilla producida por una planta transgénica que expresa una PKSRP, en donde la planta es una reproducción verdadera para una mayor tolerancia al estrés ambiental en comparación con una variedad de tipo silvestre de la planta.

La invención provee además una PKSRP aislada, en donde la PKSRP es como se describe más abajo. La invención provee además un ácido nucleico que codifica para una PKSRP aislada, en donde el ácido nucleico que codifica a la PKSRP codifica para una PKSRP como se describe más abajo.

La invención provee además un vector aislado de expresión recombinante que incluye un ácido nucleico que codifica a una PKSRP como se describe más abajo, en donde la expresión del vector en una célula huésped resulta en una mayor tolerancia al estrés por sequía en comparación con una variedad de tipo silvestre de la célula huésped. La invención provee además una célula huésped que contiene al vector y una planta que contiene a la célula huésped.

La invención provee además un método para producir una planta transgénica con un ácido nucleico que codifica para una PKSRP, en donde la expresión del ácido nucleico en la planta resulta en una mayor tolerancia al estrés ambiental en comparación con una variedad de tipo silvestre de la planta que comprende: (a) transformar una célula de una planta con un vector de expresión que incluye un ácido nucleico que codifica para una PKSRP, y (b) la generación a partir de la célula de una planta de una planta transgénica con una mayor tolerancia al estrés ambiental en comparación con una variedad de tipo silvestre de la planta, en donde el ácido nucleico y la proteína son de *Physcomitrella patens*, y en donde la PKSRP se selecciona entre 1) la Proteína Quinasa-1(PK - 1) como se define en la SEQ ID NO: 7, 2) la Proteína Quinasa-1 (PK - 2) como se define en la SEQ ID NO: 8, y 3) la Proteína Quinasa-1 activada por Mitógeno (MPK - 1) como se define en la SEQ ID NO: 9.

La presente invención provee además un método de identificación de una nueva PKSRP, que comprende: (a) el surgimiento de una respuesta específica de anticuerpo para una PKSRP, o fragmento de la misma, como se describió anteriormente; (b) seleccionar material de PKSRP putativa con el anticuerpo, en donde el enlazamiento específico del anticuerpo con el material indica la presencia de una PKSRP potencialmente nueva; y (c) analizar el material enlazado en comparación con una PKSRP conocida para determinar su novedad. Alternativamente, se puede utilizar hibridación con sondas de ácido nucleico como se describe más abajo para identificar nuevos ácidos nucleicos que codifican para PKSRP.

La presente invención también provee métodos para modificar la tolerancia al estrés de una planta que comprenden modificar la expresión de una PKSRP en la planta, en donde la PKSRP es como se describe más abajo. La invención establece que este método se puede llevar a cabo de tal manera que o bien se incrementa o se disminuye la tolerancia a la sequía.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 (A - C) muestra una secuencia de nucleótidos de la PK - 1 parcial (SEQ ID NO: 1); PK - 2 (SEQ ID NO: 2) y MPK - 1 (SEQ ID NO: 3) de *Physcomitrella patens*.

La Figura 2 (A - C) muestra una secuencia de nucleótidos de la PK - 1 de longitud completa (SEQ ID NO: 4), PK - 2 (SEQ ID NO: 5) y MPK - 1 (SEQ ID NO: 6) de *Physcomitrella patens*.

La Figura 3 (A - C) muestra una secuencia deducida de aminoácidos de PK - 1 (SEQ ID NO: 7), de PK - 2 (SEQ ID NO: 8) y MPK - 1 (SEQ ID NO: 9).

La Figura 4 muestra un diagrama del vector pGMSG de expresión de la planta que contiene al Súper promotor dirigiendo la expresión de las SEQ ID NOs: 4, 5 y 6. Los componentes son: gen aacCl de resistencia a la gentamicina (Hajdukiswicz y colaboradores., 1994 Plant Molecular Biology 25: 989 - 94), el promotor NOS (Becker y colaboradores., 1992 Plant Molecular Biology 20: 1195 - 7), el terminador g7T (Becker y colaboradores., 1992), el terminador NOSpA (Jefferson y colaboradores, 1987 EMBO J. 6: 3901 - 7). El "Gen Deseado" se refiere al gen que va a ser sobre expresado en las plantas.

La Figura 5 muestra los resultados de un análisis de estrés por sequía con plantas transgénicas que sobre expresan MPK - 1 y líneas de *Arabidopsis* de tipo silvestre. Las líneas transgénicas muestran un fenotipo tolerante. Se muestran líneas de transformantes individuales.

La Figura 6 muestra los resultados de un análisis de estrés por sequía con plantas transgénicas que sobre expresan MPK - 1 y líneas de *Arabidopsis* de tipo silvestre. Las líneas transgénicas muestran un fenotipo tolerante. Se muestran líneas de transformantes individuales.

La Figura 7 muestra los resultados de un análisis de estrés por sequía con plantas transgénicas que sobre expresan PK - 2 y líneas de *Arabidopsis* de tipo silvestre. Las líneas transgénicas muestran un fenotipo tolerante. Se muestran líneas de transformantes individuales.

La Figura 8 muestra los resultados de un análisis de estrés por salinidad con plantas transgénicas que sobre expresan PK - 2 y líneas de *Arabidopsis* de tipo silvestre. Las líneas transgénicas muestran un fenotipo tolerante. Se muestran líneas de transformantes individuales.

Descripción detallada de la invención

La presente invención puede ser entendida más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada de las modalidades preferidas de la invención y los Ejemplos incluidos allí.

Se debe entender también que la terminología utilizada aquí es para el propósito de describir modalidades específicas únicamente no pretende ser limitante. En particular, la designación de la secuencia de aminoácidos como "Proteínas Relacionadas con Estrés de Proteína Quinasa" (las PKSRP), no limita de ninguna manera la funcionalidad de aquellas secuencias.

La presente invención provee una planta transgénica transformada por un ácido nucleico que codifica para una PKSRP, en donde la expresión de la secuencia de ácido nucleico en la planta resulta en una mayor tolerancia al estrés ambiental en comparación con una variedad de tipo silvestre de la planta en donde el ácido nucleico y la proteína son de *Physcomitrella patens*, y en donde la PKSRP se selecciona entre 1) la Proteína Quinasa - 1 (PK - 1) como se define en la SEQ ID NO: 7, 2) la Proteína Quinasa - 1 (PK - 2) como se define en la SEQ ID NO: 8, y 3) la Proteína Quinasa-1 activada por Mitógeno (MPK - 1) como se define en la SEQ ID NO: 9.

La invención provee además una semilla producida por una planta transgénica transformada por un ácido nucleico que codifica a una PKSRP, en donde la semilla contiene al ácido nucleico que codifica a la PKSRP, y en donde la planta es una reproducción verdadera para una mayor tolerancia al estrés ambiental en comparación con una variedad de tipo silvestre de la planta. La invención provee además una semilla producida por una planta transgénica que expresa una PKSRP en donde la semilla contiene la PKSRP, y en donde la planta es una reproducción verdadera para una mayor tolerancia al estrés por sequía en comparación con una variedad de tipo silvestre de la planta.

Como se lo utiliza aquí, el término "variedad" se refiere a un grupo de plantas dentro de una especie que comparte caracteres constantes que las separan de la forma típica y de otras variedades posibles dentro de esa especie. Mientras posee al menos un rasgo distintivo, una variedad se caracteriza también por medio de alguna variación entre individuos dentro de la variedad, con base fundamentalmente en la segregación Mendeliana de los rasgos entre la progenie de sucesivas generaciones. Una variedad es considerada una "reproducción verdadera" por un rasgo particular si

es genéticamente homocigota para ese rasgo en la medida en que, cuando la variedad de reproducción verdadera es autopolinizada, no se observa una cantidad significativa de segregación independiente de la característica entre la progenie. En la presente invención, el rasgo surge de la expresión transgénica de una secuencia única de ADN introducida dentro de una variedad de planta.

La invención provee además una PKSRP aislada. La invención establece que la PKSRP se selecciona entre 1) la Proteína Quinasa - 1(PK - 1) como se define en la SEQ ID NO: 7; 2) la Proteína Quinasa - 1 (PK - 2) como se define en la SEQ ID NO: 8; y 3) la Proteína Quinasa - 1 activada por Mitógeno (MPK - 1) como se define en la SEQ ID NO: 9.

La invención establece además un ácido nucleico que codifica una PKSRP aislada. En modalidades preferidas, el ácido nucleico que codifica a la PKSRP se selecciona entre 1) la Proteína Quinasa - 1(PK - 1) como se define en la SEQ ID NO: 4, 2) la Proteína Quinasa - 1 (PK - 2) como se define en las SEQ ID NO: 5; y 3) la Proteína Quinasa - 1 activada por Mitógeno (MPK - 1) como se define en la SEQ ID NO: 6; y homólogos de las mismas. Los homólogos de las secuencias de nucleótidos se definen más adelante. La presente invención incluye ácidos nucleicos que codifican para la PKSRP que codifican las PKSRP como se describe aquí. La invención establece que la PKSRP se selecciona entre 1) la Proteína Quinasa - 1(PK - 1) como se define en la SEQ ID NO: 7; 2) la Proteína Quinasa - 1 (PK - 2) como se define en la SEQ ID NO: 8; y 3) la Proteína Quinasa - 1 activada por Mitógeno (MPK - 1) como se define en la SEQ ID NO: 9. De acuerdo con la invención, el ácido nucleico y la proteína se aíslan de la planta del género *Physcomitrella*. En otra modalidad preferida, el ácido nucleico y la proteína son de una planta *Physcomitrella patens* (*P. patens*).

Como se lo utiliza aquí, el término “estrés ambiental” se refiere a cualquier condición de crecimiento por debajo del óptimo e incluye, pero no se limita a, condiciones por debajo del óptimo asociadas con salinidad, sequía, temperatura, estrés por metales, químico, patológico y oxidativo, o combinaciones de los mismos. En una modalidad preferida, es estrés ambiental puede ser salinidad, sequía y temperatura, o combinaciones de los mismos, y en particular, puede ser alta salinidad, bajo contenido de agua y baja temperatura. Se debe entender también como se lo utiliza en la descripción y en las reivindicaciones, que “un” o “una” pueden significar una o más, dependiendo del contexto en el cual se lo utilice. De este modo, por ejemplo, la referencia a “una célula” puede significar que se puede utilizar al menos una célula.

De acuerdo con los propósitos de esta invención, como se incluye y se describe ampliamente aquí, esta invención, en un aspecto, provee un ácido nucleico aislado de un musgo que codifica una Proteína Relacionada con el Estrés (SRP), o una porción de la misma. En particular, la presente invención provee ácidos nucleicos que codifican a las PKSRP incluidas las secuencias de ácido nucleico mostradas en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6. La presente invención también provee las secuencias de aminoácidos de las PKSRP mostradas en las SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9. Como se mencionó anteriormente, la presente invención describe por primera vez a las proteínas predichas de *P. patens*, la Proteína Quinasa - 1(PK - 1), la Proteína Quinasa - 1 (PK - 2) y la Proteína Quinasa - 1 activada por Mitógeno (MPK - 1). La presente invención también describe por primera vez que las proteínas de *P. patens*, la Proteína Quinasa - 1(PK - 1), la Proteína Quinasa - 1 (PK - 2) y la Proteína Quinasa - 1 activada por Mitógeno (MPK - 1) son útiles para incrementar la tolerancia al estrés en las plantas.

Una molécula de ácido nucleico de la presente invención, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, o una porción de las mismas, puede ser aislada utilizando técnicas estándar de biología molecular y la información de la secuencia suministrada aquí. Por ejemplo, un ADNc que codifica para PKSRP de *P. patens* puede ser aislado de una biblioteca de *P. patens* utilizando toda o una porción de las secuencias de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 como una sonda de hibridación y técnicas estándar de hibridación (por ejemplo, como las descritas en Sambrook y colaboradores, 1989 Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2da ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Además, se puede aislar una molécula de ácido nucleico que abarca toda o una porción de la secuencia de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa utilizando iniciadores oligonucleótidos diseñados con base en esta secuencia (por ejemplo, se puede aislar una molécula de ácido nucleico que abarca toda o una porción de la secuencia de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa utilizando iniciadores oligonucleótidos diseñados con base en esta misma secuencia de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3). Por ejemplo, se puede aislar ARNm de células de plantas (por ejemplo, por medio del procedimiento de extracción del tiocianato de guanidinio de Chirgwin y colaboradores, 1979, Biochemistry 18: 5294 - 5299) y se puede preparar ADNc utilizando transcriptasa inversa (por ejemplo, la transcriptasa inversa MLV de Moloney, disponible con Gibco/BRL, Bethesda, MD; o transcriptasa inversa AMV, disponible con Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL). Los iniciadores oligonucleótidos sintéticos para amplificación por medio de reacción en cadena de la polimerasa se pueden diseñar con base en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. Se puede amplificar una molécula de ácido nucleico de la invención utilizando ADNc o, alternativamente, ADN genómico, como molde e iniciadores oligonucleótidos apropiados de acuerdo con técnicas estándar de amplificación por PCR. La molécula de ácido nucleico así amplificada se puede clonar en un vector apropiado y caracterizarlo por medio de análisis de secuencia del ADN. Además, se pueden preparar oligonucleótidos correspondientes a una secuencia de nucleótidos que codifican para la PKSRP por medio de técnicas estándar de síntesis, por ejemplo, utilizando un sintetizador automatizado de ADN.

En una modalidad preferida, una molécula aislada de ácido nucleico de la invención incluye a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6. Las secuencias de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 corresponden a los ADNc que codifican para la PKSRP de *Physcomitrella patens* de la invención. Estos ADNc incluyen secuencias que codifican a las PKSRP (esto es, la “región codificadora”, indicada en la Tabla 1), así como secuencias 5' no traducidas y secuencias 3' no traducidas. Se debe entender por lo tanto que las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 incluye ambas regiones de codificación y las regiones 5' y 3' no traducidas. Alternativamente, la molécula de ácido nucleico puede incluir únicamente la región codificadora de las secuencias en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 o puede contener fragmentos genómicos completos aislados del ADN genómico. Una región codificadora de estas secuencias es indicada como “posición del ORF”.

En otra modalidad preferida, una molécula aislada de ácido nucleico de la invención incluye una molécula de ácido nucleico que es un complemento de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, o una porción de las mismas. Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 es una que es suficientemente complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, de tal manera que pueda hibridar a una de las secuencias de nucleótidos mostradas en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, formando así un híbrido estable.

En aún otra modalidad preferida, una molécula aislada de ácido nucleico de la invención incluye una Secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente una homología del 50 - 60%, preferiblemente al menos aproximadamente del 60 - 70%, 70 - 80%, 80 - 90%, ó 90 - 95%, y más preferiblemente al menos aproximadamente del 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, o una porción de la misma. En una modalidad preferida adicional, una molécula aislada de ácido nucleico de la invención incluye una secuencia de nucleótidos que hibrida, por ejemplo, que hibrida bajo condiciones estrictas, a una de las secuencias de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, o una porción de las mismas. Estas condiciones de hibridación incluyen lavar con una solución que tiene una concentración de sal de aproximadamente 0,02 molar a pH 7 aproximadamente a 60°C.

Además, la molécula de ácido nucleico de la invención puede incluir únicamente una porción de la región codificadora de una de las secuencias en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, por ejemplo un fragmento que puede ser utilizado como una sonda o iniciador o un fragmento que codifica a una porción biológicamente activa de una PKSRP. Las secuencias y nucleótidos determinadas a partir de la clonación de los genes que codifican para la PKSRP de *P. patens* permiten la generación de sondas y de iniciadores diseñados para ser usados en la identificación y/o la clonación de homólogos de PKSRP en otros tipos de células y organismos, así como homólogos de PKSRP de otros musgos o especies relacionadas. Por lo tanto, esta invención también provee compuestos que incluyen a las moléculas de ácido nucleico descritas aquí, o fragmentos de las mismas. Estos compuestos incluyen a las moléculas de ácido nucleico, unidas a una fracción. Estas fracciones, incluyen, pero no se limitan a, fracciones de detección, fracciones de hibridación, fracciones de purificación, fracciones de suministro, fracciones de reacción, fracciones de enlazamiento, y similares. La sonda/el iniciador típicamente incluyen un oligonucleótido sustancialmente aislado. El oligonucleótido típicamente incluye una región de una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo condiciones rigurosas hasta al menos aproximadamente 12, preferiblemente aproximadamente 25, más preferiblemente aproximadamente 40, 50 ó 75 nucleótidos consecutivos de una hebra sentido de una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, una secuencia antisentido de una de las secuencias expuestas en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, o mutantes de ocurrencia natural de las mismas. Se pueden utilizar iniciadores con base en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 en reacciones PCR para clonar homólogos de PKSRP. Se pueden utilizar sondas con base en las secuencias de nucleótidos que codifican para la PKSRP para detectar transcritos o secuencias genómicas que codifican las mismas proteínas o proteínas homólogas. En modalidades preferidas, la sonda incluye además un grupo marcador unido a las mismas, por ejemplo, el grupo marcador puede ser un radio isótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un cofactor enzimático. Tales sondas se pueden utilizar como parte de un kit de análisis de un marcador genómico para identificar células que expresan una PKSRP, por ejemplo midiendo un nivel de un ácido nucleico que codifica para la PKSRP en una muestra de células, por ejemplo, detectando los niveles de ARNm para una PKSRP o determinando si un gen genómico que codifica para PKSRP ha sido mutado o suprimido.

En particular, un método útil para averiguar el nivel de transcripción del gen (un indicador de la cantidad de ARNm disponible para traducción en el producto génico) es llevar a cabo una transferencia Northern (para referencia, por ejemplo, ver Ausubel y colaboradores, 1988, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, New York), en la cual un iniciador diseñado para enlazarse al gen de interés es marcado con una etiqueta detectable (usualmente radioactiva o quimioluminiscente), de tal manera que cuando el ARN total de un cultivo del organismo es extraído, corrido sobre gel, transferido a una matriz estable e incubado con esta sonda, el enlazamiento y la cantidad de enlazamiento de la sonda indican la presencia y también la cantidad de ARNm para este gen. Esta información demuestra al menos parcialmente el grado de transcripción del gen transformado. El ARN celular total se puede preparar a partir de células, tejidos u órganos por medio de diferentes métodos, todos conocidos en el estado del arte, tal como aquellos descritos en Bormann, E. R. y colaboradores, 1992, Mol. Microbiol. 6: 317 - 326.

Para evaluar la presencia o la cantidad relativa de proteína traducida a partir de este ARNm, se pueden emplear técnicas estándar, tales como un transferencia de Western (ver, por ejemplo, Ausubel y colaboradores, 1988, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, New York). En este proceso, se extraen proteínas celulares, separadas por

medio de electroforesis en gel, se las transfiere a una matriz tal como nitrocelulosa, y se incuba con una sonda, tal como un anticuerpo, que específicamente se enlaza a la proteína deseada. Esta sonda es generalmente etiquetada con un marcador quimioluminiscente o colorimétrico que puede ser fácilmente detectado. La presencia y la cantidad de marcador observado indican la presencia y la cantidad de la proteína mutante deseada presente en la célula.

5

La molécula de ácido nucleico de la invención codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 de tal manera que la proteína o una porción de la misma mantiene la misma función o una función similar que la secuencia de aminoácidos con la cual se la compara. Como se la utiliza aquí, la expresión “suficientemente homóloga” se refiere a proteínas o a porciones de las mismas que tienen secuencias de aminoácidos que incluyen un número mínimo de residuos aminoácidos idénticos o equivalentes (por ejemplo, un residuo aminoácido que tiene una cadena lateral similar que el residuo aminoácido en uno de los ORF de una secuencia de la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9) a una secuencia de aminoácidos que codifican para la PKSRP de tal manera que la proteína o una porción de la misma sea capaz de participar en una respuesta de tolerancia al estrés en una planta, o más particularmente puede actuar en mecanismos de transducción de señal de la proteína quinasa involucrados en una respuesta de tolerancia al estrés en una planta de *Physcomitrella patens*. Se describen aquí también ejemplos de tales actividades. Ejemplos de las actividades de PKSRP están expuestos en la Tabla 1.

La presente solicitud describe una proteína que es al menos aproximadamente una homología del 50 - 60%, preferiblemente al menos aproximadamente 60 - 70% y más preferiblemente al menos aproximadamente 70 - 80%, 80 - 90%, 90 - 95%, y más preferiblemente aproximadamente al menos de 96%, 97%, 98%, 99% o más, con una secuencia entera de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9. Además, una homología al menos aproximadamente del 50 - 60%, preferiblemente aproximadamente al menos del 60 - 70% y más preferiblemente al menos aproximadamente del 70 - 80%, 80 - 90%, 90 - 95%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente del 96%, 97%, 98%, 99% o más con una secuencia entera de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

Las porciones de proteínas codificadas por las moléculas de ácido nucleico para la PKSRP de la invención son preferiblemente porciones biológicamente activas de una de las PKSRP. Como se lo utiliza aquí, el término “porción biológicamente activa de una PKSRP” pretende incluir una porción, por ejemplo, un dominio/motivo, de una PKSRP que participa en una respuesta de tolerancia al estrés por sequía en una planta, o más particularmente, participa actuando en los mecanismos de transducción de señal de una proteína quinasa involucrados en una respuesta de tolerancia al estrés por sequía en una planta, o tiene una actividad como la expuesta en la Tabla 1. Para determinar si una PKSRP o una porción biológicamente activa de la misma pueden participar en los mecanismos de transducción de señal involucrados en una respuesta de tolerancia al estrés por sequía en una planta, se puede llevar a cabo un análisis de estrés de una planta que expresa a la PKSRP. Tales métodos de análisis son conocidos por aquellos capacitados en el arte, como se detalla en el Ejemplo 7.

Se pueden preparar fragmentos adicionales de ácido nucleico que codifican porciones biológicamente activas de una PKSRP aislando una porción de la secuencia en la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9, expresando la porción codificada de la PKSRP o el péptido (por ejemplo, por medio de expresión recombinante *in vitro*) y evaluando la actividad de la porción codificada de la PKSRP o del péptido.

La invención abarca además moléculas de ácido nucleico que difieren de una de las secuencias de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 (y porciones de la misma) debido a la degeneración del código genético y de esta forma codifican la misma PKSRP que aquella codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6. En una modalidad adicional, la molécula de ácido nucleico de la invención codifica a una proteína de longitud completa de *Physcomitrella patens* seleccionada de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9.

50

Además de las secuencias de nucleótidos que codifican para PKSRP de *Physcomitrella patens* mostradas en las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 aquellos capacitados en el arte se darán cuenta de que existen polimorfismos de la secuencia de ADN que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de las PKSRP dentro de una población (por ejemplo, la población de *Physcomitrella patens*). Tal polimorfismo genético en el gen que codifica para PKSRP puede existir entre individuos de una población debido a una variación natural. Como se los utiliza aquí, los términos “gen” y “gen recombinante” se refieren a una molécula de ácido nucleico que incluyen un marco de lectura abierta que codifica a una PKSRP de *Physcomitrella patens*. Tales variaciones naturales pueden resultar típicamente en una variación del 1 - 5% en la secuencia de nucleótidos del gen que codifica para PKSRP. Se pretende que todas y cada una de tales variaciones de nucleótidos y el polimorfismo del aminoácido resultante en una PKSRP que son el resultado de una variación natural y que no altera la actividad funcional de las PKSRP estén incluidas dentro del alcance de la invención.

Las moléculas de ácido nucleico correspondientes a las variantes naturales y a los no homólogos de *Physcomitrella patens* del ADNc que codifican para PKSRP de *Physcomitrella patens* de la invención pueden ser aisladas con base en su homología con ácido nucleico que codifica para PKSRP de *Physcomitrella patens* descrito aquí utilizando el ADNc de *Physcomitrella patens*, o una porción del mismo, como sonda de hibridación de acuerdo con técnicas estándar de hibridación bajo condiciones estrictas de hibridación. Por lo tanto, en otras modalidades, una molécula aislada de ácido nucleico de la invención es de al menos 15 nucleótidos de longitud e hibrida bajo condiciones estrictas hasta la

65

molécula de ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6. En otras modalidades, el ácido nucleico es al menos de 30, 50 100, 250 o más nucleótidos de longitud. Como se lo utiliza aquí, el término “híbrida bajo condiciones estrictas” pretende describir condiciones para hibridación y lavado bajo las cuales las secuencias de nucleótidos al menos 60% homólogas entre sí permanecen típicamente hibridadas entre sí. Preferiblemente, las condiciones son tales que la homología de las secuencias son al menos aproximadamente del 65%, más preferiblemente de al menos aproximadamente del 70%, y aún más preferiblemente aproximadamente del 75% o más entre sí permanecen típicamente hibridadas entre sí. Tales condiciones de rigurosidad son conocidas por aquellos capacitados en el arte y pueden ser encontradas en Current Protocols in Molecular Biology, 6.3.1 - 6.3.6, John Wiley & Sons, N.Y. (1989). Un ejemplo no limitante preferido de condiciones estrictas de hibridación es la hibridación en citrato de sodio/cloruro de sodio 6X (SSC) aproximadamente a 45°C, seguida por una o más lavadas en 0,2 X SSC, SDS al 0,1% a 50 - 65°C. Preferiblemente, una molécula aislada de ácido nucleico de la invención que hibrida bajo condiciones estrictas hasta una secuencia de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, corresponde a una molécula de ácido nucleico de ocurrencia natural. Como se la utiliza aquí, una molécula de ácido nucleico de “ocurrencia natural” se refiere a una molécula de ARN o de ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que se presentan en la naturaleza (por ejemplo, que codifica a una proteína natural). En una modalidad, el ácido nucleico codifica a una PKSRP de *Physcomitrella patens* natural.

Además de las variantes de ocurrencia natural de la secuencia para PKSRP que pueden existir en la población, la persona capacitada en el arte se dará cuenta que se pueden introducir cambios por medio de mutación en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, conduciendo por lo tanto a cambios en la secuencia de aminoácidos de la PKSRP codificada, sin alterar la habilidad funcional de la PKSRP. Por ejemplo, las sustituciones de nucleótidos que conducen a sustituciones de aminoácidos en residuos aminoácidos “no esenciales” pueden hacerse en una secuencia de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6. Un residuo aminoácido “no esencial” es un residuo que puede ser alterado a partir de la secuencia de tipo silvestre de una de las PKSRP (SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9) sin alterar la actividad de dicha PKSRP, mientras que se requiere de un residuo aminoácido “esencial” para la actividad de la PKSRP. Otros residuos aminoácidos, sin embargo, (por ejemplo, aquellos que no están conservados o únicamente semiconservados en el dominio que tiene actividad de PKSRP) pueden no ser esenciales para la actividad y de este modo son probablemente sensibles a la alteración sin alterar la actividad de PKSRP.

Por lo tanto, otro aspecto de la invención se relaciona con moléculas de ácido nucleico que codifican las PKSRP que contienen cambios en residuos aminoácidos que no son esenciales para la actividad de PKSRP. Tales PKSRP difieren en la secuencia de aminoácidos de una secuencia contenida en las SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9, sin embargo retienen al menos una de las actividades de la PKSRP descritas aquí. En una modalidad, la molécula aislada de ácido nucleico incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína, en donde la proteína incluye unas secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 y es capaz de participar en la respuesta de tolerancia al estrés en una planta, o más particularmente participa en los mecanismos de transducción de señal de la proteína quinasa involucrados en una respuesta de tolerancia al estrés en una planta de *Physcomitrella patens*, o tiene una o más actividades expuestas en la Tabla 1. La proteína codificada por la molécula de ácido nucleico se selecciona entre las secuencias de las SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9

Para determinar el porcentaje de homología de dos secuencia de aminoácidos (por ejemplo, una de las secuencias de las SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9 y una forma mutante de las mismas) o de dos ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para propósitos de una comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir vacíos en la secuencia de una proteína o de un ácido nucleico para alineación óptima con la otra proteína o ácido nucleico). Los residuos aminoácidos o los nucleótidos en las correspondientes posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos son luego comparados. Cuando una posición en una secuencia (por ejemplo, la secuencia de la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9) está ocupada por el mismo residuo aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la otra secuencia (por ejemplo, una forma mutante de la secuencia seleccionada del polipéptido de las SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9), entonces las moléculas son homólogas en esa posición (esto es, como se utiliza aquí “homología” de aminoácido o de ácido nucleico es equivalente a la “identidad” de aminoácido o de ácido nucleico). El porcentaje de homología entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (esto es, % de homología = número de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100). La comparación de la longitud de la secuencia puede ser al menos de 15 residuos aminoácidos, al menos de 25 residuos aminoácidos, o al menos de 35 residuos aminoácidos.

Alternativamente, se puede lograr la determinación del porcentaje de homología entre dos secuencias utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido, no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873 - 5877). Tal algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul, y colaboradores (1990 J. Mol. Biol. 215: 403 - 410). Las búsquedas de ácidos nucleico con BLAST se pueden llevar a cabo con el programa NBLAST, puntaje = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de ácido nucleico homólogas a las moléculas de ácido nucleico que codifican para PKSRP. Las búsquedas de proteína con BLAST se pueden llevar a cabo con el programa XBLAST, puntaje = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias homólogas de aminoácidos con las PKSRP.

Para obtener alineaciones con vacíos para propósitos de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul, y colaboradores (1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389 - 3402). Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo,

XBLAST y NBLAST). Otro ejemplo preferido no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller (CABIOS 1989). Tal algoritmo está incorporado dentro del programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparación de secuencias de aminoácidos, se pueden utilizar una tabla de residuos por peso PAM120, una penalización por longitud de un vacío de 12 y una penalización por vacío de 4 para obtener los homólogos de secuencias de aminoácidos con las PKSRP. Para obtener alineaciones de vacíos para propósitos de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul y colaboradores (1997 *Nucleic Acids Res.* 25: 3389 - 3402). Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Otro ejemplo preferido no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller (CABIOS 1989). Tal algoritmo está incorporado dentro del programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparación de secuencias de aminoácidos, se pueden utilizar una tabla de residuos por peso PAM120, una penalización por longitud de un vacío de 12 y una penalización por vacío de 4.

Se puede crear una molécula aislada de ácido nucleico que codifica a una PKSRP homóloga a una secuencia de proteína de la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 por medio de la introducción de una o más sustituciones, adiciones, o supresiones de nucleótidos dentro de una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 de tal manera que se introducen una o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos dentro de la proteína codificada. Se pueden introducir mutaciones dentro de una de las secuencias de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 por medio de técnicas estándar, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Se pueden hacer sustituciones conservadoras de aminoácidos en uno o más residuos predichos de aminoácidos no esenciales. Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es una en la cual se reemplaza el residuo aminoácido con un residuo aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en el arte familias de residuos aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). De este modo, se reemplaza preferiblemente un residuo aminoácido no esencial predicho en una PKSRP con otro residuo aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Alternativamente, en otra modalidad, se pueden introducir aleatoriamente mutaciones junto con todo o parte de una secuencia que codifica a una PKSRP, tal como por medio de mutagénesis de saturación, y se pueden seleccionar los mutantes resultantes para una actividad de PKSRP descrita aquí para identificar mutantes que retengan actividad de PKSRP. Después de mutagénesis de la secuencia de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, se puede expresar en forma recombinante la proteína codificada y se puede determinar la actividad de la proteína analizando la tolerancia al estrés de una planta que expresa una proteína como la descrita en el Ejemplo 7.

Además de la moléculas de ácido nucleico que codifican a las PKSRP descritas anteriormente, otro aspecto de la invención se relaciona con moléculas aisladas de ácido nucleico que son antisentido a ellas. Un ácido nucleico "antisentido" incluye una secuencia de nucleótidos que es complementaria a un ácido nucleico "sentido" que codifica a una proteína, por ejemplo, complementaria a la cadena de codificación de una molécula de ADN bicatenaria o complementaria a una secuencia de ARNm. Por lo tanto, un ácido nucleico antisentido puede enlazarse a través de un puente de hidrógeno a un ácido nucleico sentido. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a una cadena de codificación completa que codifica para una PKSRP, o únicamente a una porción de la misma. En una modalidad, una molécula de ácido nucleico antisentido es antisentido a una "región codificadora" de la cadena de codificación de una secuencia de nucleótidos que codifica a una PKSRP. El término "región codificadora" se refiere a la región de la secuencia de nucleótidos que incluye codones que son traducidos en residuos aminoácidos (por ejemplo, la región codificadora entera de ,,,, incluye a los nucleótidos 1 a). En otra modalidad, la molécula de ácido nucleico antisentido es antisentido a una "región no codificadora" de la cadena de codificación de una secuencia de nucleótidos que codifica para PKSRP. El término "región no codificadora" se refiere a secuencias 5' y 3' que flanquean a la región codificadora que no son traducidas en aminoácidos (esto es, también denominadas como regiones 5' y 3' no traducidas).

Dadas las secuencias de cadena codificadora que codifican a una PKSRP descrita aquí (por ejemplo, las secuencias expuestas en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6), se pueden diseñar ácidos nucleicos antisentido de la invención de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases de Watson y Crick. La molécula de ácido nucleico antisentido puede ser complementaria a la región codificadora entera del ARNm que codifica para PKSRP, pero más preferiblemente es un oligonucleótido que es antisentido únicamente a una porción de la región codificadora o no codificadora del ARNm que codifica para PKSRP. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede ser complementario a la región que rodea al sitio de inicio de la traducción del ARNm que codifica para PKSRP. Un oligonucleótido antisentido puede ser, por ejemplo, aproximadamente de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 nucleótidos de longitud. Un ácido nucleico antisentido de la invención se puede construir utilizando síntesis química y reacciones enzimáticas de ligación utilizando procedimientos conocidos en el arte. Por ejemplo, un ácido nucleico antisentido (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido) puede ser sintetizado químicamente utilizando nucleótidos de ocurrencia natural o nucleótidos modificados en diferentes formas diseñados para incrementar la estabilidad biológica de las moléculas o para incrementar la estabilidad física del híbrido formado entre los ácidos nucleicos sentido y antisentido, por ejemplo, se pueden utilizar derivados fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. Ejemplos de nucleótidos modifica-

dos que pueden ser utilizados para generar al ácido nucleico antisentido incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-iodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometil-uracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, se puede producir biológicamente el ácido nucleico antisentido utilizando un vector de expresión dentro del cual ha sido subclonado un ácido nucleico en una orientación antisentido (esto es, el ARN transcrito desde el ácido nucleico insertado será de una orientación antisentido al ácido nucleico objetivo de interés, descrito adicionalmente en la siguiente subsección).

Las moléculas de ácido nucleico antisentido de la invención se administran típicamente a una célula o se generan *in situ* de tal manera que hibriden con o se enlacen a ARNm celular y/o a ADN genómico que codifica para una PKSRP para inhibir así la expresión de la proteína, por ejemplo, inhibiendo la transcripción y/o la traducción. La hibridación puede ser por medio de complementariedad de un nucleótido convencional para formar un híbrido estable, o, por ejemplo, en el caso de una molécula de ácido nucleico antisentido que se enlaza a híbridos de ADN, a través de interacciones específicas en el surco principal de la doble hélice. La molécula antisentido puede ser modificada de tal manera que se enlace específicamente a un receptor o a un antígeno expresado sobre una superficie celular seleccionada, por ejemplo, enlazando la molécula de ácido nucleico antisentido a un péptido o a un anticuerpo que se enlaza a un receptor de la superficie de la célula o antígeno. La molécula de ácido nucleico antisentido puede ser suministrada a las células utilizando los vectores descritos aquí. Para lograr concentraciones intracelulares suficientes de las moléculas antisentido, se prefieren constructos de vectores en los cuales se coloca la molécula de ácido nucleico antisentido bajo el control de promotores procariotas, virales o eucariotas fuertes (incluida una planta).

En aún otra modalidad, la molécula de ácido nucleico antisentido de la invención es una molécula de ácido nucleico α -anomérica. Una molécula de ácido nucleico α -anomérica forma híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en el cual, contrario a las unidades β usuales, las cadenas corren paralelas entre sí (Gaultier y colaboradores, 1987 Nucleic Acids. Res. 15: 6625 - 6641). La molécula de ácido nucleico antisentido puede incluir también un 2'-o-metilribonucleótido (Inoue y colaboradores, 1987, Nucleic Acid Res 15: 6131 - 6148) o un análogo quimérico de ARN - ADN (Inoue y colaboradores, 1987 FEBS Lett. 215: 327 - 330).

En aún otra modalidad, un ácido nucleico antisentido de la invención es una ribozima. Las ribozimas son moléculas catalíticas de ARN con actividad de ribonucleasa que son capaces de escindir un ácido nucleico bicatenario, tal como un ARNm, con el cual tienen una región complementaria. De este modo, se pueden utilizar ribozimas (por ejemplo, ribozimas cabeza de martillo (descritas en Haselhoff y Gerlach, 1988 Nature 334: 585 - 591)) para escindir catalíticamente transcritos de ARNm que codifican para PKSRP para inhibir así la traducción de ARNm que codifica para PKSRP. Se puede diseñar una ribozima que tiene especificidad por un ácido nucleico que codifica para una PKSRP con base en la secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica para PKSRP descrito aquí (esto es, la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6) o con base en una secuencia heteróloga que es aislada de acuerdo con los métodos enseñados en esta invención. Por ejemplo, se puede construir un derivado de un ARN que codifica para L-19 IVS de *Tetrahymena* en el cual la secuencia de nucleótidos del sitio activo es complementaria a la secuencia de nucleótidos que es escindida en un ARNm que codifica para PKSRP. Ver, por ejemplo, la patente estadounidense No. 4.987.071 de Cech y colaboradores y la patente estadounidense No. 5.116.742 de Cech y colaboradores. Alternativamente, se puede utilizar ARNm que codifica para PKSRP para seleccionar un ARN catalítico que tenga una actividad específica de ribonucleasa a partir de una reserva de moléculas de ARN. Ver, por ejemplo, Bartel, D. y Szostak, J.W., 1993 Science 261: 1411 - 1418.

Alternativamente, se puede inhibir la expresión del gen que codifica para PKSRP dirigiendo secuencias de nucleótidos complementarias a la región reguladora de una secuencia de nucleótidos que codifican para PKSRP (por ejemplo, un promotor y/o reforzador de PKSRP) para formar estructuras de triple hélice que evitan la transcripción de un gen que codifica para PKSRP en células objetivo. Ver generalmente Helene, C., 1991 Anticancer Drug Des. 6(6): 569 - 84; Helene, C. y colaboradores., 1992 Ann. N.Y. Acad. Sci. 660: 27 - 36; y Maher, L.J., 1992 Bioassays 14(12): 807 - 15.

La invención provee además un vector aislado de expresión recombinante que incluye un ácido nucleico como se describió anteriormente, en donde la expresión del vector en una célula huésped resulta en una mayor tolerancia al estrés por sequía comparado con una variedad de tipo silvestre de la célula huésped. Como se lo utiliza aquí el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar a otro ácido nucleico al cual ha sido enlazado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de ADN bicatenario dentro del cual se pueden ligar segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde se pueden ligar segmentos adicionales de ADN dentro del genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped dentro de la cual son introducidos (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) se integran dentro del genoma de una célula huésped después de la introducción en la célula huésped, y por lo tanto son replicados junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales están operativamente enlazados. Tales vectores son denominados aquí como "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión útiles en las técnicas de ADN recombinante son a menudo en la forma de

plásmidos. En la presente descripción, “plásmido” y “vector” pueden ser intercambiados ya que el plásmido es la forma comúnmente más utilizada de un vector. Sin embargo, la invención pretende incluir tales otras formas de vectores de expresión, tal como los vectores virales (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que sirven funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinante de la invención incluyen un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para expresión del ácido nucleico en una célula huésped, lo cual significa que los vectores de expresión recombinante incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas con base en las células huésped que son utilizadas para expresión, que están operativamente enlazadas a las secuencias de ácido nucleico que van a ser expresadas. Dentro de un vector de expresión recombinante, “operativamente enlazado” se pretende que signifique que la secuencia de nucleótidos de interés está enlazada a la(s) secuencia(s) reguladora(s) en una forma que permita la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula huésped cuando se introduce el vector en la célula huésped). El término “secuencia reguladora” pretende incluir promotores, reforzadores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras son descritas, por ejemplo, en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) o ver: Gruber y Crosby, en: *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, eds. Glick y Thompson, Capítulo 7, 89 - 108, CRC Press: Boca Ratón, Florida, incluidas las referencias citadas allí. Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células huésped y a aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos únicamente en ciertas células huésped o bajo ciertas condiciones. Aquellos capacitados en el arte se darán cuenta que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la escogencia de la célula huésped que va a ser transformada, del nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Los vectores de expresión de la invención se pueden introducir en células huésped para producir así proteínas o péptidos, incluidos proteínas o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos como se describe aquí (por ejemplo, las PKSRP, formas mutantes de las PKSRP, proteínas de fusión, etc.).

Los vectores de expresión recombinante de la invención se pueden diseñar para la expresión de las PKSRP en células procariotas o en células eucariotas. Por ejemplo, los genes que codifican para PKSRP se pueden expresar en células bacterianas tales como *C. glutamicum*, células de insectos (utilizando vectores de expresión de baculovirus), levaduras y otras células de hongos (ver Romanos, M.A. y colaboradores., 1992 *Foreign gene expression in yeast: a review*, *Yeast* 8: 423 - 488; van den Hondel, C.A.M.J.J. y colaboradores., 1991 *Heterologous gene expression in filamentous fungi*, en: *More Gene Manipulations in Fungi*, J.W. Bennet & L.L. Lasure, eds., p. 396 - 428: Academic Press: San Diego; y van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J., 1991 *Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi*, en: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, Peberdy, J.F. y colaboradores., eds., p. 1 - 28, Cambridge University Press: Cambridge), algas (Falcatore y colaboradores., 1999 *Marine Biotechnology* 1(3):239 - 251), ciliados de los tipos: Holotrichia, Peritrichia, Spirotrichia, Suctoria, Tetrahymena, Paramecium, Colpidium, Glaucoma, Platyophrya, Potomacus, Pseudo-dicohnelembus, Euplotes, Engelmanniella, y Stylonychia, especialmente del género *Stylonychia lemnae* con vectores siguiendo un método de transformación como el descrito en WO 98/01572 y células de plantas multicelulares (ver Schmidt, R. y Willmitzer, L., 1988 *High efficiency Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Arabidopsis thaliana leaf and cotyledon explants*, *Plant Cell Rep.* 583 - 586); *Plant Molecular Biology and Biotechnology*, C Press, Boca Ratón, Florida, capítulo 6/7, S. 71 - 119 (1993); F.F. White, B. Jené y colaboradores., *Techniques for Gene Transfer*, en: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. Kung und R. Wu, 128-43, Academic Press: 1993; Potrykus, 1991 *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42: 205 - 225 y las referencias citadas allí) o células de mamífero. Las células huésped adecuadas son discutidas adicionalmente en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press: San Diego, CA (1990). Alternativamente, el vector de expresión recombinante puede ser transcrito y traducido *in vitro*, por ejemplo utilizando las secuencias reguladoras del promotor T7 y la polimerasa T7.

La expresión de proteínas en procariotas a menudo se lleva a cabo con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión ya sea de las proteínas de fusión o de las proteínas que no son de fusión. Los vectores de fusión añaden una cantidad de aminoácidos a una proteína codificada allí, usualmente al terminal amino de la proteína recombinante pero también al terminal C o se fusionan dentro de regiones adecuadas en las proteínas. Tales vectores de fusión sirven típicamente tres propósitos: 1) para incrementar la expresión de proteína recombinante; 2) para incrementar la solubilidad de la proteína recombinante; y 3) para ayudar en la purificación de la proteína recombinante actuando como un ligando en purificación por afinidad. A menudo, en vectores de expresión por fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión de la fracción por fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante de la fracción por fusión subsiguiente a la purificación de la proteína de fusión. Tales enzimas, y sus secuencias de reconocimiento consanguíneas, incluido el Factor Xa, trombina y enteroquinasa.

Los vectores típicos de expresión por fusión incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D. B. y Johnson, K.S., 1988 *Gene* 67: 31 - 40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fusionan glutatión S-transferasa (GST), proteína de enlazamiento de maltosa E, o proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante objetivo. En una modalidad, la secuencia de codificación de la PKSRP es clonada dentro de un vector de expresión pGEX para crear un vector que codifica a una proteína de fusión que incluye, desde el terminal N hasta el terminal C, a una proteína en el sitio X para escisión de GST-trombina. La proteína de fusión se puede purificar por medio de cromatografía de afinidad utilizando resina glutatión-agarosa. Se puede recuperar a la PKSRP recombinante no fusionada a GST por medio de escisión de la proteína de fusión con trombina.

- Los ejemplos de vectores adecuados de expresión inducible de *E. coli* que no son de fusión incluyen pTrc (Amann y colaboradores., 1988 Gene 69: 301 - 315) y pET 11d (Studier y colaboradores., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89). La expresión del gen objetivo del vector pTrc cuenta con la transcripción de ARN polimerasa huésped de un promotor híbrido de fusión trp-lac.
- 5 La expresión del gen objetivo del vector pET 11d cuenta con la transcripción de un promotor de fusión T7 gn10-lac mediado por una ARN polimerasa viral coexpresada (T7 gn1). Esta polimerasa viral es suministrada por las cepas huésped BL21(DE3) o HMS174(DE3) a partir de un profago residente λ que hospeda a un gen T7 gn1 bajo el control transcripcional del promotor lacUV 5.
- 10 Una estrategia para maximizar la expresión de la proteína recombinante es expresar la proteína en una bacteria huésped con una capacidad deteriorada para escindir proteolíticamente la proteína recombinante (Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119 - 128). Otra estrategia es alterar la secuencia de ácidos nucleicos del ácido nucleico que va a ser insertado dentro de un vector de expresión a fin de que los codones individuales para cada aminoácido sean aquellos preferencialmente utilizados en la bacteria escogida para la expresión, tal como *C. glutamicum* (Wada y colaboradores, 1992 Nucleic Acids Res. 20: 2111 - 2118). Tal alteración de las secuencias de ácido nucleico de la invención se puede llevar a cabo por medio de técnicas estándar de síntesis de ADN.
- 15 En otra modalidad, el vector de expresión de PKSRP es un vector de expresión de levadura. Los ejemplos de los vectores para expresión en levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSec1 (Baldari, y colaboradores, 1987 Embo J. 6: 229 - 234), pMFa (Kurjan y Herskowitz, 1982 Cell 30: 933 - 943), pJRY88 (Schultz y colaboradores, 1987 Gene 54: 113 - 123), y pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Los vectores y los métodos para la construcción de vectores apropiados para uso en otros hongos, tal como los hongos filamentosos, incluyen a aquellos detallados en: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P. J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi", en: Applied Molecular Genetics of Fungi, J. F. Peberdy, y colaboradores, eds., p. 1 - 28, Cambridge University Press: Cambridge.
- 20 Alternativamente, las PKSRP de la invención se pueden expresar en células de insecto utilizando vectores de expresión baculovirus. Los vectores baculovirus disponibles para expresión de proteínas en células cultivadas de insecto (por ejemplo, células Sf9) incluyen la serie pAc (Smith y colaboradores, 1983 Mol. Cell Biol. 3: 2156 - 2165) y la serie pVL (Lucklow y Summers, 1989 Virology 170: 31 - 39).
- 25 En aún otra modalidad, un ácido nucleico de la invención se expresa en células de mamífero utilizando un vector de expresión de mamífero. Los ejemplos de vectores de expresión de mamífero incluyen pCDM8 (Seed, B., 1987 Nature 329:840) y pMT2PC (Kaufman y colaboradores, 1987 EMBO J. 6: 187 - 195). Cuando se utilizan en células de mamífero, las funciones de control del vector de expresión son a menudo proveídas por elementos reguladores virales. Por ejemplo, los promotores comúnmente utilizados se derivan de polioma, Adenovirus 2, citomegalovirus y Virus del Simio 40. Para otros sistemas adecuados de expresión tanto para células procariotas como eucariotas ver los capítulos 16 y 17 de Sambrook, J., Fritsh, E. F., y Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- 30 En otra modalidad, el vector de expresión recombinante de mamífero es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico preferencialmente en un tipo de célula particular (por ejemplo, se utilizan elementos reguladores específicos del tejido para expresar al ácido nucleico). Los elementos reguladores específicos del tejido son conocidos en el arte. Los ejemplos no limitantes de promotores adecuados específicos del tejido incluyen al promotor de albumina (específico del hígado; Pinkert y colaboradores, 1987 Genes Dev. 1: 268 - 277), promotores específicos linfoides (Calame y Eaton, 1988 Adv. Immunol 43: 235 - 275), en particular promotores de receptores de células T (Winoto y Baltimore, 1989 EMBO J. 8: 729 - 733) e inmunoglobulinas (Banerji y colaboradores, 1983 Cell 33: 729 - 740; Queen and Baltimore, 1983 Cell 33: 741 - 748), promotores específicos de neuronas (por ejemplo, el promotor de neurofilamentos; Byrne y Ruddle, 1989 PNAS 86: 5473 - 5477), promotores específicos del páncreas (Edlund y colaboradores, 1985 Science 230: 912 - 916), y promotores específicos de la glándula mamaria (por ejemplo, el promotor del suero de la leche; patente estadounidense No. 4.873.316 y la publicación de la solicitud europea No. 264.166). Los promotores regulados de desarrollo son también abarcados, por ejemplo los promotores homeobox de mûrido (Kessel y Gruss, 1990 Science 249: 374 - 379) y el promotor de la proteína fetal (Campes y Tilghman, 1989 Genes Dev. 3: 537 - 546).
- 35 En otra modalidad, las PKSRP de la invención se pueden expresar en células de plantas unicelulares (tales como algas) (ver Falciatore y colaboradores, 1999 Marine Biotechnology 1(3): 239 - 251 y las referencias citadas allí) y las células de plantas de plantas superior (por ejemplo, las espermatofitas, tales como plantas de cultivo). Los ejemplos de vectores de expresión de plantas incluyen a aquellos detallados en: Becker, D., Kemper, E., Schell, J. y Masterson, R., 1992, New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border, Plant Mol. Biol. 20: 1195 - 1197; y Bevan, M.W., 1984 Binary Agrobacterium vectors for plant transformation, Nucl. Acid. Res. 12: 8711 - 8721; Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; en: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds.: Kung y R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15 - 38.
- 40 Un casete de expresión de una planta preferiblemente contiene secuencias reguladoras capaces de dirigir la expresión génica en células de plantas y que están operativamente enlazadas de tal manera que cada secuencia pueda cumplir su función, por ejemplo, la terminación de la transcripción por medio de señales de poliadenilación. Las señales de poliadenilación preferidas son aquellas originadas a partir de ADN-t de *Agrobacterium tumefaciens* tal como las

del gen 3 conocidas como octopina sintasa de pTiACH5 del plásmido Ti (Gielen y colaboradores, 1984 EMBO J. 3: 835) o equivalentes funcionales del mismo pero también son adecuados todos los otros terminadores funcionalmente activos en plantas.

Como la expresión de un gen en una planta muy a menudo no está limitada a niveles transcripcionales, un casete de expresión de una planta contiene preferiblemente otras secuencias operativamente enlazadas como reforzadores transcripcionales tales como la secuencia de sobrecarga que contiene a la secuencia líder 5' no traducida del virus del mosaico del tabaco que mejora la proporción de proteína por ARN (Gallie y colaboradores, 1987, Nucl. Acids Research 15: 8693 - 8711).

La expresión del gen de la planta tiene que estar operativamente enlazada a un promotor apropiado que confiere expresión génica en una forma puntual, específica para la célula o para el tejido. Se prefieren los promotores que dirigen la expresión constitutiva (Benfey y colaboradores, 1989 EMBO J. 8: 2195 - 2202) como aquellos derivados de virus de planta como el 35S CAMV (Franck y colaboradores, 1980 Cell 21: 285 - 294), el 19S CaMV (ver también la patente estadounidense No. 5.352.605 y WO8402913) o promotores de la planta como aquellos de la pequeña subunidad Rubisco descritos en la patente estadounidense No. 4.962.028.

Otras secuencias preferidas para uso en casetes de expresión del gen de la planta son las secuencias objetivo necesarias para dirigir el producto génico en su compartimiento celular apropiado (para una revisión ver Kermode, 1996 Crit. Rev. Plant Sci. 15(4): 285 - 423 y las referencias citadas allí) tal como la vacuola, el núcleo, todos los tipos de plástidos como los amiloplastos, los cloroplastos, los cromoplastos, el espacio extracelular, la mitocondria, el retículo endoplasmático, los cuerpos de aceite, los peroxisomas y otros compartimientos de las células de la planta. La expresión del gen de la planta se puede facilitar también a través de un promotor inducible (para revisión ver Gatz, 1997 Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48: 89 - 108). Los promotores químicamente inducibles son especialmente adecuados si se desea que la expresión génica ocurra en una forma específica de tiempo. Los ejemplos de tales promotores son un promotor inducible de ácido salicílico (WO 95/19443), un promotor inducible de tetraciclina (Gatz y colaboradores, 1992 Plant J. 2: 397 - 404) y un promotor inducible de etanol (WO 93/21334).

También, promotores adecuados que responden a condiciones de estrés biótico o abiótico son aquellos tales como el promotor del gen PRP1 inducible por un patógeno (Ward y colaboradores, 1993 Plant. Mol. Biol. 22: 361 - 366), el promotor hsp80 del tomate inducible por calor (patente estadounidense No. 5.187.267), el promotor alfa-amilasa de la patata inducible por frío (WO 96/12814) o el promotor pinII inducible por lesiones (EP 375091). Para otros ejemplos de promotores inducibles por sequía, frío, y sal, tales como el promotor RD29A, ver Yamaguchi-Shinozaki y colaboradores (1993 Mol. Gen. Genet. 236: 331 - 340).

Se prefieren especialmente aquellos promotores que confieren expresión génica en tejidos y órganos específicos, tales como las células guardianas y las células ciliadas de la raíz. Los promotores adecuados incluyen al promotor del gen de la napina de colza (patente estadounidense No. 5.608.152), al promotor de USP de Vicia faba (Baeumlein y colaboradores, 1991, Mol Gen Genet. 225(3): 459 - 67), al promotor de oleosina de *Arabidopsis* (WO9845461) al promotor de faseolina de *Phaseolus vulgaris* (patente estadounidense No. 5504200), al promotor de Bce4 de *Brassica* (WO9113980 o al promotor de B4 de legumina (LeB4; Baeumlein y colaboradores, 1992 Plant Journal, 2(2): 233 - 9) así como promotores que confieren expresión específica a la semilla en plantas monocotiledoneas como maíz, cebada, trigo, centeno, arroz, etc. Los promotores adecuados para resaltar son el promotor génico lpt2 o el lpt1 de cebada (WO 95/15389 y WO 95/23230) o aquellos descritos en WO 99/16890 (promotores del gen de la cebada hordein, del gen de la glutelina del arroz, gen de la orizina del arroz, gen de prolamina del arroz, gen de la gliadina del arroz, gen de la glutelina del trigo, gen de la zeina del maíz, gen de la glutelina de la avena, gen de kasirina del sorgo y gen de la secalina de la cebada).

También son especialmente adecuados los promotores que confieren expresión génica específica de plástido ya que los plástidos son el compartimiento en donde se sintetizan los precursores y algunos productos finales de la biosíntesis de lípidos. Los promotores adecuados son el promotor de la ARN-polimerasa viral descrito en WO 95/16783 y WO 97/06250 y el promotor de clpP de *Arabidopsis* descrito en WO 99/46394.

La invención provee además un vector de expresión recombinante que incluye una molécula de ADN de la invención clonada dentro del vector de expresión en una orientación antisentido. Esto es, la molécula de ADN está operativamente enlazada a una secuencia reguladora en una forma que permite la expresión (por transcripción de la molécula de ADN) de una molécula de ARN que es antisentido a una ARNm que codifica para PKSRP. Las secuencias reguladoras operativamente enlazadas a una molécula de ácido nucleico clonada en la orientación antisentido pueden ser escogidas que dirijan la expresión continua de la molécula de ARN antisentido en una variedad de tipos de células. Por ejemplo, los promotores virales y/o los reforzadores, o las secuencias reguladoras se pueden escoger para que dirijan la expresión constitutiva, específica del tejido o específica del tipo de célula de ARN antisentido. El vector de expresión antisentido puede ser en la forma de un plásmido recombinante, fagémido o virus atenuado en los cuales se producen ácidos nucleicos antisentido bajo el control de una región reguladora de alta eficiencia, cuya actividad se puede determinar por medio del tipo de célula dentro de la cual se introduce el vector. Para una discusión de la regulación de la expresión génica utilizando genes antisentido ver Weintraub, H. y colaboradores, Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics, Vol. 1(1) 1986 y Mol y colaboradores, 1990 FEBS Letters 268: 427 - 430.

Otro aspecto de la invención se relaciona con células huésped dentro de las cuales se ha introducido un vector de expresión recombinante de la invención. Los términos “célula huésped” y “célula huésped recombinante” se los utiliza aquí en forma intercambiable. Se entiende que tales términos se refieren no únicamente a la célula objetivo particular sino que también se aplican a la progenie o a la progenie potencial de tal célula. Debido a que pueden ocurrir ciertas modificaciones en sucesivas generaciones debido ya sea a mutación o a influencias ambientales, tal progenie puede no ser idéntica en realidad a la célula progenitora, pero están aún incluidas dentro del alcance del término como se lo utiliza aquí.

Una célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, una PKSRP se puede expresar en células bacterianas tales como *C. glutamicum*, células de insecto, células de hongo o células de mamífero (tales como células de ovario de hámster chino (CHO) o células COS), algas, ciliados, células de plantas, hongos u otros microorganismos tipo *C. glutamicum*. Otras células huésped adecuadas son conocidas por aquellos capacitados en el arte.

El ADN del vector se puede introducir en células procariotas o eucariotas a través de técnicas convencionales de transformación o de transfección. Como se los utiliza aquí, los términos “transformación”, “transfección”, “conjugación” y “transducción” pretenden hacer referencia a una variedad de técnicas reconocidas en el arte para introducir ácido nucleico foráneo (por ejemplo, ADN) dentro de una célula huésped, incluyendo coprecipitación con fosfato de calcio o con cloruro de calcio, transfección mediada por dextrano-DEAE, lipofección, competencia natural, transferencia y electroporación mediada químicamente. Se pueden encontrar métodos adecuados para transformación o transfección de células huésped incluidas células de planta en Sambrook, y colaboradores (Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd, ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) y en otros manuales de laboratorio tales como Methods in Molecular Biology, 1995, Vol. 44, Agrobacterium protocols, ed: Gartland and Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey. Como la tolerancia al estrés biótico y abiótico es un rasgo general que se desea sea heredado dentro de una amplia variedad de plantas como maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, soja, cacahuete, algodón, colza y canola, casabe, pimienta, girasol, tagetes, plantas solanáceas como patata, tabaco, berenjena, y tomate, especie Vicia, guisante, alfalfa, plantas tupidas (café, cacao, té), especie Salix, árboles (palma aceitera, coco), hierbas perennes y cultivos de forraje, estas plantas de cultivo son también plantas objetivo preferidas para una ingeniería genética como una modalidad adicional de la presente invención.

En particular, la invención provee un método de producción de una planta transgénica con un ácido nucleico que codifica para PKSRP, en donde la expresión del ácido nucleico en la planta resulta en una mayor tolerancia al estrés ambiental comparada con una variedad de tipo silvestre de la planta, que comprende: (a) transformar una célula de una planta con un vector de expresión que incluye un ácido nucleico que codifica para PKSRP, y (b) generar a partir de la célula de la planta una planta transgénica con una mayor tolerancia al estrés ambiental comparada con una variedad de tipo silvestre de la planta, en donde el ácido nucleico y la proteína son de *Physcomitrella patens*, y en donde la PKSRP se selecciona entre 1) la Proteína Quinasa - 1 (PK - 1) como se define en la SEQ ID NO: 7, 2) la Proteína Quinasa - 1 (PK - 2) como se define en la SEQ ID NO: 8, y 3) la Proteína Quinasa - 1 activada por Mitógeno (MPK - 1) como se define en la SEQ ID NO: 9.

En modalidades preferidas, el ácido nucleico que codifica para la PKSRP es como se describió anteriormente. La invención también provee un método de incrementar la expresión de un gen de interés dentro de una célula huésped comparada con una variedad de tipo silvestre de la célula huésped, en donde el gen de interés es transcrito en respuesta a una PKSRP, que comprende: (a) transformar una célula huésped con un vector de expresión que incluye un ácido nucleico que codifica para PKSRP, y (b) expresar la PKSRP dentro de la célula huésped, incrementando así la expresión del gen transcrito en respuesta a la PKSRP comparada con una variedad de tipo silvestre de la célula huésped. De acuerdo con la invención, la PKSRP es como se describió anteriormente. En modalidades preferidas, el ácido nucleico que codifica para PKSRP es como se describió anteriormente.

Para tal transformación de la planta, se pueden utilizar vectores binarios tales como pBinAR (Höfgen y Willmitzer, 1990 Plant Science 66: 221 - 230). La construcción de los vectores binarios se puede llevar a cabo por medio de ligación del ADN en orientación sentido o antisentido dentro del iniciador en posición 5 del ADN-T al ADNc, un promotor de la planta activa la transcripción del ADNc. Se localiza una secuencia de poliadenilación en el iniciador en posición 3 del ADNc. La expresión específica del tejido se puede lograr por medio del uso de un promotor específico del tejido. Por ejemplo, la expresión específica de la semilla se puede lograr por medio de la clonación del iniciador en posición 5 del promotor de napina o de LeB4 o de USP del ADNc. También, se puede utilizar cualquier otro elemento promotor específico de la semilla. Para expresión constitutiva dentro de la planta completa, se puede utilizar al promotor CaMV 35S. la proteína expresada puede ser dirigida a un compartimiento celular utilizando un péptido señal, por ejemplo para plástidos, mitocondria o retículo endoplasmático (Kermode, Crit. Rev. Plant. Sci., 1996 4 (15): 285 - 423). El de péptido señal se clona en el iniciador en posición 5 en el marco para el ADNc para archivar la localización subcelular de la proteína de fusión. La transformación de la planta mediada por *Agrobacterium* se puede realizar utilizando por ejemplo a la cepa GV3101 (pMP90) (Koncz y Schell, 1986 Mol. Gen. Genet. 204: 383 - 396) o a la cepa LBA4404 (Clontech) de *Agrobacterium tumefaciens*. La transformación se puede realizar por medio de técnicas estándar de transformación (Deblaere y colaboradores, 1994 Nucl. Acids. Res. 13: 4777 - 4788). En una modalidad, se pueden utilizar los promotores que son responsables por el estrés abiótico, tal como el promotor RD29A de *Arabidopsis*, con las secuencias de ácido nucleico descritas aquí. Alguien capacitado en el arte se dará cuenta que el promotor utilizado debe estar operativamente enlazado al ácido nucleico de tal manera que el promotor provoque la transcripción del

ácido nucleico lo cual resulta en la síntesis de un ARNm que codifica a un polipéptido. Alternativamente, el ARN puede ser un ARN antisentido para afectar la expresión subsiguiente del mismo o de otro gen o genes.

La transformación de la planta mediada por *Agrobacterium* se puede realizar utilizando técnicas estándar de transformación y de regeneración (Gelvin, Stanton B. y Schilperoort, Robert A, Plant Molecular Biology Manual, 2nd Ed. - Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995. - en Sect., Ringbuc Centrale Signatur: BT11 - P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R.; Thompson, John E., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Ratón: CRC Press, 1993 - 360 S., ISBN 0-8493-5164-2). Por ejemplo, la colza puede ser transformada a través de transformación cotiledonea o hipocotiledonea (Moloney y colaboradores, 1989 Plant cell Report 8:238-242; De Block y colaboradores, 1989 Plant Physiol. 91:694-701). El uso de antibióticos para *Agrobacterium* y la selección de la planta dependen del vector binario y de la cepa de *Agrobacterium* utilizados para la transformación. La selección de la colza se lleva a cabo normalmente utilizando kanamicina como marcador seleccionable de la planta. La transferencia del gen mediada por *Agrobacterium* al lino puede ser realizada utilizando, por ejemplo, una técnica descrita por Mlynarova y colaboradores, 1994 Plant Cell Report 13: 282 - 285. Adicionalmente, la transformación de la soja se puede realizar utilizando por ejemplo una técnica descrita en EP 0424 047, en la patente estadounidense No. 5.322.783 (Pioneer Hi-Bred International) o en EP 0397 687, en la patente estadounidense No. 5.376.543, en la patente estadounidense No. 5.169.770 (Universidad Toledo).

La transformación de la planta utilizando bombardeo de partículas, absorción de ADN mediada por Polietilén Glicol o a través de la técnica de Fibra de Carburo de Silicio es descrita por ejemplo por Freeling y Walbot "The maize handbook" Springer Verlag: New York (1993) ISBN 3-540-97826-7. Un ejemplo específico de la transformación de maíz se encuentra en la patente estadounidense No. 5.990.387 y un ejemplo específico de la transformación de trigo se puede encontrar en WO 93/07256.

Para la transfección estable de células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y de la técnica de transfección utilizada, únicamente una pequeña fracción de células puede integrar al ADN foráneo en su genoma. Con el propósito de identificar y de seleccionar estos integrantes, se introduce generalmente un gen que codifica a un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a los antibióticos) dentro de las células huésped junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen a aquellos que confieren resistencia a los medicamentos, tales como G418, higromicina y metotrexato o en plantas que confieren resistencia hacia un herbicida tal como glifosato o glufosinato. Las moléculas de ácido nucleico que codifican a un marcador seleccionable se pueden introducir dentro de una célula huésped sobre el mismo vector que aquel que codifica una PKSRRP o se pueden introducir sobre un vector separado. Las células transfectadas en forma estable con la molécula de ácido nucleico introducida pueden ser identificadas, por ejemplo, por medio de selección del medicamento (por ejemplo, las células que han incorporado al gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).

Para crear un microorganismo recombinante homólogo, se prepara un vector que contiene al menos una porción de un gen que codifica para PKSRRP dentro del cual se ha introducido una supresión, adición o sustitución para alterar así, por ejemplo, para desestabilizar funcionalmente al gen que codifica para la PKSRRP. Preferiblemente, este gen que codifica para la PKSRRP es un gen que codifica para la PKSRRP de *Physcomitrella patens*, pero puede ser un homólogo de una planta relacionada o incluso de una fuente de mamífero, de levadura o de insecto. En una modalidad preferida, se diseña el vector de tal manera que, por recombinación homóloga, el gen endógeno que codifica para PKSRRP se desestabiliza funcionalmente (esto es, no codifica más una proteína funcional; también conocido como un vector desactivador). Alternativamente, se puede diseñar al vector de tal manera que, por recombinación homóloga, el gen endógeno que codifica para PKSRRP es mutado o bien alterado pero todavía codifica una proteína funcional (por ejemplo, se puede alterar la región reguladora secuencia arriba para alterar de esta manera la expresión de la PKSRRP endógena). Para crear una mutación puntual a través de recombinación homóloga, se pueden utilizar híbridos de ADN-ARN en una técnica conocida como quimeroplastia (Cole-Strauss y colaboradores, 1999 Nucleic Acids Research 27(5): 1323 - 1330 y Kmiec, 1999 Gene therapy American Scientist. 87(3): 240 - 247). Los procedimientos de recombinación homóloga en *Physcomitrella patens* son también conocidos en el arte y también se los contempla para uso aquí.

Mientras en el vector de recombinación homóloga, la porción alterada del gen que codifica para PKSRRP está flanqueado en sus extremo 3' y 5' por medio de una molécula adicional de ácido nucleico del gen que codifica para PKSRRP para permitir que ocurra la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica para PKSRRP transportado por el vector y un gen que codifica para PKSRRP endógena en un microorganismo o planta. La molécula adicional de flanqueo de ácido nucleico que codifica para PKSRRP es de una longitud suficiente para una recombinación homóloga exitosa con el gen endógeno. Típicamente, desde varios cientos de pares de bases hasta kilobases de ADN de flanqueo (ambas en los extremo 5' y 3') son incluidas en el vector (ver por ejemplo, Thomas, K.R., y Capecchi, M.R., 1987 Cell 51: 503 para una descripción de los vectores de recombinación homóloga o Strepp y colaboradores, 1998 PNAS, 95 (8): 4368 - 4373 para recombinación basada en ADNc en *Physcomitrella patens*). Se introduce el vector en la célula de un microorganismo o de una planta (por ejemplo, a través de ADN mediado por polietilén glicol) y se seleccionan las células en las cuales el gen introducido que codifica para PKSRRP se han recombinado en forma homóloga con el gen endógeno que codifica para PKSRRP, utilizando técnicas conocidas en el arte.

En otra modalidad, se pueden producir microorganismo recombinantes que contiene sistemas seleccionados que permiten la expresión regulada del gen introducido. Por ejemplo, la inclusión de un gen que codifica para PKSRRP

sobre un vector que lo coloca bajo el control del operón lac permite la expresión del gen que codifica para PKSRP únicamente en presencia de IPTG. Tales sistemas reguladores son conocidos en el arte.

Se puede utilizar una célula huésped de la invención, tal como una célula huésped eucariota o procariota en cultivo, para producir (esto es, expresar) una PKSRP. Se puede aplicar adicionalmente un método alternativo en plantas por medio de transferencia directa de ADN dentro de flores en desarrollo a través de electroporación o de transferencia génica en medio de *Agrobacterium*. Por lo tanto, la invención provee además métodos para producir las PKSRP utilizando las células huésped de la invención. En una modalidad, el método incluye cultivar la célula huésped de la invención (en la cual se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica a una PKSRP, o dentro de cuyo genoma se ha introducido un gen que codifica para una PKSRP alterada o de tipo silvestre) en un medio adecuado hasta que se produzca la PKSRP. En otra modalidad, el método incluye además aislar las PKSRP del medio o de la célula huésped.

Otro aspecto de la invención se relaciona con PKSRP aisladas en donde la PKSRP se selecciona entre 1) la Proteína Quinasa - 1 (PK - 1) como se define en la SEQ ID NO: 7, 2) la Proteína Quinasa - 1 (PK - 2) como se define en la SEQ ID NO: 8, y 3) la Proteína Quinasa - 1 activada por Mitógeno (MPK - 1) como se define en la SEQ ID NO: 9, y porciones biológicamente activas de las mismas.

Una proteína “aislada” o “purificada” o una porción biológicamente activa de la misma está libres de algo del material celular cuando son producidas por medio de técnicas de ADN recombinante, o de precursores químicos u otros químicos cuando se las sintetiza químicamente. La expresión “sustancialmente libre de material celular” incluye preparaciones de PKSRP en las cuales se separa la proteína de algunos de los componentes celulares de las células en las cuales son producidas en forma natural o recombinante. En una modalidad, la expresión “sustancialmente libre de material celular” incluye preparaciones de PKSRP que tienen aproximadamente menos del 30% (en peso seco) de material que no es PKSRP (también denominada aquí como una “proteína contaminante”), más preferiblemente aproximadamente menos del 20% de material que no es PKSRP, aún más preferiblemente aproximadamente menos del 10% de material que no es PKSRP, y los más preferible aproximadamente menos del 5% de material que no es PKSRP. Cuando se produce en forma recombinante la PKSRP o una porción biológicamente activa de la misma, está también preferiblemente sustancialmente libre de medio de cultivo, esto es, el medio de cultivo representa aproximadamente menos del 20%, más preferiblemente aproximadamente menos del 10%, y lo más preferible aproximadamente menos del 5% del volumen de la preparación de la proteína. La expresión “sustancialmente libre de precursores químicos o de otros químicos” incluye preparaciones de la PKSRP en las cuales la proteína está separada de los precursores químicos o de otros químicos que están involucrados en la síntesis de la proteína. En una modalidad, la expresión “sustancialmente libre de precursores químicos o de otros químicos” incluye preparaciones de la PKSRP que tiene aproximadamente menos del 30% (en peso seco) de precursores químicos o de químicos que no son de PKSRP, más preferiblemente aproximadamente menos del 20% de precursores químicos o de químicos que no son de PKSRP, aún más preferiblemente aproximadamente menos del 10% de precursores químicos o de químicos que no son de PKSRP, y los más preferible aproximadamente menos del 5% de precursores químicos o de químicos que no son de PKSRP. En modalidades preferidas, las proteínas aisladas o porciones biológicamente activas de las mismas carecen de proteína contaminantes del mismo organismo a partir del cual se deriva la PKSRP. Típicamente, tales proteínas son producidas por medio de expresión recombinante, por ejemplo, de una PKSRP de *Physcomitrella patens* en plantas diferentes de *Physcomitrella patens* o de microorganismos tales como *C. glutamicum*, ciliados, algas u hongos.

Una PKSRP aislada o una porción de la misma de la invención pueden participar en una respuesta de tolerancia al estrés en una planta, o más particularmente pueden participar como un canal de potasio en una respuesta de tolerancia al estrés en una planta de *Physcomitrella patens*, o tienen una o más de las actividades expuestas en la Tabla 1. En modalidades preferidas, la proteína o una porción de la misma incluyen una secuencia de aminoácidos que es suficientemente homóloga a una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 de tal manera que la proteína o una porción de la misma mantengan la habilidad de participar en el metabolismo de los compuestos necesarios para la construcción de membranas celulares en *Physcomitrella patens*, o en el transporte de moléculas a través de estas membranas. La porción de la proteína es preferiblemente una porción biológicamente activa como se describe aquí.

Una PKSRP de la invención tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9. En aún otra modalidad preferida, la PKSRP tiene una secuencia de aminoácidos que es codificada por medio de una secuencia de nucleótidos que híbrida, por ejemplo, bajo condiciones estrictas, hasta una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6. La solicitud establece que la PKSRP tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una homología aproximadamente al menos del 50 - 60%, preferiblemente aproximadamente al menos del 60 - 70%, más preferiblemente aproximadamente al menos del 70 - 80%, 80 - 90%, 90 - 95%, y aún más preferiblemente aproximadamente al menos del 96%, 97%, 98%, 99% o más con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9. Las PKSRP preferidas de la presente invención poseen preferiblemente al menos una de las actividades de la PKSRP descritas aquí. Por ejemplo, una PKSRP preferida de la presente invención incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que híbrida, por ejemplo, bajo condiciones estrictas, a una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, y que puede participar en una respuesta de tolerancia al estrés en una planta, o más particularmente puede participar en la transcripción de una proteína involucrada en la respuesta de tolerancia al estrés en una planta de *Physcomitrella patens*, o que tiene una o más de las actividades expuestas en la Tabla 1. La solicitud establece que la PKSRP es sustancialmente homóloga a una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ

ID NO: 9 y retiene la actividad funcional de la proteína de una de las SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, aunque difiere en la secuencia de aminoácidos debido a variación natural o a mutagénesis, como se describe en detalle más arriba. Por lo tanto, la solicitud establece además que la PKSRP es una proteína que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene una homología aproximadamente al menos del 50 -60%, y más preferiblemente aproximadamente al menos del 70 - 80%, 80 - 90%, 90 - 95%, y más preferiblemente aproximadamente al menos del 96%, 97%, 98%, 99% o más, con una secuencia entera de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 y que tiene al menos una de las actividades de la PKSRP descritas aquí.

La solicitud incluye a una proteína completa de *Physcomitrella patens* que es sustancialmente homóloga a una secuencia entera de aminoácidos codificada por un ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

Las porciones biológicamente activas de una PKSRP incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos derivadas de la secuencia de aminoácido de una PKSRP, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 o la secuencia de aminoácidos de una proteína homóloga a una PKSRP, que incluye menos aminoácidos que una PKSRP de longitud completa o la proteína de longitud completa que es homóloga a una PKSRP, y exhibe al menos una actividad de una PKSRP. Típicamente las porciones biológicamente activas (péptidos, por ejemplo, péptidos que son de, por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100 o más aminoácidos de longitud) incluyen un dominio o motivo con al menos una actividad de una PKSRP. Además, otras porciones biológicamente activas, en las cuales están suprimidas otras regiones de la proteína, se pueden preparar por medio de técnicas recombinantes y se pueden evaluar para una o más de las actividades descritas aquí. Preferiblemente, las porciones biológicamente activas de una PKSRP incluyen uno o más de los dominios/motivos seleccionados o porciones de los mismos que tienen actividad biológica.

Las PKSRP son preferiblemente producidas por medio de técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica a la proteína es clonada dentro de un vector de expresión (como se describió anteriormente), se introduce en vector de expresión dentro de una célula huésped (como se describió anteriormente) y la PKSRP se expresa en la célula huésped. La PKSRP puede ser aislada entonces de las células por medio de un esquema apropiado de purificación utilizando técnicas estándar de purificación de proteínas. En forma alternativa a la expresión recombinante, se pueden sintetizar químicamente una PKSRP, un polipéptido, o un péptido utilizando técnicas estándar de síntesis de péptidos. Además, se puede aislar una PKSRP nativa a partir de las células (por ejemplo, *Physcomitrella patens*), por ejemplo utilizando un anticuerpo anti-PKSRP, que puede ser producido por medio de técnicas estándar utilizando una PKSRP o fragmento de la misma de esta invención.

La invención también provee una proteína quimérica PKSRP o una proteína de fusión. Como se lo utiliza aquí, una “proteína quimérica” PKSRP o una “proteína de fusión” incluyen a un polipéptido de PKSRP operativamente enlazado a un polipéptido que no es de PKSRP. Un “polipéptido de PKSRP” se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a una PKSRP, mientras que un “polipéptido que no es de PKSRP” se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a una proteína que no es sustancialmente homóloga a la PKSRP, por ejemplo, una proteína que es diferente de la PKSRP y que se deriva del mismo organismo o de un organismo diferente. Dentro de la proteína de fusión, el término “operativamente enlazado” pretende indicar que el polipéptido de PKSRP y el polipéptido que no es de PKSRP están fusionados entre sí para que ambas secuencias cumplan con la función propuesta atribuida a la secuencia utilizada. El polipéptido que no es de PKSRP se puede fusionar al N-terminal o al C-terminal del polipéptido de PKSRP. Por ejemplo, en una modalidad, la proteína de fusión es una proteína de fusión GST-PKSRP en la cual las secuencias de la PKSRP están fusionadas al C-terminal de las secuencias de GST. Tales proteína de fusión pueden facilitar la purificación de las PKSRP recombinantes. En otra modalidad, la proteína de fusión es una PKSRP que contiene una secuencia heteróloga de una señal en su N-terminal. En ciertas células huésped (por ejemplo, células huésped de mamífero) la expresión y/o la secreción de una PKSRP se pueden incrementar a través del uso de una secuencia heteróloga de una señal.

Preferiblemente, una proteína quimérica PKSRP o una proteína de fusión de la invención son producidas por medio de técnicas estándar de ADN recombinante. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican para las diferentes secuencias de polipéptido están ligadas juntas en el marco de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo empleando terminales para ligación redondeados en el extremo o escalonados en el extremo, digestión con una enzima de restricción para proveer terminales apropiados, rellenar de terminales cohesivos según sea adecuado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar una unión indeseada y ligación enzimática. En otra modalidad, el gen de fusión puede ser sintetizado por medio de técnicas convencionales que incluyen sintetizadores automatizados de ADN. Alternativamente, la amplificación por medio de PCR de fragmentos génicos se puede llevar a cabo utilizando iniciadores ancla que dan lugar a salientes complementarias entre dos fragmentos génicos consecutivos que pueden ser posteriormente apareados y amplificados nuevamente para generar una secuencia génica quimérica (ver, por ejemplo Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Ausubel y colaboradores. John Wiley & Sons: 1992). Además, se encuentran comercialmente disponibles muchos vectores de expresión que ya codifican una fracción de fusión (por ejemplo, un polipéptido de GST). Se puede clonar un ácido nucleico que codifica para una PKSRP dentro de un vector de expresión tal que la fracción de fusión esté enlazada en el marco a la PKSRP.

Los homólogos de la PKSRP se pueden generar por medio de mutagénesis, por ejemplo, mutación puntual discreta o truncamiento de la PKSRP. Como se lo utiliza aquí, el término “homólogo” se refiere a una variante de la PKSRP que actúa como un agonista o como un antagonista de la actividad de la PKSRP. Un agonista de la PKSRP puede

retener sustancialmente las mismas, o un subconjunto, de las actividades biológicas de la PKSRP. Un antagonista de la PKSRP puede inhibir una o más de las actividades de la forma de ocurrencia natural de la PKSRP, por ejemplo, por medio de enlazamiento competitivo a un miembro secuencia abajo o secuencia arriba de la cascada metabólica del componente de la membrana celular que incluye la PKSRP, o por medio de enlazamiento a una PKSRP que media el transporte de compuestos a través de tales membranas, evitando por lo tanto que tenga lugar el desplazamiento.

En una modalidad alternativa, se pueden identificar los homólogos de la PKSRP por medio de bibliotecas de selección por combinación de mutantes, por ejemplo, mutantes de truncamiento, de la PKSRP para antagonistas de PKSRP o actividad antagonista. En una modalidad, se genera una biblioteca heterogénea de variantes de PKSRP por medio de mutagénesis de combinación a nivel del ácido nucleico y es codificada por medio de una biblioteca génica heterogénea. Se puede producir una biblioteca heterogénea de variantes de PKSRP, por ejemplo, por medio de ligación enzimática de una mezcla de oligonucleótidos sintéticos dentro de secuencias génicas de tal manera que se pueda expresar un conjunto degenerado de secuencias potenciales de PKSRP como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para despliegue del fago) que contiene allí al conjunto de secuencias de la PKSRP. Existe una variedad de métodos que pueden ser utilizados para producir bibliotecas de homólogos potenciales de PKSRP a partir de una secuencia degenerada de oligonucleótidos. Se puede llevar a cabo una síntesis química de una secuencia génica degenerada en un sintetizador automático de ADN, y se liga luego al gen sintético dentro de un vector de expresión apropiado. El uso de un conjunto degenerado de genes permite la provisión, en una mezcla, de todas las secuencias que codifican al conjunto deseado de secuencias potenciales de PKSRP. Los métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados son conocidos en el arte (ver, por ejemplo, Narang, S.A., 1983 Tetrahedron 39: 3; Itakura y colaboradores, 1984 Annu. Rev. Biochem. 53: 323; Itakura y colaboradores, 1984 Science 198: 1056; Ike y colaboradores, 1983 Nucleic Acid Res. 11: 477.

Además, se pueden utilizar las bibliotecas de fragmentos de la codificación de PKSRP para generar una población heterogénea de fragmentos de PKSRP para identificación y posterior selección de homólogos de una PKSRP. En una modalidad, se puede generar una biblioteca de fragmentos de secuencias de codificación tratando un fragmento bicatenario de PCR de una secuencia que codifica para PKSRP con una nucleasa bajo condiciones en donde ocurre mellado aproximadamente únicamente una vez por molécula, desnaturalizando al ADN bicatenario, renaturalizando al ADN para formar ADN bicatenario que puede incluir pares sentido/antisentido de diferentes productos mellados, removiendo porciones monocatenarias de híbridos reformados por tratamiento con nucleasa S1, y ligando la biblioteca del fragmento resultante dentro de un vector de expresión. Por medio de este método, se puede derivar una biblioteca de expresión que codifica fragmentos N-terminales, C-terminales e internos de diferentes tamaños de la PKSRP.

Se conocen varias técnicas en el arte para seleccionar productos génicos de bibliotecas de combinación elaboradas por medio de mutaciones o truncamientos puntuales, y por selección de bibliotecas de ADNc para productos génicos que tienen una característica seleccionada. Tales técnicas son adaptables para selección rápida de las bibliotecas génicas generadas por medio de mutagénesis de combinación de homólogos de PKSRP. Las técnicas más ampliamente utilizadas, que son sensibles a un análisis rápido, para selección de bibliotecas génicas grandes, típicamente incluyen la clonación de la biblioteca génica dentro de vectores de expresión replicables, transformando células apropiadas con la biblioteca resultante de los vectores, y expresando los genes de combinación bajo condiciones en las cuales la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica al gen cuyo producto fue detectado. Se puede utilizar la mutagénesis de ensamble recursivo (REM), una nueva técnica que incrementa la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, en combinación con los ensayos de selección para identificar para identificar homólogos de PKSRP (Arkin y Yourvan, 1992 PNAS 89: 7811 - 7815; Delgrave y colaboradores, 1993 Protein Engineering 6(3): 327 - 331). En otra modalidad, se puede sacar provecho de los ensayos basados en células para analizar una biblioteca heterogénea de PKSRP, utilizando métodos conocidos en el arte. La presente invención provee además un método de identificación de una nueva proteína para transporte activo de potasio (AKT), que incluye (a) el surgimiento de una respuesta específica de anticuerpo para una AKT, o fragmento de la misma, como se describe más arriba; (b) seleccionar material putativo de AKT con el anticuerpo, en donde el enlazamiento específico del material putativo de selección con el anticuerpo, en donde el enlazamiento específico del anticuerpo con el material indica la presencia de una AKT potencialmente nueva, y (c) el análisis del material enlazado en comparación con AKT conocida para determinar su novedad.

Las moléculas de ácido nucleico, las proteínas, los homólogos de proteínas, las proteínas de fusión, los iniciadores, los vectores, y las células huésped descritas aquí pueden ser utilizados en un o más de los siguientes métodos: identificación de *Physcomitrella patens* y de organismos relacionados; mapeo de genomas de organismos relacionados con *Physcomitrella patens*; identificación y localización de secuencias de interés de *Physcomitrella patens*; estudios evolutivos; determinación de regiones de PKSRP requeridas para cada función; modulación de una actividad de PKSRP; modulación del metabolismo de una o más funciones celulares; modulación del transporte transmembrana de uno o más compuestos; y modulación de resistencia al estrés.

La *Physcomitrella patens* de musgo representa un miembro de los musgos. Está relacionada con otros musgos tales como *Ceratodon purpureus* que es capaz de crecer en ausencia de luz. Los musgos tipo *Ceratodon* y *Physcomitrella* comparten un alto grado de homología sobre la secuencia de ADN y el nivel de péptido permitiendo el uso de selección heteróloga de moléculas de ADN con sondas que evolucionan de otros musgos u organismos, permitiendo así la derivación de una secuencia de consenso adecuada para selección heteróloga o para anotación funcional y predicción de las funciones génicas en terceras especies. La habilidad para identificar tales funciones puede tener por lo tanto una relevancia significativa, por ejemplo, en la predicción de especificidad del sustrato de las enzimas.

Además, estas moléculas de ácido nucleico pueden servir como puntos de referencia para el mapeo de genomas de musgo, o de genomas de organismos relacionados.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican para PKSRP de la invención tienen una variedad de usos. Mucho más importante, las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de la presente invención pueden ser utilizadas para transformar plantas, induciendo por lo tanto la tolerancia a estrés por sequía. La presente invención provee por lo tanto una planta transgénica transformada por medio de un ácido nucleico que codifica para PKSRP como se define en las reivindicaciones, en donde la expresión de la secuencia de ácido nucleico en la planta resulta en una mayor tolerancia al estrés por sequía en comparación con una variedad de tipo silvestre de la planta. La planta transgénica puede ser una monocotiledónea o una dicotiledónea. La invención establece además que la planta transgénica se puede seleccionar entre maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, soja, cacahuete, algodón, colza, canola, casabe, pimienta, girasol, tagetes, plantas solanáceas, patata, tabaco, berenjena, tomate, especie *Vicia*, guisante, alfalfa, café, cacao, especie *Salix*, palma aceitera, coco, hierbas perennes y cultivos de forraje, por ejemplo. En particular, la presente invención describe el uso de la expresión de PK - 1 (SEQ ID NO: 7), PK - 2 (SEQ ID NO: 8) y MPK - 1 (SEQ ID NO: 9) para modificar por ingeniería genética a las plantas intolerantes a la sequía. Esta estrategia ha sido demostrada aquí para *Arabidopsis thaliana*, Colza/Canola, sojas, maíz y trigo pero su aplicación no está restringida a estas plantas. Por lo tanto, la invención provee una planta transgénica que contiene una PKSRP seleccionada entre 1) PK - 1; 2) PK - 2; 3) PK - 3 como se definió anteriormente, en donde el estrés ambiental es sequía. Se describe también el principio de uso de la sobreexpresión de PK - 2 (SEQ ID NO: 8) y MPK - 1 (SEQ ID NO: 9) para modificar por ingeniería genética las plantas tolerantes a la sal. Nuevamente, esta estrategia ha sido demostrada aquí para *Arabidopsis thaliana*, Colza/Canola, sojas, maíz y trigo pero su aplicación no está restringida a estas plantas. Por lo tanto, la invención provee una planta transgénica que contiene a la PKSRP seleccionada entre 1) PK - 2 y 2) PK - 3 como se definió anteriormente, en donde el estrés ambiental es salinidad.

La presente invención también provee métodos para modificar la tolerancia al estrés de una planta que comprenden, modificar la expresión de una PKSRP en la planta. La invención establece que este método se puede realizar de tal manera que se incremente o se disminuya la tolerancia a la sequía.

Además, este método puede ser utilizado en donde la planta es o bien transgénica o no transgénica. En los casos en donde la planta es transgénica, la planta puede ser transformada con un vector que contiene a cualquiera de los ácido nucleicos que codifican para PKSRP descritos anteriormente, o la planta puede ser transformada con un promotor que dirige la expresión de la PKSRP nativa en la planta, por ejemplo. La invención establece que tal promotor puede ser específico del tejido. Además, tal promotor puede ser regulado desde el punto de vista del desarrollo. Alternativamente, las plantas no transgénicas pueden tener expresión de PKSRP nativa modificada por medio de la inducción de un promotor nativo. Además, la invención establece que la expresión de la PKSRP puede ser modificada por medio de la administración de una molécula antisentido que inhibe la expresión de PKSRP.

La expresión de PK - 1 (SEQ ID NO: 7), PK - 2 (SEQ ID NO: 8) y MPK - 1 (SEQ ID NO: 9) en plantas objetivo se puede lograr por medio de, pero no se limita a, uno de los siguientes ejemplos: la sobreexpresión de (a) un promotor constitutivo, (b) un promotor inducible por estrés, (c) un promotor inducido químicamente, y (d) un promotor modificado por ingeniería genética por ejemplo con factores de transcripción derivados de un dedo de zinc (Greisman y Pabo, 1997, Science 275: 657). El último caso involucra la identificación de los homólogos de PK - 1 (SEQ ID NO: 7), PK - 2 (SEQ ID NO: 8) y MPK - 1 (SEQ ID NO: 9) en la planta objetivo así como de su promotor. Los factores de transcripción recombinante que contienen un dedo de zinc son modificados por ingeniería genética para interactuar específicamente con el homólogo de PK - 1 (SEQ ID NO: 7), PK - 2 (SEQ ID NO: 8) y MPK - 1 (SEQ ID NO: 9) y se activa la transcripción del gen correspondiente.

Como se muestra aquí y se describe con más detalle más abajo, la expresión de las PKSRP (PK - 1 (SEQ ID NO: 7), PK - 2 (SEQ ID NO: 8) y MPK - 1 (SEQ ID NO: 9)) en *Arabidopsis thaliana* le confiere a la planta un alto grado de tolerancia a la sequía. Adicionalmente, varias PKSRP le confieren tolerancia a altas concentraciones de sal (PK - 2 (SEQ ID NO: 8) y MPK - 1 (SEQ ID NO: 9)) a esta planta.

Además de la introducción de las secuencias de ácido nucleico que codifican para PKSRP dentro de plantas transgénicas, estas secuencias pueden ser utilizadas también para identificar que un organismo es *Physcomitrella patens* o un familiar cercano de la misma. También, pueden ser utilizadas para identificar la presencia de *Physcomitrella patens* o un familiar de la misma en una población mezclada de microorganismos. La invención provee las secuencias de ácido nucleico de una cantidad de genes de *Physcomitrella patens*; examinando a fondo el ADN genómico extraído de un cultivo de una población única o mezclada de microorganismos bajo condiciones restrictivas con una sonda que abarca a una región de un gen de *Physcomitrella patens* que es único para este organismo, uno puede evaluar si este organismo está presente.

Además, las moléculas de ácido nucleico y de proteína de la invención pueden servir como marcadores para regiones específicas del genoma. Esto tiene utilidad no solamente en el mapeo del genoma, sino también en estudios funcionales de proteínas de *Physcomitrella patens*. Por ejemplo, para identificar la región del genoma a la cual se enlaza una proteína particular de enlazamiento de ADN de *Physcomitrella patens*, se podría digerir el genoma de *Physcomitrella patens*, e incubar los fragmentos con la proteína de enlazamiento de ADN. Aquellas que se enlazan a la proteína pueden ser adicionalmente examinadas a fondo con las moléculas de ácido nucleico de la invención, preferiblemente con marcadores fácilmente detectables; el enlazamiento de tal molécula de ácido nucleico al fragmento de

genoma permite la localización del fragmento en el mapa del genoma de *Physcomitrella patens*, y, cuando se lleva a cabo varias veces con diferentes enzimas, facilita una determinación rápida de la secuencia de ácido nucleico a la cual se enlaza la proteína. Además, las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden ser suficientemente homólogas con las secuencias de las especies relacionadas de tal manera que estas moléculas de ácido nucleico puedan servir como marcadores para la construcción de un mapa genómico en musgos relacionados.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican para PKSRP de la invención también son útiles para estudios estructurales evolutivos y de la proteína. Los procesos metabólicos y de transporte en los cuales participan las moléculas de la invención son utilizados por medio de una gran variedad de células procariotas y eucariotas; comparando las secuencias de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención con aquellas que codifican enzimas similares de otros organismos, se puede evaluar la relevancia evolutiva de los organismos. En forma similar, tal comparación permite una evaluación sobre que regiones de la secuencia están conservadas y cuales no, lo cual puede ayudar en la determinación de aquellas regiones de la proteína que son esenciales para el funcionamiento de la enzima. Este tipo de determinación es valiosa para los estudios de ingeniería de la proteína y pueden dar una indicación de lo que la proteína puede tolerar en términos de mutagénesis sin perder la función.

La manipulación de las moléculas de ácido nucleico que codifican para PKSRP de la invención puede resultar en la producción de las PKSRP que tienen diferencias funcionales con las PKSRP de tipo silvestre. Estas proteínas pueden ser mejoradas en eficiencia o en actividad, pueden estar presentes en mayor cantidad que lo usual en la célula, o pueden disminuir en eficiencia o en actividad. Existen una cantidad de mecanismos por medio de los cuales la alteración de una PKSRP de la invención puede afectar directamente la respuesta al estrés y/o la tolerancia al estrés. En el caso de plantas que expresan a las PKSRP, un mayor transporte puede conducir a una partición mejorada de sal y/o de soluto dentro del tejido y de los órganos de la planta. Incrementado ya sea el número o la actividad de las moléculas transportadoras que exportan moléculas iónicas de la célula, puede ser posible afectar la tolerancia a la sal de la célula.

El efecto de la modificación genética en plantas, *C. glutamicum*, hongos, algas, o ciliados sobre la tolerancia al estrés puede ser evaluado cultivando los microorganismos modificados o la planta bajo condiciones menos adecuadas y luego analizando las características de crecimiento y/o el metabolismo de la planta. Tales técnicas de análisis son bien conocidas por alguien capacitado en el arte, e incluyen síntesis de proteínas en peso seco, en peso húmedo, síntesis de carbohidratos, síntesis de lípidos, tasas de evapotranspiración, rendimiento general de la planta y/o del cultivo, floración, reproducción, colocación de la semilla, crecimiento de la raíz, tasas de respiración, tasas de fotosíntesis, etc. (Applications of HPLC in Biochemistry en: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol. 17; Rehm y colaboradores, 1993 Biotechnology, vol. 3, Capítulo III: Product recovery and purification, páginas 469 - 714, VCH: Weinheim; Belter, P. A. y colaboradores, 1988 Bioseparations: downstream processing for biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy, J. F. y Cabral, J. M. S., 1992 Recovery processes for biological materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J. A. y Henry, J. D., 1988 Biochemical separations, en: Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, vol. B3, Capítulo 11, páginas 1 - 27, VCH: Weinheim y Dechow, F. J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).

Por ejemplo, los vectores de expresión de levadura que incluyen a los ácidos nucleicos divulgados allí, o fragmentos de los mismos, pueden ser contruidos y transformados dentro de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando protocolos estándar. Las células transgénicas resultantes se pueden evaluar entonces por fallas o alteraciones de su tolerancia al estrés por sequía, por sal y por temperatura. En forma similar, se pueden construir vectores de expresión de plantas que incluyen a los ácidos nucleicos divulgados allí, o fragmentos de los mismos, y transformarlos dentro de una célula de una planta apropiada tal como *Arabidopsis*, soja, colza, maíz, trigo, *Medicago truncatula*, etc., utilizando protocolos estándar. Las células transgénicas resultantes y/o las plantas derivadas de ellas se pueden evaluar entonces por la falla o alteración de su tolerancia al estrés por sequía, por sal, y por temperatura.

La modificación por ingeniería genética de uno o más de los genes que codifican para PKSRP de la invención puede resultar también en las PKSRP que tienen actividades alteradas que impactan indirectamente la respuesta al estrés y/o la tolerancia al estrés de algas, plantas, ciliados u hongos, u otros microorganismos como *C. glutamicum*. Por ejemplo, el proceso bioquímico normal del metabolismo resulta en la producción de una variedad de productos (por ejemplo, peróxido de hidrógeno y otras especies con oxígeno reactivo) que pueden interferir activamente con estos mismos procesos metabólicos (por ejemplo, se sabe que el peroxinitrito ntra las cadenas laterales de tirosina), inactivando así a algunas enzimas que tienen tirosina en el sitio activo (Groves, J. T., 1999 Curr. Opin. Chem. Biol. 3(2): 226 - 235). Mientras que estos productos son excretados típicamente, se pueden alterar genéticamente células para transportar más productos de los que son típicos para la célula tipo silvestre. Por medio de la optimización de la actividad de una o más de las PKSRP de la invención que están involucradas en la exportación de moléculas específicas, tal como moléculas de sal, puede ser posible mejorar la tolerancia al estrés de la célula.

Adicionalmente, la secuencia divulgada aquí, o los fragmentos de la misma, pueden ser utilizados para generar mutaciones desactivadas en los genomas de diferentes organismos, tales como bacterias, células de mamífero, células de levadura, y células de plantas (Girke, T., 1998 The Plant Journal 15: 39 - 48). Las células desactivadas resultantes pueden ser luego evaluadas por su habilidad o capacidad para tolerar diferentes condiciones de estrés, su respuesta a diferentes condiciones de estrés, y el efecto sobre el fenotipo y/o el genotipo de la mutación. Para otros métodos de inactivación genética incluir la patente estadounidense No. 6.004.804 "Non-Chimeric Mutational Vectors" y Puttaraju y colaboradores, 1999 Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy Nature Biotechnology 17: 246 - 252.

Las estrategias de mutagénesis anteriormente mencionadas para las PKSRP que resulta en una mayor resistencia al estrés no se pretendan que sean limitantes; las variaciones sobre estas estrategias serán fácilmente evidentes para alguien capacitado en el arte. Utilizando tales estrategias, e incorporando los mecanismos divulgados aquí, se pueden utilizar las moléculas de ácido nucleico y de proteína de la invención para generar algas, ciliados, plantas, hongos u otros microorganismos como el *C. glutamicum* que expresan moléculas mutadas de proteína y de ácido nucleico que codifica para PKSRP de tal manera que se mejora la tolerancia al estrés.

La presente invención también provee anticuerpos que se enlazan específicamente a un polipéptido de PKSRP, o a una porción de la misma, como la codificada por un ácido nucleico como el divulgado aquí o como el descrito aquí. Los anticuerpos se pueden elaborar por medio de muchos métodos conocidos. (Ver, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies; A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, (1988)). En resumen, se puede inyectar antígeno purificado dentro de un animal en una cantidad y en intervalos suficientes para producir una respuesta inmune. Los anticuerpos pueden ser o bien purificados directamente, o se pueden obtener células de bazo del animal. Se pueden fusionar luego las células con una línea de células inmortales y seleccionadas para secreción de anticuerpo. Se pueden utilizar los anticuerpos para seleccionar bibliotecas de clones de ácido nucleico para células que segregan el antígeno. Se pueden secuenciar luego aquellos clones positivos. (Ver, por ejemplo, Kelly y colaboradores, 1992 Bio/Technology 10: 163 - 167; Bebbington y colaboradores, 1992 Bio/Technology 10: 169 - 175).

Las frases "se enlaza selectivamente" y "se enlaza específicamente" con el polipéptido se refieren a una reacción de enlazamiento que es determinativa de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros compuestos biológicos. De este modo, bajo condiciones designadas de inmunoensayo, los anticuerpos especificados enlazados a una proteína particular no se enlazan en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. El enlazamiento selectivo a un anticuerpo bajo tales condiciones puede requerir de un anticuerpo que es seleccionado por su especificidad para una proteína particular. Se pueden utilizar una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos que se enlazan selectivamente con una proteína particular. Por ejemplo, se utilizan rutinariamente inmunoensayos de ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos selectivamente inmunoreactivos con una proteína. Ver Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Publications, New York, (1988), para una descripción de los formatos de inmunoensayo y de las condiciones que podrían ser utilizadas para determinar el enlazamiento selectivo.

En algunos casos, es deseable preparar anticuerpos monoclonales de diferentes huéspedes. Se puede encontrar una descripción de técnicas para la preparación de tales anticuerpos monoclonales en Stites y colaboradores, editors, "Basic and Clinical Immunology," (Lange Medical Publications, Los Altos, Calif., Fourth Edition) y las referencias citadas allí, y en Harlow y Lane ("Antibodies, A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Publications, New York, 1988).

A lo largo de toda esta solicitud se referencian diferentes publicaciones. La descripción de todas estas publicaciones y de aquellas referencias citadas dentro de esas publicaciones se incorpora aquí en su totalidad como referencia dentro de esta solicitud con el propósito de describir más completamente el estado del arte al cual pertenece esta invención.

Se debe entender también que lo anterior se relaciona con modalidades preferidas de la presente invención y que se pueden hacer numerosos cambios allí dentro sin apartarse del alcance de la invención. La invención se ilustra adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos, que no pretenden constituirse de ninguna manera en limitaciones obligatorias del alcance de la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1

Desarrollo de cultivos de *Physcomitrella patens*

Para este estudio, se utilizaron plantas de la especie *Physcomitrella patens* (Hedw.) B. S. G. de la colección de la sección de estudios genéticos de la Universidad de Hamburgo. Ellas se originaron a partir de la cepa 16/14 recolectada por H. L. K. Whitehouse en Gransden Wood, Huntingdonshire (Inglaterra), la cual fue subcultivada a partir de una espora por Engel (1968, Am. J. Bot. 55, 438 - 446). La proliferación de las plantas se realizó por medio de esporas y por medio de regeneración de los gametofitos. El protonema desarrollado a partir de la espora haploide como un cloronema rico en cloroplastos y un caulonema rico en cloroplastos, sobre el cual se formaron brotes aproximadamente después de 12 días. Estos crecieron para producir gametóforos que soportaban anteridio y arquegonio. Después de fertilización, resultaron el esporofito diploide con una seta corta y la cápsula de espора, en los cuales maduraron las meiosporas.

El cultivo se realizó en una cámara climática a una temperatura del aire de 25°C y una intensidad de luz de 55 micromols⁻¹m² (luz blanca; tubo fluorescente Philips TL de 65W/25) y un cambio luz/oscuridad de 16/8 horas. El musgo fue modificado también en medio de cultivo líquido utilizando medio Knop de acuerdo a Reski y Abel (1985, Planta 165: 354 - 358) o fue cultivado sobre medio sólido Knop utilizando agar Oxoid al 1% (Unipath, Basingstoke, Inglaterra). Se cultivaron los protonemas utilizados para el aislamiento de ARN y ADN en cultivos líquidos aireados. Los protonemas fueron desmenuzados cada 9 días y transferidos a medio de cultivo fresco.

ES 2 316 400 T3

Ejemplo 2

Aislamiento del ADN total de las plantas

- 5 Los detalles para el aislamiento del ADN total se relacionan con la elaboración de un gramo de peso fresco del material de la planta. Los materiales utilizados incluyen los siguientes amortiguadores: amortiguador CTAB: bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetilamonio al 2% (p/v) (CTAB); Tris HCl 100 mM pH 8,0; NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM; amortiguador N-Laurilsarcosina: N-laurilsarcosina al 10% (p/v); Tris HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 20 mM.
- 10 Se trituró el material de la planta bajo nitrógeno líquido en un mortero para producir un polvo fino y se lo transfirió a recipientes Eppendorf de 2 ml. Se cubrió luego el material congelado de la planta con una capa de 1 ml de amortiguador de descomposición (1 ml de amortiguador CTAB, 100 μ l de amortiguador N-laurilsarcosina, 20 μ l de β -mercaptoetanol y 10 μ l de solución de proteinasa K, 10 mg/ml) y se lo incubó a 60°C durante una hora con agitación continua. El homogenato obtenido fue distribuido en dos recipientes Eppendorf (2 ml) y se extrajo dos veces por medio de
- 15 agitación con el mismo volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Para la separación de fases, se llevó a cabo una centrifugación a 8000 x g y a temperatura ambiente durante 15 minutos en cada caso. Se precipitó luego el ADN a -70°C durante 30 min utilizando isopropanol enfriado sobre hielo. El ADN precipitado fue sedimentado a 4°C y 10.000 g durante 30 minutos y resuspendido en 180 μ l del amortiguador TE (Sambrook y colaboradores, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6). Para purificación adicional, se trató el ADN con NaCl (concentración final 1,2 M) y se precipitó nuevamente a -70°C durante 30 minutos utilizando dos veces el volumen de etanol absoluto. Después de una etapa de lavado con etanol al 70%, se secó el ADN y posteriormente se lo recogió en 50 μ l de H₂O + ARNasa (concentración final 50 mg/ml). Se disolvió el ADN durante la noche a 4°C y se llevó a cabo posteriormente la digestión con la ARNasa a 37°C durante 1 hora. El almacenamiento del ADN tuvo lugar a 4°C.

25 Ejemplo 3

Aislamiento del ARN total y construcción de la biblioteca de ADNc y de ARN de poli-(A)⁺ de Physcomitrella patens

- 30 Para la investigación de los transcriptos, se aislaron tanto el ARN total como el ARN de poly-(A)⁺. Se obtuvo el ARN total de protonemas de tipo silvestre de 9 días de edad siguiendo el método GTC (Reski y colaboradores 1994, Mol. Gen. Genet., 244: 352 - 359). Se aisló el ARN de Poli(A)⁺ utilizando Dyna BeadsR (Dyna, Oslo, Noruega) siguiendo las instrucciones del protocolo de los fabricantes. Después de la determinación de la concentración del ARN o del ARN de poli(A)⁺, se precipitó el ARN por medio de la adición de 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M
- 35 pH 4,6 y 2 volúmenes de etanol y se almacenó a -70°C.

- Para la construcción de la biblioteca de ADNc, se logró la síntesis de la primera hebra utilizando transcriptasa inversa del Virus de Leucemia de Múrido (Roche, Mannheim, Alemania) y oligo-d(T)-iniciadores, la síntesis de la segunda hebra por medio de incubación con ADN polimerasa I, enzima Klenow y digestión con ARNasaH a 12°C
- 40 (2 horas), 16°C (1 hora) y 22°C (1 hora). Se detuvo la reacción por medio de incubación a 65°C (10 minutos) y posteriormente se transfirió sobre hielo. Se embotaron las moléculas de ADN bicatenario por medio de la T4-ADN-polimerasa (Roche, Mannheim) a 37°C (30 minutos). Se removieron los nucleótidos por medio de extracción con fenol/cloroformo y columnas espín G50 de Sefadex. Se ligaron adaptadores de EcoRI (Farmacia, Friburgo, Alemania) a los extremos del ADNc por medio de T4-ADN-ligasa (Roche, 12°C, durante la noche) y se fosforiló por medio
- 45 de incubación con polinucleótido quinasa (Roche, 37°C, 30 minutos). Se sometió esta mezcla a separación sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión. Se eluyeron del gel las moléculas de ADN mayores de 300 pares de bases, se extrajo con fenol, se concentró sobre columnas Elutip-D (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) y se las ligó a los brazos del vector y se las empacó en fagos lambda ZAPII o en fagos lambda ZAPExpress utilizando el Kit Gigapack Gold (Stratagene, Ámsterdam, Holanda) utilizando material y siguiendo las instrucciones del fabricante.
- 50

Ejemplo 4

Secuenciación y anotación de la función de los EST de Physcomitrella patens

- 55 Se utilizaron bibliotecas de ADNc como las descritas en el Ejemplo 3 para la secuenciación del ADN de acuerdo con métodos estándar, y en particular, por medio del método de terminación de la cadena utilizando el Kit ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer, Weiterstadt, Alemania). Se llevó a cabo una secuenciación aleatoria posterior a la recuperación preparativa del plásmido de las bibliotecas de ADNc a través del
- 60 corte de masa *in vivo*, nueva transformación, y posterior siembra en placa de DH10B sobre palcas de agar (material y detalles del protocolo de Stratagene, Ámsterdam, Holanda). Se preparó ADN de plásmido a partir de cultivos de *E. coli* que se desarrollaron durante la noche cultivados en medio de Caldo Luria que contiene ampicilina (ver Sambrook y colaboradores, 1989 Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) sobre un robot de una preparación de ADN de Qiagene (Qiagen, Hilden) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Se utilizaron los iniciadores de
- 65 secuenciación con las siguientes secuencias de nucleótidos:

ES 2 316 400 T3

5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3' SEQ ID NO: 10

5'-CTAAAGGGAACAAAAGCTG-3' SEQ ID NO: 11

5'-TGTAACACGACGGCCAGT-3' SEQ ID NO: 12

Se procesaron y anotaron las secuencias utilizando el paquete de software EST-MAX suministrado comercialmente por Bio-Max (Múnich, Alemania). El programa incorpora prácticamente todos los métodos bioinformáticos importantes para la caracterización funcional y estructural de secuencias de proteína. Para referencia, el sitio web en pedant.mips.biochem.mpg.de. Los algoritmos más importantes incorporados en EST-MAX son: FASTA: Búsquedas muy sensibles en bases de datos de secuencia con estimados de significancia estadística; Pearson W. R. (1990) Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol.* 183: 63 - 98; BLAST: Búsquedas muy sensibles en bases de datos de secuencia con estimados de significancia estadística. Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., y Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403 - 10; PREDATOR: Predicción muy precisa de la estructura secundaria de secuencias múltiples e individuales. Frishman, D. y Argos, P. (1997) Precisión del 75% en la predicción de la estructura secundaria de la proteína. *Proteins*, 27: 329 - 335; CLUSTALW: Alineación múltiple de secuencia. Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: mejorando la sensibilidad de la alineación progresiva de secuencias múltiples a través de ponderación de la secuencia, penalizaciones de vacíos en posiciones específicas y escogencia del peso de la matriz. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673 - 4680; TMAP: Predicción de la región transmembrana a partir de la multiplicación de las secuencias alineadas. Persson, B. y Argos, P. (1994) Prediction of transmembrane segments in proteins utilizing multiple sequence alignments. *J. Mol. Biol.* 237: 182 - 192; ALOM2: Predicción de la región transmembrana a partir de secuencias individuales. Klein, P., Kanehisa, M., y DeLisi, C. Prediction of protein function from sequence properties: A discriminate analysis of a database. *Biochim. Biophys. Acta* 787: 221 - 226 (1984). Versión 2 por el Dr. K. Nakai; PROSEARCH: Detección de los patronews de secuencia de la proteína PROSTTE. Kolkowski L. F. Jr., Leunissen J. A. M., Smith J. E. (1992) ProSearch: fast searching of protein sequences with regular expression patterns related to protein structure and function. *Biotechniques* 13, 919 - 921; BLIMPS: Búsqueda de similitudes contra una base de datos de bloques sin vacíos. J. C. Wallace y Henikoff S., (1992); PATMAT: A searching and extraction program for sequence, pattern and block queries and databases, *CABIOS* 8: 249 - 254. Escrito por Bill Alford.

Ejemplo 5

Identificación del ORF de *Physcomitrella patens* correspondiente a PpPK-1, PpPK-2 y PpMPK-1

Se identificó el ADNc parcial de *Physcomitrella patens* (las EST) mostrado en la Tabla 1 más abajo en el programa de secuenciación EST de *Physcomitrella patens* utilizando el programa EST-MAX a través del análisis BLAST. (Las Tablas 2 - 4 muestran algunos de los resultados). Los Números de Identificación de la Secuencia correspondiente a estas EST son los siguientes: PpPK - 1 (SEQ ID NO: 1); PpPK - 2 (SEQ ID NO: 2) y PpMPK - 1 (SEQ ID NO: 3). Estos clones particulares fueron escogidos para análisis adicionales ya que ellos codifican para proteínas quinasas.

TABLA 1

Categoría Funcional	Función	Código de Secuencia	Posición del ORF	Nombre
Proteína Quinasa	MAP quinasa	S_pp004047334r	1-560	PpMPK-1
	proteína quinasa de serina/treonina	s_pp004012036r	1-467	PpPK-2
	serina/treonina quinasa	s_pp004005088r	1-324	PpK-1

ES 2 316 400 T3

TABLA 2

Grado de Identidad y Similitud de los Aminoácidos de PpPK-1 y de Otras Proteínas Homólogas (se utilizó el programa GCG Gap: penalización por vacío: 10; penalización por extensión del vacío: 0,1; matriz de la puntuación: blosum62).					
Swiss-Prot #	024342	Q9ZVD9	Q9MAM1	Q9LDI3	Q9LKC9
Nombre de la proteína	Serina/Treonina Quinasa	Proteína quinasa putativa de Serina/Trionina	T25K16.13	Proteína quinasa de Serina/Trionina SOS2	Proteína quinasa 3 que interactúa con CBL
Especie	<i>Sorghum bicolor</i> (Sorgo)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (berro oreja de ratón)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (berro oreja de ratón)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (berro oreja de ratón)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (berro oreja de ratón)
% de identidad	66%	62%	64%	55%	55%
% de similitud	78%	76%	75%	69%	67%

TABLA 3

Grado de Identidad y Similitud de los Aminoácidos de PpPK-2 y de Otras Proteínas Homólogas (se utilizó el programa GCG Gap: penalización por vacío: 10; penalización por extensión del vacío: 0,1; matriz de la puntuación: blosum62).					
Swiss-Prot #	Q9LZ05	Q9LZ96	Q9LJU5	P43293	004245
Nombre de la proteína	Tipo proteína quinasa	Proteína quinasa NAK específica de Serina/Trionina	Proteína tipo proteína quinasa receptora	Proteína quinasa NAK probable de Serina/Trionina	Proteína quinasa de Ser/Thr tipo NAK putativa
Especie	<i>Arabidopsis thaliana</i> (berro oreja de ratón)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (berro oreja de ratón)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (berro oreja de ratón)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (berro oreja de ratón)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (berro oreja de ratón)
% de identidad	32%	32%	32%	32%	28%
% de similitud	43%	41%	41%	41%	35%

ES 2 316 400 T3

TABLA 4

Grado de Identidad y Similitud de los Aminoácidos de PpMPK-1 y de Otras Proteínas Homólogas (se utilizó el programa GCG Gap: penalización por vacío: 10; penalización por extensión del vacío: 0,1; matriz de la puntuación: blosum62).					
Swiss-Prot #	Q06060	Q39024	Q40532	Q9M136	Q9M534
Nombre de la proteína	Homólogo D5 de proteína quinasa activada por mitógeno	Homólogo 4 de proteína quinasa activada por mitógeno	Homólogo NTF4 de proteína quinasa activada por mitógeno	MAP quinasa 4	Proteína quinasa activada por mitógeno
Especie	<i>Pisum sativum</i> (Guisante de jardín)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (berro oreja de ratón)	<i>Nicotiana tabacum</i> (Tabaco común)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (berro oreja de ratón)	<i>Euphorbia esula</i> (Lechetezina)
% de identidad	45%	45%	44%	45%	44%
% de similitud	53%	52%	53%	52%	53%

Ejemplo 6

Clonación del ADNc de longitud completa de *Physcomitrella patens* que codifica para PpPK-1, PpPK-2 y PpMPK-1

Para aislar los clones que codifican para PpPK-1, PpPK-2 y PpMPK-1 de *Physcomitrella patens*, se crearon bibliotecas de ADNc con un kit de Amplificación de ADNc de SMART RACE (Clontech Laboratories) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó el ARN total aislado como se describe en el Ejemplo 3 como el molde. Los oligos diseñados para RACE se muestran en la Tabla 2. Se trataron los cultivos antes del aislamiento del ARN de la siguiente manera: Estrés por Sal: 2, 6, 12, 24, 48 h con medio suplementado con NaCl 1M; Estrés por Frío: 4°C para los mismos períodos de tiempo que para la sal; Estrés por Sequía: se incubaron los cultivos sobre papel de filtro seco durante los mismos períodos de tiempo anteriores.

TABLA 5

Esquema e iniciadores utilizados para clonación de clones de longitud completa				
Gen	Sitios finales en el producto	Método de aislamiento	Iniciadores para Race	Iniciador para RT-PCR
PpPK-1	XmaI/SacI	5' RACE y RT-PCR para clon de Longitud completa	RC077 (SEQ ID NO: 13) 5'CCGGGCTCCTGAC GAGAACCAAGGA	RC096 (SEQ ID NO: 14) 5'ATCCCGGGCGTTC AAGCAGGTGAATAT GACAAC RC097 (SEQ ID NO: 15) 3'ATGAGCTCGGGCA CTTCACAGCACGGG CATAT

TABLA 5 (continuación)

Esquema e iniciadores utilizados para clonación de clones de longitud completa				
Gen	Sitios finales en el producto	Método de aislamiento	Iniciadores para Race	Iniciador para RT-PCR
PpPK-2	XmaI/HpaI	5' RACE y RT-PCR para clon de Longitud completa	RC051 (SEQ ID NO: 15) 5'GCCCCCTTCGCCG ACTACATTATCA3'	RC156 (SEQ ID NO: 16) 5'ATCCCGGGCGCGC ACAATTTTCAGTTGG GAATCA RC157 (SEQ ID NO: 17) 5'GCGTTAACGCCCCG CAAAGGTCAAAACA GGCGTGG
PpMPK-1	XmaI/HpaI	5' RACE y RT-PCR para clon de Longitud completa	RC074 (SEQ ID NO: 18) 5'GCCGCTGTGTACA TTCGGCTCCCAAG	RC100 (SEQ ID NO: 19) 5'ATCCCGGGCGGTT TGGACACGATGTTT CAGTCC RC101 (SEQ ID NO: 20) 5'GCGTTAACTAACC GCGTTTAAGTCCCT CAAC

Protocolo de 5' RACE

Las secuencias EST PpPK-1 (SEQ ID NO: 1), PpPK-2 (SEQ ID NO: 2) y PpMPK-1 (SEQ ID NO: 3) identificadas a partir de la búsqueda en la base de datos como se describe en el Ejemplo 4 fueron utilizadas para diseñar oligos para RACE (ver Tabla 5). Las secuencias extendidas para estos genes fueron obtenidas llevando a cabo una Amplificación Rápida de los Extremos del ADNc por reacción en cadena de la polimerasa (RACE PCR) utilizando el kit para PCR Advantage 2 (Clontech Laboratories) y el kit de amplificación del ADNc SMART RACE (Clontech Laboratories) utilizando un Termociclador Biometra T3 siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias obtenidas a partir de las reacciones de RACE correspondieron con las regiones de codificación de longitud completa de PpPK-1, PpPK-2 y PpMPK-1 y se las utilizó para diseñar oligos para clonación de longitud completa de los genes respectivos (ver más abajo amplificación de longitud completa).

Amplificación de Longitud Completa

Se obtuvieron los clones de longitud completa de PpPK-1 (SEQ ID NO: 4), PpPK-2 (SEQ ID NO: 5) y PpMPK-1 (SEQ ID NO: 6) llevando a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores específicos del gen (ver Tabla 5) y la EST original como el molde. Las condiciones para la reacción fueron condiciones estándar con PWO ADN polimerasa (Roche). La PCR se realizó de acuerdo con condiciones estándar y con los protocolos del fabricante (Sambrook y colaboradores, 1989. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, Biometra T3 Thermocycler). Los parámetros para la reacción fueron: cinco minutos a 94°C seguido por cinco ciclos de un minuto a 94°C, un minuto a 50°C y 1,5 minutos a 72°C. Esto fue seguido por veinticinco ciclos de un minuto a 94°C, un minuto a 65°C y 1,5 minutos a 72°C.

Se extrajeron los fragmentos amplificados del gel de agarosa con el kit de Extracción en Gel QIAquick (Qiagen) y ligados dentro del vector TOPO pCR 2.1 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se transformaron los vectores recombinantes dentro de células Top 10 (Invitrogen) utilizando condiciones estándar (Sambrook y colaboradores, 1989. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY). Se seleccionaron las células transformadas sobre agar LB que contenía 100 mg/ml de carbenicilina, 0,8 mg de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosido) y 0,8 mg de IPTG (isopropiltio- β -D-galactosido) que crecieron durante la noche a 37°C. Se seleccionaron las colonias de color blanco y se las utilizó para inocular 3 ml de LB líquido que contenía 100 μ g/ml de ampicilina que crecieron durante la noche a 37°C. Se extrajo el ADN del plásmido utilizando el Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los análisis de clones posteriores y el mapeo de restricción se realizaron de acuerdo con técnicas estándar de biología molecu-

ES 2 316 400 T3

lar (Sambrook y colaboradores, 1989. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY).

Ejemplo 7

Modificación por ingeniería genética de plantas de Arabidopsis tolerantes al estrés por sobreexpresión de los genes PpPK-1, PpPK-2 y PpMPK-1

Construcción del vector binario: pGMSG

Se digirió el vector pLMNC53 (Mankin, 2000, tesis de Doctorado) con HindIII (Roche) y se rellenó el extremo romo con enzima Klenow y los dNTP 0,1 mM (Roche) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se extrajo este fragmento del gel de agarosa con un Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se digirió luego el fragmento purificado con EcoRI (Roche) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se extrajo este fragmento del gel de agarosa con un Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El fragmento resultante de 1,4 kilobases, el casete de gentamicina, incluía al promotor nos, al gen aacCI y al terminador g7.

Se digirió el vector pBlueScript con EcoRI y SmaI (Roche) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se extrajo el fragmento resultante del gel de agarosa gel con un Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se ligaron el vector pBlueScript digerido y los fragmentos del casete de gentamicina con la T4 ADN Ligasa (Roche) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, uniendo los dos sitios EcoRI respectivos y uniendo el extremo romo del sitio HindIII con el sitio SmaI.

Se transformó el vector recombinante (pGMBS) dentro de células Top10 (Invitrogen) utilizando condiciones estándar. Se seleccionaron las células transformadas sobre agar LB que contenía 100 µg/ml de carbenicilina, 0,8 mg de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido) y 0,8 mg de IPTG (isopropiltio-β-D-galactósido), que crecieron durante la noche a 37°C. Se seleccionaron las colonias blancas y se las utilizó para inocular 3 ml de LB líquido que contenía 100 µg/ml de ampicilina y crecieron durante la noche a 37°C. Se extrajo el ADN del plásmido utilizando el Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se llevaron a cabo los análisis de los clones subsiguientes y el mapeo de restricción de acuerdo con técnicas estándar de biología molecular (Sambrook y colaboradores, 1989. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2da Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY).

Se digirieron tanto el vector pGMBS como el vector p1bxSuperGUS con XbaI y KpnI (Roche) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, cortando el casete de gentamicina de pGMBS y produciendo la columna vertebral del vector p1bxSuperGUS. Se extrajeron los fragmentos resultantes del gel de agarosa con un Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se ligaron estos dos fragmentos con la T4 ADN ligasa (Roche) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se transformó el vector recombinante resultante (pGMSG) dentro de células Top10 (Invitrogen) utilizando condiciones estándar. Se seleccionaron las células transformadas sobre agar LB que contenía 100 µg/ml de carbenicilina, 0,8 mg de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido) y 0,8 mg de IPTG (isopropiltio-β-D-galactósido), y crecieron durante la noche a 37°C. Se seleccionaron las colonias blancas y se las utilizó para inocular 3 ml de LB líquido que contenía 100 µg/ml de ampicilina y crecieron durante la noche a 37°C. Se extrajo el ADN del plásmido utilizando el Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se llevaron a cabo los análisis de los clones subsiguientes y el mapeo de restricción de acuerdo con técnicas estándar de biología molecular (Sambrook y colaboradores, 1989. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2da Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY).

Subclonación de PpPK-1, PpPK-2 y PpMPK-1 dentro del vector binario

Se subclonaron los fragmentos que contenían a los diferentes genes como los de la proteína quinasa de *Physcomitrella patens* de los vectores recombinantes PCR2.1 TOPO por medio de digestión doble enzimas de restricción (ver Tabla 6) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se cortó el fragmento subsiguiente del gel de agarosa con un Kit de Extracción QIAquick Gel (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se lo ligó dentro del vector binario pGMSG, se lo escindió con enzimas apropiadas (ver Tabla 6) y se lo desfosforiló antes de la ligación. El vector pGMSG recombinante resultante contenía al correspondiente factor de transcripción en la orientación sentido bajo control del súper promotor constitutivo.

TABLA 6

Nombres de las diferentes construcciones de las proteínas del tipo de la proteína quinasa de <i>Physcomitrella patens</i> utilizadas para la transformación de la planta			
Gen	Enzimas utilizadas para generar el fragmento génico	Enzimas utilizadas para restringir a pGMSG	Construido del Vector Binario
PpPK-1	XmaI/SacI	XmaI/SacI	PBPSLVM004
PpPK-2	XmaI/HpaI	XmaI/Ec1136	PBPSLVM005
PpMPK-1	XmaI/HpaI	XmaI/Ec1136	PBPSLVM006

Transformación de *Agrobacterium*

Se transformaron los vectores recombinantes dentro de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 y PMP90 de acuerdo a condiciones estándar (Hoefgen y Willmitzer, 1990).

Transformación de la Planta

Se cultivaron y transformaron los ecotipos C24 de *Arabidopsis thaliana* de acuerdo a condiciones estándar (Bechtold 1993, Acad. Sci. Paris. 316: 1194 - 1199; Bent y colaboradores, 1994, Science 265: 1856 - 1860).

Selección de las Plantas Transformadas

Se esterilizaron semillas T1 de acuerdo a protocolos estándar (Xiong y colaboradores, 1999, Plant Molecular Biology Reporter 17: 159 - 170). Se sembraron en placa las semillas sobre medio de agar MS al 0,6% agar suplementado con sacarosa al 1%, 150 µg/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich) y 2 µg/ml de benomil (Sigma-Aldrich). Se aceleró el proceso de maduración de las semillas sobre las placas durante 4 días a 4°C. Se germinaron las semillas en una cámara climática a una temperatura del aire de 22°C y una intensidad de luz de 40 micromols⁻¹m² (luz blanca; tubo fluorescente Philips TL de 65W/25) y un ciclo diario repartido entre 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Se seleccionaron las plántulas transformadas después de 14 días y se las transfirió a placas con agar MS al 0,6% agar suplementado con sacarosa al 1% y se les permitió recuperarse durante cinco - siete días.

Selección por Tolerancia a la Sequía

Se transfirieron las plántulas T1 a un papel filtro estéril seco en una caja de Petri y se les permitió secarse durante dos horas con una RH del 80% (humedad relativa) en una Cámara de Crecimiento Sanyo MLR-350H, micromols⁻¹m² (luz blanca; tubo fluorescente Philips TL de 65W/25). Se disminuyó luego la RH hasta un 60% y se secaron las plántulas durante ocho horas más. Se removieron luego las plántulas y se las colocó sobre placas con agar MS al 0,6% suplementado con 2 µg/ml de benomil y se contabilizó después de cinco días.

Los resultados de la selección por tolerancia a la sequía en plantas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan a la proteína del tipo de la Proteína Quinasa se muestran en la Tabla 7. Es notable que estos análisis de hubieran llevado a cabo con plantas T1 ya que los resultados deberían ser mejores cuando se encuentra un expresador homocigoto fuerte.

TABLA 7

Resumen de las pruebas de estrés por sequía			
Nombre del Gen	Prueba de Estrés por Sequía		
	Número de sobrevivientes	Número total de plantas	Porcentaje de sobrevivientes
PpPK-1	2	4	50%
PpPK-2	10	12	84%
PpMPK-1	23	25	92%
Control	18	84	21%

Selección por Tolerancia a la Sal

Se transfirieron las plántulas a papel filtro remojado en medio MS y se las colocó sobre medio de agar MS al 0,6% suplementado con 2 $\mu\text{g/ml}$ de benomil la noche anterior a la selección por tolerancia a la sal. Para la selección por tolerancia a la sal, se movió el papel filtro con las plántulas hasta pilas de papel filtro estéril, remojado en NaCl 50 mM, en una caja de Petri. Después de dos horas, se movió el papel filtro con las plántulas hasta pilas de papel filtro estéril, remojadas con NaCl 200 mM, en una caja de Petri. Después de dos horas, se movió el papel filtro con las plántulas hasta pilas de papel filtro estéril, remojadas en NaCl 600 mM, en una caja de Petri. Después de 10 horas, se movieron las plántulas hasta las cajas de Petri que contenían medio agar MS al 0,6% suplementado con 2 $\mu\text{g/ml}$ de benomil. Se contabilizaron las plántulas después de 5 días.

Los resultados de la selección por tolerancia a la sal en plantas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan a las proteínas del tipo de la Proteína Quinasa se muestran en la Tabla 8. Es notable que estos análisis se hubieran realizado con plantas T1 ya que los resultados deberían ser mejores cuando se encuentra un expresador homocigoto fuerte.

TABLA 8

Resumen de las pruebas de estrés por sal			
Nombre del Gen	Prueba de Estrés por Sal		
	Número de sobrevivientes	Número total de plantas	Porcentaje de sobrevivientes
PpPK-2	5	8	62%
PpMPK-1	14	25	56%
Control	4	43	9%

Selección por Tolerancia a la Congelación

Se movieron las plántulas hasta cajas de Petri que contenían agar MS al 0,6% suplementado con sacarosa al 2% y 2 $\mu\text{g/ml}$ de benomil. Después de cuatro días, se incubaron las plántulas a 4°C durante 1 hora y luego se las cubrió con hielo raspado. Se colocaron luego las plántulas en una Cámara Ambiental Environmental Specialist ES2000 y se incubó durante 3,5 horas comenzando a -1,0°C disminuyendo -1°C por hora. Se incubaron luego las plántulas a -5,0°C durante 24 horas y luego se les permitió descongelarse a 5°C durante 12 horas. Se retiró el agua y se contabilizaron las plántulas después de 5 días. Se seleccionan luego las plantas transgénicas por su mayor tolerancia al frío demostrando que la expresión transgénica confiere tolerancia al frío.

Ejemplo 8

Detección de los transgenes PpPK-1, PpPK-2 y PpMPK-1 en las líneas transgénicas de *Arabidopsis*

Se homogenizó una hoja de una planta transgénica y otra de tipo silvestre de *Arabidopsis* en 250 μl de amortiguador de bromuro de hexadeciltrimetil amonio (CTAB) (CTAB al 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 8 mM y Tris 20 mM pH 8,0) y 1 μl de β -mercaptoetanol. Se incubaron las muestras a 60 - 65°C durante 30 minutos y se añadieron luego 250 μl de Cloroformo a cada muestra. Se sometieron las muestras a agitación tipo vórtice durante 3 minutos y se centrifugó durante 5 minutos a 18.000 x g. Se retiró el sobrenadante de cada muestra y se añadieron 150 μl de isopropanol. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 15 minutos, y se centrifugó durante 10 minutos a 18.000 x g. Se lavó cada precipitador con etanol al 70%, se secó, y se resuspendió en 20 μl de TE. Se utilizaron 4 μl de la suspensión anterior en 20 μl de una reacción PCR utilizando una Taq ADN polimerasa (Roche Molecular Bio Chemicals) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se utilizó un plásmido de vector binario que contenía a cada gen STA como control positivo, y se utilizó el ADN genómico C24 de tipo silvestre como control negativo en las reacciones PCR. Se analizaron 10 μl de la reacción PCR sobre gel de agarosa al 0,8% - bromuro de etidio.

Notablemente, se amplificaron exitosamente los transgenes a partir de las líneas transgénicas T1, pero no a partir de C24 de tipo silvestre. Estos resultados indican que las plantas transgénicas T1 contienen al menos una copia de los transgenes. No hubo indicación de la existencia de otra idéntica o muy similar en el control no transformado de *Arabidopsis thaliana* que pudiera ser amplificada por medio de este método.

ES 2 316 400 T3

PpPK-1

Los iniciadores utilizados en las reacciones fueron:

5 5'CTAGTAACATAGATGACACC3' SEQ ID NO: 21

5'ATCCCGGGCGTTCAAGCAGGTGAATATGACAAC3' SEQ ID NO: 22

10 El programa para la PCR fue el siguiente: 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62°C y 4 minutos a 72°C, seguido de 10 minutos a 72°C. Se produjo un fragmento de 1,6 kb a partir del control positivo y las plantas transgénicas.

PpPK-2

15 Los iniciadores utilizados en las reacciones fueron:

5'GAATAGATACGCTGACACGC3' SEQ ID NO: 23

20 5'GCGTTAACGCCCCGCAAAGGTCAAAACAGGCGTGG3' SEQ ID NO: 24

Se utilizaron los iniciadores en la primera vuelta de las reacciones con el siguiente programa: 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62°C y 4 minutos a 72°C, seguido de 10 minutos a 72°C. Luego se amplificó nuevamente 1 µl de la reacción anterior en una reacción de 20 µl utilizando los siguientes iniciadores en el mismo programa:

5'ATCCCGGGCGCGCACAATTTTCAGTTGGGAATCA3' SEQ ID NO: 25

30 5'GCGTTAACGCCCCGCAAAGGTCAAAACAGGCGTGG3' SEQ ID NO: 24

Se generó un fragmento de 2,0 kb a partir del control positivo y las plantas transgénicas T1.

PpMPK-1

35 Los iniciadores utilizados en las reacciones fueron:

5'ATCCCGGGCGGTTTGGACACGATGTTCCAGTCC3' SEQ ID NO: 26

40 5'GCGTTAACTAACCGCGTTTAAGTCCCTCAAC3' SEQ ID NO: 27

45 El programa para la PCR fue el siguiente: 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62°C y 4 minutos a 72°C, seguido de 10 minutos a 72°C. Se produjo un fragmento de 1,6 kb a partir del control positivo y las plantas transgénicas.

Ejemplo 9

50 *Detección del ARNm de los transgenes PpPK-1, PpPK-2 y PpMPK-1 en líneas transgénicas de Arabidopsis*

Se detectó la expresión del transgen utilizando RT-PCR. Se aisló el ARN total de las plantas tratadas por estrés utilizando un procedimiento adaptado de (Verwoerd y colaboradores, 1989. NAR 17: 2362). Se recolectaron muestras de hojas (50 - 100 mg) y se las molió hasta un polvo fino en nitrógeno líquido. Se resuspendió el tejido molido en 500 µl de una mezcla 1:1 a 80°C, de fenol con respecto al amortiguador de extracción (LiCl 100 mM, Tris 100 mM pH 8, EDTA 10 mM, SDS al 1%), seguido por una breve agitación tipo vórtice para efectuar la mezcla. Después de la adición de 250 µl de cloroformo, se sometió brevemente a agitación tipo vórtice a cada muestra. Se centrifugaron luego las muestras durante 5 minutos a 12.000 x g. Se removió la fase acuosa superior a un tubo eppendorf fresco. Se precipitó el ARN por medio de la adición de 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y de 2 volúmenes de etanol al 95%. Se mezclaron las muestras por medio de inversión del tubo y se las colocó sobre hielo durante 30 minutos. Se precipitó el ARN por medio de centrifugación a 12.000 x g durante 10 minutos. Se removió el sobrenadante y se secó brevemente el precipitado. Se resuspendió el precipitador de la muestra de ARN en 10 µl de agua tratada con DEPC. Para remover el ADN contaminante de las muestras, cada una fue tratada con DNasa libre de RNasa (Roche) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se sintetizó el ADNc a partir del ARN total utilizando el kit de síntesis de ADNc de la primera hebra (Boehringer Mannheim) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se llevó a cabo la amplificación PCR de un fragmento específicos del gen del ADNc sintetizado utilizando Taq ADN polimerasa (Roche) e iniciadores específicos del gen (ver Tabla 5 para los iniciadores) en la siguiente reacción: amortiguador PCR 1X, MgCl₂ 1,5 mM, cada iniciador 0,2 µM, los dNTP 0,2 µM, 1 unidad de polimerasa, 5 µl de ADNc de la reacción de síntesis. Se

ES 2 316 400 T3

llevó a cabo la amplificación bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización, 95°C, 1 minuto; hibridación, 62°C, 30 segundos; extensión, 72°C, 1 minuto, 35 ciclos; extensión, 72°C, 5 minutos; mantener, 4°C, todo el tiempo. Se corrieron los productos PCR sobre un gel de agarosa al 1%, se coloreó con bromuro de etidio, y se visualizó bajo luz UV utilizando el sistema de documentación en gel Quantity-One (Bio-Rad).

Se detectó la expresión de los transgenes en la línea transgénica T1. Estos resultados indican que los transgenes se expresan en las líneas transgénicas y sugiere fuertemente que su producto génico mejoró la tolerancia al estrés de las plantas en las líneas transgénicas. De acuerdo con lo establecido previamente, no se podría detectar expresión de genes endógenos muy similares o idénticos por medio de este método. Estos resultados están de acuerdo con los datos del Ejemplo 7.

Ejemplo 10

Modificación por medio de ingeniería genética de plantas de soja tolerantes al estrés por medio de la sobreexpresión de los genes PpPK-1, PpPK-2 y PpMPK-1

Se utilizaron los constructos pBPSLVM004, pBPSLVM005 y pBPSLVM006 para transformar soja como se describe más adelante.

Se esterilizó la superficie de las semillas de soja con etanol al 70% durante 4 minutos a temperatura ambiente con agitación continua, seguido por Clorox al 20% (v/v) suplementado con Tween al 0,05% (v/v) durante 20 minutos con agitación continua. Luego, se enjuagaron las semillas 4 veces con agua destilada y se las colocó sobre un papel filtro estéril humedecido en una caja Petri a temperatura ambiente durante 6 a 39 horas. Se retiró el recubrimiento de las semillas, y se separaron los cotiledones del eje del embrión. Se examinó el eje del embrión para asegurarse de que la región meristemática no esté dañada. Se recolectaron los ejes cortados de los embriones en una caja de Petri estéril parcialmente abierta y secados al aire hasta un contenido de humedad menor al 20% (peso fresco) en una caja de Petri sellada hasta un uso posterior.

Se preparó un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* a partir de una colonia única en medio LB sólido más antibióticos apropiados (por ejemplo, 100 mg/l de estreptomycin, 50 mg/l kanamicina) seguido por el crecimiento de la única colonia en medio LB líquido hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,8. Luego, se precipitó el cultivo de bacterias a 7.000 rpm durante 7 minutos a temperatura ambiente, y se resuspendió en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con acetosiringona 100 μ M. Se incubaron los cultivos de bacterias en este medio de inducción previa durante 2 horas a temperatura ambiente antes de ser usados. Los ejes de los embriones de semilla cigótica de soja con un contenido aproximado de humedad del 15% fueron embebidos durante 2 horas a temperatura ambiente el cultivo inducido previamente en suspensión de *Agrobacterium*. Se removieron los embriones del cultivo embebido y transferidos a cajas de Petri que contenían medio MS sólido suplementado con sacarosa al 25% y se incubó durante 2 días, en la oscuridad a temperatura ambiente. Alternativamente, se colocaron los embriones en la parte superior del papel filtro estéril humedecido (medio MS líquido) en una caja de Petri y se incubó bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Después de este período, se transfirieron los embriones ya sea a medio MS líquido o sólido suplementado con 500 mg/L de carbenicilina o 300 mg/L de cefotaxime para matar las agrobacterias. Se utilizó el medio líquido para humedecer el papel de filtro estéril. Se incubaron los embriones durante 4 semanas a 25°C, bajo 150 μ mol m⁻²sec⁻¹ y un período de luz de 12 horas. Una vez que las plántulas produjeron raíces fueron transferidas a suelo Metromix estéril. Se lavó el medio de las plantas *in vitro* antes de transferir las plantas al suelo. Se mantuvieron las plantas bajo una cubierta plástica durante 1 semana para favorecer el proceso de aclimatación. Luego, se transfirieron las plantas a un cuarto de crecimiento donde se las incubó a 25°C, bajo una intensidad de luz de 150 μ mol m⁻²sec⁻¹ y un período de luz de 12 horas aproximadamente durante 80 días.

Se seleccionaron luego las plantas transgénicas por su tolerancia mejorada a la sequía, la sal y/o el frío de acuerdo con el método de selección descrito en el Ejemplo 7 demostrando que la expresión transgénica confiere tolerancia al estrés.

Ejemplo 11

Modificación por ingeniería genética de plantas de Colza/Canola tolerantes al estrés por medio de la sobreexpresión de los genes PpPK-1, PpPK-2 y PpMPK-1

Se utilizaron los constructos pBPSLVM004, pBPSLVM005 y pBPSLVM006 para transformar colza/canola como se describe más adelante.

El método de transformación de una planta descrito aquí es también aplicable a Brassica y a otros cultivos. Las semillas de canola se esterilizan en la superficie con etanol al 70% durante 4 minutos a temperatura ambiente con agitación continua, seguido por Clorox al 20% (v/v) suplementado con Tween al 0,05% (v/v) durante 20 minutos, a temperatura ambiente con agitación continua. Luego, se enjuagan las semillas 4 veces con agua destilada y se las coloca sobre papel filtro estéril humedecido en una caja de Petri a temperatura ambiente durante 18 horas. Luego se remueven los recubrimientos de la semilla y se secan las semillas al aire durante la noche en una caja de Petri estéril medio abierta. Durante este período, las semillas pierden aproximadamente 85% de su contenido de agua. Se almacenan luego las semillas a temperatura ambiente en una caja de Petri sellada hasta un uso adicional. Los

constructos de ADN y la imbibición del embrión son como se describe en el Ejemplo 10. Las muestras de las plantas transgénicas primarias (T0) se analizan por medio de PCR para confirmar la presencia de ADN-T. Estos resultados se confirman por medio de hibridación Southern en la cual se somete a electroforesis al ADN sobre un gel de agarosa al 1% y se transfiere a una membrana de nylon cargada positivamente (Roche Diagnostics). Se utiliza el Kit para Síntesis PCR DIG (Roche Diagnostics) para preparar una sonda marcada con digoxigenina por medio de PCR, y se la utiliza como lo recomienda el fabricante.

Se seleccionan luego las plantas transgénicas por su tolerancia mejorada al estrés de acuerdo con el método de selección descrito en el Ejemplo 7 demostrando que la expresión del transgén confiere tolerancia a la sequía.

Ejemplo 12

Modificación por ingeniería genética de plantas de maíz tolerantes al estrés por medio de la sobreexpresión de los genes PpCABF-1; PpDBF-1, PpCBF-1, PpHDZ-1, PpZF-1, PpLZ-1 y PpCABF-2

Se utilizaron los constructos pBPSLVM004, pBPSLVM005 y pBPSLVM006 para transformar maíz como se describe más abajo.

La transformación de maíz (*Zea Mays* L.) se lleva a cabo con el método descrito por Ishida y colaboradores, 1996. Nature Biotech 14745 - 50. Se cocultivan los embriones inmaduros con *Agrobacterium tumefaciens* que transportan vectores "súper binarios", y se recuperan plantas transgénicas a través de organogénesis. Este procedimiento provee una eficiencia de transformación entre 2,5% y 20%. Se seleccionaron luego las plantas transgénicas por su tolerancia mejorada a la sequía, la sal y/o el frío de acuerdo con el método de selección descrito en el Ejemplo 7 demostrando que la expresión transgénica confiere tolerancia al estrés.

Ejemplo 13

Modificación por ingeniería genética de plantas de trigo tolerantes al estrés por medio de la sobreexpresión de los genes PpPK-1, PpPK-2 y PpMPK-1

Se utilizaron los constructos pBPSLVM004, pBPSLVM005 y pBPSLVM006 para transformar trigo como se describe más abajo.

La transformación de trigo se lleva a cabo con el método descrito por Ishida y colaboradores, 1996. Nature Biotech 14745 - 50. Se cocultivan los embriones inmaduros con *Agrobacterium tumefaciens* que transportan vectores "súper binarios", y se recuperan plantas transgénicas a través de organogénesis. Este procedimiento provee una eficiencia de transformación entre 2,5% y 20%. Se seleccionan luego las plantas transgénicas por su tolerancia mejorada al estrés, de acuerdo con el método de selección descrito en el Ejemplo 7 demostrando que la expresión transgénica confiere tolerancia a la sequía.

Ejemplo Comparativo 15

Identificación de Genes Homólogos y Heterólogos

Se pueden utilizar secuencias génicas para identificar genes homólogos o heterólogos a partir de ADNc o de bibliotecas genómicas. Se pueden aislar genes homólogos (por ejemplo, clones de longitud completa) a través de hibridación de ácido nucleico utilizando por ejemplo bibliotecas de ADNc. Dependiendo de la abundancia del gen de interés, se siembran en placa de 100.000 hasta 1.000.000 de bacteriófagos recombinantes y se transfieren a membranas de nylon. Después de la desnaturalización con álcali, se inmoviliza el ADN sobre la membrana por ejemplo, por medio de entrelazamiento por UV. La hibridación se lleva a cabo con condiciones altamente restrictivas. En una solución acuosa, la hibridación y el lavado se llevan a cabo con una fuerza iónica de NaCl 1 M y una temperatura de 68°C. Las sondas de hibridación se generan por ejemplo, por medio de marcación de transcripción que hace muescas radioactivas (³²P) (High Prime, Roche, Mannheim, Alemania). Las señales se detectan por medio de autorradiografía.

Los genes parcialmente homólogos o heterólogos que están relacionados pero no son idénticos se puede identificar en una forma análoga al procedimiento anteriormente descrito utilizando condiciones de hibridación de baja rigurosidad y lavado. Para hibridación acuosa, la fuerza iónica se mantiene normalmente con NaCl 1 M mientras se disminuye progresivamente la temperatura desde 68 hasta 42°C.

El aislamiento de las secuencias genómicas con homologías (o la identidad/similitud de las secuencias) únicamente se puede llevar a cabo en un dominio distinto (por ejemplo 10 - 20 aminoácidos) por medio del uso de sondas sintéticas de oligonucleótido radiomarcadas. Los oligonucleótidos radiomarcados se preparan por medio de fosforilación del extremo 5 del iniciador de dos oligonucleótidos complementarios con T4 polinucleótido quinasa. Los oligonucleótidos complementarios se hibridan y se ligan para formar concatémoros. Se marcan en forma radioactiva los concatémoros bicatenarios, por ejemplo, por medio de transcripción de muescas. La hibridación se lleva a cabo normalmente con condiciones de baja rigurosidad utilizando altas concentraciones de oligonucleótido.

ES 2 316 400 T3

Solución para hibridación de oligonucleótidos:

6 x SSC

Fosfato de sodio 0,01 M

EDTA 1 mM (pH 8)

SDS al 0,5%

100 µg/ml de ADN desnaturalizado de esperma de salmón

Leche en polvo sin grasa al 0,1%.

Durante la hibridación, se disminuye la temperatura paso a paso hasta 5 - 10°C por debajo del T_m estimado del oligonucleótido o por debajo de la temperatura ambiente seguido por etapas de lavado y autorradiografía. El lavado se lleva a cabo con rigurosidad baja tal como 3 etapas de lavado utilizando 4 x SSC. Los detalles adicionales son descritos por Sambrook, J. y colaboradores, (1989), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press o por Ausubel, F. M. y colaboradores, (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons.

Ejemplo Comparativo 16

Identificación de Genes Homólogos por medio de Selección de las Bibliotecas de Expresión con Anticuerpos

Se pueden utilizar los clones de ADN-C para producir proteína recombinante por ejemplo en *E. coli* (por ejemplo, sistema Qiagen QIAexpress pQE). Las proteínas recombinantes se purifican luego normalmente por afinidad a través de cromatografía de afinidad Ni-NTA (Qiagen). Se utilizan luego las proteínas recombinantes para producir anticuerpos específicos por ejemplo por medio del uso de técnicas estándar para inmunización de conejos. Se purifican por afinidad los anticuerpos utilizando una columna Ni-NTA Saturada con el antígeno recombinante como lo describen Gu y colaboradores, 1994 BioTechniques 17: 257 - 262. Se puede utilizar luego el anticuerpo para seleccionar las bibliotecas de expresión de ADNc para identificar genes homólogos o heterólogos a través de una selección inmunológica (Sambrook, J. y colaboradores, (1989), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press o Ausubel, F. M. y colaboradores, (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons).

Ejemplo 17

Mutagénesis In vivo

La mutagénesis *in vivo* de los microorganismos se puede llevar a cabo por medio del paso del ADN del plásmido (o de otro vector) a través de *E. coli* o de otros microorganismos (por ejemplo, *Bacillus* spp. o levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*) que están deteriorados en su capacidad para mantener la integridad de su información genética. Las cepas típicas que provocan mutaciones en los genes para el sistema de reparación de ADN (por ejemplo mutHLS, mutD, mutT, etc.; para referencia, ver Rupp, W.D. (1996) DNA repair mechanisms, en: *Escherichia coli* y *Salmonella*, p. 2277 - 2294, ASM: Washington). Tales cepas son bien conocidas por aquellos capacitados en el arte. El uso de tales cepas está ilustrada, por ejemplo, en Greener, A. y Callahan, M. (1994) Strategies 7: 32 - 34. La transferencia de moléculas mutadas de ADN en plantas se hace preferiblemente después de la selección y análisis en microorganismos. Las plantas transgénicas se generan de acuerdo a diferentes ejemplos dentro de los ejemplos de este documento.

Ejemplo 18

Análisis in vitro de la Función de los Genes de Physcomitrella en Organismos Transgénicos

La determinación de actividades y parámetros cinéticos de enzimas está bien establecida en el arte. Los experimentos para determinar la actividad de cualquier enzima alterada dada deben ser diseñados para la actividad específica de la enzima de tipo silvestre, lo cual hace parte de los conocimientos de una persona capacitada en el arte. Un vistazo general acerca de las enzimas, así como los detalles específicos relacionados con la estructura, la cinética, los principios, los métodos, las aplicaciones y los ejemplos para la determinación de muchas actividades de la enzima se pueden encontrar, por ejemplo, en las siguientes referencias: Dixon, M., y Webb, E.C., (1979) Enzymes. Longmans: London; Fersht, (1985) Enzyme Structure y Mechanism. Freeman: New York; Walsh, (1979) Enzymatic Reaction Mechanisms. Freeman: San Francisco; Price, N.C., Stevens, L. (1982) Fundamentals of Enzymology. Oxford Univ. Press: Oxford; Boyer, P.D., ed. (1983) The Enzymes, 3rd ed. Academic Press: New York; Bisswanger, H., (1994) Enzymkinetik, 2nd ed. VCH: Weinheim (ISBN 3527300325); Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, J., Grabl, M., eds. (1983-1986) Methods of Enzymatic Analysis, 3rd ed., vol. I-XII, Verlag Chemie: Weinheim; y Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1987) vol. A9, Enzymes. VCH: Weinheim, p. 352 - 363.

La actividad de las proteínas que se enlazan al ADN se puede medir por medio de diferentes métodos bien establecidos, tales como los ensayos de desplazamiento de la banda de ADN (también llamados ensayos de retardo en gel). El efecto de tales proteínas sobre la expresión de otras moléculas puede ser medido utilizando ensayos de gen reportero (tales como aquellos descritos en Kolmar, H. y colaboradores, (1995) EMBO J. 14: 3895 - 3904 y en las referencias citadas allí). Los sistemas de análisis del gen reportero son bien conocidos y están bien establecidos para aplicaciones tanto en células procariotas como eucariotas, utilizando enzimas tales como la β -galactosidasa, la proteína de fluorescencia verde y muchas otras.

La determinación de la actividad de las proteínas para transporte por membrana se puede llevar a cabo de acuerdo con técnicas tales como aquellas descritas en Gennis, R. B. Pores, Channels y Transporters, in Biomembranes, Molecular Structure y Function, páginas 85 - 137, 199 - 234 y 270 - 322, Springer: Heidelberg (1989).

Ejemplo 19

15 Purificación del Producto Deseado de Organismos Transformados

Recuperación del producto deseado del material de la planta (esto es, *Physcomitrella patens* o *Arabidopsis thaliana*), hongos, algas, ciliados, células de *C. glutamicum*, u otras células bacterianas transformadas con las secuencias de ácido nucleico descritas aquí, o del sobrenadante de los cultivos anteriormente descritos puede realizarse por medio de diferentes métodos bien conocidos en el arte. Si el producto deseado no es secretado de las células, puede ser recolectado del cultivo por medio de centrifugación a baja velocidad, se pueden lisar las células por medio de técnicas estándar, tales como por medio de fuerza mecánica o por sonicación. Se pueden separar mecánicamente órganos de plantas de otros tejidos u órganos. Después de la homogenización se remueven los residuos celulares por medio de centrifugación, y se retiene la fracción del sobrenadante que contiene las proteínas solubles para purificación adicional del compuesto deseado. Si el producto deseado es secretado a partir de las células deseadas, entonces se remueven las células del cultivo por medio de centrifugación a baja velocidad, y la fracción sobrenadante es retenida para purificación adicional.

La fracción sobrenadante de cualquiera de los métodos de purificación es sometida a cromatografía con una resina adecuada, en la cual la molécula deseada es o bien retenida sobre una resina de cromatografía mientras que muchas de las impurezas en la muestra no lo son, o en donde las impurezas son retenidas por la resina mientras que la muestra no lo es. Tales etapas de cromatografía pueden ser repetidas según sea necesario, utilizando la misma o diferentes resinas de cromatografía. Alguien capacitado en el arte estaría capacitado para seleccionar las resinas de cromatografía apropiadas y en la aplicación más eficiente para purificar una molécula particular. El producto purificado puede ser concentrado por medio de filtración o de ultrafiltración, y almacenado a una temperatura a la cual sea mayor la estabilidad del producto.

Existe una gran variedad de métodos de purificación conocidos en el arte y el método de purificación precedente no pretende ser una limitante. Tales técnicas de purificación están descritas, por ejemplo, en Bailey, J. E. & Ollis, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill: New York (1986). Adicionalmente, se puede evaluar la identidad y la pureza de los compuestos aislados por medio de técnicas estándar en el arte. Estas incluyen cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC), métodos espectroscópicos, métodos de coloración, cromatografía en capa delgada, NIRS, ensayos enzimáticos, o microbiológicos. Tales métodos de análisis son revisados en: Patek y colaboradores, 1994 Appl. Environ. Microbiol. 60: 133 - 140; Malakhova y colaboradores, 1996 Biotechnologiya 11: 27 - 32; y Schmidt y colaboradores, 1998 Bioprocess Engineer. 19: 67 - 70. Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, (1996) vol. A27, VCH: Weinheim, páginas 89 - 90, páginas 521 - 540, páginas 540 - 547, páginas 559 - 566, 575 - 581 y páginas 581 - 587; Michal, G. (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry y Molecular Biology, John Wiley y Sons; Fallon, A. y colaboradores (1987) Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry y Molecular Biology, vol. 17.

Referencias citadas en la descripción

Este listado de referencias citado por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento europeo de la patente. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación, no se pueden excluir los errores o las omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patente citados en la descripción

- | | | |
|----|-----------------------------|-----------------------|
| 60 | • US 4987071 A, Cech [0052] | • WO 9113980 A [0071] |
| | • US 5116742 A, Cech [0052] | • WO 9515389 A [0071] |
| | • WO 9801572 A [0056] | • WO 9523230 A [0071] |
| 65 | • US 4873316 A [0064] | • WO 9916890 A [0071] |

ES 2 316 400 T3

- EP 264166 A [0064]
- WO 9516783 A [0072]
- US 5352605 A [0068]
- WO 9706250 A [0072]
- WO 8402913 A [0068]
- WO 9946394 A [0072]
- US 4962028 A [0068]
- EP 0424047 A [0080]
- WO 9519443 A [0069]
- US 5322783 A [0080]
- WO 9321334 A [0069]
- EP 0397687 A [0080]
- US 5187267 A [0070]
- US 5376543 A [0080]
- WO 9612814 A [0070]
- US 5169770 A [0080]
- EP 375091 A [0070]
- US 5990387 A [0081]
- US 5608152 A [0071]
- WO 9307256 A [0081]
- WO 9845461 A [0071]
- US 6004804 A [0114]
- US 5504200 A [0071].

Literatura citada en la descripción que no es de patente

- VAN DER GEAR y colaboradores, *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1994, vol. 10, 251 - 337 [0005]
- BECRAFT, P. W. *Trends Plant Sci.*, 1998, vol. 3, 384-388 [0005]
- KNIGHT y colaboradores, *Nature*, 1991, vol. 352, 524 [0006]
- SCHROEDER, J. I.; THULEAU, P. *Plant Cell*, 1991, vol. 3, 555 [0006]
- BUSH, D. S. *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.*, 1995, vol. 46, 95 [0006]
- URAO, T. y colaboradores, *Mol. Gen. Genet.*, 1994, vol. 244, 331 [0006]
- HAJDUKIEWICZ y colaboradores, *Plant Molecular Biology*, 1994, vol. 25, 989 - 94 [0018]
- BECKER y colaboradores, *Plant Molecular Biology*, 1992, vol. 20, 1195 - 7 [0018]
- JEFFERSON y colaboradores, *EMBO J*, 1987, vol. 6, 3901 - 7 [0018]
- SAMBROOK y colaboradores, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989 [0028] [0076]
- CHIRGWIN y colaboradores, *Biochemistry*, 1979, vol. 18, 5294 - 5299 [0028]
- AUSUBEL y colaboradores, *Current Protocols in Molecular Biology. Wiley*, 1988 [0033] [0034]
- BORMANN, E. R. y colaboradores, *Mol. Microbiol.* 1992, vol. 6, 317 - 326 [0033]
- Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons*, 1989, 6.3.1 - 6.3.6 [0041]
- KARLIN; ALTSCHUL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 90, 5873 - 5877 [0045]
- ALTSCHUL y colaboradores, *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403 - 410 [0045]
- ALTSCHUL y colaboradores, *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25, 3389 - 3402 [0046] [0046]
- MYERS; MILLER. *CABIOS*, 1989 [0046] [0046]
- GAULTIER y colaboradores, *Nucleic Acids. Res.*, 1987, vol. 15, 6625 - 6641 [0051]
- INOUE y colaboradores, *Nucleic Acids Res.*, 1987, vol. 15, 6131 - 6148 [0051]

ES 2 316 400 T3

- **INOUE** y colaboradores, *FEBS Lett.*, 1987, vol. 215, 327 - 330 [0051]
- **HASELHOFF; GERLACH**. *Nature*, 1988, vol. 334, 585 - 591 [0052]
- 5 • **BARTEL, D.; SZOSTAK, J.W.** *Science*, 1993, vol. 261, 1411 - 1418 [0052]
- **HELENE, C.** *Anticancer Drug Des.*, 1991, vol. 6 (6), 569 - 84 [0053]
- **HELENE, C. y colaboradores**, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, vol. 660, 27 - 36 [0053]
- 10 • **MAHER, L. J.** *Bioassays*, 1992, vol. 14 (12), 807 - 15 [0053]
- **GOEDEL**. Gene Expression Technology: Methods in Enzymology. *Academic Press*, 1990, vol. 185 [0055]
- 15 • **GRUBER; CROSBY**. Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology. *CRC Press*, 89 - 108 [0055]
- **ROMANOS, M. A. y colaboradores**, Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, 1992, vol. 8, 423 - 488 [0056]
- 20 • Heterologous gene expression in filamentous fungi. **VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. y colaboradores**, More Gene Manipulations in Fungi. *Academic Press*, 1991, 396 - 428 [0056]
- Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi. **VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J.; PUNT, P. J. y colaboradores**, Applied Molecular Genetics of Fungi. *Cambridge University Press*, 1991, 1 - 28 [0056]
- 25 [0061]
- **FALCIATORE** y colaboradores, *Marine Biotechnology*, 1999, vol. 1 (3), 239 - 251 [0056] [0065]
- **SCHMIDT, R.; WILLMITZER, L.** High efficiency *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of
- 30 *Arabidopsis thaliana* leaf and cotyledon explants. *Plant Cell Rep.*, 1988, 583 - 586 [0056]
- Plant Molecular Biology and Biotechnology. *C Press*, 1993, 71 - 119 [0056]
- Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants. F. F. **WHITE; B. JENES** y colaboradores, Engineering
- 35 and Utilization. *Academic Press*, 1993, vol. 1, 128 - 43 [0056]
- **POTRYKUS**. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.*, 1991, vol. 42, 205 - 225 [0056]
- **SMITH, D. B.; JOHNSON, K. S.** *Gene*, 1988, vol. 67, 31 - 40 [0058]
- 40 • **AMANN** y colaboradores, *Gene*, 1988, vol. 69, 301 - 315 [0059]
- **STUDIER** y colaboradores, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology. *Academic Press*, 1990, vol. 185, 60 - 89 [0059]
- 45 • **GOTTESMAN, S.** Gene Expression Technology: Methods in Enzymology. *Academic Press*, 1990, vol. 185, 119 - 128 [0060]
- **WADA** y colaboradores, *Nucleic Acids Res.*, 1992, vol. 20, 2111 - 2118 [0060]
- 50 • **BALDARI** y colaboradores, *Embo J.*, 1987, vol. 6, 229 - 234 [0061]
- **KURJAN; HERSKOWITZ**. *Cell*, 1982, vol. 30, 933 - 943 [0061]
- 55 • **SCHULTZ** y colaboradores, *Gene*, 1987, vol. 54, 113 - 123 [0061]
- **SMITH** y colaboradores, *Mol. Cell Biol.*, 1983, vol. 3, 2156 - 2165 [0062]
- **LUCKLOW; SUMMERS**. *Virology*, 1989, vol. 170, 31 - 39 [0062]
- 60 • **SEED, B.** *Nature*, 1987, vol. 329, 840 [0063]
- **KAUFMAN** y colaboradores, *EMBO J.*, 1987, vol. 6, 187 - 195 [0063]
- 65 • **SAMBROOK, J.; FRITSH, E. F.; MANIATIS, T.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989 [0063]
- **PINKERT** y colaboradores, *Genes Dev.*, 1987, vol. 1, 268 - 277 [0064]

ES 2 316 400 T3

- **CALAME; EATON.** *Adv. Immunol.*, 1988, vol. 43, 235 - 275 [0064]
- **WINOTO; BALTIMORE.** *EMBO J.*, 1989, vol. 8, 729 - 733 [0064]
- 5 • **BANERJI y colaboradores,** *Cell*, 1983, vol. 33, 729 - 740 [0064]
- **QUEEN; BALTIMORE.** *Cell*, 1983, vol. 33, 741 - 748 [0064]
- **BYRNE; RUDDLE.** *PNAS*, 1989, vol. 86, 5473 - 5477 [0064]
- 10 • **EDLUND y colaboradores,** *Science*, 1985, vol. 230, 912 - 916 [0064]
- **KESSEL; GRUSS.** *Science*, 1990, vol. 249, 374 - 379 [0064]
- 15 • **CAMPES; TILGHMAN.** *Genes Dev.*, 1989, vol. 3, 537 - 546 [0064]
- **BECKER, D.; KEMPER, E.; SCHELL, J.; MASTERSON, R.** New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border. *Plant Mol. Biol.*, 1992, vol. 20, 1195 - 1197 [0065]
- 20 • **BEVAN, M.W.** Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucl. Acid. Res.*, 1984, vol. 12, 8711 - 8721 [0065]
- Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants. Engineering and Utilization. *Academic Press*, 1993, vol. 1, 15 - 38 [0065]
- 25 • **GIELEN y colaboradores,** *EMBO J.*, 1984, vol. 3, 835 [0066]
- **GALLIE y colaboradores,** *Nucl. Acids Research*, 1987, vol. 15, 8693 - 8711 [0067]
- 30 • **BENFEY y colaboradores,** *EMBO J.*, 1989, vol. 8, 2195 - 2202 [0068]
- **FRANCK y colaboradores,** *Cell*, 1980, vol. 21, 285 - 294 [0068]
- **KERMODE.** *Crit. Rev. Plant Sci.*, 1996, vol. 15 (4), 285 - 423 [0069]
- 35 • **GATZ.** *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1997, vol. 48, 89 - 108 [0069]
- **GATZ y colaboradores,** *Plant J.*, 1992, vol. 2, 397 - 404 [0069]
- 40 • **WARD y colaboradores,** *Plant. Mol. Biol.*, 1993, vol. 22, 361 - 366 [0070]
- **SHINOZALEI y colaboradores,** *Mol. Gen. Genet.*, 1993, vol. 236, 331 - 340 [0070]
- **BAEUMLEIN y colaboradores,** *Mol Gen Genet.*, 1991, vol. 225 (3), 459 - 67 [0071]
- 45 • **BAEUMLEIN y colaboradores,** *Plant Journal*, 1992, vol. 2 (2), 233 - 9 [0071]
- **WEINTRAUB, H. y colaboradores,** Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis. *Reviews - Trends in Genetics*, 1986, vol. 1 (1) [0073]
- 50 • **MOL y colaboradores,** *FEBS Letters*, 1990, vol. 268, 427 - 430 [0073]
- Agrobacterium protocols. Methods in Molecular Biology. *Humana Press*, 1995, vol. 44 [0076]
- 55 • **HÖFGEN; WILLMITZER.** *Plant Science*, 1990, vol. 66, 221 - 230 [0079]
- **KERMODE.** *Crit. Rev. Plant Sci.*, 1996, vol. 4 (15), 285 - 423 [0079]
- 60 • **KONCZ; SCHELL.** *Mol. Gen. Genet.*, 1986, vol. 204, 383 - 396 [0079]
- **DEBLAERE y colaboradores,** *Nucl. Acids. Res.*, 1994, vol. 13, 4777 - 4788 [0079]
- **GELVIN, STANTON B.; SCHILPEROORT, ROBERT A.** Plant Molecular Biology Manual. *Kluwer Academic Publ.*, 1995 [0080]
- 65 • **GLICK, BERNARD R.; THOMPSON, JOHN E.** Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology. *CRC Press*, 1993, 360 [0080]

- **MOLONEY** y colaboradores, *Plant cell Report*, 1989, vol. 8, 238 - 242 [0080]
- **DE BLOCK** y colaboradores, *Plant Physiol.*, 1989, vol. 91, 694 - 701 [0080]
- 5 • **MLYNAROVA** y colaboradores, *Plant Cell Report*, 1994, vol. 13, 282 - 285 [0080]
- **FREELING; WALBOT**. The maize handbook. Springer Verlag, 1993 [0081]
- **COLE-STRAUSS** y colaboradores, *Nucleic Acids Research*, 1999, vol. 27 (5), 1323 - 1330 [0083]
- 10 • **KMIEC**. *Gene therapy American Scientist.*, 1999, vol. 87 (3), 240 - 247 [0083]
- **THOMAS, K.R.; CAPECCHI, M.R.** *Cell*, 1987, vol. 51, 503 [0084]
- 15 • **STREPP** y colaboradores, *PNAS*, 1998, vol. 95 (8), 4368 - 4373 [0084]
- Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons*, 1992 [0095]
- **NARANG, S.A.** *Tetrahedron*, 1983, vol. 39, 3 [0097]
- 20 • **ITAKURA** y colaboradores, *Annu. Rev. Biochem.*, 1984, vol. 53, 323 [0097]
- **ITAKURA** y colaboradores, *Science*, 1984, vol. 198, 1056 [0097]
- 25 • **IKE** y colaboradores, *Nucleic Acid Res.*, 1983, vol. 11, 477 [0097]
- **ARKIN; YOURVAN.** *PNAS*, 1992, vol. 89, 7811 - 7815 [0099]
- **DELGRAVE** y colaboradores, *Protein Engineering*, 1993, vol. 6 (3), 327 - 331 [0099]
- 30 • **GREISMAN; PABO.** *Science*, 1997, vol. 275, 657 [0105]
- *Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 17 [0111]
- 35 • Product recovery and purification. **REHM** y colaboradores, *Biotechnology. VCH*, 1993, vol. 3, 469 - 714 [0111]
- **BELTER, P. A.** y colaboradores, *Bioseparations: downstream processing for biotechnology. John Wiley and Sons*, 1988 [0111]
- 40 • **KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S.** Recovery processes for biological materials. *John Wiley and Sons*, 1992 [0111]
- **SHAEIWITZ, J. A.; HENRY, J. D.** Biochemical separations, en: *Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. VCH, 1988, vol. B3, 1 - 27 [0111]
- 45 • **DECHOW, F. J.** Separation and purification techniques in biotechnology. *Noyes Publications*, 1989
- **GROVES, J. T.** *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1999, vol. 3 (2), 226 - 235 [0113]
- 50 • **GIRKE, T.** *The Plant Journal*, 1998, vol. 15, 39 - 48 [0114]
- **PUTTARAJU** y colaboradores, Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy. *Nature Biotechnology*, 1999, vol. 17, 246 - 252 [0114]
- 55 • **HARLOW; LANE.** Antibodies; A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, 1988 [0116]
- **KELLY** y colaboradores, *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 163 - 167 [0116]
- 60 • **BEBBINGTON** y colaboradores, *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 169 - 175 [0116]
- **HARLOW; LANE.** Antibodies, A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Publications*, 1988 [0117] [0118]
- Basic and Clinical Immunology. *Lange Medical Publications* [0118]
- 65 • **ENGEL.** *Am. J. Bot.*, 1968, vol. 55, 438 - 446 [0121]
- **RESKI; ABEL.** *Planta*, 1985, vol. 165, 354 - 358 [0122]

ES 2 316 400 T3

- **RESKI** y colaboradores, *Mol. Gen. Genet.*, 1994, vol. 244, 352 - 359 [0125]
- **PEARSON** W. R. Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol.*, 1990, vol. 183, 63 - 98 [0128]
- **ALTSCHUL** S. F.; **GISH** W.; **MILLER** W.; **MYERS** E. W.; **LIPMAN** D. J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, vol. 215, 403 - 10 [0128]
- **FRISHMAN**, D.; **ARGOS**, P. 75% accuracy in protein secondary structure prediction. *Proteins*, 1997, vol. 27, 329 - 335 [0128]
- **THOMPSON**, J. D.; **HIGGINS**, D. G.; **GIBSON**, T. J. **CLUSTAL** W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 1994, vol. 22, 4673 - 4680 [0128]
- **PERSSON**, B.; **ARGOS**, P. Prediction of transmembrane segments in proteins utilizing multiple sequence alignments. *J. Mol. Biol.*, 1994, vol. 237, 182 - 192 [0128]
- **KLEIN**, P.; **KANEHISA**, M.; **DELISI**, C. Prediction of protein function from sequence properties: A discriminate analysis of a database. *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, vol. 787, 221 - 226 [0128]
- **KOLAKOWSKI** L. F. JR.; **LEUNISSEN** J. A. M.; **SMITH** J. E. Pro Search: fast searching of protein sequences with regular expression patterns related to protein structure and function. *Biotechniques*, 1992, vol. 13, 919 - 921 [0128]
- **J. C. WALLACE**; **HENIKOFFS**. **PATMAT**: A searching and extraction program for sequence, pattern and block queries and databases. *CABIOS*, 1992, vol. 8, 249 - 254 [0128]
- **SAMBROOK** y colaboradores, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0132] [0133] [0133] [0138]
- **MANKIN**. *PhD thesis*, 2000 [0134]
- **SAMBROOK** y colaboradores, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 1989 [0136]
- **BECHTOLD**. *Acad. Sci. Paris.*, 1993, vol. 316, 1194 - 1199 [0141]
- **BENT** y colaboradores, *Science*, 1994, vol. 265, 1856 - 1860 [0141]
- **XIONG** y colaboradores, *Plant Molecular Biology Reporter*, 1999, vol. 17, 159 - 170 [0142]
- **VERWOERD** y colaboradores, *NAR*, 1989, vol. 17, 2362 [0153]
- **ISHIDA** y colaboradores, *Nature Biotech.*, 1996, 14745 - 50 [0163] [0165]
- **SAMBROOK**, J. y colaboradores, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0170] [0171]
- **AUSUBEL**, F. M. y colaboradores, *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, 1994 [0171]
- **GU** y colaboradores, *BioTechniques*, 1994, vol. 17, 257 - 262 [0171]
- **RUPP**, W. D. DNA repair mechanisms, en: *Escherichia coli* and Salmonella. *ASM*, 1996, 2277 - 294 [0172]
- **GREENER**, A.; **CALLAHAN**, M. *Strategies*, 1994, vol. 7, 32 - 34 [0172]
- **DIXON**, M.; **WEBB**, E.C. *Enzymes*. Longmans, 1979 [0173]
- **FERSHT**. *Enzyme Structure and Mechanism*. Freeman, 1985 [0173]
- **WALSH**. *Enzymatic Reaction Mechanisms*. Freeman, 1979 [0173]
- **PRICE**, N. C.; **STEVENS**, L. *Fundamentals of Enzymology*. Oxford Univ. Press, 1982 [0173]
- *The Enzymes*. Academic Press, 1983 [0173]
- **BISSWANGER**, H. *Enzymkinetik*. VCH, 1994 [0173]

ES 2 316 400 T3

• Methods of Enzymatic Analysis. *Verlag Chemie*, 1983, vol. I - XII [0173]

• Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. *VCH*, 1987, vol. A9, 352 - 363 [0173]

5 • **KOLMAR**, H. y colaboradores, *EMBO J.*, 1995, vol. 14, 3895 - 3904 [0174]

• Channels and Transporters, en Biomembranes. **GENNIS**, R. B. **PORES**. Molecular Structure and Function. *Springer*, 1989, 85 - 137 [0175]

10 • **BAILEY**, J. E.; **OLLIS**, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals. McGraw-Hill, 1986 [0178]

• **PATEK** y colaboradores, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, vol. 60, 133 - 140 [0178]

15 • **MALAKHOVA** y colaboradores, *Biotekhnologiya*, 1996, vol. 11, 27 - 32 [0178]

• **SCHMIDT** y colaboradores, *Bioprocess Engineer.*, 1998, vol. 19, 67 - 70 [0178]

20 • Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. *VCH*, 1996, vol. A27, 89 - 90521 - 540540 -547559 - 566575 - 581581 - 587 [0178]

• **MICHAL**, G. Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology. *John Wiley and Sons*, 1999 [0178]

25 • **FALLON**, A. y colaboradores, *Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 17 [0178].

REIVINDICACIONES

1. Una planta transgénica transformada por medio de un ácido nucleico que codifica a una proteína relacionada con el estrés por proteína quinasa (PKSRP), en donde la expresión de la secuencia de ácido nucleico en la planta resulta en una mayor tolerancia al estrés ambiental comparada con una variedad de la planta de tipo silvestre, en donde el ácido nucleico y la proteína son de *Physcomitrella patens*, y en donde la PKSRP se selecciona entre 1) la Proteína Quinasa-1(PK - 1) como se define en la SEQ ID NO: 7, 2) la Proteína Quinasa-1 (PK - 2) como se define en la SEQ ID NO: 8, y 3) la Proteína Quinasa-1 activada por Mitógeno (MPK - 1) como se define en la SEQ ID NO: 9.

2. La planta transgénica de la Reivindicación 1, en donde el ácido nucleico que codifica para PKSRP se selecciona entre 1) la Proteína Quinasa-1(PK - 1) como se define en la SEQ ID NO: 4, 2) la Proteína Quinasa-1 (PK - 2) como se define en la SEQ ID NO: 5, y 3) la Proteína Quinasa-1 activada por Mitógeno (MPK - 1) como se define en la SEQ ID NO: 6; y ácidos nucleicos que son al menos 60% idénticos a las SEQ ID NO: 4, 5 y 6 sobre la región de codificación, respectivamente.

3. La planta transgénica de la Reivindicación 1, en donde el ácido nucleico que codifica para PKSRP se selecciona entre 1) la Proteína Quinasa-1(PK - 1) como se define en la SEQ ID NO: 4, 2) la Proteína Quinasa-1 (PK - 2) como se define en la SEQ ID NO: 5, y 3) la Proteína Quinasa-1 activada por Mitógeno (MPK - 1) como se define en la SEQ ID NO: 6.

4. La planta transgénica de la Reivindicación 1, en donde el estrés ambiental se selecciona entre salinidad, sequía, y temperatura.

5. Una planta transgénica de cualquiera de las Reivindicaciones 1 ó 3, en donde el estrés ambiental es salinidad, y la PKSRP se selecciona entre PK-2 y MPK-1.

6. Una planta transgénica de cualquiera de las Reivindicaciones 2 y 4, en donde el estrés ambiental es salinidad, y el ácido nucleico que codifica para la PKSRP se selecciona entre PK-2 y MPK-1.

7. Una planta transgénica de la Reivindicación 1, en donde el estrés ambiental es sequía, y la PKSRP se selecciona entre PK-1, PK-2 y MPK-1.

8. Una planta transgénica de cualquiera de las Reivindicaciones 2 y 3, en donde el estrés ambiental es sequía, y el ácido nucleico que codifica para la PKSRP se selecciona entre PK-1, PK-2 y MPK-1.

9. La planta transgénica de cualquiera de las Reivindicaciones 1 - 8, en donde la planta es una monocotiledónea.

10. La planta transgénica de cualquiera de las Reivindicaciones 1 - 8, en donde la planta es una dicotiledónea.

11. La planta transgénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8, en donde la planta se selecciona entre maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, soja, cacahuete, algodón, colza, canola, casabe, pimienta, girasol, tagetes, plantas solanáceas, patata, tabaco, berenjena, tomate, especie Vicia, guisante, alfalfa, café, cacao, té, especie Salix, palma aceitera, coco, hierbas perennes y cultivos de forraje.

12. Una semilla producida por una planta transgénica transformada por medio de un ácido nucleico que codifica a una proteína relacionada con el estrés por proteína quinasa (PKSRP), en donde la semilla contiene la PKSRP de la Reivindicación 1 y en donde la planta es una reproducción verdadera para mayor tolerancia al estrés ambiental comparada con una variedad de tipo silvestre de la planta.

13. Una semilla producida por una planta transgénica transformada por medio de un ácido nucleico que codifica a una proteína relacionada con el estrés por proteína quinasa (PKSRP), en donde la semilla contiene al ácido nucleico que codifica para la PKSRP de las Reivindicaciones 2 y 3 y en donde la planta es una reproducción verdadera para mayor tolerancia al estrés ambiental comparada con una variedad de tipo silvestre de la planta.

14. Una proteína aislada relacionada con el estrés por proteína quinasa (PKSRP), en donde la PKSRP es como se describe en la Reivindicación 1.

15. Un ácido nucleico aislado que codifica a una proteína relacionada con el estrés por proteína quinasa (PKSRP), en donde el ácido nucleico que codifica para la PKSRP codifica para una PKSRP como se describe en la Reivindicación 1.

16. Un ácido nucleico aislado que codifica a una proteína relacionada con el estrés por proteína quinasa (PKSRP), en donde el ácido nucleico que codifica para la PKSRP es como se describe en cualquiera de las Reivindicaciones 2 y 3.

17. Un vector aislado de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico de cualquiera de las Reivindicaciones 15 y 16, en donde la expresión del vector en una célula huésped resulta en una mayor tolerancia al estrés ambiental comparada con una variedad de tipo silvestre de la célula huésped.

ES 2 316 400 T3

18. Una célula huésped que contiene al vector de la Reivindicación 17.

19. La célula huésped de la Reivindicación 18, en donde la célula es una planta.

5 20. Un método de producción de una planta transgénica con un ácido nucleico que codifica a una proteína relacionada con el estrés por proteína quinasa (PKSRP), en donde la expresión del ácido nucleico en la planta resulta en una mayor tolerancia al estrés ambiental comparada con una variedad de tipo silvestre de la planta, que comprende

10 (a) transformar una célula de una planta con un vector de expresión que incluye al ácido nucleico que codifica para la PKSRP, y

(b) generar a partir de la célula de la planta una planta transgénica con una mayor tolerancia al estrés ambiental comparada con una variedad de tipo silvestre de la planta, en donde el ácido nucleico y la proteína son de *Physcomitrella patens*, y en donde la PKSRP se selecciona entre 1) la Proteína Quinasa-1 (PK - 1) como se define en la SEQ ID NO: 7, 2) la Proteína Quinasa-1 (PK - 2) como se define en la SEQ ID NO: 8, y 3) la Proteína Quinasa-1 activada por Mitógeno (MPK - 1) como se define en la SEQ ID NO: 9.

20 21. El método de la Reivindicación 20, en donde el ácido nucleico que codifica para la PKSRP es como se describe en cualquiera de las Reivindicaciones 2 y 3.

22. Un método para identificación de una nueva proteína relacionada con el estrés por proteína quinasa (PKSRP) que comprende:

25 (a) el surgimiento de un anticuerpo específico en respuesta a una PKSRP como se describe en la Reivindicación 1;

(b) la selección de un material putativo de PKSRP con el anticuerpo, en donde el enlazamiento específico del anticuerpo con el material indica la presencia de una PKSRP potencialmente nueva; y

30 (c) la identificación del material enlazado como una PKSRP nueva.

23. Un método para modificar la tolerancia al estrés de una planta que comprende, modificar la expresión de una proteína relacionada con el estrés por proteína quinasa (PKSRP) en la planta, en donde la PKSRP es como se describe en la Reivindicación 1.

35 24. El método de la Reivindicación 23, en donde se incrementa la tolerancia al estrés.

25. El método de la Reivindicación 23, en donde se disminuye la tolerancia al estrés.

40 26. El método de la Reivindicación 25, en donde la planta es transgénica.

27. El método de la Reivindicación 26, en donde la planta es transformada con un ácido nucleico que codifica para la PKSRP como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4.

45 28. El método de la Reivindicación 26, en donde la planta es transformada con un constructo génico que dirige la expresión de los genes PK-1, PK-2 y MPK-1 por medio de un promotor específico de la planta.

29. El método de la Reivindicación 28, en donde el promotor es específico del tejido.

50 30. El método de la Reivindicación 29, en donde el promotor es regulado desde el punto de vista del desarrollo.

31. El método de la Reivindicación 20, en donde la expresión de PKSRP se modifica por medio de la administración de una molécula antisentido que inhibe la expresión de PKSRP.

55

60

65

FIGURA 1

Secuencia de nucleótidos de la PK-1 parcial de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO: 1)
GCACGAGGACAAGGGCTACTCTGGGGCTACTGCCGATTTGTGGTCATGCGGTGTTAT
TTTATATGTACTGATGGCTGGATACTTGCCATTTGAGGAGCCCACAATCATGGCACT
TTACAAGAAGATTTACCGAGCACAGTTCTCTTGGCCTCCTTGGTTCTCGTCAGGAGC
CCGGAAATTAATCTCAAAGATACTGGATCCCAATCCAAGAACTCGCATTTCTGCATC
TCAAATTTATAAAAATGATTGGTTTAAGAAAGGATATACTCCAGCCCAGTTTGACAG
AGAAGTTGATGTCAACCTTGACGATGTGAATGCTATCTTTA

FIGURA 1B

Secuencia de nucleótidos de la PK-2 parcial de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO: 2)
GCACCAGGTCTCTACATGCTTATTTCAACCCTAAACCTGAAGGGTCATTATTATCA
GGAAGTATGGCAAGCTCTACAACGATTCTTATGGATCTAGCATGGCCAACTACACA
TGCACTGCTAAGACGTTCACTTTAGCAGAATTAGAAAGAGCAACAGATAATTTTAGA
CCTGATAATGTAGTCGGCGAAGGGGGCTTTGGTCGAGTTTACCAAGGGGTACTTGAT
AGTGGTATTGAAGTGGCTGTAAAGGTGCTGACAAGGGATGATCATGAGGGTGGTCG
TGAGTTTGTGCGGAGGTANAAATGTTAAGCAGATTGCACCATCGCAACCTTGTGAA
GCTAATTGGCATCTGTACTGAGGAAATACGATGTTTGGTTTATGAGCTCATCACGAA
CGGGAGCGTGGAATCTCACTTGCATGGTCTAGATAAATACACTGCTCCTCTCAACTG
GGATGCACGTGTT

FIGURA 1C

Secuencia de nucleótidos de la MPK-1 parcial de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO: 3)
GCACGAGGTGACCTGAAGCCCAGTAATCTCCTCATCAATTGCAACGACTGTCTACTC
AAGATTTGTGATTTTGGCTTGGCTCGAACATCTGCAGAGGATGACTTCCTTACGGAG

TATGTTGTTACTCGACCATATCGAGCTCCAGAGCTCTTGCTTGGGAGCCGAATGTAC
 ACAGCGGCTGTTGATATGTGGTCAGTGGGCTGCATCTTCATGGAGATGCTTACAGGA
 CAACCTTTGTTTCCAATCCGGTCAAGGCAAGAGCATCCCGTGAATCATTTGAAACTC
 ATCACGGAGCTTCTAGGAACACCCGATGCTTCGGACCTGTCGTTTCTGCAGAATCCA
 GATGCTCGGCAAAGAATCCAAATGGCTTTGTTAGGTCAGGAAAGGAAGCCTTTGTTT
 TCGAGGTTTCCTCAAACGTCTGCAATAGCTTGTGACTTAGCGGAGAAGATGCTGAGG
 TTTAACCCATCCAACAGAATAACTGCGGAAGAGGCTTGGCCCATCCTTACTTGGGCA
 GCGCTTCACGACCTAAGTGATGAGCCAACGTGTCATCTTATGTTTCGAC

FIGURA 2A

Secuencia de nucleótidos de la PK-1 de longitud completa de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO: 4)

ATCCCGGGCGTTCAAGCAGGTGAATATGACAACTAAATCAAACATGCCGACTACTA
 ACGTCGAACGTACGCGGGTCGGAAAGTATGACCTCGGCAAGACCTTGGGAGAGGGT
 ACATTTGCCAAAGTCAAGGTGGCCAAACATATTGACACTGGTCACACTGTTGCCATC
 AAGATTTTGGACAAGGAGAAGATTCTCAGGCACAAGATGGTGGAACAGATCAAAAG
 AGAAATATCTACCATGAAGCTGGTGAAACATCCCTATGTCGTCCAGCTGTTGGAGGT
 AATGGCCAGCAGGACGAAGATCTACATTGTGCTTGAGTATGTCACAGGTGGCGAGC
 TTTTAAATAAGATTGCTCAACAAGGAAGACTGTCAGAGGATGAAGCAAGGAAGTAT
 TTTCAGCAGCTGATTGATGCAGTTGATTATTGCCACAGTCGGCAAGTGTATCACAGA
 GATCTGAAACCAGAGAATCTTCTTCTGGATTCCAAAGGCAACTTAAAAATTTCCGAC
 TTTGGCTTGAGTGCGCTACCTCAGCAATTTAGGGAAGATGGTTTATTACATACAAC
 TGCGGAACTCCCAACTACGTGGCCCCTGAGGTTATCATGGACAAGGGCTACTCTGGG
 GCTACTGCCGATTTGTGGTCATGCGGTGTTATTTTATATGTACTGATGGCTGGATACT
 TGCCATTTGAGGAGCCCACAATCATGGCACTTTACAAGAAGATTTACCGAGCACAGT
 TCTCTTGGCCTCCTTGGTTCTCGTCAGGAGCCCGGAAATTAATCTCAAAGATACTGG

ATCCCAATCCAAGAACTCGCATTTCTGCATCTCAAATTTATAAAAATGATTGGTTTA
 AGAAAGGATATACTCCAGCCCAGTTTGACAGAGAAGTTGATGTCAACCTTGACGAT
 GTGAATGCTATCTTTAGTTGCTCACAGGAACATATGGTTGTGCGAAAGGAAGGAAAC
 AAAGCCGGTGTCAATGAATGCTTTCGAGCTTATCTCCATGTCATCAGGGCTCAACCT
 CTCCAGCCTCTTCGAGACGAAAGAGATTCTGAAAAGGAGGACACTAGGTTTACGA
 GTAAGAAGTCTGCGAAGGAGATCATCTCTTCAATTGAGGAAGCTGCAAAGCCCTTA
 GGGTTCAACGTTTTGAAACGTGATTTCAAGCTGAAACTACAAGGTCAGCTGGGGAG
 GAAGGGACCTCTGTCAGTTTCAACTGAGGTGTTTGAGGTGGCACCTTCTCTTTACAT
 GGTTGAGTTACAGAAGAACAGCGGCGATACGTTGGAGTACAATAACTTTTATAAGA
 ATCTTTCCAAGGGTCTCAAAGACATCGTGTGGAAAGCAGACCCTATTCCTACAAGTG
 AGCAAAAGTAGAAAGCTTCCGCTACGGCTTTAATATATGCCCGTGCTGTGAAGTGCC
 CGAGCTCAT

FIGURA 2B

Secuencia de nucleótidos de la PK-2 de longitud completa de *Physcomitrella patens* (SEQ ID
 NO: 5)

ATCCCGGGCGCGCACAAATTTAGTTGGGAATCAAGCTGGAAAAGTTTTTCTCTAG
 TGGCTGAGCTGGCCAAGGAACTGGCCATTGGACTCTTCTTACAACTAGTCAAGTCC
 GTATTGTAGGAGCCAATGCTGTTGAACCCAACCAGGACAAGACAAACGTGAGTGCA
 GATTTTGTGCCGCTAGATACCAAATTTGATCACACCACTGCCCATCTTCTTGCTACAC
 GCTTGTGGAGTGGTGAAGTTCCATTGAACAAGACACTATTTGGAACCTACTATGTTA
 TTTATATAATTTACCCAGGTCTTCTCCCTCTCCACCTCCCCAGTTCCCTGGGAATAT
 TTCACCTTCAGGTCCTGTCAACCAGCTTCCATCTGGGGTGGATCCAAATAAAACAAA
 TCATAAACTCAGTTCGGGAATGATTACCGTGATTGCTTTGGCTTCGGTTATGGGTGT
 ATTGTTATTTATTGGGATTGTATGGCTCATTCTCCTACGCCGCAGCCTGGATGAGAA
 AACTTCGCCTTCGGTTGTGGTCTCTACATGCTTATTTCAACCCTAAACCTGAAGGT

GTGCAACTGATCCAAGTGAATGCTTATTTCAACTCTAAACCTGAAGGGTCA
TTATTATCAGGAAGTATGGCAAGCTCTACAACGATTTCTTATGGATCTAGCATGGCC
AACTACACATGCACTGCTAAGACGTTCACTTTAGCAGAATTAGAAAGAGCAACAGA
TAATTTTAGACCTGATAATGTAGTCGGCGAAGGGGGCTTTGGTCGAGTTTACCAAGG
GGTACTTGATAGTGGTATTGAAGTGGCTGTAAAGGTGCTGACAAGGGATGATCATG
AGGGTGGTCGTGAGTTTGTTCGGAGGTAGAAATGTAAAGCAGATTGCACCATCGC
AACCTTGCGAAGCTAATTGGCATCTGTACTGAGGAAATACGATGTTTGGTTTATGAG
CTCATCACGAACGGGAGCGTGGAATCTCACTTGCGATGGTCTAGATAAATACACTGCT
CCTCTCAACTGGGATGCACGTGTTAAAATTGCATTAGGAGCTGCTCGTGGGCTGGCA
TACCTGCACGAAGATTCTCAGCCTAGGGTTATTCATAGAGATTTTAAAGGAAGCAAC
ATTCTACTTGAGGACGATTACACTCCAAAAGTATCTGATTTTGGTCTAGCTAAATCG
GCAACTGAGGGAGGCAAGGAGCATATTTCCACTCGAGTAATGGGCACGTTTGGATA
TGTGGCTCCTGAATACGCAATGACAGGACATTTGCTTGTGAAGAGTGACGTTTATAG
TTATGGAGTGGTACTGCTCGAGCTCCTCTCGGGGCGTAAACCCGTGGATATGTCTCA
ACCACCTGGACAAGAGAATCTAGTTACTTGGGCACGCCCACTCCTTACAAGCAAGG
ATGGACTAGAGCAGCTTGTGGATCCTTACCTCAAAGACAACCTTCCATTTGACCACT
TTGCGAAGGTAGCTGCAATAGCGTCCATGTGTGTACAACCTGAAGTCTCTCATCGAC
CATTCATGGGCGAGGTGGTGCAGGCCTTGAAACTTGTGTGCAATGAAACAGAAGCC
AAAGACGTCGGACAGGCTAAAGGAACAGTTTCTCCCACTTCTGACTTGGCCGAAAC
ACAGAACACAGGATTTCTGCGGGACGCCACCTTTATTAGTGTTGATTACGACTCGGG
GCCCTTCGAAACCTTGGATCTTGAACAGCGAAAGCGGAAACCTCTTCTGCTTCGGC
TACTATGAGTGGCTCTGGAGGGTTCTTACGACAACCTTTCGGATTCATTCAGACGCTA
CAGTGTTTCTGCCCCCTCAAAGGCTGCTTCACTGCCAAGAACTTCATGGTATGCACT
GGGTAGTTCAAAACCTGTAGGAAGCATGAGTGAGGCTAGAGCAGCTAGATTCTTAG
ATCCTCAACGCAGGAGATTTTACGGGTTTTGGCCCTAATTCTTCCACGCCTGTTTTGA
CCTTTGCGGGCGTTAACGCAA

FIGURA 2C

Secuencia de nucleótidos de la MPK-1 de longitud completa de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO: 6)

ATCCCGGGCGGTTTGGACACGATGTTCCAGTCCTTTATATATATGAGACACAGCTGG
 AGAAAACAGTGCAAGGGAAAGGTCTTGGAAAGTTTTTAATGCAGTTACTTGAGTTG
 GTTGCACGAAAGAACAACATGAAAGCAGTACTTTTAGCTGTGCATAAAAGAAACAC
 AAGGGCGCTAACCTTTTACAATGAACGTTTAGGGTATAAGTTGGCAATTAGATCAGC
 ATCAAGTCAACAAAGCACACAACTGTCACAGAGATGAAATACGAGATTCTTTGTA
 AAACCTTTCGATGTGGAGTACACAGCCGTTGTAGAGGAACGGCAAGGGGACATGGAT
 TGTGAATCACGTGAAGAGAGCGCTGGAGAAGCAAGCTGCCAGACAGTTGACGCAGA
 GGATCAGGTTTTGGATGACTCACGTCCTGATACAGAATGTGAGTCACGGATCGAGA
 GCGTGCCAAACACCCTACAAGGAATGAAGTACACACAGTACAATGTGAGGGGCGAC
 AAGTTTGAAGTCTACGACAAGTATGTAATGATTGGTCCCATTGGTCATGGAGCTTAT
 GGCGATGTGTGTGCTTTCACGAACAGGGAGACAGGGGAGAAAAGTGGCCATAAAGAA
 GATTGGAAACGCATTTTCAAGAACAATACTACAGCGAGGCGCACACTTAGAGAGATTT
 TGTGCTCCGCCATACTGAACACGACAACATCATTCCCATCAGAGATATCATTGTGC
 CTGCTAACATTGAGGACTTTCATGATGCCTATATCGCAAATGAGCTCATGGATACAG
 ACCTTCACCAGATAGTGAGGTCAACAAAACCTTGACGAATACCATTGCCAGTTCCTGC
 TTTACCAGCTGTTGAGGGGTCTCAAATACATCCACTCTGCCAATATATTGCACCGTG
 ACCTGAAGCCCAGTAATCTCCTCATCAATTGCAACGACTGTCTACTCAAGATTTGTG
 ATTTTGGCTTGGCTCGAACATCTGCAGAGGATGACTTCCTTACGGAGTATGTTGTTA
 CTCGACCATATCGAGCTCCAGAGCTCTTGCTTGGGAGCCGAATGTACACAGCGGCTG
 TTGATATGTGGTCAGTGGGCTGCATCTTCATGGAGATGCTTACAGGACAACCTTTGT

TTCCAATCCGGTCAAGGCAAGGGCATCCCGTGAATCATTGAAACCCATCACGGAG
 CTTCTAGGAACACCCGATGCTTCGGACCTGTCGTTTCTGCAGAATCCAGATGCTCGG
 CAAAGAATCCAAATGGCTTTGTTAGGTCAGGAAAGGAAGCCTTTGTTTTCGAGGTTT
 CCTCAAACGTCTGCAATAGCTTGTGACTTAGCGGAGAAGATGCTGAGGTTTAACCCA
 TCCAACAGAATAACTGCGGAAGAGGCCTTGGCCCATCCTTACTTGGCAGCGCTTCAC
 GACCTAAGTGATGAGCCAACGTGTCATCTTATGTTTCGACTTCGATGCTTACCTTCCCA
 GCCTAACAGTTGAGCATGTGAAAACCTTATCTGGAGGGAAGCTACACTTATCAACG
 TCCAGTAATCGCCATAAAGATGTATCGGACCAGATGTCGCTGCACCAATTGGCAAA
 GCTTAAGGGTTGAGGGACTTAAACGCGGTTAGTTAACGCAA

FIGURA 3A

Secuencia deducida de aminoácidos de PK-1 de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO: 7)
 MPTTNVERTRVGKYDLGKTLGEGTFAKVKVAKHIDTGHTVAIKILDKEKILRHKMVEQI
 KREISTMKLVKHPYVVQLLEVMASTRKIYIVLEYVTGGELFNKIAQQGRLEDEARKYF
 QQLIDAVDYCHSRQVYHRDLKPENLLDSKGNLKISDFGLSALPQQFREDGLLHTTCGT
 PNYVAPEVIMDKGYSGATADLWSCGVILYVLMAGYLPFEPTIMALYKKIYRAQFSWPP
 WFSSGARKLISKILDPNPRTRISASQIYKNDWFKKGYTPAQFDREVDVNLDVNAIFSCS
 QEHMVVERKETKPVSMNAFELISMSSGLNLSSLFETKEIPEKEDTRFTSKKSAKEIISIEE
 AAKPLGFNVLKRDFKLKLGQQLGRKGPLSVSTEVFEVAPSLYMVELQKNSGDTLEYNN
 FYKNLSKGLKDIVWKADPIPTSEQK*

FIGURA 3B

Secuencia deducida de aminoácidos de PK-2 de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO: 8)
 MITVIALASVMGVLLFIGIVWLILLRSLDEKTSPPSVVGPLHAYFNPKEGVQLIQLRMN
 AYFNSKPEGSLLSGSMASSTTISYGSSMANYTCTAKTFTLAELERATDNFRPDNVVGE
 GFGRVYQGVLDSGIEVAVKVLTRDDHEGGREFVAEVEMLSRLHHRNLAKLIGICTEIR
 CLVYELITNGSVESHLHGLDKYTAPLNWDARVKIALGAARGLAYLHEDSQPRVIHRDFK
 GSNILLEDDYTPKVSDFGLAKSATEGGKEHISTRVMGTFGYVAPEYAMTGHLVKS
 YSYGVVLELLSGRKPVDMSQPPGQENLVTWARPLTSDKGLEQLVDPYLKDNFPFDH
 FAKVAAIASMCVQPEVSHRPFMGEVVQALKLVCNETEAKDVGQAKGTVSPTS
 DLAEQNTGFLRDATFISVDYDSGPFETLDLEQRKRKPLSASATMSGSGGFLRQLSDSFR
 RYSVSA
 PPKAASLPRTSWYALGSSKPVGSMSEARAARFLDPQRRRFYGFWP*

FIGURA 3C

Secuencia deducida de aminoácidos de MPK-1 de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO: 9)
 MQLLELVARKNNMKAVLLAVHKRNTALTFYNERLGYKLAISSASSQQSTQTVTEMK
 YEILCKTFDVEYTAVVEERQGDMDCESREESAGEASCQTVDAEDQVLDDSRPDTECESR
 IESVPNTLQGMKYTQYNVRGDKFEVYDKYVMIGPIGHGAYGDVCAFTNRETGEKVAIK
 KIGNAFQNNTTARRTLREILLRHTEDNIIPIRDIIVPANIEDFHDAYIANELMDTDLHQI
 VRSTKLDEYHCQFLYQLLRGLKYHISANILHRDLKPSNLLINCNDCLLKICDFGLARTS
 AEDDFLTEYVVTRPYRAPELLLGSRMYTAAVDMWSVGCIFMEMLTGQPLFPISRQGH
 PVNHLKPITELLGTPDASDLSFLQNPDAQRQIMALLGQERKPLFSRFPQTSIAICDLAEK
 MLRFNPSNRITAEALAHPLYAALHDLSDEPTCHLMFDFDAYLPSLTVEHVKTLIWREA
 TLINVQ*

FIGURA 4

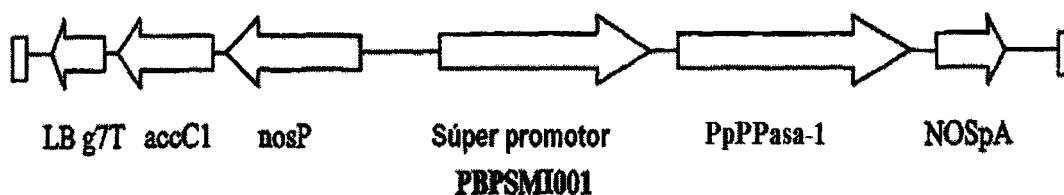


Figura 5

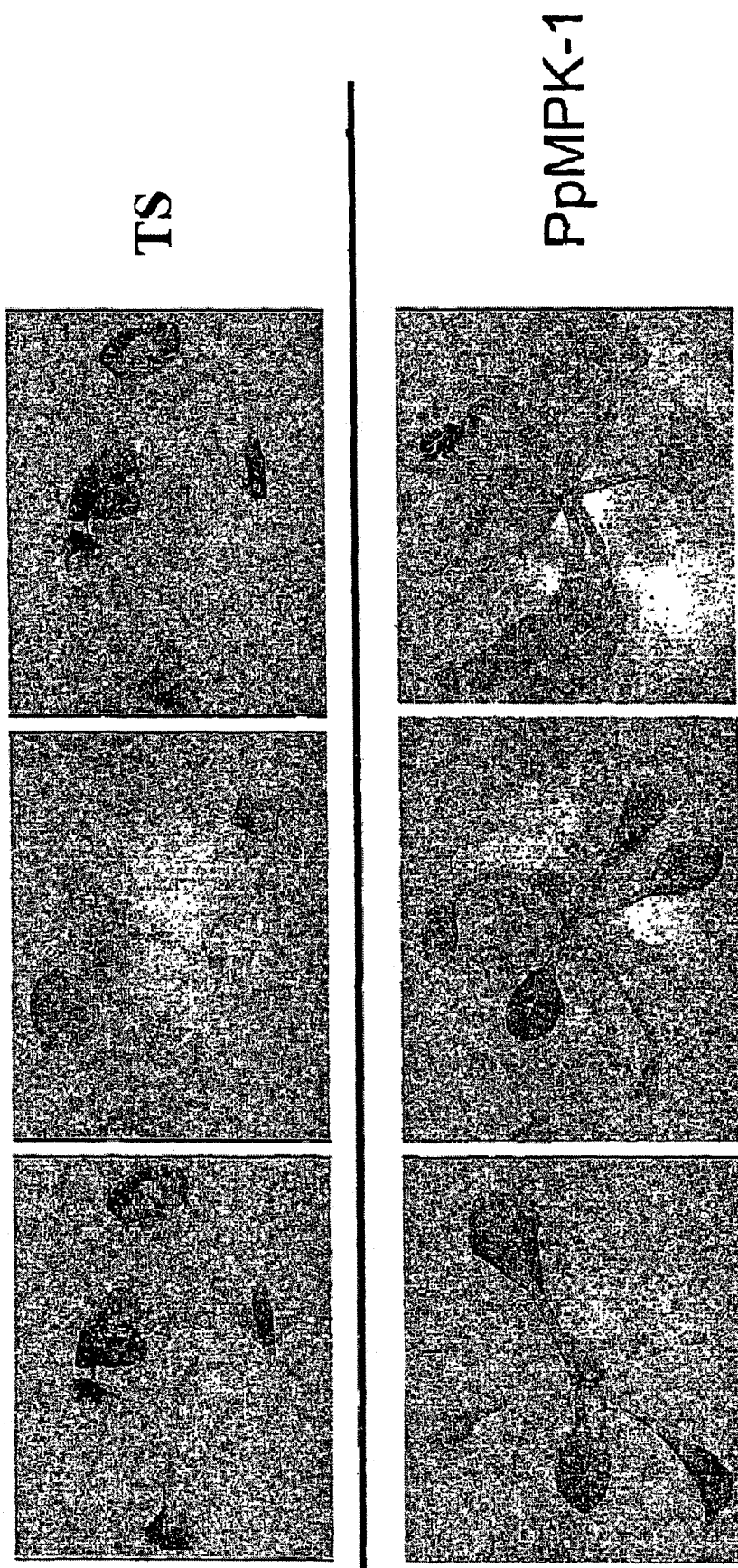


Figura 6

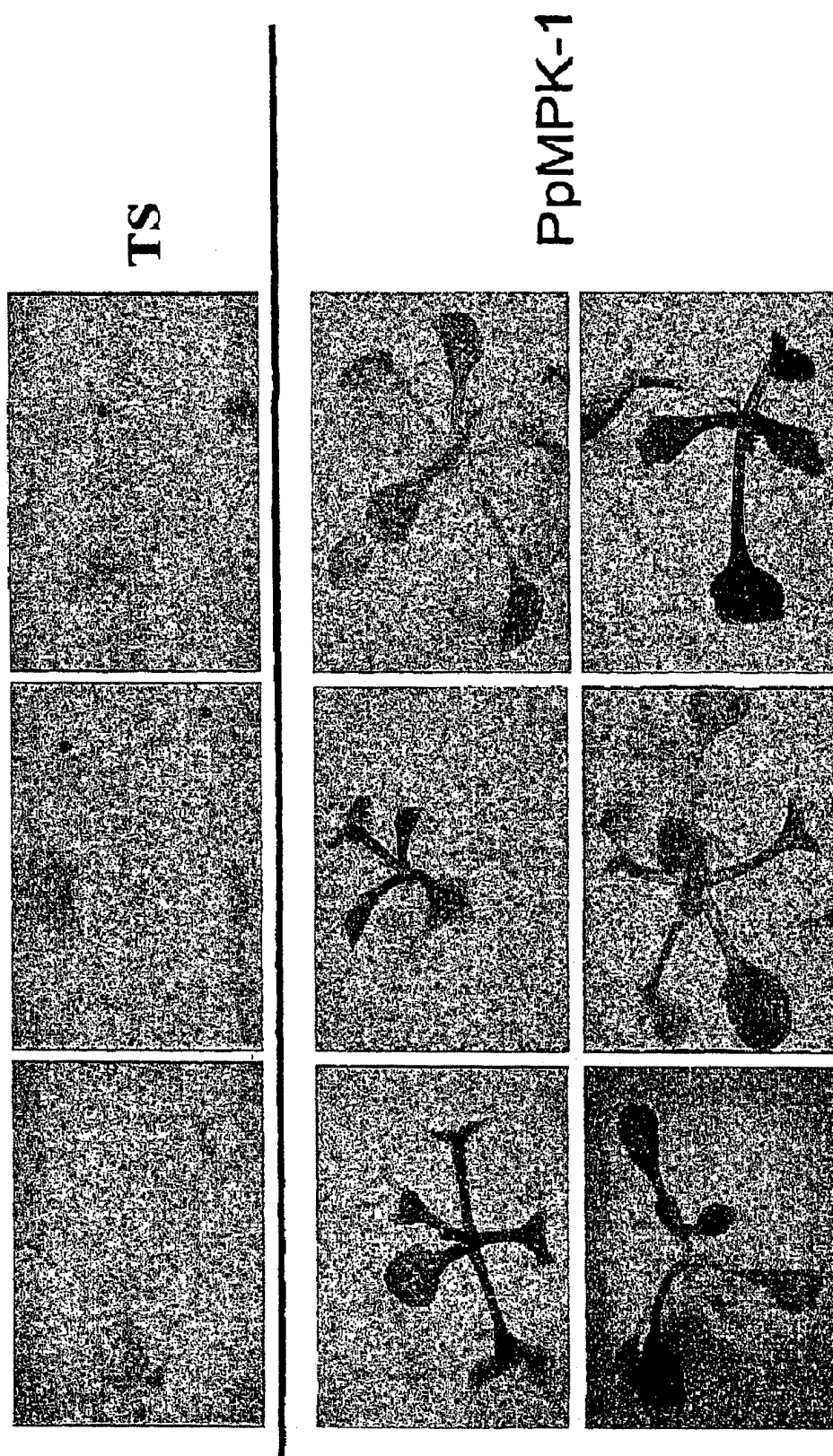


Figura 7

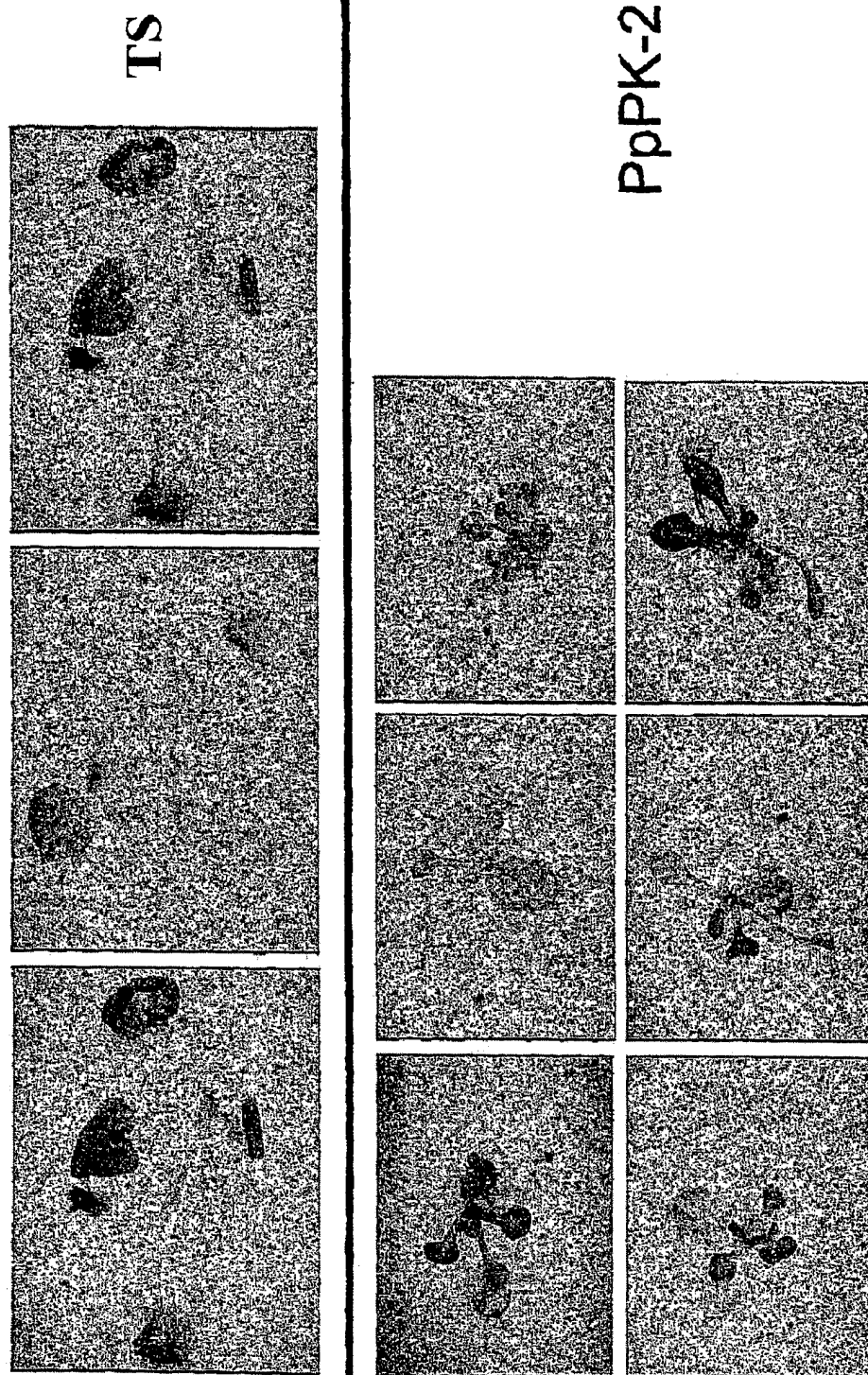


Figura 8

