



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 134 155**

⑫ Número de solicitud: 009702085

⑤① Int. Cl.⁷: C12N 15/53
A01H 1/00

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫② Fecha de presentación: **07.10.1997**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.09.1999**

Fecha de concesión: **25.09.2000**

⑫⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.11.2000**

⑫⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.11.2000

⑦③ Titular/es: **Universidad de Málaga**
Plaza de El Ejido, s/n
29071 Málaga, ES

⑦② Inventor/es: **Valpuesta Fernández, Victoriano;**
Botella Mesa, Miguel Angel y
Quesada Felice, Miguel Angel

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Método para conferir a plantas glicófitas tolerancia al estrés osmótico, hídrico y salino, mediante la utilización de genes que codifican proteínas con actividad peroxidasa.**

⑤⑦ Resumen:

Método para conferir a plantas glicófitas tolerancia al estrés osmótico, hídrico y salino, mediante la utilización de genes que codifican proteínas con actividad peroxidasa.

Para ello se introduce en el genoma de la planta la secuencia nucleotídica correspondiente al marco abierto de lectura del gen de peroxidasa neutra de tomate TPX1 o del gen de peroxidasa básica de tomate TPX2, utilizando el método de transformación mediada por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Las plantas transformadas expresan el transgen y muestran una respuesta significativa de tolerancia al estrés osmótico, hídrico y salino en diferentes estadios de su desarrollo.

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

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 134 155 B1

DESCRIPCION

Método para conferir a plantas glicófitas tolerancia al estrés osmótico, hídrico y salino, mediante la utilización de genes que codifican proteínas con actividad peroxidasa.

5 **Estado de la técnica**

En la actualidad existe un problema de crecimiento de plantas de interés agronómico en condiciones adversas de estrés osmótico, siendo éste provocado bien por un exceso de sales inorgánicas en el suelo o el agua de riego, o bien por un defecto de agua que se refleja en un gradiente osmótico desfavorable para el crecimiento de la planta.

Este problema se ha intentado resolver mediante la investigación dirigida a la mejora de la calidad del suelo y del agua o mediante la investigación dirigida a la obtención de plantas cultivables tolerantes al estrés osmótico. En el primer caso los costes son elevados y los resultados positivos sólo parciales. En el segundo caso, por, programas de mejoras de especies cultivadas por métodos tradicionales también se han obtenido resultados parciales. Concretamente, los únicos resultados positivos encontrados en la bibliografía de la modificación genética de una especie vegetal por introducción de un gen de otra especie son dos: uno publicado en 1993 (revista, Science 259: 508-510) y otro publicado en 1996 (revista Plant Physiology 110: 249-257). En el primer caso introduce en tabaco un que codifica la proteína manitol-1-fosfato deshidrogenasa y en el segundo se introduce en arroz un gen que codifica, una proteína de las denominadas LEA del grupo 3 (concretamente HVA1).

Los genes cuya utilización para la mejora de especies vegetales de plantas glicófitas en su resistencia al estrés osmótico, hídrico y salino reivindicamos son el TPX1, que codifica una peroxidasa neutra de tomate, del que hemos clonado el cDNA y cuya secuencia de nucleótidos se encuentra en la base de datos del GenBank con el número de acceso L13654, el TPX2, que codifica una peroxidasa básica de tomate, del que hemos clonado el cDNA y cuya secuencia de nucleótidos se encuentra en la base de datos del GenBank con el número de acceso L13653, y por extensión cualquier gen que codifica una proteína con actividad peroxidasa, clasificadas como EC 1.11.1.7, de acuerdo con la recomendación del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica, de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), sobre la base que catalizan la misma reacción que los productos de los genes TPX1 y TPX2.

35 **Breve descripción**

La patente que se propone es el procedimiento de utilizar el gen TPX1, el gen TPX2 o cualquier gen que codifica una proteína con actividad peroxidasa, sobreexpresado en una planta que presente problemas de supervivencia en condiciones de estrés salino ocasionado ya sea por el alto contenido de NaCl en el agua de riego, o en el suelo en que se cultiva, para incrementar su nivel de tolerancia a dichas condiciones adversas de cultivo. El procedimiento es igualmente válido para aquellas situaciones de cultivo de la planta en que el déficit de agua ocasione un estrés osmótico en la misma.

Básicamente consiste en introducir en el genoma de la especie vegetal cuya resistencia al estrés salino y/u osmótico se quiere mejorar, de la secuencia de nucleótidos completa de lo que se denomina fase abierta de lectura del gen, es decir de la secuencia que va a ser reconocida por la especie receptora y traducida a proteína, según el código genético de plantas superiores, pues en definitiva será la proteína la que deberá conferir la mejora a la especie receptora.

En nuestro caso esta secuencia corresponde al gen TPX1 o al gen TPX2 y es identificada inequívocamente en las secuencia de cDNA que hemos depositado en la base de datos GenBank. Para la correcta traducción del gen introducido a proteína en la especie vegetal transformada se necesita además unir en el denominado extremo 5', región que le precede, de la fase abierta de lectura del gen a introducir, en nuestro caso TPX1 ó TPX2, una secuencia de las denominadas promotoras, que será la que determine la expresión, y consiguientemente la actividad, del gen introducido. En nuestro caso hemos introducido la región promotora denominada 35S y procedente del virus del mosaico de la coliflor, sin embargo el resultado sería el mismo utilizado otro promotor de los conocidos como promotores potentes y asequibles actualmente a la comunidad científica. Finalmente, la secuencia de nucleótidos anteriormente descrita para introducir en la especie vegetal a transformar, debe ir seguida, en su denominado extremo 3', por otra secuencia que posibilite la correcta terminación de su lectura, transcripción y traducción en la especie receptora. En nuestro caso hemos utilizado la correspondiente a la región terminadora del gen de la subunidad pequeña de la ribulosa bifosfato carboxilasa de guisante (RBS). Igualmente la utilización de otro terminador procedente de otros genes reconocibles por plantas superiores para ser expresados, sería

igualmente útil.

Una vez introducido el gen en la especie vegetal receptora, por algunos de los procedimientos actualmente conocidos o que se puedan conocer en el futuro, se comprueba que el gen foráneo se ha integrado en el genoma de la especie receptora, y que se expresa según los mecanismos propios de esta especie. Es decir, se transcribe, se traduce, y la proteína sintetizada es funcional.

Descripción detallada

En la obtención de las plantas transgénicas de tabaco sobreexpresando el gen TPX1 de una peroxidasa de tomate se empleó el siguiente procedimiento.

La secuencia completa de nucleótidos, correspondiente a la denominada fase abierta de lectura del gen TPX1 de tomate es la que se detalla en la lista de secuencias con el número 1.

A dicha secuencia, en forma de doble hebra complementaria, se le añadieron unos oligonucleótidos en los extremos para generar los sitios de restricción únicos *Xho*I y *Sac*I. La adición de dichos oligonucleótidos se hizo de la siguiente manera:

La secuencia de nucleótidos correspondiente al marco abierto de lectura del gen TPX1 se encontraba insertada en el vector plasmídico BluescriptII en el sitio de restricción único *Eco*RI de dicho plásmido. La amplificación de la región correspondiente a dicha secuencia de nucleótidos se hizo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa utilizando como cebadores dos oligonucleótidos con secuencia solapantes con las que flanqueaban la del TPX1 y algunos nucleótidos adicionales que permitían generar un DNA que era reconocido en sus extremos por las enzimas de restricción arriba indicadas, *Xho*I y *Sac*I. Las secuencias completas de los oligonucleótidos empleados como cebadores fueron:

Oligonucleótido 1:5'-AAC TCG AGA TGG CTT CAT TTA GCT ATT T-3'

Oligonucleótido 2:5'-TCT CGA GCT CTT AAC TAT TCA CAA ATG CAC -3'

La secuencia de DNA amplificada, correspondiente al marco abierto de lectura del gen TPX1 y regiones adyacentes anteriormente indicadas, se digirió con las enzimas de restricción *Xho*I y *Sac*I, y posteriormente se insertó en el vector plasmídico binario de *Agrobacterium tumefaciens* pKYLX71, cuyas características se describen en la siguiente publicación Gene, volumen 61, páginas 1-11, en 1987.

El vector binario pKYLX71 con el marco abierto de lectura del gen TPX1 insertado en el sentido de lectura entre el promotor 35S de dicho vector binario y el terminador RBS, dentro de la región T del plásmido, fue introducido en la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación. El vector binario tenía en la región T el gen que codifica la neomicina fosfotransferasa cuya expresión confiere resistencia al antibiótico kanamicina, y que se utilizó como marcador de selección.

Con dicha cepa se infectaron trozos de cotiledones de tabaco (*Nicotiana tabacum*) cultivar Winsconsin 38, a partir de los cuales se regeneraron plantas enteras por métodos convencionales.

Las plantas regeneradas fueron analizadas para comprobar que el DNA correspondiente al marco abierto de lectura del gen TPX1 se había insertado en el genoma del tabaco y dicho gen era activo en su expresión. Los análisis realizados fueron tanto de la actividad enzimática peroxidasa, presencia del isoenzima codificado por el TPX1 verificado por isoelectroenfoque, y análisis de concentración de RNA mensajeros de TPX1 en el tabaco transgénico. Estos análisis mostraron inequívocamente que el gen TPX1 de tomate era activo en el tabaco transgénico. La medida de la actividad peroxidasa, extraída y medida por métodos convencionales y estandarizados, de hojas de plantas transgénicas y de plantas control, dieron los resultados que se presentan en la Tabla 1.

ES 2 134 155 B1

Tabla 1:

Actividades peroxidasa de extractos de hojas de tabaco de plantas transgénicas con la construcción TPX1 (I-7.7 y I-7.8), transgénicas con el plásmido pKYLX71 (pKY) y sin transformar (W-38). La actividad peroxidasa se evaluó en extractos de proteínas solubles y unidas iónicamente a pared celular (extraídas con 1 M KCl) y usando α -dianisidina como sustrato. Una unidad de actividad (U) corresponde a un incremento de una unidad de densidad óptica a 460 nm por minuto. Las roteínas se midieron por el método de Bradford, utilizando como patrón albúmina de suero bovino.

Muestra	U/ml extracto	U/totales	U/g hoja	U/mg proteína
W-38	15,0	30,0	39,5	116,7
pKY	9,2	22,0	26,2	54,2
1-7.7	11,4	28,4	46,6	120,1
1-7.8	5,1	12,9	29,2	74,2

Aunque las medidas de actividad no dieron superiores en las plantas transformadas con TPX1 respecto a los controles sin transformar (W-38) y transformados con el vector binario sin inserto (pKY) sin embargo la, electroforesis por isoelectroenfoque dio una banda de actividad peroxidasa en el gel, ausente en los controles, que corresponde al producto de expresión del TPX1 insertado.

Las semillas de tabaco transgénico, procedentes de transformantes independientes y homocigóticas con respecto al transgén TPX1, se mostraron resistentes a la germinación en placa de agar en medio MS (Murashige y Skoog) al que se le añadió NaCl en una concentración 250 mM o manitol a concentración de 470 mM. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2 y en la Tabla 3.

Tabla 2:

Porcentajes de germinación de semillas de plantas transgénicas de tabaco (I-7) así como de semillas de planta de tabaco transformadas con el plásmido pKYLX71 sin el gen TPX1 (pKY) en medio MS sin y con 250 mM de NaCl.

Días	Medio	pKY	I-7
11	MS	100	100
13	MS+NaCl	0	46

Tabla 3:

Porcentajes de germinación de semillas de plantas transgénicas de tabaco (I-7) así como de semillas de plantas de tabaco sin transformar (W-38) en medio MS sin y con manitol 470 mM

Días	Medio	W-38	I-7
11	MS	100	100
35	MS+Manitol	3	24

En la obtención de las plantas transgénicas de tabaco sobreexpresando el gen TPX2 de una peroxidasa de tomate se empleó el siguiente procedimiento.

La secuencia completa de nucleótidos, correspondiente a la denominada fase abierta de lectura del gen TPX2 de tomate (leída desde su extremo inicial 5' hasta su extremo final 3') es la que se detalla en la lista de secuencias con el número 2.

A dicha secuencia, en forma de doble hebra complementaria, se le añadieron unos oligonucleótidos en los extremos para generar los sitios de restricción únicos *XhoI* y *SacI*. La adición de dichos oligonucleótidos se hizo de la siguiente manera:

La secuencia de nucleótidos correspondiente al marco abierto de lectura de F gen TPX2 se encontraba insertada en el vector plasmídico BluescriptII en el sitio de restricción único *EcoRI* de dicho plásmido. La amplificación de la región correspondiente a dicha secuencia de nucleótidos se hizo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa utilizando como cebadores dos oligonucleótidos con secuencia solapantes con las que flanqueaban la del TPX2 y algunos nucleótidos adicionales que permitían generar un DNA que era reconocido en sus extremos por las enzimas de restricción arriba indicadas, *XhoI* y *SacI*. Las secuencias completas de los oligonucleótidos empleados como cebadores fueron:

Oligonucleótido 1: 5'-AAC TCG AGA TGG CTA AAT TTG GTG ATT T-3'

Oligonucleótido 2: 5'-ACT CGA GCT CTT AAC TAT TCA CAG-3'

La secuencia de DNA amplificada, correspondiente al marco abierto de lectura del gen TPX2 y regiones adyacentes anteriormente indicadas, se digirió con las enzimas de restricción *XhoI* y *SacI*, y posteriormente se insertó en el vector plasmídico binario de *Agrobacterium tumefaciens* pKYLX71, cuyas características se describen en la siguiente publicación Gene, volumen 61, páginas 1-11, en 1987.

El vector binario pKYLX71 con el marco abierto de lectura del gen TPX2 insertado en el sentido de lectura entre el promotor 35S de dicho vector binario y el terminador RBS, dentro de la región T del plásmido, fue introducido en la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación. El vector binario tenía en la región T el gen que codifica la neomicina fosfotransferasa cuya expresión confiere resistencia al antibiótico kanamicina, y que se utilizó como marcador de selección.

Con dicha cepa se infectaron trozos de cotiledones de tabaco (*Nicotiana tabacum*) cultivar Winsconsin 38, a partir de los cuales se regeneraron plantas enteras por métodos convencionales.

Las plantas regeneradas fueron analizadas para comprobar que el DNA correspondiente al marco abierto de lectura del gen TPX2 se había insertado en el genoma del tabaco y dicho gen era activo en su expresión. Los análisis realizados fueron tanto de la actividad enzimática peroxidasa, presencia del isoenzima codificado por el TPX2 verificado por isoelectroenfoque, y análisis de concentración de RNA mensajeros de TPX2 en el tabaco transgénico. Estos análisis mostraron inequívocamente que el gen TPX2 de tomate era activo en el tabaco transgénico. La medida de la actividad peroxidasa, extraída y medida por métodos convencionales y estandarizados, de hojas de plantas transgénicas y de plantas control, dieron los resultados que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4:

Actividades peroxidasa de extractos de hojas de tabaco de plantas transgénicas con la construcción TPX2 (II-24, II-10 y II-32), transgénicas con el plásmido pKYLX71 (pKY) y sin transformar (W-38). La actividad peroxidasa se evaluó en extractos de proteínas solubles y unidas iónicamente a pared celular (extraídas con 1 M KCl) y usando o-dianisidina como sustrato. Una unidad de actividad (U) corresponde a un incremento de una unidad de densidad óptica a 460 nm por minuto. Las proteínas se midieron por el método de Bradford, utilizando como patrón albúmina de suero bovino.

Muestra	U/ml extracto	U/totales	U/g hoja	U/mg proteína
W-38	9,6	15,4	50,1	15,9
pKY	9,3	7,9	36,2	11,7
II-10	313,5	376,2	1.288,3	391,8
II-24	80,9	113,2	343,1	80,9
II-32	102,3	143,3	374,1	113,7

Las semillas de tabaco transgénico, procedentes de transformantes independientes y homocigóticas con respecto al transgén TPX2, se mostraron resistentes a la germinación en placa de agar en medio MS (Murashige y Skoog) al que se le añadió NaCl en una concentración 250 mM o manitol a concentración de 470 mM. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5 y en la Tabla 6.

Tabla 5:

Porcentajes de germinación de semillas de plantas transgénicas de tabaco (II-24, II-32, II-10) así como de semillas de planta de tabaco transformadas con el plásmido pKYLX71 sin el gen TPX2 (pKY) en medio MS sin y con 250 mM de NaCl.

ES 2 134 155 B1

Días	Medio	pKY	II-24	II-32	II-10
11	MS	100	100	100	100
13	MS+NaCl	0	75	71	80

Tabla 6:

Porcentajes de germinación de semillas de plantas transgénicas de tabaco (II-24) así como de semillas de plantas de tabaco sin transformar (W-38) en medio MS sin y con manitol 470 mM

Días	Medio	W-38	II-24
11	MS	100	100
35	MS+Manitol	3	67

SECUENCIA n° 1. ID.SEC.N° 1

Identidad de la secuencia: número de acceso en la base de secuencias del GenBank: L13654

Información de la secuencia:

Longitud: 1221 pares de bases

Tipo: ácido nucleico (ADN)

Número de hebras: doble

Tipo de molécula: ADN complementario

Origen: tomate (*Lycopersicon esculentum*, cultivar Pera)

Característica: Péptido señal

Localización: 46. 111

Característica: Péptido maduro

Localización: 112. 1029

Otra información: clon de ADN complementario del gen de la peroxidasa TPX1

Descripción de la secuencia:

```

GACGGATCGA TAAGCTTGAT ATCGAATTTCG CGGCCGAAAT AACAA ATG      48
Met
GCT TCA TTT AGC TAT TTG ATG AGT GTT TTG GTA TTA TGT GTA ATC ATA    96
Ala Ser Phe Ser Tyr Leu Met Ser Val Leu Val Leu Cys Val Ile Ile
-20                      -15                      -10
GGT TAT ACA AAT GCT CAA TTA GAG CTT AAT TTC TAT GCT AAA AGC TGT    144
Gly Tyr Thr Asn Ala Gln Leu Glu Leu Asn Phe Tyr Ala Lys Ser Cys
-5                      1                      5                      10
CCA AAA GCT GAG AAA ATT ATT AAA GAT TTT GTT CAG CAA CAA GTT CCT    192
Pro Lys Ala Glu Lys Ile Ile Lys Asp Phe Val Gln Gln Gln Val Pro
15                      20                      25

```

ES 2 134 155 B1

	AAG GCT CCA AAT ACT GCA GCA GCC ATA CTC AGA ATG CAT TTC CAT GAT	240
	Lys Ala Pro Asn Thr Ala Ala Ala Ile Leu Arg Met His Phe His Asp	
5	30 35 40	
	TGC TTT GTC AGG GGT TGT GAT GGA TCT GTA CTT CTC AAT TTC ACT TCG	288
	Cys Phe Val Arg Gly Cys Asp Gly Ser Val Leu Leu Asn Phe Thr Ser	
10	45 50 55	
	ACT AAC GGA AAT CAA ACT GAA AAA CTA GCT AAT CCT AAT TTG ACA TTG	336
	Thr Asn Gly Asn Gln Thr Glu Lys Leu Ala Asn Pro Asn Leu Thr Leu	
15	60 65 70 75	
	AGA GGT TTC TCA TTC ATT GAT GCT GTT AAA AGA TTA GTT GAA GCT GAA	384
	Arg Gly Phe Ser Phe Ile Asp Ala Val Lys Arg Leu Val Glu Ala Glu	
20	80 85 90	
	TGT CCG GGA GTT GTT TCT TGT GCT GAT ATT GTC GCG TTG GTT GCT AGA	432
	Cys Pro Gly Val Val Ser Cys Ala Asp Ile Val Ala Leu Val Ala Arg	
25	95 100 105	
	GAT GCA GTT GTG GCT ACG GAG GGT CCT TTT TGG AAT GTG CCA ACT GGT	480
	Asp Ala Val Val Ala Thr Glu Gly Pro Phe Trp Asn Val Pro Thr Gly	
30	110 115 120	
	AGA AGA GAT GGA ACG ATA TCA AAT GTG TCA GAA GCC AAT GGT GAT ATC	528
	Arg Arg Asp Gly Thr Ile Ser Asn Val Ser Glu Ala Asn Gly Asp Ile	
35	125 130 135	
	CCA GCA CCA ACT AGT AAC TTT ACT AGA CTG CAA CAA TCC TTC GCG AAG	576
	Pro Ala Pro Thr Ser Asn Phe Thr Arg Leu Gln Gln Ser Phe Ala Lys	
40	140 145 150 155	
	AAA GGT CTT GAT CTG AAT GAC CTG GTC CTT CTA TCA GGT GCC CAT ACT	624
	Lys Gly Leu Asp Leu Asn Asp Leu Val Leu Leu Ser Gly Ala His Thr	
45	160 165 170	
	ATT GGA GTG TCT CGT TGC TCA TCA TTT TCA GAG CGT CTA TAC AAT TTC	672
	Ile Gly Val Ser Arg Cys Ser Ser Phe Ser Glu Arg Leu Tyr Asn Phe	
50	175 180 185	
	ACC GGG GTT GTA GGT ACA CAA GAT CCA TCT CTA GAC AGT GAA TAT GCG	720
	Thr Gly Val Val Gly Thr Gln Asp Pro Ser Leu Asp Ser Glu Tyr Ala	
55	190 195 200	
60		

ES 2 134 155 B1

	GAT AAT CTC AAG TCA AGA AAA TGC AGA TCA ATC AAT GAC AAT ACT ACT	768
5	Asp Asn Leu Lys Ser Arg Lys Cys Arg Ser Ile Asn Asp Asn Thr Thr	
	205 210 215	
	ATA GTA GAA ATG GAT CCA GGT AGT TTC AAG ACA TTT GAT CTC AGC TAC	816
10	Ile Val Glu Met Asp Pro Gly Ser Phe Lys Thr Phe Asp Leu Ser Tyr	
	220 225 230 235	
	TTC AAG CTT TTG CTC AAA AGG AGA GGT CTG TTC CAA TCC GAT GCA GCA	864
15	Phe Lys Leu Leu Leu Lys Arg Arg Gly Leu Phe Gln Ser Asp Ala Ala	
	240 245 250	
	TTG ACA ACA CGT ACC TCA ACG AAA TCG TTT ATC GAG CAG CTT GTA GAT	912
20	Leu Thr Thr Arg Thr Ser Thr Lys Ser Phe Ile Glu Gln Leu Val Asp	
	255 260 265	
	GGA CCA CTC AAC GAA TTT TTC GAT GAA TTT GCT AAA TCG ATG GAG AAA	960
25	Gly Pro Leu Asn Glu Phe Phe Asp Glu Phe Ala Lys Ser Met Glu Lys	
	270 275 280	
	ATG GGA AGA GTT GAA GTT AAG ACA GGG AGT GCT GGT GAA ATC AGG AAG	1008
30	Met Gly Arg Val Glu Val Lys Thr Gly Ser Ala Gly Glu Ile Arg Lys	
	285 290 295	
	CAT TGT GCA TTT GTG AAT AGT TAAAATTGAA GTTTTAATTA ATGATTTTGT	1059
35	His Cys Ala Phe Val Asn Ser	
	300 305	
	GTTCCTGTATT TATGATTTAT GTGTACTGTT GACTGTTGAG TTAATTGTTT GGTGTAATAT	1119
40	GTATCATGTA CTTTTTTATA TTTATTTCAA TTGTAATTTT GCAGTTTGTGTT GGTGTTTTGT	1179
	AGCAATAAAA GTGATGTGAT GAAGAGCATT TCCAAAAAAT TG	1221

45 SECUENCIA n° 2. ID. SEC.N° 2

La secuencia completa de nucleótidos, correspondiente a la denominada fase lectura del gen TPX2 de tomate es la siguiente (leída desde su extremo inicial 5' extremo final 3'):

50 Identidad de la secuencia: número de acceso en la base de secuencias del GenBank:L13653

Información de la secuencia:

Longitud: 1244 pares de bases

55 Tipo: ácido nucleico, (ADN)

Número de hebras: doble

60 Tipo de molécula: ADN complementario

Origen: tomate (*Lycopersicon esculentum*, cultivar Pera)

ES 2 134 155 B1

Característica: Péptido señal

Localización: 5. 79

Característica: Péptido maduro

Localización: 79. 990

5 Otra información: clon de ADN complementario del gen de la peroxidasa TPX2

Descripción de la secuencia:

10	TAA ATG GCT AAA TTT GGT GAT TTG AGT AAC TTT CTA GTG TTG TGT ATT	48
	Met Ala Lys Phe Gly Asp Leu Ser Asn Phe Leu Val Leu Cys Ile	
	-25 -20 -15	
15	CTA GTA GGA ATA GCG GGT TCT AGC TAT GGT CAG TTG CAG CTT AAC TTC	96
	Leu Val Gly Ile Ala Gly Ser Ser Tyr Gly Gln Leu Gln Leu Asn Phe	
20	-10 -5 1 5	
	TAT GCA AAG AGC TGT CCG CAA GCA GAA AAG ATA ATT CAA GAT TAT GTG	144
	Tyr Ala Lys Ser Cys Pro Gln Ala Glu Lys Ile Ile Gln Asp Tyr Val	
25	10 15 20	
	TAT AAG CAA ATC CCA AAC GCT CCA TCT CTT GCA GCT GCA TTG CTC AGA	192
	Tyr Lys Gln Ile Pro Asn Ala Pro Ser Leu Ala Ala Ala Leu Leu Arg	
30	25 30 35	
	ATG CAT TTC CAC GAT TGC TTT GTC AGG GGT TGT GAT GGT TCT GTA CTC	240
	Met His Phe His Asp Cys Phe Val Arg Gly Cys Asp Gly Ser Val Leu	
35	40 45 50	
	1CTG AAC TTC ACT TCG AGC ACT AAA AAC CAG ACT GAA AAA GTA GCA GTT	288
	Leu Asn Phe Thr Ser Ser Thr Lys Asn Gln Thr Glu Lys Val Ala Val	
40	55 60 65 70	
	CCT AAT CAA ACG CTG AGA GGC TTC TCA TTC ATT GAT GGT GTG AAG AAA	336
	Pro Asn Gln Thr Leu Arg Gly Phe Ser Phe Ile Asp Gly Val Lys Lys	
45	75 80 85	
	GCA GTA GAA GCT GAG TGC CCT GGA GTT GTC TCT TGT GCG GAT ATT GTT	384
	Ala Val Glu Ala Glu Cys Pro Gly Val Val Ser Cys Ala Asp Ile Val	
50	90 95 100	
	GCC TTG GTT GCT AGA GAC TCT GTT GTG GTC ACG GGA GGC CCT TAC TGG	432
	Ala Leu Val Ala Arg Asp Ser Val Val Val Thr Gly Gly Pro Tyr Trp	
55	105 110 115	
	AAG GTT CCA ACT GGT AGA AGA GAT GGG GAG ATA TCA AAC GCC TCG GAA	480
	Lys Val Pro Thr Gly Arg Arg Asp Gly Glu Ile Ser Asn Ala Ser Glu	
60	120 125 130	

ES 2 134 155 B1

	GCC TTG GCA AAC ATC CCT CCT CCG ACA AGT AAC TTT TCC AGT CTC CAG	528
	Ala Leu Ala Asn Ile Pro Pro Pro Thr Ser Asn Phe Ser Ser Leu Gln	
5	135 140 145 150	
	ACG TCT TTT GCC AGC AAG GGT CTT GAC CTA AAA GAC TTG GTA CTA TTG	576
	Thr Ser Phe Ala Ser Lys Gly Leu Asp Leu Lys Asp Leu Val Leu Leu	
10	155 160 165	
	TCT GGT GCA CAT ACC ATT GGA GTC TCT CAT TGC CCG TCA TTT TCA TCA	624
	Ser Gly Ala His Thr Ile Gly Val Ser His Cys Pro Ser Phe Ser Ser	
15	170 175 180	
	CGT TTA TAC AAT TTT ACT GGA GTT TCG GGC AAA AAG TCC TCT CTA GAC	672
	Arg Leu Tyr Asn Phe Thr Gly Val Trp Gly Lys Lys Ser Ser Leu Asp	
20	185 190 195	
	AGC GAA TAT GCA GCT AAT CTT AAG ATG AAG AAA TGC AAA TCC ATC AAT	720
	Ser Glu Tyr Ala Ala Asn Leu Lys Met Lys Lys Cys Lys Ser Ile Asn	
25	200 205 210	
	GAC AAC ACC ACA ATT GTC GAA ATG GAT CCT GAA AGT TCC AGT AAA TTT	768
	Asp Asn Thr Thr Ile Val Glu Met Asp Pro Glu Ser Ser Ser Lys Phe	
30	215 220 225 230	
	GAT CTT AGC TAC TTC CAG CTT GTG CTC AGA AGA AAA GGG CTG TTC CAA	816
	Asp Leu Ser Tyr Phe Gln Leu Val Leu Arg Arg Lys Gly Leu Phe Gln	
35	235 240 245	
	TCT GAT GCA GCC TTG ACA ACA AGT GCG ACA ACA AAG TCA TTC ATC AAC	864
	Ser Asp Ala Ala Leu Thr Thr Ser Ala Thr Thr Lys Ser Phe Ile Asn	
40	250 255 260	
	CAG CTA GTA CAA GGA TCA GTG AAA CAA TTC TAT GCC GAA CCG GGA GCA	912
	Gln Leu Val Gln Gly Ser Val Lys Gln Phe Tyr Ala Glu Pro Gly Ala	
45	265 270 275	
	ATG GAG AAA ATG GGA AAG ATT GAA GTG AAG ACC GGC TCT GCT GGT GAG	960
	Met Glu Lys Met Gly Lys Ile Glu Val Lys Thr Gly Ser Ala Gly Glu	
50	280 285 290	
	ATT AGG AAG CAC TGT GCA GCT GTG AAT AGT TAAGAGCTAG CTTTCTTTTC	1110
	Ile Arg Lys His Cys Ala Ala Val Asn Ser	
55	295 300	
60		

ES 2 134 155 B1

5 CTTTGTTC CAACTTCAA TATTCGTGTG TTTGTATTTT GTATGTAACC TTTGTGTGAA 1170
TGATTCGCGA TAACATCCAT CATTTCTTTT TGTGCTTATT CTTGTATATT GGTGGTTTCT 1230
CTTGAAATAT TAAA 1244

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para conferir a plantas glicófitas tolerancia al estrés osmótico, hídrico y salino **ca-**
racterizado por introducir, mediante transformación con *Agrabacterium tumefaciens*, un gen que exprese
5 una proteína con actividad peroxidasa (E.C. 1.11.1.7).

2. Procedimiento para conferir a plantas glicófitas tolerancia al estrés osmótico, hídrico y salino, según
la reivindicación 1, **caracterizado** porque las plantas se transforman con el gen TPXI definido por la
ID.SEC.n° 1 que codifica una actividad peroxidasa de tomate.

3. Procedimiento para conferir a plantas glicófitas tolerancia al estrés osmótico, hídrico y salino, según
la reivindicación 1, **caracterizado** porque las plantas se transforman con el gen TPX2 definido por la
ID. SEC.n° 2 que codifica una actividad peroxidasa de tomate.

4. Procedimiento para conferir a plantas glicófitas tolerancia al estrés osmótico, hídrico, y salino,
según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la planta transformada es *Nicotiana tabacum* cultivar
Wisconsin 38.

5. Plantas transgénicas que tienen tolerancia al estrés osmótico, lúdrico y salino obtenidas según
procedimiento de reivindicaciones 1 a 4.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 134 155
⑫ N.º solicitud: 9702085
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 07.10.97
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: C12N 15/53, A01H 1/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ROXAS, V.P. et al. "Engineering stress tolerance in transgenic plants", ACTA PHYSIOLOGIAE PLANTARUM, 1997, Vol. 19, N° 4, páginas 591-594, todo el documento.	1
Y	Todo el documento.	2-5
Y	BOTELLA, M.A. et al. "Characterization and in situ localization of a salt-induced tomato peroxidase mRNA", PLANT MOLECULAR BIOLOGY, 1994, Vol. 25, páginas 105-114, todo el documento.	2,3,5
Y	BOTELLA, M.A. et al. "Nucleotide sequences of two peroxidase genes from tomato (Lycopersicon esculentum)", PLANT PHYSIOL., 1993, Vol. 103, páginas 665-666.	4
A	BOTELLA, M.A. et al. "Induction of a tomato peroxidase gene in vascular tissue", FEBS. LETTERS, 1994, Vol. 347, páginas 195-198, todo el documento.	1-5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
10.08.99

Examinador
J.L. Vizán Arroyo

Página
1/1