

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/034862 A1

(43) Fecha de publicación internacional
1 de abril de 2010 (01.04.2010)

PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A01N 33/24 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01) A01H 3/04 (2006.01)

Tecnología Agraria y Alimentaria (inia), Ctra. de la
Coruña, km. 7,5, E-28040 Madrid (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2009/070383

(74) Mandatario: PONS ARIÑO, Ángel; Glorieta de Rubén
Dario, 4, E-28010 Madrid (ES).

(22) Fecha de presentación internacional:
16 de septiembre de 2009 (16.09.2009)

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS,
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200802652
18 de septiembre de 2008 (18.09.2008) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo
US): CONSEJO SUPERIOR DE
INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (35%)
[ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y
TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA
(INIA) (65%) [ES/ES]; Ctra. de la Coruña, km. 7,5,
E-28040 Madrid (ES).

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG,
KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS,
IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): SALINAS
MUÑOZ, Julio [ES/ES]; Centro de Investigaciones
Biológicas (cib), C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040
Madrid (ES). CATALÁ RODRÍGUEZ, Rafael [ES/ES];
Centro de Investigaciones Biológicas (cib), C/ Ramiro de
Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). LÓPEZ COBOLLO,
Rosa [ES/ES]; Instituto Nacional de Investigación Y

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción
(Regla 5.2(a))

(54) Title: RCI5 TRANSGENIC PLANT RESISTANT TO COLD AND SALINE STRESS PRODUCING TMAO, ELEMENTS NECESSARY FOR ITS OBTAINMENT, AND USE OF COMPOSITIONS CONTAINING TMAO TO INDUCE TOLERANCE TO COLD AND SALINE STRESS

(54) Título : PLANTA TRANSGENICA RCI5 RESISTENTE AL FRIO Y ESTRÉS SALINO PRODUCTORA DE TMAO, ELEMENTOS NECESARIOS PARA SU OBTENCIÓN Y USO DE COMPOSICIONES QUE CONTIENEN TMAO PARA INDUCIR TOLERANCIA AL FRIO Y ESTRÉS SALINO

(57) Abstract: The present invention describes a transgenic plant resistant to cold and to saline stress based on the use of a new gene, gene RCI5, encoding a monooxygenase enzyme which induces the appearance of TMAO. Moreover, the invention provides a sequence of nucleotides, vectors and cells necessary to carry out the procedure for the obtainment of said transgenic plants. Finally, there is added the use of compositions containing TMAO to improve the tolerance to saline stress of affected plants by means of exogenous application of said solutions onto the plant or seed, for example spraying or injection.

(57) Resumen: La presente invención describe una planta transgénica resistente al frío y al estrés salino basada en el uso de un nuevo gen, el gen RCI5, codificante de una enzima monooxigenasa que induce la aparición de TMAO. Además la invención proporciona secuencia de nucleótidos, vectores y células necesarias para llevar a cabo el procedimiento para obtener dichas plantas transgénicas. Finalmente, se añade el uso de composiciones que contienen TMAO para la mejora de la tolerancia al estrés salino de las plantas afectadas mediante la aplicación exógena de dichas soluciones sobre la planta o semilla, por ejemplo pulverización o inyección.

WO 2010/034862 A1

PLANTA TRANSGÉNICA RCI5 RESISTENTE AL FRIO Y ESTRES SALINO PRODUCTORA DE TMAO, ELEMENTOS NECESARIOS PARA SU OBTENCIÓN Y USO DE COMPOSICIONES QUE CONTIENEN TMAO PARA INDUCIR TOLERANCIA AL FRIO Y ESTRÉS SALINO

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se refiere a un método para aumentar la tolerancia al frío y al estrés salino de una planta alterando la expresión del gen *RCI5*. En particular, la presente invención proporciona una planta transgénica que tiene un mayor nivel de la proteína RCI5 en relación con una planta no transgénica, y el uso de composiciones que contienen TMAO para la mejora de la tolerancia al estrés salino de las plantas afectadas, mediante la aplicación de las soluciones que contengan dicho compuesto por cualquier vía que ponga en contacto la composición de la invención con cualquier parte de la planta y/o semillas.

15

ESTADO DE LA TÉCNICA

Las temperaturas de congelación constituyen uno de los principales factores ambientales que limitan el crecimiento, productividad y distribución geográfica de las plantas (Boyer, 1982). Muchas especies de climas templados han adquirido a lo largo de la evolución una respuesta adaptativa que les permite enfrentarse a las temperaturas de congelación. Por medio de esta respuesta, conocida como aclimatación al frío (Levitt, 1980), las plantas adquieren una tolerancia a las temperaturas de congelación después de un tiempo de exposición a temperaturas bajas no congelantes. La aclimatación a frío constituye un ejemplo representativo de la interacción de las plantas con su entorno y de como esta interacción ha condicionado la evolución de algunas especies. El esclarecimiento de los mecanismos moleculares que controlan este proceso adaptativo no es solo interesante desde el punto de vista básico, para entender como crecen y se desarrollan las plantas, sino que además tiene un gran

20

25

30

potencial biotecnológico en la obtención de herramientas moleculares para mejorar la tolerancia a la congelación de cultivos muy importantes. Hay que resaltar que, diferentes trabajos han mostrado que la aclimatación a las temperaturas bajas también aumenta la tolerancia de las plantas a otros estreses abióticos como deshidratación y estrés salino. Por tanto, el estudio de la aclimatación a frío debería aportar información esencial de como las plantas responden de manera coordinada a diferentes condiciones ambientales adversas

El proceso de aclimatación a frío es muy complejo y conlleva numerosos cambios a nivel bioquímico y fisiológico, incluyendo cambios en la membrana lipídica (Uemura et al., 1995), síntesis de nuevas proteínas (Kawamura y Uemura, 2003), incremento del contenido endógenos de ABA (Lang et al., 1994), y la acumulación de solutos compatibles (Wanner y Juntila, 1999). Cada vez hay mas pruebas que muestran que la mayoría de estos cambios son controlados a través de una extensa reprogramación de la expresión génica (Salinas 2002; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006; Welling y Palva, 2006). De hecho, estudios recientes usando la tecnología de microarrays han revelado que la expresión de cientos de genes cambia en respuesta a las temperaturas bajas, indicando que la aclimatación a frío esta mediada por múltiples rutas (Fowler y Thomashow, 2002; Kreps et al., 2002; Seki et al., 2002; Maruyama et al., 2004; Vogel et al., 2005; Lee et al., 2005; Oono et al., 2006; Matsui et al., 2008; Chawade et al., 2007). Muchos de estos genes también son regulados por deshidratación y salinidad (Matsui et al., 2008), confirmando a nivel molecular la estrecha relación existente en las repuestas de la planta a estos estreses abióticos. Como ejemplo de esto sirve un grupo de genes que contienen el motivo CCGAC en su promotor, que es la secuencia central del elemento de regulación en *cis* CRT/DRE (C-repeat/dehydration-responsive element) (Baker et al., 1994; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994). El motivo CCGAC es suficiente para mediar la respuesta de la expresión génica a frío, deshidratación y

estrés salino (Baker et al., 1994; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994), e interacciona específicamente con la familia de factores transcripcionales denominados CBF/DREB (C-repeat Binding Factor/DRE Binding protein) (Stockinger et al., 1997; Liu et al., 1998). Tres genes correspondientes a
5 miembros de esta familia (CBF1/DREB1B, CBF2/DREB1C, CBF3/DREB1A) son inducidos rápidamente por temperaturas bajas (Gilmour et al., 1998; Liu et al., 1998; Medina et al., 1999), mientras que la expresión de otros dos (DREB2A, DREB2B) responde principalmente a deshidratación y estrés salino (Liu et al., 1998).

10 Desafortunadamente, sin embargo, a pesar del gran número de genes que se han identificado cuya expresión es regulada por frío, las funciones celulares y metabólicas de la mayoría de los mismos, así como su implicación en la aclimatación a frío, son todavía desconocidos. El análisis de las secuencias de algunos de estos genes sugiere que deben
15 estar implicados en la protección de la célula produciendo proteínas funcionales, mientras que otros genes codificarían proteínas con alguna función en la regulación de la expresión génica y en la transmisión de la señal (Fowler y Thomashow, 2002; Kreps et al., 2002; Seki et al., 2002; Maruyama et al., 2004; Vogel et al., 2005; Lee et al., 2005; Oono et al.,
20 2006; Matsui et al., 2008; Chawade et al., 2008). Las proteínas funcionales incluyen enzimas para la producción de osmolitos compatibles, enzimas relacionadas con el quenching de especies reactivas de oxígeno (ROS), chaperonas que protegerían las proteínas y las membranas, y canales iónicos y de agua para el mantenimiento de la homeostasis iónica y del
25 agua. Entre las proteínas reguladoras, además de los factores de transcripción, se encuentran proteínas de unión a RNA, de unión a calcio, proteínas kinasas y fosfatasa, enzimas implicadas en el reciclaje de fosfoinositoles y otras moléculas señalizadoras (Matsui et al., 2008). La caracterización de la función de los genes regulados por frío y de su
30 implicación en el proceso de aclimatación debería contribuir al entendimiento de los mecanismos que gobiernan este proceso adaptativo.

Estreses abióticos ambientales, como las temperaturas de congelación y el estrés salino, se encuentran entre los problemas más importantes para una agricultura sostenible a nivel mundial. En los últimos años, se han realizado grandes esfuerzos para entender la respuesta a nivel molecular a estos estreses, lo cual ha facilitado la identificación de genes implicados en la tolerancia a las temperaturas de congelación y al estrés salino (Hasegawa et al., 2000; Zhu et al., 2007). Sin embargo, aun se ha de aclarar cómo son percibidas las señales físicas y cómo son convertidas en señales bioquímicas.

10

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Descripción Breve

Un aspecto de la invención lo constituye una planta transgénica tolerante al frío y al estrés salino, en adelante planta transgénica RC15 de la invención, que comprende una secuencia de nucleótidos que permite la expresión de una proteína con actividad monooxigenasa (FMO), seleccionada del siguiente grupo:

15

i.- la secuencia de nucleótidos del gen *RC15* de SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma; y

20

ii.- una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a).

Un aspecto particular de la presente invención lo constituye una planta transgénica de la presente invención en la que la secuencia de nucleótidos, que permite la expresión de una proteína con actividad monooxigenasa (FMO), es el gen *RC15* de SEQ ID NO: 1. Una realización particular de ésta es la planta transgénica de *Arabidopsis RC15-OE* generada en la presente invención (ver Ejemplo 1.2 y Materiales y Métodos).

25

Otro aspecto de la invención lo constituye un procedimiento de obtención de la planta transgénica RC15, en adelante procedimiento de obtención de una planta transgénica de la invención, que consiste en la

30

introducción en una planta de una secuencia de nucleótidos constituida por:

i.- una secuencia de nucleótidos codificante de proteína con actividad monooxigenasa (FMO), seleccionada del siguiente grupo:

5 - la secuencia de nucleótidos del gen *RCI5* de SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma; o una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a). y

ii.- una secuencia de nucleótidos promotora que permite y regula la expresión de la secuencia de i.- y la aparición de una proteína con actividad monooxigenasa en el interior de la célula.

Una realización particular de la presente invención lo constituye un procedimiento de obtención de plantas de la invención que comprende los siguientes pasos:

- 15 a) obtención de un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos del gen *RCI5* SEQ ID NO: 1,
- b) obtención de microorganismos portadores del vector a), y
- c) transformación de las plantas con el vector de a) o con el microorganismo de b).

Otro aspecto de la presente invención lo constituye una secuencia de nucleótidos, en adelante secuencia de la presente invención, que permite la expresión de una proteína con actividad monooxigenasa en las células de planta y que está constituida por una de las posibilidades siguientes:

25 a) una secuencia de nucleótidos codificante de una proteína con actividad monooxigenasa (FMO), seleccionada del siguiente grupo: la secuencia de nucleótidos del gen *RCI5* de SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma; o una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a), con o sin

30 b) una secuencia de nucleótidos promotora que permite y regula la expresión de la secuencia de a) y la aparición de una proteína con actividad monooxigenasa en el interior de la célula.

Otro aspecto particular de la presente invención lo constituye una secuencia de nucleótidos de la invención en la que la secuencia de nucleótidos codificante de una proteína con actividad monooxigenasa está constituida por la secuencia de nucleótidos *RCI5* de SEQ ID NO: 1, un
5 fragmento de la misma o una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definidas anteriormente.

Otro aspecto particular de la presente invención lo constituye una secuencia de nucleótidos de la invención en la que la secuencia de nucleótidos promotora es cualquier secuencia de nucleótidos promotora
10 capaz de regular la expresión génica en plantas como por ejemplo, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, un promotor fuerte constitutivo, como por ejemplo el promotor del virus del mosaico 35S, o un promotor que se exprese en respuesta a distintos tipos de estrés abiótico, como por ejemplo el del gen *RD29A* (Kasuga et al, 1999)

15 La invención también se refiere a un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos *RCI5* de la invención, en adelante vector de expresión de la presente invención, y que permite la transformación o transfección de microorganismos y células y la posterior obtención de las plantas transgénicas de la invención. Como realizaciones
20 particulares del vector de expresión de la invención se han generado los vectores *GST::RCI5* (ver Ejemplo 1) y el vector *35S::RCI5* (ver ejemplo 2).

Otro aspecto de la invención lo constituye un microorganismo o célula, en adelante célula de la invención, que contiene la secuencia de nucleótidos *RCI5* de la invención o el vector de expresión de la invención.

25 Otro aspecto más particular de la invención lo constituye una semilla de una planta que comprende una secuencia de nucleótidos, codificante de una proteína con actividad monooxigenasa, constituida por la secuencia de nucleótidos *RCI5* de SEQ ID NO: 1, un fragmento de la misma o una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definidas anteriormente.

30 Finalmente, otro aspecto de la presente invención es el uso de las secuencias de nucleótidos, vectores de expresión, células transformadas,

y del procedimiento de la presente invención para la obtención de plantas transgénicas de interés comercial.

Además, otro aspecto de la invención se basa en el uso de una composición por ejemplo, acuosa, que comprende el compuesto óxido de trimetilamina (TMAO) o un derivado del mismo, en adelante uso de una
5 composición de la invención, para inducir tolerancia al estrés salino y al frío en las plantas y/o semillas.

Otro aspecto particular de la presente invención se basa en el uso de una composición de la invención donde la composición acuosa
10 comprende el compuesto TMAO en una concentración comprendida entre 1 μM y 100 mM, preferentemente entre 50 μM y 1 mM, y más preferentemente a 100 μM .

Una realización particular de la presente invención lo constituye el uso de una composición de la invención en el que la concentración de
15 TMAO es de 100 μM .

La concentración de los componentes activos de las composiciones dependerá del tipo de planta, fase de desarrollo de la misma, así como de la frecuencia y forma de aplicación de las composiciones.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el uso de una
20 composición de la invención para inducir tolerancia al estrés salino en las plantas mediante su aplicación a la parte aérea mediante pulverización.

Los principios fisiológicos del transporte de los compuestos absorbidos por las hojas mediante pulverización, son similares a los que ingresan en las plantas por la absorción vía radicular, sin embargo, el
25 movimiento de los compuestos aplicados sobre las hojas no es el mismo en tiempo y forma que el que se realiza desde las raíces al resto de la planta. La absorción foliar es más efectiva cuando las condiciones de absorción desde el suelo son adversas como por ejemplo en caso de sequía, estrés salino, temperaturas extremas u otros estreses. Además, es
30 mucho más fácil obtener una distribución uniforme, a diferencia de la aplicación de granulados o en mezclas físicas.

Otro aspecto particular de la presente invención lo constituye el uso de una composición de la invención para inducir tolerancia al estrés salino y al frío en las plantas mediante su aplicación al tallo por inyección.

Otro aspecto particular de la presente invención lo constituye el uso de una composición de la invención que se aplica al suelo u otro sustrato de cultivo, al agua de riego (o solución de cultivo) o por inmersión del sistema radicular de las plantas y/o de semillas.

La aplicación de las composiciones acuosas por medio de la inmersión de la parte radicular de la planta así como de semillas se realiza por un tiempo y con una concentración que depende del tipo de planta, estado de desarrollo así como de la frecuencia y forma de aplicación de las composiciones. En el caso de semillas que requieran un tratamiento especial de escarificación o eliminación de determinadas cubiertas para facilitar su germinación, el proceso de inmersión en las composiciones acuosas de la presente invención, se podrá realizar de forma más efectiva después de la eliminación de las cubiertas para facilitar la absorción de los compuestos activos. Asimismo, también se podrán sumergir las semillas en cualquier estadio de germinación.

Las formas de aplicación que se han citado hasta ahora no limitan otro tipo de aplicaciones de las composiciones que contienen TMAO a las plantas.

Los usos de una composición de TMAO descritos anteriormente pueden comprender además un aditivo seleccionado de entre fertilizantes orgánicos o inorgánicos, insecticidas, nematocidas, fungicidas, bactericidas o herbicidas. De esta manera, al aplicar las composiciones que contienen TMAO junto con aditivos, ya sea para aportar nutrientes o para tratar determinadas infecciones o plagas, se consigue no aumentar los costos de los tratamientos al hacerlo de forma coordinada.

30 **Descripción Detallada**

La presente invención se enfrenta al problema de proporcionar nuevas plantas transgénicas capaces de adaptarse a situaciones limitantes del medio ambiente, preferentemente por su tolerancia al estrés salino y al frío, así como a la necesidad de aportar nuevas composiciones para mejorar la tolerancia de las plantas al estrés.

La solución proporcionada por esta invención se basa en que los inventores han aislado, identificado y caracterizado un nuevo gen que codifica una flavina monooxigenasa (FMO), en adelante *RCI5* (SEQ ID NO: 1), es decir, un nuevo gen *RCI*, que es inducido por estrés salino y el frío. La sobreexpresión constitutiva de la proteína *RCI5* (SEQ ID NO: 2 en *Arabidopsis* condujo a la expresión incrementada de diferentes genes inducibles por estrés, incluyendo el regulon CBF y genes codificantes de proteínas implicadas en la eliminación de especies reactivas de oxígeno, con lo que se provoca una mejora de la tolerancia a la congelación y al estrés salino.

En animales, la monooxigenasas (FMOs) están implicadas en la síntesis de óxido de trimetilamina (TMAO) que funciona como un importante osmoprotector (Yancey et al., 2004). Además, los datos presentados demuestran, por primera vez, que las plantas también contienen TMAO y proteína *RCI5* endógenos involucrados en la biosíntesis de TMAO. De acuerdo con esto, los niveles de TMAO en *Arabidopsis* se incrementan cuando la proteína *RCI5* es sobreexpresada en respuesta a las temperaturas bajas y al NaCl, la cual es capaz de oxidar el metabolito endógeno TMA a TMAO.

El gen *RCI5* se identificó buscando nuevos genes en *Arabidopsis* implicados en la aclimatación al frío. Al igual que otros genes inducidos por frío, el gen *RCI5* está sometido a una compleja regulación. Bajo condiciones controladas, durante estadios tempranas del desarrollo de *Arabidopsis*, su expresión es muy baja y se encuentra limitada al tejido vascular de todos los tejidos. En plantas adultas, sin embargo, *RCI5* únicamente se expresa, y en niveles muy bajos, en las venas de las hojas.

En respuesta a temperaturas bajas, los niveles de expresión de *RCI5* se inducen de forma intensa, principalmente en la vasculatura de las hojas. Esta inducción no se ve afectada en mutantes deficientes en ABA ni en plantas que no expresan *CBFs*, indicando que la regulación de *RCI5* por frío se lleva a cabo mediante vías de transducción de señales independientes de ABA y los *CBFs*. *RCI5* es además inducido por el tratamiento con NaCl a través de una vía independiente de ABA. Los niveles de expresión inducidas por NaCl son idénticos al los causados por las temperaturas bajas. Es interesante el hecho de que el efecto del NaCl no es debido a su componente osmótico sino que es específico del iónico. La deshidratación, sin embargo, no tiene efecto alguno en la expresión de *RCI5*. El genoma de *Arabidopsis* contiene mas de 50 genes cuya expresión es regulada, al igual que *RCI5*, por las temperaturas bajas y por NaCl pero no por deshidratación (Fowler y Thomashow, 2002; Kreps et al., 2002; Seki et al., 2002; Maruyama et al., 2004; Vogel et al., 2005; Lee et al., 2005; Oono et al., 2006; Matsui et al., 2008), poniendo de manifiesto la existencia de una importante interacción entre las vías de señalización de frío y sal.

La sobreexpresión constitutiva de *RCI5* incrementa de forma significativa la tolerancia a la congelación en *Arabidopsis*, antes y después de la aclimatización al frío, lo que sugiere fuertemente que *RCI5* regula de forma positiva tanto la respuesta a la aclimatización al frío como la tolerancia a la congelación. Más aún, plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan la proteína *RCI5* son significativamente más tolerantes a altas concentraciones de NaCl y LiCl que las plantas salvajes originales, demostrando que *RCI5* actúa como un regulador positivo en la tolerancia al estrés salino en *Arabidopsis*. Por el contrario, la proteína *RCI5* parece que no está implicado en la tolerancia de esta especie al estrés producido por la deshidratación y por el tratamiento con manitol. Por lo tanto, los resultados de la presente invención indican que *RCI5* no juega un papel general en el desarrollo de tolerancia en plantas a estrés abiótico, sino que

presenta una función más específica en la tolerancia al frío y al estrés salino, lo que se corresponde con el hecho que la expresión de la proteína *RCI5* se induce como respuesta a bajas temperaturas, NaCl y LiCl, pero no por deshidratación ni por manitol.

5 Además, los datos de la presente invención demuestran que la proteína *RCI5* regula positivamente la expresión génica inducida por estrés. De hecho, bajo condiciones control y/o de estrés (frío y estrés salino), las plantas *RCI5-OE* muestran niveles altos de transcritos correspondientes a diferentes genes inducibles por estrés, entre los que se
10 encuentran los *CBFs*, *KIN1*, *LTI78*, *COR15A*, *COR47*, *CAT2* y *SOD2*. Por contra, la expresión de *RAB18* y *RCI1A* no está alterada en las líneas *RCI5-OE*, evidenciando de nuevo que la proteína *RCI5* no opera como un regulador positivo general de la expresión génica inducida por estrés. Por otro lado, es importante destacar que se ha descrito que la expresión de
15 *CBFs*, *KIN1*, *LTI78*, *COR15A*, *COR47*, *CAT2* y *SOD2* es capaz de mejorar la supervivencia a estrés abiótico (Jaglo-Ottosen et al., 1998; Liu et al., 1998; Kasuga et al., 1999; Gilmour et al., 2000; Catala et al., 2003; Maruyama et al., 2004; Gilmour et al., 2004; Novillo et al., 2004; McKersie et al., 1996; Van Breusegem et al., 1998; Apel y Hirt, 2004). Por tanto, el
20 incremento de la tolerancia a las temperaturas de congelación, antes y después de la aclimatación a frío, y al estrés salino mostrado por las plantas *RCI5-OE* debe ser atribuido a la alta expresión de estos genes.

 El gen *RCI5* codifica una proteína con actividad monooxygenasa como se evidencia por la caracterización de la proteína recombinante
25 obtenida y el análisis de la oxidación de NADPH en extractos de las plantas transgénicas *RCI5-OE*. Sin embargo, esta proteína contiene todos los motivos típicos característicos de las enzimas FMO, incluyendo un punto de unión a FAD, un motivo identificativo de FMO, y un dominio de unión a NADPH (Cashman, 1994). Los motivos FMOs se han descrito en
30 distintos organismos, desde bacterias a humanos, siendo los de origen eucariota los mejor caracterizados. Este motivo FMO se une al cofactor

FAD y cataliza la oxigenación de metabolitos endógenos que contienen nitrógeno nucleofílico, fósforo, azufre, o selenio a expensas de NADPH. En plantas, se ha descrito que las proteínas FMOs juegan un papel en la biosíntesis de auxinas en petunia y *Arabidopsis* (Zhao et al., 2001; 5 Tobeña-Santamaria et al., 2002; Cheng et al., 2007). Además, en *Arabidopsis*, las FMOs son requeridas en la respuesta de defensa frente a patógenos (Bartsch et al., 2006; Koch et al., 2006; Mishina y Zeier, 2006) y se han implicado en la biosíntesis de glucosinolatos (Hansen et al., 2007). Los resultados descritos en esta invención indican claramente que estos 10 dominios FMOs de la proteína de la invención RCI5 en plantas presentan una función en respuestas al estrés abiótico, principalmente en respuestas al estrés por frío o estrés salino. Finalmente, RCI5 presenta una propiedad funcional en las respuestas de la planta a patógenos aunque deberá ser investigado en un futuro.

15 Por último, la aplicación exógena del compuesto TMAO reproduce parcialmente los perfiles de expresión génica inducida por bajas temperaturas y estrés salino, así como los fenotipos originados por la sobreexpresión de *RCI5* (ver Ejemplo 3), indicando que el TMAO es una nueva molécula señalizadora en plantas que media la tolerancia a frío y al 20 estrés salino mediante la regulación positiva de la expresión de genes inducidos por estrés. Hay que señalar que los fenotipos de tolerancia inducidos por el TMAO son muy similares a los manifestados por las plantas transgénicas *RCI5-OE*, como cabría esperar de estar RCI5 implicado en la biosíntesis de TMAO.

25 En resumen, los resultados presentados en la presente invención son la primera evidencia de que las plantas también contienen el metabolito TMAO, cuya síntesis está inducida por la proteína RCI5 y que las plantas transgénicas *RCI5-OE* que contienen mayores niveles de RCI5 son mas tolerantes al frío y al estrés salino que las plantas silvestres; y 30 que la aplicación exógena en plantas del compuesto TMAO las protege del frío y del estrés salino.

Por lo tanto, un aspecto de la invención lo constituye una planta transgénica tolerante al frío y al estrés salino, en adelante planta transgénica *RCI5* de la invención, que comprende una secuencia de nucleótidos que permite la expresión de una proteína con actividad monooxigenasa (FMO), seleccionada del siguiente grupo:

i.- la secuencia de nucleótidos del gen *RCI5* de SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma; y

ii.- una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a).

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análoga” pretende incluir a cualquier secuencia de nucleótidos que pueda ser aislada o construida en base a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID NO1, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia.

En general, una secuencia de nucleótidos análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos identificada como la SEQ ID NO: 1. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad, a nivel de nucleótidos, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.

Un aspecto particular de la presente invención lo constituye una planta transgénica de la presente invención en la que la secuencia de nucleótidos, que permite la expresión de una proteína con actividad monooxigenasa (FMO), es el gen *RCI5* de SEQ ID NO: 1. Una realización particular de ésta es la planta transgénica de *Arabidopsis RCI5-OE* generada en la presente invención (ver Ejemplo 1.2 y Materiales y Métodos).

Además, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de mejora de la tolerancia de plantas a salinidad y frío mediante ingeniería genética de plantas. La técnica ha sido desarrollada en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* y puede ser aplicada a plantas de interés agronómico y comercial - entre otras, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención: arroz, trigo, soja, maíz, tomate, tabaco, judía, así como diferentes especies frutales (naranja, limonero, etc.) - mediante distintas técnicas de ingeniería genética conocidas por un experto en la materia. Ello es posible porque las secuencias de nucleótidos ortólogos u homólogas de la secuencia descrita en la presente invención (SEQ ID NO: 1) están conservados en plantas de interés agronómico y existe tecnología adecuada para su aislamiento y uso en ingeniería genética de plantas.

Secuencias de nucleótidos homólogas a la descrita en la presente invención (SEQ ID NO: 1) pueden encontrarse como formas homólogas en otras especies de plantas superiores de interés comercial donde pueden estar de forma natural o en otro caso, también podrían estar como resultado de un proceso de transformación génica en el que el organismo transformado reproduzca dichas moléculas de ADN. Estas formas homólogas de la invención pueden ser aisladas, mediante técnicas convencionales, a partir del ADN de cualquier planta que las contenga y mediante el empleo de sondas o de oligonucleótidos, preparados gracias a la información de las secuencias de nucleótidos de dichas moléculas de ADN proporcionadas en esta invención, por cualquier experto en la materia.

Así, otro aspecto de la invención lo constituye un procedimiento de obtención de la planta transgénica RC15, en adelante procedimiento de obtención de una planta transgénica de la invención, que consiste en la introducción en una planta de una secuencia de nucleótidos constituida por:

i.- una secuencia de nucleótidos codificante de proteína con actividad monooxigenasa (FMO), seleccionada del siguiente grupo:

- la secuencia de nucleótidos del gen *RC/5* de SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma; o una secuencia de nucleótidos análoga a la
5 secuencia definida en a), y

ii.- una secuencia de nucleótidos promotora que permite y regula la expresión de la secuencia de i.- y la aparición de una proteína con actividad monooxigenasa en el interior de la célula.

Una realización particular de la presente invención lo constituye un
10 procedimiento de obtención de plantas de la invención que comprende los siguientes pasos:

a) obtención de un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos del gen *RC/5* SEQ ID NO: 1,

b) obtención de microorganismos portadores del vector a), y

15 c) transformación de las plantas con el vector de a) o con el microorganismo de b).

Las secuencias de nucleótidos, vectores de expresión y células o microorganismos transformados, desarrollados y necesarios para la puesta en práctica del procedimiento de obtención de las plantas transgénicas de
20 la presente invención, así como su empleo para la producción de dichas plantas, constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

Así, otro aspecto de la presente invención lo constituye una secuencia de nucleótidos, en adelante secuencia de la presente invención, que permite la expresión de una proteína con actividad monooxigenasa en
25 las células de planta y que está constituida por una de las posibilidades siguientes:

b) una secuencia de nucleótidos codificante de una proteína con actividad monooxigenasa (FMO), seleccionada del siguiente grupo: la secuencia de nucleótidos del gen *RC/5* de SEQ ID
30 NO: 1, o un fragmento de la misma; o una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a), con o sin

b) una secuencia de nucleótidos promotora que permite y regula la expresión de la secuencia de a) y la aparición de una proteína con actividad monooxigenasa en el interior de la célula.

Otro aspecto particular de la presente invención lo constituye una
5 secuencia de nucleótidos de la invención en la que la secuencia de nucleótidos codificante de una proteína con actividad monooxigenasa está constituida por la secuencia de nucleótidos *RCI5* de SEQ ID NO: 1, un fragmento de la misma o una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definidas anteriormente.

10 Otro aspecto particular de la presente invención lo constituye una secuencia de nucleótidos de la invención en la que la secuencia de nucleótidos promotora es cualquier secuencia de nucleótidos promotora capaz de regular la expresión génica en plantas como por ejemplo, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, un promotor fuerte
15 constitutivo, como por ejemplo el promotor del virus del mosaico 35S, o un promotor que se exprese en respuesta a distintos tipos de estrés abiótico, como por ejemplo el del gen *RD29A* (Kasuga et al, 1999)

La secuencia de nucleótidos *RCI5* de la invención puede ser utilizada, en general, en la generación de un vector de expresión que
20 permite la expresión de estas proteínas en una amplia gama de células huésped.

Por lo tanto, la invención también se refiere a un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos *RCI5* de la invención, en adelante vector de expresión de la presente invención, y que
25 permite la transformación o transfección de microorganismos y células y la posterior obtención de las plantas transgénicas de la invención. Como realizaciones particulares del vector de expresión de la invención se han generado los vectores *GST::RCI5* (ver Ejemplo 1) y el vector *35S::RCI5* (ver ejemplo 2).

30 En general, el vector de expresión de la presente invención comprende, al menos, una secuencia de la invención y, al menos, un

promotor que dirige la transcripción del gen de interés (en este caso se indica el cDNA del gen como secuencia de nucleótidos codificante representativa del propio gen) al que está operativamente enlazado, y otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción del gen de interés y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), etc. Ejemplos de vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso concreto entre plásmidos de expresión de plantas (Rothstein et al, 1987; Potrykus, I, 1991), virus ("Plant Virology Protocols" From Virus Isolation to Transgenic Resistance Edited by: Gary D. Foster University of Bristol, Bristol, UK Published: 1998), que pueden contener, además, un origen bacteriano o de levadura de replicación para que pueda ser amplificado en bacterias o levaduras, así como un marcador utilizable para seleccionar las células transfectadas diferente al gen o genes de interés. Para la transformación de las plantas se pueden utilizar diferentes métodos - vectores plasmidicos, liposomas, electroporación, microinyección, etc - descritos en diversos manuales (ver por ejemplo: (Plant Gene Transfer and Expression Protocols Jones, Heddwyn University of Hertfordshire, Hatfield, UK. Human Press Publishers). La elección del vector dependerá de la célula hospedadora y de la planta en la que se va a introducir posteriormente.

Otro aspecto de la invención lo constituye un microorganismo o célula, en adelante célula de la invención, que contiene la secuencia de nucleótidos RCI5 de la invención o el vector de expresión de la invención.

Otro aspecto más particular de la invención lo constituye una semilla de una planta que comprende una secuencia de nucleótidos, codificante de una proteína con actividad monooxigenasa, constituida por la secuencia de nucleótidos RCI5 de SEQ ID NO: 1, un fragmento de la misma o una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definidas anteriormente.

Finalmente, otro objeto de la presente invención es el uso de las secuencias de nucleótidos, vectores de expresión, células transformadas, y del procedimiento de la presente invención para la obtención de plantas transgénicas de interés comercial.

5 Además, otro aspecto de la invención se basa en el uso de una composición por ejemplo, acuosa, que comprende el compuesto óxido de trimetilamina (TMAO) o un derivado del mismo, en adelante uso de una composición de la invención, para inducir tolerancia al estrés salino y al frío en las plantas y/o semillas.

10 Otro aspecto particular de la presente invención se basa en el uso de una composición de la invención donde la composición acuosa comprende el compuesto TMAO en una concentración comprendida entre 1 μM y 100 mM, preferentemente entre 50 μM y 1 mM, y más preferentemente a 100 μM .

15 Una realización particular de la presente invención lo constituye el uso de una composición de la invención en el que la concentración de TMAO es de 100 μM .

 La concentración de los componentes activos de las composiciones dependerá del tipo de planta, fase de desarrollo de la misma, así como de
20 la frecuencia y forma de aplicación de las composiciones.

 Otro aspecto particular de la invención lo constituye el uso de una composición de la invención para inducir tolerancia al estrés salino en las plantas mediante su aplicación a la parte aérea mediante pulverización.

 Los principios fisiológicos del transporte de los compuestos
25 absorbidos por las hojas mediante pulverización, son similares a los que ingresan en las plantas por la absorción vía radicular, sin embargo, el movimiento de los compuestos aplicados sobre las hojas no es el mismo en tiempo y forma que el que se realiza desde las raíces al resto de la planta. La absorción foliar es más efectiva cuando las condiciones de
30 absorción desde el suelo son adversas como por ejemplo en caso de sequía, estrés salino, temperaturas extremas u otros estreses. Además, es

mucho más fácil obtener una distribución uniforme, a diferencia de la aplicación de granulados o en mezclas físicas.

Otro aspecto particular de la presente invención lo constituye el uso de una composición de la invención para inducir tolerancia al estrés salino y al frío en las plantas mediante su aplicación al tallo por inyección.

Otro aspecto particular de la presente invención lo constituye el uso de una composición de la invención que se aplica al suelo u otro sustrato de cultivo, al agua de riego (o solución de cultivo) o por inmersión del sistema radicular de las plantas y/o de semillas.

La aplicación de las composiciones acuosas por medio de la inmersión de la parte radicular de la planta así como de semillas se realiza por un tiempo y con una concentración que depende del tipo de planta, estado de desarrollo así como de la frecuencia y forma de aplicación de las composiciones. En el caso de semillas que requieran un tratamiento especial de escarificación o eliminación de determinadas cubiertas para facilitar su germinación, el proceso de inmersión en las composiciones acuosas de la presente invención, se podrá realizar de forma más efectiva después de la eliminación de las cubiertas para facilitar la absorción de los compuestos activos. Asimismo, también se podrán sumergir las semillas en cualquier estadio de germinación.

Las formas de aplicación que se han citado hasta ahora no limitan otro tipo de aplicaciones de las composiciones que contienen TMAO a las plantas.

Los usos de una composición de TMAO descritos anteriormente pueden comprender además un aditivo seleccionado de entre fertilizantes orgánicos o inorgánicos, insecticidas, nematocidas, fungicidas, bactericidas o herbicidas. De esta manera, al aplicar las composiciones que contienen TMAO junto con aditivos, ya sea para aportar nutrientes o para tratar determinadas infecciones o plagas, se consigue no aumentar los costos de los tratamientos al hacerlo de forma coordinada.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. *RCI5* es regulado transcripcionalmente por frío y NaCl en hojas y flores por una vía independiente de ABA y los CBFs.

En las hibridaciones de tipo Northern se utilizó la sonda de *RCI5* y *GUS*.

5 Cada carril contiene 20µg de RNA total. Como controles de tratamiento y carga se emplearon las sondas correspondientes a los genes *KIN1* y *18S rRNA*, respectivamente.

a) RNAs procedentes de plantas de 3 semanas crecidas a 20°C (C), o expuestas adicionalmente a 4°C los tiempos indicados.

10 b) RNAs procedentes de raíces, hojas, tallos, flores y silicuas de plantas de 8 semanas crecidas a 20°C (C), o expuestas 1 día adicional a 4°C.

c) RNAs procedentes de plantas *Ler*, *aba1-1*, *Col*, *cbf2*, *CBF1-AS3* de 3 semanas crecidas a 20°C (C), expuestas 1 día adicional a 4°C (4°C), o tratadas con NaCl 250mM recogiendo el material un día mas tarde (NaCl).

15 d) RNAs procedentes de plantas de 3 semanas crecidas a 20°C (C), expuestas un día adicional a 4°C (4°C), regadas con NaCl 250mM recogiendo el material 24h después (NaCl), deshidratadas hasta perder el 50% de su peso fresco (D), regadas con LiCl 20mM (LiCl) o manitol 500mM (Manitol) recogiendo el material a las 24h.

20 e) RNAs procedentes de plantas transgénicas *RCI5::GUS* de 3 semanas crecidas a 20°C (C), expuestas 1 día adicional a 4°C (4°C) o regadas con NaCl 250mM (NaCl) recogiendo el material a las 24h.

f) Localización histoquímica de la actividad GUS en semillas, plántulas y distintos órganos de plantas transgénicas *RCI5::GUS* de 8 semanas crecidas a 20°C (C), o expuestas un día adicional a 4°C (4°C). En la respuesta a deshidratación se obtuvo el mismo patrón de actividad GUS que las plantas control (C). En el caso de tratamiento con NaCl se obtuvo el mismo patrón que el mostrado en las plantas expuestas a 4°C (4°C).

30 **Figura 2. *RCI5* tiene actividad monooxigenasa.**

- a) Tinción con Coomassie de un gel SDS-PAGE al 12% conteniendo las distintas fracciones obtenidas al purificar RCI5. El primer carril incluye un extracto de bacterias conteniendo el vector de expresión de proteínas (pGEX), el segundo carril incluye un extracto de bacterias conteniendo el plásmido de expresión *pGEX::RCI5* (*pGEX-RCI5*), el tercer carril incluye la proteína de fusión GST::RCI5 después de ser purificada por medio de una columna de glutation sepharosa 4B (GST-RCI5), y el ultimo carril contiene la proteína RCI5 purificada a partir de GST::RCI5 mediante digestión con trombina (RCI5). Cada carril contiene 20µg de proteína.
- 5
- b) Medidas de actividad monooxigenasa de las fracciones proteicas que se muestran en el panel (a). La gráfica muestra los µmoles de NADPH consumidos por hora a 24°C. En todos los casos, los experimentos se realizaron con 100ug de proteína. Los datos corresponden a medias ±SE de tres experimentos independientes.
- 10
- c) Niveles de mRNAs de *RCI5* en plantas transgénicas *35S::RCI5*. Las hibridaciones de tipo Northern fueron realizadas con RNA total (20µg) aislado de plantas de Arabidopsis de 3 semanas y cuatro líneas transgénicas independientes (1T-4T) conteniendo la fusión *35S::RCI5* (*RCI5-OE*) crecidas en condiciones control. Como control de carga se empleó la sondas correspondiente a al gen *18S rRNA*.
- 15
- 20
- d) La gráfica muestra el NADPH consumido por hora a 24°C en plantas de Arabidopsis control (WT) y en las cuatro líneas transgénicas (1T-4T) que contienen la fusión *35S::RCI5* (*RCI5-OE*) crecidas en condiciones control.
- 25
- Figura 3. Las plantas *35S::RCI5* tienen mayor tolerancia a la congelación y al estrés salino que Col.**
- a) Porcentaje de plantas Col y transgénicas *35S::RCI5* (línea 1T1) crecidas durante 2 semanas a 20°C que sobreviven tras ser expuestas 6h a distintas temperaturas de congelación. Los datos corresponden a medias ±SE de tres experimentos independientes, con un número mínimo de 50 plantas de cada genotipo por experimento.
- 30

- b) Porcentaje de plantas Col y transgénicas 35S::*RCI5* (línea 1T1) crecidas durante 2 semanas a 20°C y aclimatadas durante 7 días a 4°C, que sobreviven tras ser expuestas 6h a distintas temperaturas de congelación. Los datos corresponden a medias \pm SE de tres experimentos independientes, con un número mínimo de 50 plantas de cada genotipo por experimento.
- c) Plantas Col y transgénicas 35S::*RCI5* (Línea 1T1) crecidas 2 semanas a 20°C, después de ser congeladas a -6°C durante 6h.
- d) Plantas Col y transgénicas 35S::*RCI5* (Línea 1T1) crecidas 2 semanas a 20°C y aclimatadas durante 7 días a 4°C, después de ser congeladas a -8°C durante 6h.
- e) Tolerancia a NaCl, LiCl y Manitol. Número de hojas verdes y porcentaje de peso fresco inicial en plantas Col y transgénicas 35S::*RCI5* (línea 1T1) expuestas a concentraciones crecientes de NaCl (50mM-200mM), LiCl (5mM-20mM) o manitol (100mM-400mM), durante 2 días a cada concentración, respecto a los mismos parámetros en plantas Col a las que no se les ha aplicado el tratamiento. Los datos corresponden a medias \pm SE de tres experimentos independientes, con un número mínimo de 20 plantas de cada genotipo por experimento.
- f) Plantas Col y transgénicas 35S::*RCI5* (línea 1T1) después de ser expuestas a concentraciones crecientes de NaCl (50mM-200mM), LiCl (5mM-20mM) o manitol (100mM-400mM), durante 2 días a cada concentración.

Figura 4. RCI5 está implicado en la biosíntesis de TMAO en Arabidopsis.

Las gráficas muestran los μ moles de TMAO por cada kg de peso fresco. Los datos corresponden a medias \pm SE de cinco experimentos independientes y en cada experimento se incluyeron un mínimo de 50 plantas.

- a) Plantas Col crecidas a 20°C durante 3 semanas y expuestas 1 día adicional a 4°C, regadas con NaCl 250mM recogiendo el material al cabo de 1 día, o deshidratadas hasta perder el 50% de su peso fresco.
- b) Plantas Col y transgénicas 35S::RCI5 crecidas a 20°C durante 3
5 semanas.
- c) Plantas col y transgénicas 35S::RCI5 crecidas a 20°C durante 3 semanas y expuestas 1 día a 4°C o regadas con NaCl 250mM recogiendo el material al cabo de un día.
- d) μ moles de TMAO obtenidos mediante una reacción *in vitro* usando
10 diferentes concentraciones (50, 100 y 200 μ M) de RCI5 purificado de *E. coli*.

Figura 5. El TMAO media la respuesta de la expresión génica a las temperaturas bajas.

- 15 Hibridaciones de tipo Northern utilizando sondas específicas para (a y c) *KIN1*, *LT178*, *COR15A*, *COR47*, *RAB18*, *RCI1A*, *CAT2*, *SOD2* y *RCI5* (esta último solo en c); (b y d) *CBF1*, *CBF2* y *CBF3* y *GUS*. Cada carril contiene 20 μ g de RNA total. En todos los casos se usaron sondas específicas para cada gen. Como control de la carga se empleó la sonda correspondiente a
20 *18S rRNA*.
- a) Hibridaciones tipo Northern con las sondas anteriormente mencionadas de muestras procedentes de plantas Col (WT) y transgénicas 35::RCI5 (*RCI5-OE*) crecidas durante 3 semanas a 20°C (C), expuestas 1 día adicional a 4°C o tratadas con NaCl 250mM recogiendo el material al cabo
25 de 1 día.
- b) Hibridaciones tipo Northern con las sondas anteriormente mencionadas de muestras procedentes de plantas Col (WT) y transgénicas 35::RCI5 (*RCI5-OE*) crecidas durante 3 semanas a 20°C (C), expuestas 3 horas adicionales a 4°C o tratadas con NaCl 250mM recogiendo el material al
30 cabo de 3 horas.

c) Hibridaciones tipo Northern con las sondas anteriormente mencionadas de muestras procedentes de plantas Col crecidas durante 3 semanas a 20°C (C), tratadas con TMAO 100µM (TMAO), expuestas a 4°C o tratadas con NaCl 250mM recogiendo el material al cabo de 1 día.

5 d) Hibridaciones tipo Northern con las sondas anteriormente mencionadas de muestras procedentes de plantas Col crecidas durante 3 semanas a 20°C (C), tratadas con TMAO 100µM (TMAO), expuestas a 4°C o tratadas con NaCl 250mM recogiendo el material al cabo de 3 horas.

10 **Figura 6. El TMAO aumenta la tolerancia a la congelación y al estrés salino.**

a) Porcentaje de plantas Col crecidas a 20°C (C) y tratadas con TMAO 100µM 3 días antes de la congelación (TMAO), no aclimatadas (NA) y aclimatadas 7 días a 4°C (A), que sobreviven tras ser expuestas 6 horas a
15 -6°C o -8°C, respectivamente. Los datos corresponden a medias ±SE de tres experimentos independientes, con un número mínimo de 50 plantas de cada genotipo por experimento.

b) Porcentaje de número de hojas verdes en plantas Col crecidas en MS (C) y Col crecidas en MS suplementado con TMAO 100µM (TMAO),
20 expuestas posteriormente a concentraciones crecientes de NaCl (50mM-200mM), LiCl (5mM-20mM) o manitol (100mM-400mM) durante 2 días a cada concentración, respecto al número de hojas verdes en plantas Col a las que no se les ha aplicado el tratamiento. Los datos corresponden a medias ±SE de tres experimentos independientes, con un número mínimo
25 de 20 plantas de cada genotipo por experimento.

c) Plantas Col crecidas a 20°C (C) y tratadas con TMAO 100µM 3 días antes de la congelación (TMAO), no aclimatadas (NA) y aclimatadas 7 días a 4°C (A), que sobreviven tras ser expuestas 6 horas a -6°C o -8°C, respectivamente.

30 d) Plantas Col crecidas en MS (C) o en MS suplementado TMAO 100µM (TMAO) después de ser expuestas a concentraciones crecientes de NaCl

(50mM-200mM), LiCl (5mM-20mM) o manitol (100mM-400mM) durante 2 días a cada concentración.

Figura 7. Organización genómica de *RCI5*

- 5 a) Mapa de restricción del fragmento de DNA genómico que contiene el gen *RCI5*. Se indican los sitios de corte de las enzimas de restricción *EcoRI* (E), *XbaI* (X) y *HindIII* (H). ATG indica el inicio de la traducción de *RCI5* y los rectángulos grises sus regiones codificantes. La línea de puntos marca la región utilizada como sonda.
- 10 b) Hibridación de tipo Southern con 5µg de DNA genómico de *Arabidopsis* digerido con *EcoRI* (E), *XbaI* (X) y *HindIII* (H), utilizando la sonda de *RCI5*. A la derecha se indican los tamaños (en kpb) de las bandas obtenidas.

Figura 8. Medidas de TMAO en plantas de *Arabidopsis* expuestas a frío o estrés salino

- 15 Gráficas representativas que muestran µmoles de TMAO por Kg de peso fresco de plantas de Col de tres semanas crecidas a 20°C y expuestas a 4°C durante diferentes tiempos (0, 6, 12, 24, 48 y 72 horas) (a) o expuestas a diferentes concentraciones de NaCl (50, 100, 150, 200, 250 y
- 20 300mM) durante 1 día (b).

Figura 9. Medidas de TMAO en plantas tratadas con TMAO

- Gráficas representativas que muestran µmoles de TMAO por Kg de peso fresco de plantas de Col de tres semanas crecidas a 20°C y tratadas con diferentes concentraciones de TMAO durante 1 día (0, 10, 50, 100 y 200
- 25 µM) (a) o tratadas con 100µM TMAO durante diferentes tiempos (0, 6, 12, 24, 48, y 76 horas).

EJEMPLOS DE LA INVENCION

- 30 **Ejemplo 1. – Aislamiento e identificación de gen y de la proteína de la invención *RCI5***

1.1.- Identificación de un cDNA codificante de la proteína *RCI5* inducido en respuesta a bajas temperaturas y a estrés salino.

RCI5 (At1g12140) fue aislado mediante el rastreo de una biblioteca de cDNAs preparada a partir de plántulas etioladas de *Arabidopsis* aclimatadas a frío (4°C, durante 3 días) con una sonda substractiva enriquecida en transcritos inducidos por frío. La comparación de este cDNA (SEQ ID NO: 1), denominado *RCI5*, con otras secuencias genómicas reveló que el gen *RCI5* contiene 5 exones y 4 intrones (SEQ ID NO: 3). El análisis de la expresión de este gen en plántulas etioladas de *Arabidopsis* mediante hibridaciones de tipo Northern con una sonda específica confirmó que, de hecho, su expresión se induce en respuesta a temperaturas bajas (Fig. 1a). Los transcritos de *RCI5* se acumulan de manera transitoria durante la exposición a 4°C, alcanzando el nivel máximo a las 12 h del comienzo del tratamiento. En plántulas crecidas en condiciones control, los niveles de transcritos de *RCI5* son muy bajos (Fig. 1a). La especificidad de la sonda fue determinada por hibridaciones de tipo Southern (Fig. 7b). Cuando se estudió la expresión de *RCI5* en plantas adultas (Fig. 1b), la inducción por frío se detectó principalmente en hojas aunque se observó una pequeña inducción en flores. La acumulación de mensajeros *RCI5* no experimentaba cambios aparentes ni en raíces, ni en tallos ni en silicuas expuestas a frío (Fig. 1b). En condiciones no estresantes, se detectaron niveles muy bajos de transcritos *RCI5* en todos los órganos, excepto en silicuas (Fig. 1b). La inducción de *RCI5* en respuesta a las temperaturas bajas no se veía afectada en *aba1-1*, un mutante deficiente en ABA (Koornneef et al., 1982), *cbf2-1*, un mutante nulo para el gen *CBF2* (Novillo et al. 2004), y *CBF1-AS3*, una línea transgénica de *Arabidopsis* que no presenta inducción por frío de *CBF1* o *CBF3* (Novillo et al., 2007) (Fig. 1c), sugiriendo fuertemente que *RCI5* es regulado por las temperaturas bajas a través de una vía de señalización independiente de ABA y de los CBFs.

Ya que, como se ha mencionado anteriormente, muchos genes inducibles por frío responden también a otros estreses abióticos, se examinó el efecto de la deshidratación y del estrés salino en la expresión de *RCI5*. Únicamente se observó acumulación de mRNAs de *RCI5* después del tratamiento con NaCl (Fig. 1d). Para determinar si esta acumulación era causada por el componente iónico u osmótico del tratamiento con NaCl, se estudió la expresión de *RCI5* en plantas de *Arabidopsis* expuestas a LiCl, ya que Li⁺ es un catión tóxico muy relacionado con el ión Na⁺, y manitol, que mimetiza el estrés osmótico sin la toxicidad del estrés iónico. Los resultados obtenidos revelaron que *RCI5* se inducía por LiCl pero no por manitol (Fig. 1d), indicando que el componente iónico era el responsable de la acumulación de transcritos de *RCI5* en respuesta a estrés salino. Como en el caso de las temperaturas bajas, la inducción de *RCI5* en respuesta a NaCl parece estar mediada a través de una vía independiente de ABA (Fig. 1c). *KIN1* fue usado como control positivo de todos los experimentos.

La expresión de *RCI5* a nivel tisular durante el desarrollo de la planta y en respuesta a diferentes tratamientos fue estudiada mediante el análisis de plantas de *Arabidopsis* que contienen una fusión de un fragmento de 782 pb del promotor de *RCI5* (de -770 a +12 desde el ATG) al gen reportador *uidA* (*GUS*). Se examinaron cinco líneas transgénicas independientes que contenían una única copia en homocigosis del transgén. En todos los casos, la acumulación de mRNAs de *GUS* en hojas expuestas a 4°C o NaCl presentaban un patrón muy similar al observado para los transcritos endógenos de *RCI5* (Fig. 1e). Estos resultados sugieren que el fragmento de promotor aislado contenía los elementos de regulación en *cis* implicados en la inducción de *RCI5* en respuesta a las temperaturas bajas y a estrés salino, y que esta inducción está regulada a nivel transcripcional. El análisis histoquímico de la actividad GUS no mostró tinción en las semillas transgénicas (Fig. 1f). Bajo condiciones no estresantes sólo se pudieron detectar niveles muy bajos de tinción GUS

durante la germinación y en los primeros estadios del desarrollo en los haces vasculares de raíces, hipocotilos, cotiledones y hojas (Fig. 1f). En plantas desarrolladas completamente, la tinción GUS fue ligeramente apreciable en las venas de las hojas (Fig. 1f). Cuando se expusieron plantas transgénicas en germinación a temperaturas bajas o NaCl, la tinción GUS fue como en plantas no estresadas pero significativamente más fuerte (Fig. 1f). Las plantas transgénicas adultas únicamente mostraban niveles altos de actividad GUS en el tejido vascular, aunque se podía observar una ligera tinción en las flores (base y venas de los sépalos) y en las silicuas (zona de abscisión) (Fig. 1f). En las líneas transgénicas sometidas a deshidratación, el patrón de actividad GUS era, en todos los casos, como el obtenido en condiciones control (Fig. 1f). En conjunto, todos estos datos demuestran que la expresión de *RCI5* se encuentra regulada durante el desarrollo de *Arabidopsis* y se induce en respuesta a frío y estrés salino, principalmente en el tejido vascular de las hojas.

1.2.- El gen *RCI5* codifica para una proteína con actividad monooxigenasa de tipo flavina

La secuencia del cDNA *RCI5* (SEQ ID NO: 1) codifica para un polipéptido de 459 aminoácidos (SEQ ID NO: 2), con un peso molecular estimado de 52 kDa y un pI de 6.1. Búsquedas en bases de datos reveló que dicho polipéptido o proteína *RCI5* contiene los típicos motivos de una enzima flavina monooxigenasa (FMO) (Cashman, 1994). De hecho, *RCI5* posee un sitio altamente conservado de unión a FAD, un dominio de identificación de FMO y un dominio de unión a NADPH que son característicos de las enzimas FMO.

Esta proteína *RCI5* es una enzima con actividad FMO que fue analizada en primer lugar investigando su capacidad para oxidar NADPH, tras haber sido expresada y purificada en *Escherichia coli* (Fig. 2a). Los resultados mostraron que, de hecho, *RCI5* tiene actividad monooxigenasa.

La proteína de fusión GST::RCI5 purificada y, sobre todo, la misma proteína RCI5 exhibió una mayor capacidad para oxidar NADPH (2 y 8 veces, respectivamente) que los extractos de *E. coli* conteniendo el plásmido vacío o con el cDNA de *RCI5* (fig. 2b). Posteriormente, se analizó la actividad monooxigenasa de RCI5 *in vivo* utilizando plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan de forma constitutiva la proteína RCI5 (plantas transgénicas *RCI5-OE*). Para determinar la actividad monooxigenasa se seleccionaron cuatro líneas independientes, homocigotas para una copia única del transgén y que mostraban niveles altos de expresión de *RCI5* en condiciones control (Fig. 2c). Las plantas sobreexpresoras de *RCI5* crecieron y se desarrollaron de manera idéntica a las plantas silvestres en condiciones normales de crecimiento. En todos los casos, extractos de estas líneas transgénicas *RCI5-OE* presentaron una capacidad para oxidar NADPH significativamente mayor que los extractos de plantas silvestres (Fig. 2d). Así, se concluye que la proteína RCI5 es una enzima con actividad FMO.

Ejemplo 2.- Las plantas transgénicas RCI5 de la invención presentan una mayor tolerancia al frío y al estrés salino la cual está mediatizada por mayores niveles de TMAO producidos por la proteína RCI5

2.1.- La sobreexpresión de la proteína RCI5 incrementa la tolerancia de las plantas, *Arabidopsis*, al estrés por frío y al salino

La tolerancia a la congelación de plantas transgénicas *RCI5-OE* y silvestres de dos semanas, antes y después de aclimatarlas al frío (4°C, 7d), fue cuantificada como el porcentaje de plantas supervivientes después de haber sido expuestas 6 h a diferentes temperaturas de congelación. La deshidratación fue inducida manteniendo plántulas transgénicas y silvestres de 10 días en un papel de filtro durante 2 días. La tolerancia a este estrés fue cuantificada como el porcentaje de peso fresco inicial (FW) remanente tras el tratamiento. Por último, la tolerancia al estrés salino fue estimada determinando el peso fresco y el número de hojas de plantas

transgénicas *RCI5-OE* y silvestres de 10 días cultivadas durante 8 días en medios con concentraciones crecientes de NaCl (de 50 a 200 mM). La sobreexpresión de *RCI5* incrementó significativamente la tolerancia de *Arabidopsis* a la congelación tanto de plantas no aclimatadas como

5 aclimatadas 7 días a 4°C, siendo este incremento muy similar en ambos casos. Como todas las líneas transgénicas *RCI5-OE* mostraron fenotipos de tolerancia similares, únicamente se presentan los resultados de la línea 1T (Figs. 3a, b). Los valores de LT_{50} (temperatura que causa un 50% de mortalidad) de plantas no aclimatadas silvestres y transgénicas *RCI5-OE*

10 estimados fueron -5,4 y -6,5°C, respectivamente (Fig. 3a). Los valores de LT_{50} de plantas silvestres y *RCI5-OE* aclimatadas a frío fueron -7,5 y -8,7°C, respectivamente (Fig. 3b). El incremento en la tolerancia de las líneas *RCI5-OE*, antes y después de la aclimatación, era muy evidente a nivel fenotípico (Figs. 3c, d). No se observó ninguna diferencia entre las

15 plantas silvestres y *RCI5-OE* cuando se analizó la tolerancia a la deshidratación (datos no mostrados). Sin embargo, todas las líneas sobreexpresoras de *RCI5* presentaron una mayor tolerancia al estrés salino que las plantas silvestres. Los fenotipos de tolerancia mostrados por las diferentes líneas *RCI5-OE* eran casi indistinguibles por lo que

20 solamente se presentan los resultados correspondientes a la línea 1T (Fig. 3e). Las plantas transgénicas *RCI5-OE* expuestas a estrés salino tenían mayor número de hojas verdes y de FW que las plantas silvestres no estresadas (p.e., alrededor de 120% en ambos casos; Fig. 3e), indicando que la sobreexpresión del gen *RCI5* es suficiente para superar el estrés

25 producido por el tratamiento de NaCl. Además, las plantas silvestres sólo tuvieron un 80 y 70% de hojas verdes y peso fresco del que presentan en condiciones control (Fig. 3e). Los mismos resultados se obtuvieron cuando se expusieron plantas silvestres y transgénicas *RCI5-OE* a concentraciones crecientes de LiCl (5 mM-20 mM; Fig 3e). Por el contrario,

30 plantas silvestres y transgénicas *RCI5-OE* expuestas a concentraciones crecientes de manitol (100 mM-400 mM) mostraron valores de número de

hojas verdes y FW muy similares (Fig 3e). Las diferencias encontradas entre la tolerancia de las plantas transgénicas *RCI5-OE* y de las plantas silvestres a los tratamientos con NaCl y LiCl fueron muy claras a nivel fenotípico (Fig. 3f). En conjunto, estos resultados demuestran que la sobreexpresión constitutiva del gen *RCI5* incrementa la tolerancia de Arabidopsis a la congelación y al estrés salino, debido a su componente iónico, sugiriendo que la proteína RCI5 actúa como un regulador positivo de la respuesta de Arabidopsis a frío y estrés salino.

10 2.2.- La proteína de la invención RCI5 (SEQ ID NO: 2) participa en la biosíntesis del óxido trimetilamina (TMAO)

La pregunta resultante era como la proteína RCI5 podría regular en Arabidopsis las respuestas al estrés por frío o salino. Numerosos estudios indican que una de las funciones fisiológicas de las FMO podría ser la osmoregulación, ya que en animales se ha demostrado que estas enzimas oxidan el metabolito endógeno trimetilamina (TMA) a TMAO (Ziegler, 1993; Larsen y Schelenk, 2001), un potente osmolito que facilita la adaptación de diferentes organismos marinos a entornos salinos y con temperaturas de congelación (Yancey et al., 1982; Larsen y Schelenk, 2001; Seibel y Walsh, 2002; Treberg et al., 2005; Strambini y Gonnelli, 2008). Por lo tanto, se decidió investigar si la proteína RCI5 estaba implicada en la biosíntesis de TMAO. Así, se trató de detectar TMAO en plantas de Arabidopsis creciendo en condiciones controladas. Los resultados revelaron que, de hecho, plantas de Arabidopsis no estresadas tienen niveles muy bajos, pero detectables ($\sim 5 \mu\text{mol Kg}^{-1}$ FW) de TMAO (Fig. 4a). Es destacable, sin embargo, que cuando las plantas fueron expuestas a temperaturas bajas o estrés salino, los dos tratamientos que inducen la expresión del gen *RCI5* (Fig. 1d), el contenido de TMAO se incrementa significativamente. Así pues, la exposición a 4°C ó 250 mM durante 24 h produce una acumulación de TMAO hasta valores cercanos a 25 y 35 $\mu\text{mol Kg}^{-1}$ FW, respectivamente (Fig. 4a), que son los niveles máximos de

TMAO endógeno que se detectaron en las condiciones de estrés (Fig. 8). La deshidratación como estrés, que no tiene ningún efecto en la expresión de RCI5 (Fig. 1d), tampoco afecta los niveles de TMAO (Fig. 4a).

La identificación de TMAO endógeno en *Arabidopsis* y la existencia
5 de una correlación entre la expresión de la proteína RCI5 y el contenido en TMAO llevó a analizar el contenido de esta molécula en las líneas transgénicas *RCI5-OE*. De forma clara, todas las plantas que sobreexpresaban el gen *RCI5* (*RCI5-OE*) manifestaron niveles significativamente más elevados de TMAO (~2 veces) que las plantas
10 silvestres originales (Figura 4b), indicando que la proteína RCI5 está involucrada en la biosíntesis de TMAO. Estos niveles, sin embargo, eran menores (3-4 veces) que los determinados en plantas silvestres expuestas a frío o a el tratamiento con sal (Figura 4a), lo que sugiere fuertemente que otras enzimas FMO, además de RCI5, tienen que estar implicadas en la
15 biosíntesis de TMAO en respuesta a estos estreses. De igual forma, las plantas transgénicas *RCI5-OE* sometidas a 4°C ó a 250 mM de NaCl durante 24 horas exhibieron mayores (~2 veces) cantidades de TMAO que las plantas silvestres expuestas al mismo tratamiento (Figura 4c).

Una evidencia completa y definitiva de la implicación de la proteína
20 RCI5 en la biosíntesis de TMAO se obtuvo mediante ensayos *in vitro* donde se analizó la capacidad de RCI5 para oxidar TMA a TMAO. Los resultados confirmaron que la proteína RCI5 de la invención purificada de *E. coli* fue capaz de oxidar TMA de una manera dosis dependiente, generando cantidades sustanciales de TMAO (Figura 4d). Estos datos
25 demuestran que las plantas *Arabidopsis* contienen niveles constitutivos de TMAO, que dichos niveles se incrementan significativamente en respuesta a estrés por bajas temperaturas y salino, y que dicho incremento se debe en parte, por la inducción de la expresión de *RCI5*.

30 **3.- El compuesto TMAO media la tolerancia a frío y sal en *Arabidopsis***

3.1.- El compuesto TMAO media la tolerancia a frío y sal en *Arabidopsis* mediante la regulación positiva de la expresión de genes que responden a estrés

Los resultados descritos hasta ahora sugieren una función de la proteína RCI5 en la osmoregulación a través de la biosíntesis de TMAO. Sin embargo, la mayor acumulación de TMAO en plantas de *Arabidopsis* sujetas a estrés por frío o sal (25-35 $\mu\text{mol Kg}^{-1}$ FW) parece ser baja para mediar un reajuste osmótico en estas condiciones. De hecho, esta concentración es del orden de tres veces de magnitud menor que la descrita para el TMAO en animales (Larsen y Schlenk, 2001; Seibel y Walsh, 2002) y para diferentes osmolitos, como la prolina y la glicinobetaina, en plantas (Wood et al., 1996; Russell et al., 1998; Sakamoto y Murata, 2000). Se ha propuesto que, en bajas concentraciones, algunos osmolitos pueden ejercer su papel protector frente a estrés abiótico por medio de mecanismos diferentes a la osmoprotección (Chen y Murata, 2002). Por ejemplo, se ha sugerido que la prolina y la glicina botaina podrían regular la expresión génica (Rajendrakumar et al., 1997; Iyer y Caplan, 1998; Kavi Kishor et al., 2005; Mattioli et al., 2008). Por tanto, se examinó la posibilidad de que el TMAO pudiese actuar como una molécula señalizadora mediando la inducción de la expresión génica en respuesta a estrés.

Ya que la proteína RCI5 está implicado en la síntesis de TMAO (ver mas arriba), primero se estudiaron los niveles de transcritos de diferentes genes cuya expresión se induce por estrés en las líneas transgénicas *RCI5-OE* crecidas en condiciones control o expuestas a temperaturas bajas o estrés salino. Entre los genes estudiados se incluyeron *KIN1*, *LTI78*, *COR15A* y *COR47*, que son inducidos en respuesta a diferentes estreses abióticos a través de las rutas dependientes e independientes de los CBFs (Gilmour et al., 2004; Maruyama et al., 2004), *RAB18* y *RCI1A*, que son regulados positivamente por frío por una vía independiente de los CFBs (Lang y Palva, 1992; Jarillo et al., 1994; Gilmour et al., 2004;

Maruyama et al., 2004; López-Cobollo y Salinas, unpublished results), y *CAT2* y *SOD2*, dos genes cuya expresión aumenta en respuesta a diferentes estreses y codifican proteínas implicadas en la detoxificación de ROS (Refs; Kliebestein et al., 1998; Chevalier et al., 1992). Además, se estudiaron los niveles de los genes *CBFs* (*CBF1-3*), cuya expresión es promovida específicamente por las temperaturas bajas (Gilmour et al., 1998; Liu et al., 1998; Medina et al., 1999). Como los patrones de expresión de todas las líneas transgénicas *RCI5-OE* analizadas fueron muy similares solo se muestran los resultados obtenidos con la línea 1T (Figs. 5a, b). En condiciones control, la acumulación de transcritos correspondientes a *KIN1*, *COR15A*, *COR47*, y principalmente los de *CAT2* y *SOD2* fueron considerablemente superiores en las plantas sobreexpresoras de *RCI5* que en las silvestres (Fig. 5a). La expresión de los otros genes analizados no se vio afectada en las líneas transgénicas *RCI5-OE* (Figs. 5a, b). La inducción de todos los genes, excepto *RAB18* y *RCI1A*, en respuesta a frío era mayor en las plantas que sobreexpresaban *RCI5* (Fig. 5a, b). En condiciones de estrés salino, todos los genes que responden a NaCl (p.e., *KIN1*, *LT178*, *COR15A*, *COR47*, *CAT2* y *SOD2*, ver estos genes en la Fig 5a) mostraban una mayor inducción en las plantas *RCI5-OE* (Fig. 5a, b). Estos patrones de expresión justifican completamente el incremento de la tolerancia a la congelación, antes y después de la aclimatación a frío y a estrés salino de las líneas *RCI5-OE* (Fig. 3). Por tanto, se concluye que la proteína *RCI5* regula positivamente la respuesta de la expresión génica a estrés, lo cual sugiere que el TMAO podría, de hecho, mediar la inducción por estrés de la expresión génica y, por tanto, la tolerancia de *Arabidopsis* a la congelación y al estrés salino.

3.2.- La aplicación externa mediante pulverización de TMAO induce tolerancia al frío y al estrés salino

Si el TMAO actúa como una molécula señalizadora y media la inducción de la expresión génica por estrés, su aplicación exógena a

plantas de *Arabidopsis* en condiciones control debería inducir la expresión génica regulada por estrés. Esta hipótesis se verificó examinando la acumulación de los transcritos correspondientes a los genes analizados anteriormente in plantas silvestres de *Arabidopsis* pulverizadas con 100 μM TMAO, una concentración que, tras 24 h de tratamiento, provoca una acumulación de TMAO endógeno en el mismo rango detectado en plantas expuestas a temperaturas bajas o estrés salino ($30\text{-}35 \mu\text{mol Kg}^{-1} \text{FW}$; Fig. 9). Excepto en el caso de *RAB18* y *RCI1A*, el TMAO exógeno activó la expresión de todos los genes hasta niveles similares a los alcanzados tras la exposición a 4°C y NaCl (Figs. 5c, d), confirmando que el TMAO media la inducción de la expresión génica por estrés. También se estudió La acumulación de mRNA de *RCI5* en respuesta a TMAO. Los resultados obtenidos indican que la inducción por frío y sal del gen *RCI5* no está mediada por TMAO (Fig. 5c).

Por último, se estudió si el TMAO también mediaba la tolerancia de *Arabidopsis* a la congelación y al estrés salino. Para ello, plantas silvestres de *Arabidopsis* fueron pulverizadas con $100 \mu\text{M}$ TMAO y se determinó su tolerancia a la congelación, antes y después de la aclimatación a frío, así como su tolerancia a deshidratación y estrés salino. De manera consistente con lo descrito anteriormente, la aplicación exógena de TMAO aumentó de manera significativa la tolerancia de *Arabidopsis* a la congelación, tanto de plantas aclimatadas como no aclimatadas, y a estrés salino (Figs. 6a, b), pero no tuvo ningún efecto en la capacidad de *Arabidopsis* para tolerar la deshidratación. También se estudió la tolerancia a LiCl y manitol de plantas de *Arabidopsis* tratadas con TMAO. El TMAO incrementó la tolerancia de *Arabidopsis* a LiCl pero no a manitol (Fig. 6b), indicando que, como la proteína *RCI5*, está implicado de manera específica en la tolerancia al componente iónico del estrés salino. Las diferencias fenotípicas de las plantas tratadas con TMAO y las no tratadas son muy evidentes (Figs. 6c, d). En conjunto, todos estos resultados indican que el TMAO actúa como una molécula señalizadora mediando la

tolerancia de *Arabidopsis* a la congelación y al estrés salino regulando positivamente la inducción de la expresión génica.

MATERIALES Y MÉTODOS

5 **Material vegetal, condiciones de crecimiento y tratamientos**

En este estudio se utilizó como material vegetal *Arabidopsis thaliana* (L.) ecotipos Columbia (Col) y Landsberg *erecta* (Ler), los mutantes *aba1-1* (ref) y *cbf2-1* (Novillo et al., 2004), así como *CBF1-AS3*, una línea transgénica de *Arabidopsis* en la cual *CBF1* y *CBF3* no son inducidos por
10 frío (Novillo et al., 2007). Para la obtención de plántulas, las semillas eran sembradas en condiciones estériles en cajas Petri con medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 250 mg/l MES, solidificado con agar al 0,8% (w/v). Las plantas eran cultivadas en macetas que
15 contenían una mezcla de sustrato orgánico con vermiculita (3:1, v/v), y se regaban con agua y una solución mineral (Haughn y Sommerville, 1986). Ambas, plántulas y plantas, se crecían a $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ en condiciones de día largo (16 horas de luz blanca fluorescente, flujo de fotones de $70\text{-}90\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{sec}^{-1}$).

Los análisis de expresión se realizaron con plantas de tres
20 semanas, excepto en el análisis en diferentes órganos donde se utilizaron plantas de 8 semanas. El tratamiento de bajas temperaturas se realizó transfiriendo las plantas a una cámara de crecimiento a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante diferentes periodos bajo las condiciones de luz y fotoperiodo descritas a anteriormente. Para los tratamientos con NaCl, LiCl y manitol las plantas
25 fueron regadas con 250mM NaCl, 20mM LiCl y 500mM manitol respectivamente, y recolectadas un día mas tarde. La deshidratación fue inducida dejando las plantas, previamente separadas de su sistema radicular, perder un 50% de su FW. Para los tratamientos de TMAO, las plantas fueron pulverizadas con 100 μM TMAO y recolectadas un día mas
30 tarde. El control del tratamiento de TMAO se obtuvo pulverizando plantas con agua. En todos los casos, las plantas fueron congeladas

inmediatamente con N₂ después de los tratamientos y guardadas a -80°C hasta su uso.

El TMAO endógeno se midió siempre en plantas de 3 semanas. Se utilizaron plantas pulverizadas con 100µM TMAO y recogidas tras diferentes tiempos de tratamiento, o pulverizadas con diferentes concentraciones (10, 50, 100 y 200µM) de TMAO y recogidas un día después. También se regaron plantas con diferentes concentraciones (50, 100, 150, 200, 250 y 300mM) de NaCl y se recogieron un día después. El efecto de las temperaturas bajas en el contenido de TMAO endógeno se estudio exponiendo plantas a 4°C durante diferentes tiempos. Después de recogerlas, las plantas siempre fueron congeladas en N₂ y usadas inmediatamente.

Los experimentos de congelación se llevaron a cabo con plantas de 2 semanas como se ha descrito previamente (Novillo et al., 2004). La tolerancia fue establecida como la capacidad de las plantas de crecer tras 14 días de recuperación en condiciones control. La tolerancia a sal se analizó transfiriendo plántulas de 1º días a placas nuevas medio suplementado con concentraciones crecientes de NaCl (50, 100, 150 y 200mM) o LiCl (5, 10, 15 y 20mM). El estrés osmótico se impuso transfiriendo plántulas de 10 días a placas con medios suplementados con concentraciones crecientes de manitol (100, 200, 300 y 400mM). En todos los casos, las plantas se mantuvieron 2 días a cada concentración. La tolerancia a estos tratamientos se evaluó determinando el peso fresco y el número de hojas verdes al final del tratamiento. La deshidratación fue inducida retirando las plántulas de 10 días del medio de crecimiento, situándolas en un papel de filtro húmedo, y se dejaron que crecieran durante 2 días sin agua. La deshidratación se estimó como el porcentaje de FW inicial después del tratamiento. Para analizar el efecto del TMAO en la tolerancia a la congelación, se pulverizaron plantas de 2 semanas con 100µM TMAO 1 h antes de ser congeladas o aclimatadas a frío como se ha descrito previamente. El efecto del TMAO en la tolerancia de

Arabidopsis a NaCl, LiCl, manitol y deshidratación se estudió germinando semillas en placas con medio suplementado con 100µM TMAO. A continuación, las plántulas de 10 días se procesaron como se ha descrito anteriormente.

5

Métodos de Biología Molecular

RCI5 se aisló rastreando una biblioteca de cDNA, preparada a partir de plántulas etioladas de Arabidopsis aclimatadas a frío, con una sonda substractiva enriquecida en transcritos inducibles por frío siguiendo protocolos descritos previamente (Jarillo *et al.* 1994). Para los análisis de similitud de secuencia se usó el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Centre for Biotechnology Information (Altschul *et al.*, 1997). Las digestiones con encimas de restricción, los clonajes, la extracción de proteínas totales de plantas, y las hibridaciones de DNA y RNA se realizaron de acuerdo a procedimientos estándar (Sambrook *et al.*, 1989). El RNA total se aisló como se ha sido reportado previamente (Logemann *et al.*, 1987).

El cDNA completo de *RCI5* fue obtenido por RT-PCR de RNA total de plantas de Arabidopsis ecotipo Col expuestas a 4°C durante 24h, usando los cebadores SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5. El fragmento resultante se rellenó con Klenow y se ligó en el sitio *SmaI* del plásmido *pBluescript SK(+)* (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, USA) para obtener el plásmido *pBSRCI5*. Para obtener la fusión *GST::RCI5*, el plásmido *pBSRCI5* fue digerido con *BamHI* y *Sall*. Entonces, el fragmento conteniendo el cDNA de *RCI5* se rellenó con Klenow y se ligó en el sitio *SmaI* del vector *pGEX-4T1* (GE Healthcare, Bio-Sciences, Piscataway, NJ).

Para expresar *RCI5* en *E. coli*, se transformó la cepa BL21(DE3) pLysS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) con el vector *pGEX-4T1* que contiene la fusión *GST::RCI5*. La purificación de *RCI5* de *E. coli* se realizó de acuerdo al protocolo de la casa comercial, induciendo la expresión en el

30

cultivo durante 4 horas a 28°C con 0.1mM IPTG. El vector *pGEX-4T1* se usó como control.

La sonda específica para *RCI5* se generó mediante PCR sobre cDNA de *Arabidopsis* ecotipo Col usando los cebadores SEQ ID NO: 6 y
5 SEQ ID NO: 7. Las sondas específicas para *KIN1*, *LTI78*, *COR47*,
COR15A, *RCI1A*, *RAB18*, *CBF1*, *CBF2*, *CBF3*, *GUS* y *SOD2* fueron
obtenidas como se ha sido descrito previamente (Kliebenstein *et al.*, 1998;
Novillo *et al.*, 2007;). La sonda específica para *CAT2* se obtuvo mediante
10 PCR sobre DNA genómico de *Arabidopsis* con los cebadores SEQ ID NO:
8 y SEQ ID NO: 9. Como control de carga se usó un fragmento *EcoRI* del
18S rRNA (Tremousaygue *et al.*, 1992). Las muestras de RNA de cada
experimento se analizaron en al menos dos membranas independientes, y
cada experimento se repitió al menos 3 veces.

15 **Obtención de las Plantas Transgénicas**

Mediante PCR se amplificó un fragmento de 0.77 kb inmediatamente anterior al ATG de la región codificante de *RCI5*, usando como molde DNA genómico de *Arabidopsis* ecotipo Col y los cebadores SEQ ID NO: 10 y
20 SEQ ID NO: 11. El fragmento de promotor se clonó en el sitio *SmaI* del
vector *pBluescript SK(+)*. Posteriormente, el plásmido fue digerido con *Sall*
y *BamHI*, y el fragmento obtenido se ligó en los correspondientes sitios de
restricción del plásmido *pBI101* (Clontech, Palo Alto, **CA, USA**) para
obtener la fusión *RCI5::GUS*. El plásmido *pBSRCI5* (ver anterior) fue
digerido con *SmaI* y el cDNA de *RCI5* resultante se ligó en el sitio *SmaI* del
25 vector *pROK2* bajo el control del promotor CaMv35S (Baulcombe *et al.*,
1986), para obtener la construcción *35S::RCI5*.

Los plásmidos recombinantes, una vez verificada la construcción mediante secuenciación, se introdujeron en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (Deblaere *et al.*, 1985). Para transformar las plantas
30 de *Arabidopsis* ecotipo Col se siguió el método de inmersión floral (Clough y Bent, 1998).

Localización Histoquímica de la Actividad GUS

El análisis histoquímico de la actividad GUS en las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que contienen la fusión *RCI5::GUS* se realizó siguiendo protocolos descritos anteriormente (Medina et al., 2001).

5

Cuantificación de la Actividad Monooxigenasa

La cuantificación de la actividad monooxigenasa se realizó siguiendo esencialmente protocolos publicados previamente con modificaciones (Agustsson y Strom, 1981); (Lang et al., 1998). Resumidamente, 100 µl de
10 tampón PBS (pH 7.4) conteniendo 100 µg de proteínas procedentes de extractos bacterianos, 100 µg de proteínas purificadas de *E. coli*, o 100 µg de proteínas totales de plantas de 3 semanas se añadieron a 2ml de una mezcla de reacción estándar consistente en 2.5nmol FAD, 600nmol
15 NADPH, 6µmol MgCl₂ y 40µmol de pirofosfato potásico (pH 8.2). La reacción se inició con 300nmol TMA. Después de 20 min a 24°C, la reacción se paró añadiendo HClO₄ a una concentración final del 1%. La actividad monooxigenasa se cuantificó como la cantidad de NADPH consumido por hora a 24°C.

20 Determinación del Contenido en TMAO

El contenido de TMAO fue cuantificado reduciendo el TMAO a TMA con TiCl₃, siguiendo el protocolo descrito previamente (Bystedt et al., 1959) con algunas modificaciones. Diez gramos de tejido verde congelado se
25 homogeneizó con 7,5% TCA. Después de 2h de incubación a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron 15 min a 20°C y el sobrenadante se filtró a través de papel Whatman n° 1. El contenido en TMA se estimó añadiendo 1ml de formaldehído al 20%, 3 ml de KOH al 30% y 10ml de tolueno a 1ml de sobrenadante filtrado. Esta mezcla se agitó vigorosamente durante 15s y se dejó reposar 5 min, la fase de tolueno que
30 contenía el TMA se recuperó y se transfirió a un tubo nuevo que contenía 1mg de Na₂SO₄. Mediante agitación suave se obtuvo una fase acuosa

libre de tolueno que se usó en el análisis espectrofotométrico. Cinco ml del extracto con tolueno se incubó con 5ml de ácido pícrico 0,02% durante 30s a temperatura ambiente. Tras esta incubación, en presencia de TMA se desarrollo un color amarillo cuya concentración era proporcional a la concentración de TMA, y que era directamente proporcional a la absorbancia a 410nm. El TMAO se redujo añadiendo 132 μ l de 15% $TiCl_3$ a 4 ml del sobrenadante filtrado. La mezcla se incubó a 80°C durante 90s y se enfrió inmediatamente. El contenido en TMA en la mezcla, después de la reducción del TMAO, se determinó como en las muestras de TMA. Los valores obtenidos se refirieron a una curva de calibración generada con varias soluciones con distintas concentraciones de TMA comercial (Sigma, St. Louis, MO). El contenido en TMAO se calculó como la diferencia de TMA antes y después de la reducción.

Para evaluar la capacidad de RCI5 para generar TMAO, se cuantificó la actividad monooxigenasa, usando 0, 50, 100 y 200 μ g de proteína purificada de *E. coli*, como se ha descrito anteriormente (Cuantificación de la Actividad Monooxigenasa). A continuación, la determinación de TMAO se realizó como se ha descrito anteriormente cogiendo 1ml de reacción final para medir el TMA y 1ml para reducir el TMAO a TMA.

BIBLIOGRAFIA

Agustsson, I., and Strom, A.R. (1981). Biosynthesis and turnover of trimethylamine oxide in the teleost cod, *Gadus morhua*. The Journal of biological chemistry 256, 8045-8049.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic acids research 25, 3389-3402.

- Apel, K., and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual review of plant biology* 55, 373-399.
- Baker, S.S., Wilhelm, K.S., and Thomashow, M.F. (1994). The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant molecular biology* 24, 701-713.
- Bartsch, M., Gobbato, E., Bednarek, P., Debey, S., Schultze, J.L., Bautor, J., and Parker, J.E. (2006). Salicylic acid-independent ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 signaling in *Arabidopsis* immunity and cell death is regulated by the monooxygenase FMO1 and the Nudix hydrolase NUDT7. *The Plant cell* 18, 1038-1051.
- Baulcombe, D.C., Saunders, G.R., Bevan, M.W., Mayo, M.A. and Harrison, B.D. (1986). Expression of biologically active viral satellite RNA from nuclear genome of transformed plants. *Nature* 321, 446-449.
- Boyer, J.S. (1982). *Plant Productivity and Environment*. Science (New York, N.Y) 218, 443-448.
- Bystedt, J., Swenne, L., and Aas, W.A. (1959). Determination of trimethylamine oxide in fish muscle. *J. Sci. Food Agric.* 10 301-304.
- Cashman, J.R. (1994). Structural and catalytic properties of the mammalian flavin-containing monooxygenase. *Chem. Res. Tox.* 8 165-181.
- Catala, R., Santos, E., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Martinez-Zapater, J.M., and Salinas, J. (2003). Mutations in the Ca²⁺/H⁺ transporter CAX1 increase CBF/DREB1 expression and the cold-acclimation response in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 15, 2940-2951.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16, 735-743.
- Chawade, A., Brautigam, M., Lindlof, A., Olsson, O., and Olsson, B. (2007). Putative cold acclimation pathways in *Arabidopsis thaliana* identified by a

- combined analysis of mRNA co-expression patterns, promoter motifs and transcription factors. *BMC genomics* 8, 304.
- Chen, T.H., and Murata, N. (2002). Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current opinion in plant biology* 5, 250-257.
- Cheng, Y., Dai, X., and Zhao, Y. (2006). Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes & development* 20, 1790-1799.
- Chevalier, C., Yamaguchi, J., and McCourt, P. (1992). Nucleotide
10 Sequence of a cDNA for Catalase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology* 99, 1726-1728.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., and Leemans, J. (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic acids
15 research* 13, 4777-4788.
- Fowler, S., and Thomashow, M.F. (2002). *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *The Plant cell* 14, 1675-1690.
- 20 Gilmour, S.J., Fowler, S.G., and Thomashow, M.F. (2004). *Arabidopsis* transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. *Plant molecular biology* 54, 767-781.
- Gilmour, S.J., Sebolt, A.M., Salazar, M.P., Everard, J.D., and Thomashow, M.F. (2000). Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional
25 activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant physiology* 124, 1854-1865.
- Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Stockinger, E.J., Salazar, M.P., Houghton, J.M., and Thomashow, M.F. (1998). Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in
30 cold-induced COR gene expression. *Plant J* 16, 433-442.

- Hansen, B.G., Kliebenstein, D.J., and Halkier, B.A. (2007). Identification of a flavin-monooxygenase as the S-oxygenating enzyme in aliphatic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 50, 902-910.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., and Bohnert, H.J. (2000). Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 51, 463-499.
- Haughn, G., and Sommerville, C. (1986). Sulfonyleurea-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. General Genet.* 204, 430-434.
- Iyer, S., and Caplan, A. (1998). Products of Proline Catabolism Can Induce Osmotically Regulated Genes in Rice. *Plant Physiol.* 116, 203-211.
- Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Schabenberger, O., and Thomashow, M.F. (1998). *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science (New York, N.Y)* 280, 104-106.
- Jarillo, J.A., Capel, J., Leyva, A., Martinez-Zapater, J.M., and Salinas, J. (1994). Two related low-temperature-inducible genes of *Arabidopsis* encode proteins showing high homology to 14-3-3 proteins, a family of putative kinase regulators. *Plant molecular biology* 25, 693-704.
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature biotechnology* 17, 287-291.
- Kavi Kishor, P.B., Sangam, S., Amrutha, R.N., Laxmi, P.S., Naidu, K.R., Rao, K.R.S.S., Rao, S., Reddy, K.J., Theriappan, P., and Sreenivasulu, N. (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current science* 88, 424 - 438.
- Kawamura, Y., and Uemura, M. (2003). Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of *Arabidopsis* leaves associated with cold acclimation. *Plant J* 36, 141-154.

- Kliebenstein, D.J., Monde, R.A., and Last, R.L. (1998). Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant physiology* 118, 637-650.
- Koch, M., Vorwerk, S., Masur, C., Sharifi-Sirchi, G., Olivieri, N., and Schlaich, N.L. (2006). A role for a flavin-containing mono-oxygenase in resistance against microbial pathogens in Arabidopsis. *Plant J* 47, 629-639.
- Koornneef, M., Dellaert, L.W., and van der Veen, J.H. (1982). EMS- and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Mutation research* 93, 109-123.
- 10 Kreps, J.A., Wu, Y., Chang, H.S., Zhu, T., Wang, X., and Harper, J.F. (2002). Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant physiology* 130, 2129-2141.
- Lang, D.H., Yeung, C.K., Peter, R.M., Ibarra, C., Gasser, R., Itagaki, K., Philpot, R.M., and Rettie, A.E. (1998). Isoform specificity of trimethylamine N-oxygenation by human flavin-containing monooxygenase (FMO) and P450 enzymes: selective catalysis by FMO3. *Biochemical pharmacology* 15 56, 1005-1012.
- Lang, V., and Palva, E.T. (1992). The expression of a rab-related gene, rab18, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Plant molecular biology* 20, 951-962.
- 20 Larsen, B.K., and Schlenk, D. (2001). Effect of salinity on flavin-containing monooxygenase expression and activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of comparative physiology* 171, 421-429.
- Lee, B.H., Henderson, D.A., and Zhu, J.K. (2005). The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *The Plant cell* 17, 25 3155-3175.
- Levitt, J. (1980). Responses of plants to environmental stresses: chilling, freezing and high temperatures stresses. (New York: Academic Press).
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular 30

signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 10, 1391-1406.

Logemann, J., Schell, J., and Willmitzer, L. (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical biochemistry* 163, 16-20.

Maruyama, K., Sakuma, Y., Kasuga, M., Ito, Y., Seki, M., Goda, H., Shimada, Y., Yoshida, S., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). Identification of cold-inducible downstream genes of the *Arabidopsis* DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *Plant J* 38, 982-993.

Matsui, A., Ishida, J., Morosawa, T., Mochizuki, Y., Kaminuma, E., Endo, T.A., Okamoto, M., Nambara, E., Nakajima, M., Kawashima, M., Satou, M., Kim, J.M., Kobayashi, N., Toyoda, T., Shinozaki, K., and Seki, M. (2008). *Arabidopsis* transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array. *Plant & cell physiology* 49, 1135-1149.

Mattioli, R., Marchese, D., D'Angeli, S., Altamura, M.M., Costantino, P., and Trovato, M. (2008). Modulation of intracellular proline levels affects flowering time and inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology* 66, 277-288.

McKersie, B.D., Bowley, S.R., Harjanto, E., and Leprince, O. (1996). Water-Deficit Tolerance and Field Performance of Transgenic Alfalfa Overexpressing Superoxide Dismutase. *Plant physiology* 111, 1177-1181.

Medina, J., Catala, R., and Salinas, J. (2001). Developmental and stress regulation of RCI2A and RCI2B, two cold-inducible genes of *Arabidopsis* encoding highly conserved hydrophobic proteins. *Plant physiology* 125, 1655-1666.

Medina, J., Bargues, M., Terol, J., Perez-Alonso, M., and Salinas, J. (1999). The *Arabidopsis* CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated

by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant physiology* 119, 463-470.

Mishina, T.E., and Zeier, J. (2006). The *Arabidopsis* flavin-dependent monooxygenase FMO1 is an essential component of biologically induced systemic acquired resistance. *Plant physiology* 141, 1666-1675.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* 15, 473-497.

Novillo, F., Medina, J., and Salinas, J. (2007). *Arabidopsis* CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 21002-21007.

Novillo, F., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Salinas, J. (2004). CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3985-3990.

Oono, Y., Seki, M., Satou, M., Iida, K., Akiyama, K., Sakurai, T., Fujita, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2006). Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* genes during cold acclimation and deacclimation using DNA microarrays. *Functional & integrative genomics* 6, 212-234.

Rajendrakumar, C.S., Suryanarayana, T., and Reddy, A.R. (1997). DNA helix destabilization by proline and betaine: possible role in the salinity tolerance process. *FEBS letters* 410, 201-205.

Russell, B.L., Rathinasabapathi, B., and Hanson, A.D. (1998). Osmotic stress induces expression of choline monooxygenase in sugar beet and amaranth. *Plant physiology* 116, 859-865.

Sakamoto, A., and Murata, N. (2000). Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *Journal of experimental botany* 51, 81-88.

- Salinas, J. (2002). Molecular mechanisms of signal transduction in cold acclimation. (Oxford University Press).
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: a Laboratory Manual. (Cold Spring Harbor, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- 5 Seibel, B.A., and Walsh, P.J. (2002). Trimethylamine oxide accumulation in marine animals: relationship to acylglycerol storage. *The Journal of experimental biology* 205, 297-306.
- 10 Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y., and Shinozaki, K. (2001). Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *The Plant cell* 13, 61-72.
- 15 Stockinger, E.J., Gilmour, S.J., and Thomashow, M.F. (1997). Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 1035-1040.
- 20 Strambini, G.B., and Gonnelli, M. (2008). Singular efficacy of trimethylamine N-oxide to counter protein destabilization in ice. *Biochemistry* 47, 3322-3331.
- 25 Tobena-Santamaria, R., Blied, M., Ljung, K., Sandberg, G., Mol, J.N., Souer, E., and Koes, R. (2002). FLOOZY of petunia is a flavin mono-oxygenase-like protein required for the specification of leaf and flower architecture. *Genes & development* 16, 753-763.
- Treberg, J.R., Bystriansky, J.S., and Driedzic, W.R. (2005). Temperature effects on trimethylamine oxide accumulation and the relationship between plasma concentration and tissue levels in smelt (*Osmerus mordax*). *Journal of experimental zoology* 303, 283-293.

- Tremousaygue, D., Laudie, M., Grellet, F., and Delseny, M. (1992). The *Brassica oleracea* rDNA spacer revisited. *Plant molecular biology* 18, 1013-1018.
- Uemura, M., Warren, G., and Steponkus, P.L. (2003). Freezing sensitivity
5 in the *sfr4* mutant of *Arabidopsis* is due to low sugar content and is manifested by loss of osmotic responsiveness. *Plant physiology* 131, 1800-1807.
- Van Breusegem, F., Kushnir, S., Sooten, L., Bauw, G., Botterman, J., Van Montagu, M., and Inze, D. (1998). Processing of a chimeric protein in
10 chloroplasts is different in transgenic maize and tobacco plants. *Plant molecular biology* 38, 491-496.
- Vogel, J.T., Zarka, D.G., Van Buskirk, H.A., Fowler, S.G., and Thomashow, M.F. (2005). Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *Plant J* 41,
15 195-211.
- Wanner, L.A., and Junttila, O. (1999). Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 120, 391-400.
- Welling, A., and Palva, E.T. (2008). Involvement of CBF transcription factors in winter hardiness in birch. *Plant physiology* 147, 1199-1211.
- 20 Wood, A.J., Saneoka, H., Rhodes, D., Joly, R.J., and Goldsbrough, P.B. (1996). Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum. *Plant physiology* 110, 1301-1308.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1994). A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought,
25 low-temperature, or high-salt stress. *The Plant cell* 6, 251-264.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual review of plant biology* 57, 781-803.
- Yancey, P.H., Rhea, M.D., Kemp, K.M., and Bailey, D.M. (2004).
30 Trimethylamine oxide, betaine and other osmolytes in deep-sea animals:

depth trends and effects on enzymes under hydrostatic pressure. Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France) 50, 371-376.

Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., and Somero, G.N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. Science (New York, N.Y 217, 1214-1222.

Zhao, Y., Christensen, S.K., Fankhauser, C., Cashman, J.R., Cohen, J.D., Weigel, D., and Chory, J. (2001). A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. Science (New York, N.Y 291, 306-309.

Zhu, J., Dong, C.H., and Zhu, J.K. (2007). Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. Current opinion in plant biology 10, 290-295.

Ziegler, D.M. (1990). Flavin-containing monooxygenases: enzymes adapted for multisubstrate specificity. Trends in pharmacological sciences 11, 321-324.

Zou, Q., Bennion, B.J., Daggett, V., and Murphy, K.P. (2002). The molecular mechanism of stabilization of proteins by TMAO and its ability to counteract the effects of urea. Journal of the American Chemical Society 124, 1192-1202.

REIVINDICACIONES

1.- Planta transgénica tolerante al frío y al estrés salino caracterizada porque comprende una secuencia de nucleótidos que permite la expresión
5 de una proteína con actividad monooxigenasa (FMO), seleccionada del siguiente grupo:

i.- la secuencia de nucleótidos del gen *RCI5* de SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma; y

10 ii.- una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a).

2.- Planta transgénica según la reivindicación 1 caracterizada porque la secuencia de nucleótidos es la SEQ ID NO: 1.

15 3.- Planta transgénica según la reivindicación 1 caracterizada porque la planta es *Arabidopsis*, preferentemente la planta transgénica *RCI5-OE*, que contiene la SEQ ID NO: 1

20 4.- Procedimiento de obtención de la planta transgénica según las reivindicaciones 1 a la 3 caracterizado porque consiste en la introducción en una planta de una secuencia de nucleótidos constituida por:

i.- una secuencia de nucleótidos codificante de proteína con actividad monooxigenasa (FMO), seleccionada del siguiente grupo:

25 - la secuencia de nucleótidos del gen *RCI5* de SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma; o una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a). y

ii.- una secuencia de nucleótidos promotora que permite y regula la expresión de la secuencia de i.- y la aparición de una proteína con actividad monooxigenasa en el interior de la célula.

30

5.- Procedimiento según la reivindicación 4 caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

- a) obtención de un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos del gen *RCI5* SEQ ID NO: 1,
- 5 b) obtención de microorganismos portadores del vector a), y
- c) transformación de las plantas con el vector de a) o con el microorganismo de b).

6. Una secuencia de nucleótidos codificante de una proteína con actividad monooxigenasa (FMO), seleccionada del siguiente grupo:

- a) la secuencia de nucleótidos del gen *RCI5* de SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma; o una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a), con o sin
- 10 b) b) una secuencia de nucleótidos promotora que permite y regula la expresión de la secuencia de a) y la aparición de una proteína con actividad monooxigenasa en el interior de la célula.
- 15 c)

7.- Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 6 caracterizado porque la secuencia de nucleótidos de a) está constituida por la secuencia de nucleótidos *RCI5* de SEQ ID NO: 1.

8.- Vector de expresión génica caracterizado porque comprende la secuencia de nucleótidos según las reivindicaciones 6 y 7 y que permite la transformación o transfección de microorganismos y células y la posterior obtención de las plantas transgénicas de la invención.

9.- Vector de expresión según la reivindicación 8 caracterizado porque es el vector 35S::*RCI5*.

10.- Microorganismo o célula caracterizado porque contiene la secuencia de nucleótidos según las reivindicaciones 6 y 7 o el vector de expresión según las reivindicaciones 8 y 9.

5 11.- Semilla de una planta caracterizada porque contiene la secuencia de nucleótidos según las reivindicaciones 6 y 7 o el vector de expresión según las reivindicaciones 8 y 9.

10 12.- Uso de una composición acuosa que comprende el compuesto óxido de trimetilamina (TMAO) o un derivado del mismo para inducir tolerancia al estrés salino y al frío en las plantas y/o semillas.

15 13.- Uso de una composición según la reivindicación 12 caracterizado porque la composición acuosa comprende el compuesto TMAO en una concentración comprendida entre 1 μM y 100 mM, preferentemente entre 50 μM y 1 mM, y más preferentemente a 100 μM .

20 14.- Uso de una composición según la reivindicación 12 caracterizado porque la composición acuosa de TMAO es de 100 μM .

25 15.- Uso de una composición según las reivindicaciones 12 a la 14 caracterizado porque la composición acuosa se aplica mediante pulverización a la parte aérea.

30 16.- Uso de una composición según las reivindicaciones 12 a la 14 caracterizado porque la composición acuosa se aplica al tallo por inyección.

35 17.- Uso de una composición según las reivindicaciones 12 a la 14 caracterizado porque la composición acuosa se aplica al suelo u otro

sustrato de cultivo, al agua de riego (o solución de cultivo) o por inmersión del sistema radicular de las plantas y/o de semillas.

5

10

15

20

25

30

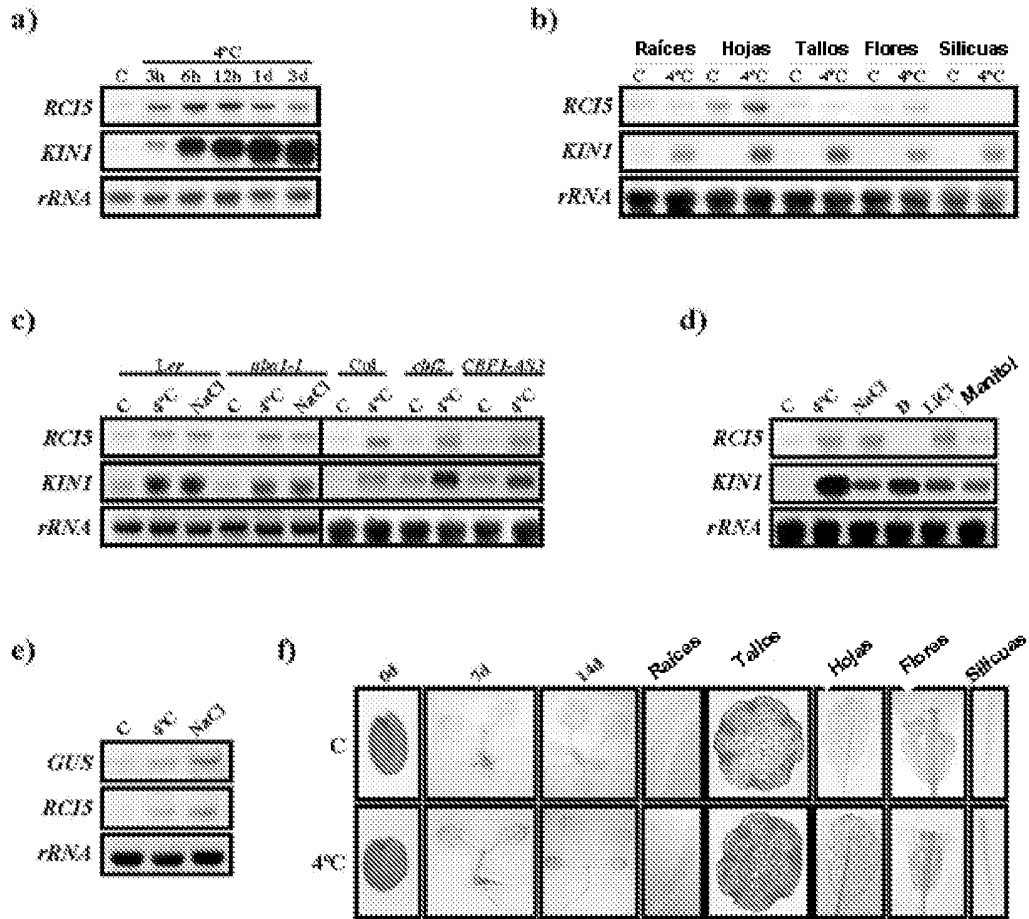


FIG. 1

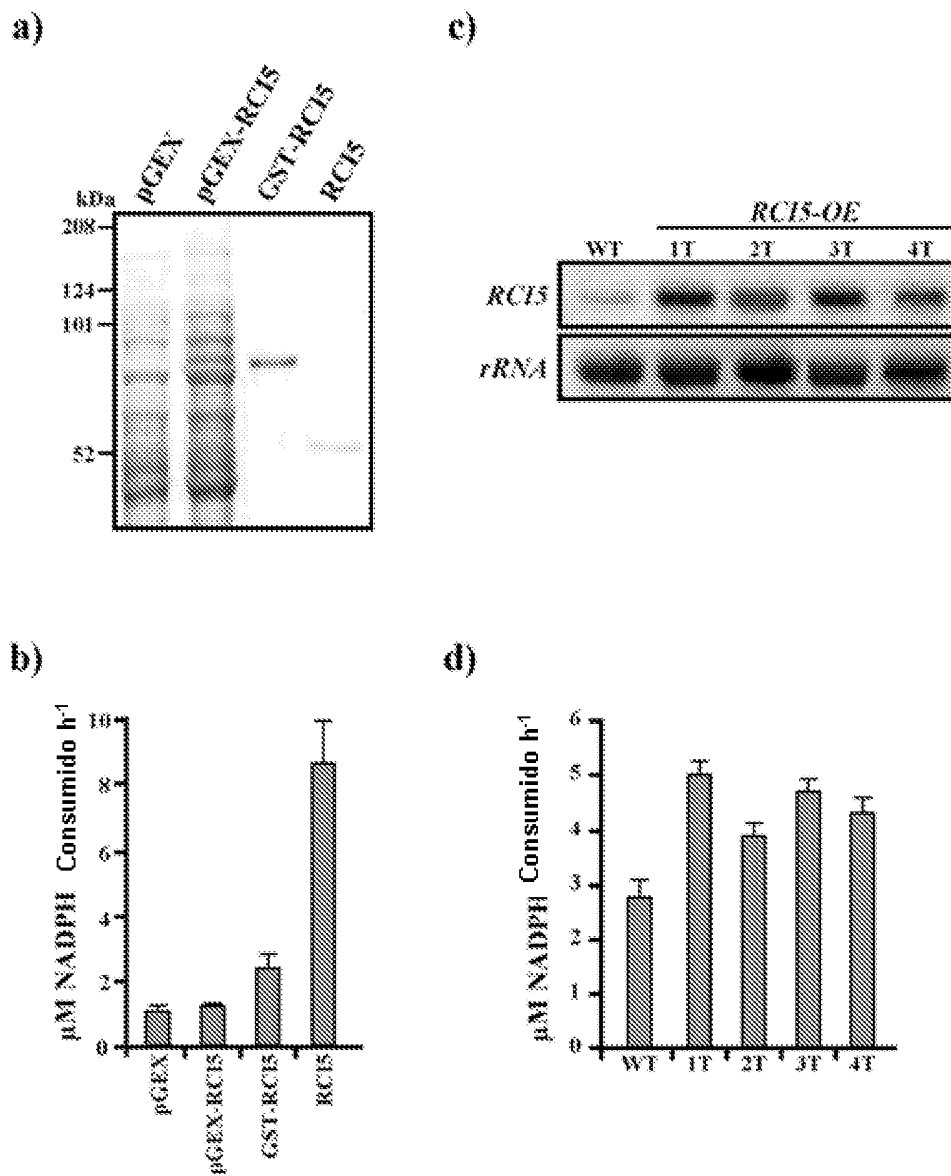


FIG. 2

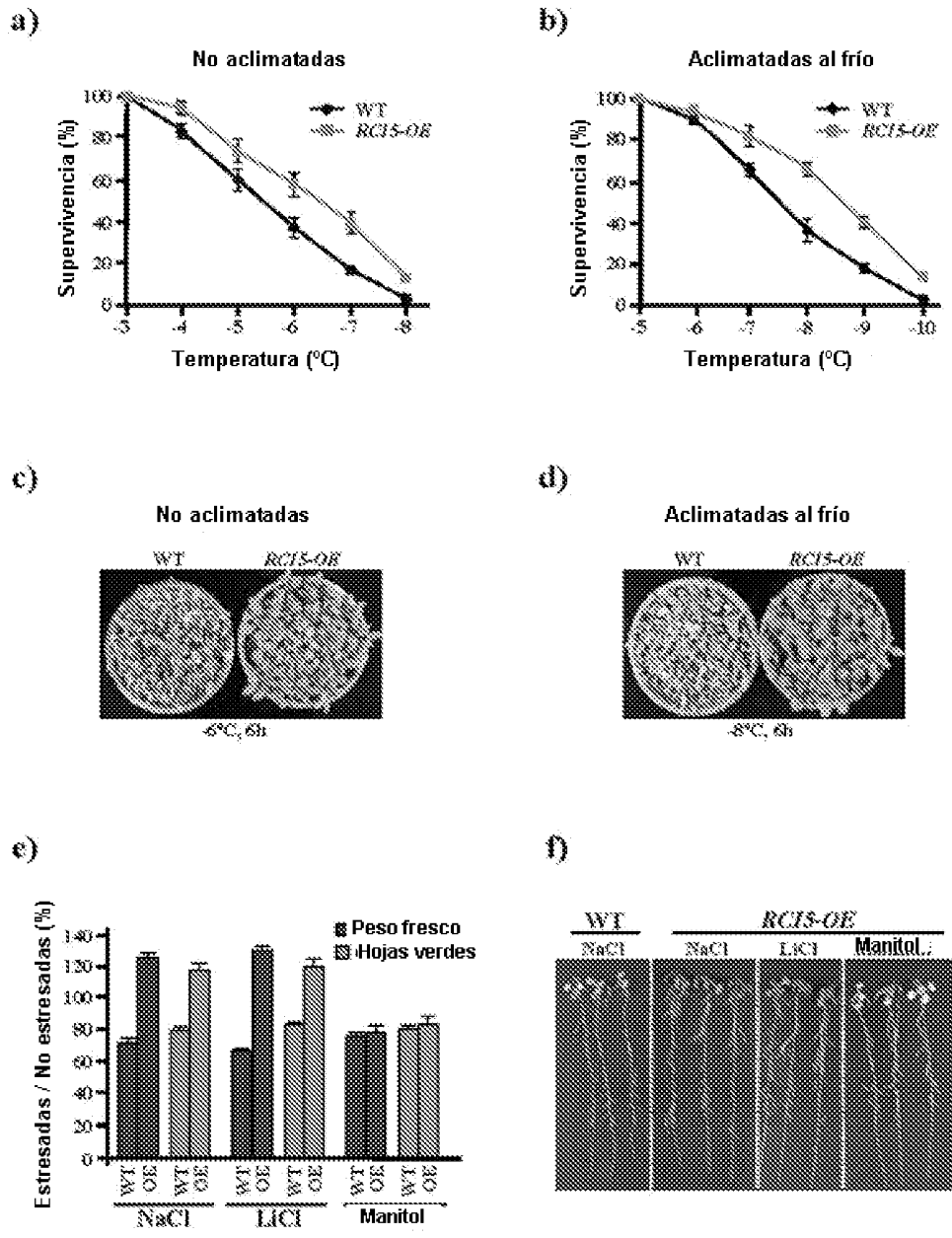


FIG. 3

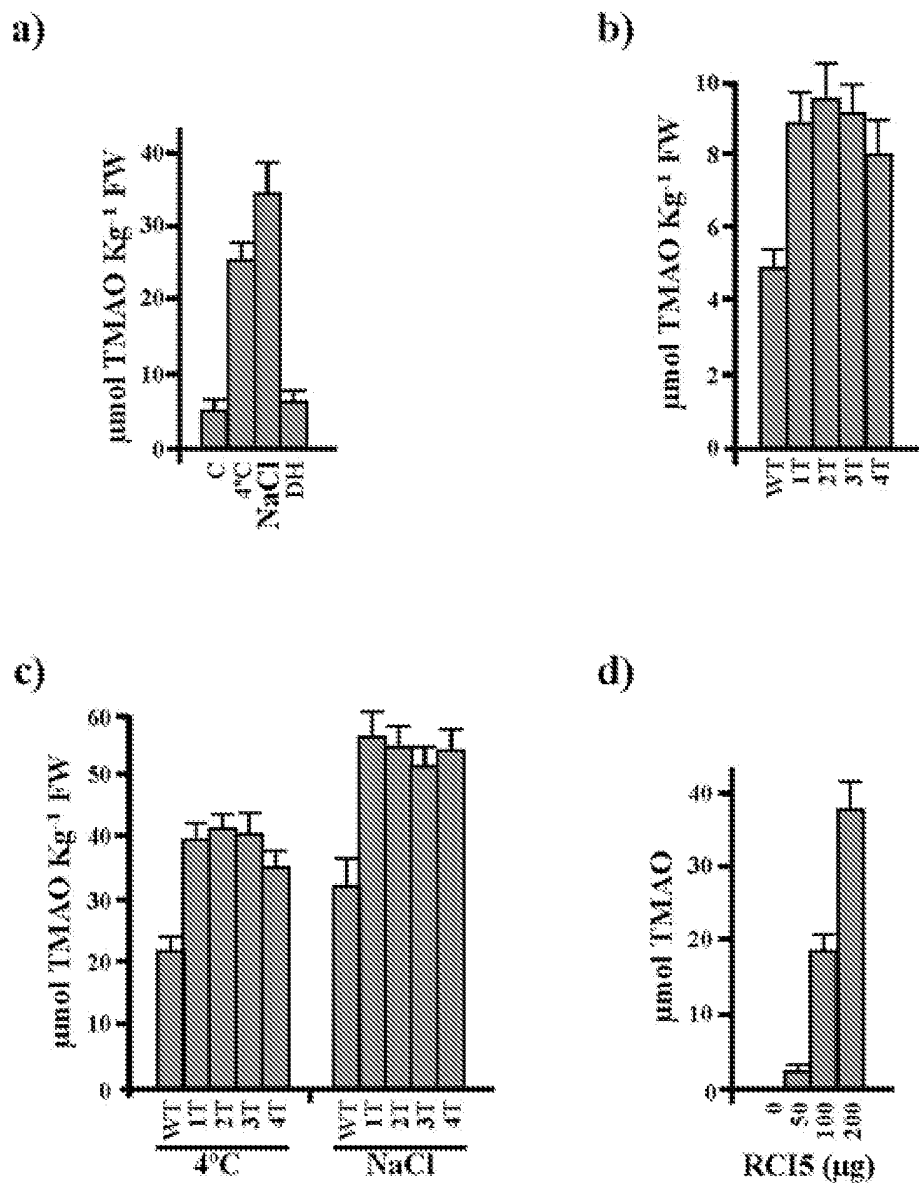


FIG. 4

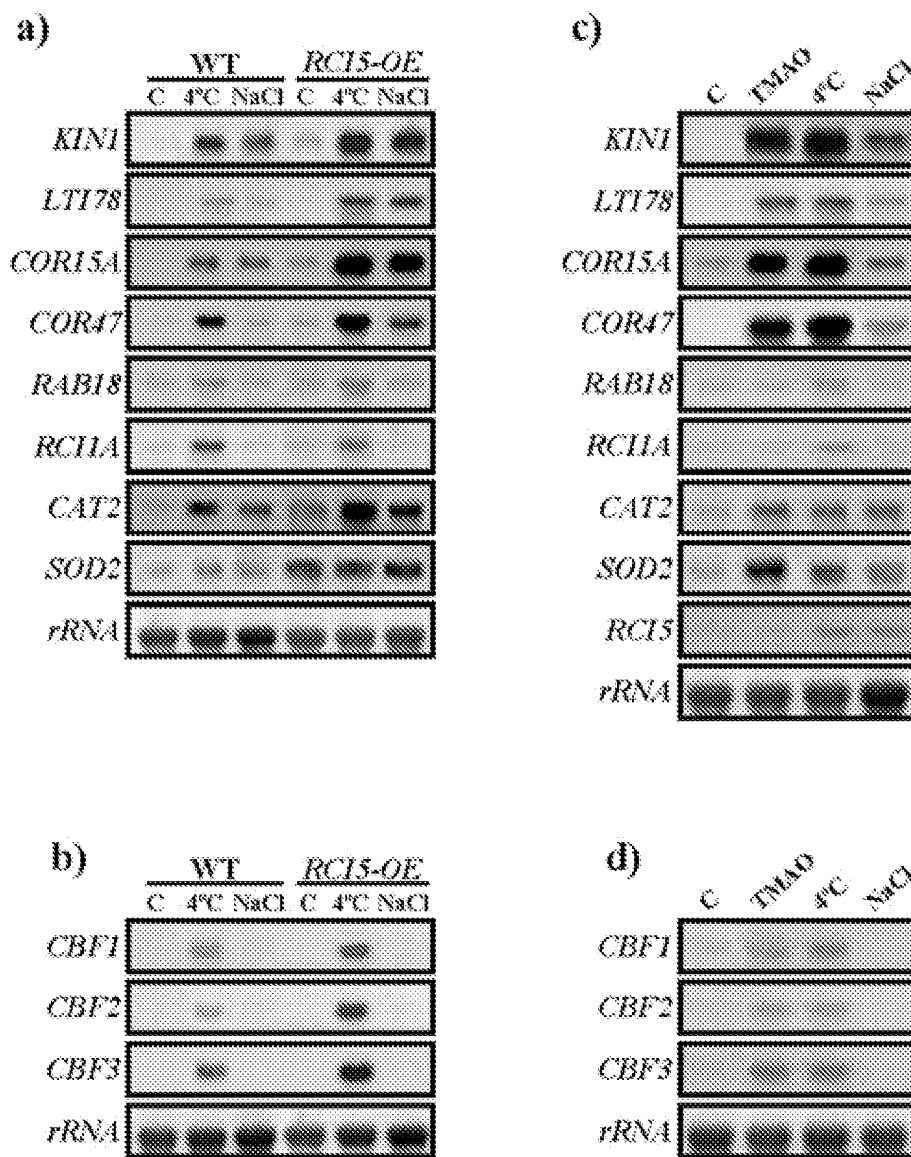


FIG. 5

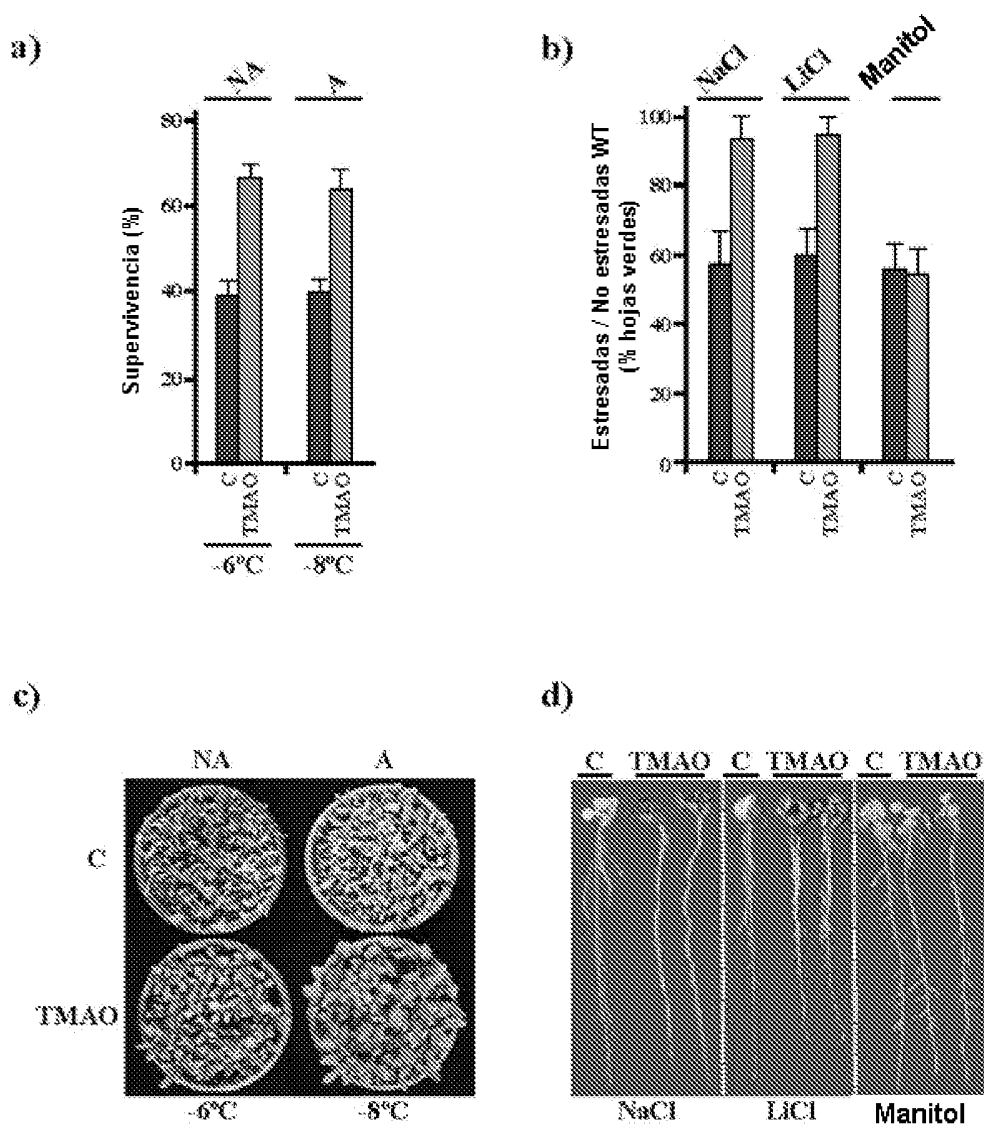
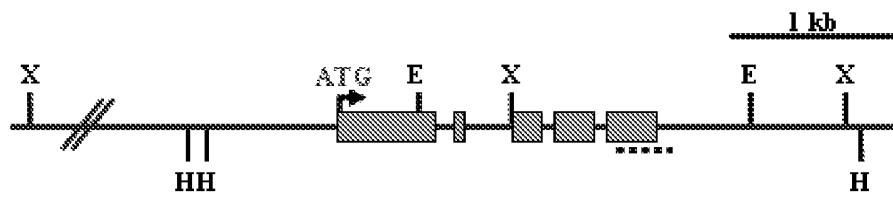


FIG. 6



b)

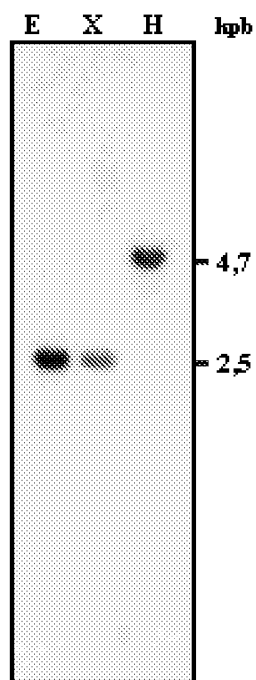


FIG. 7

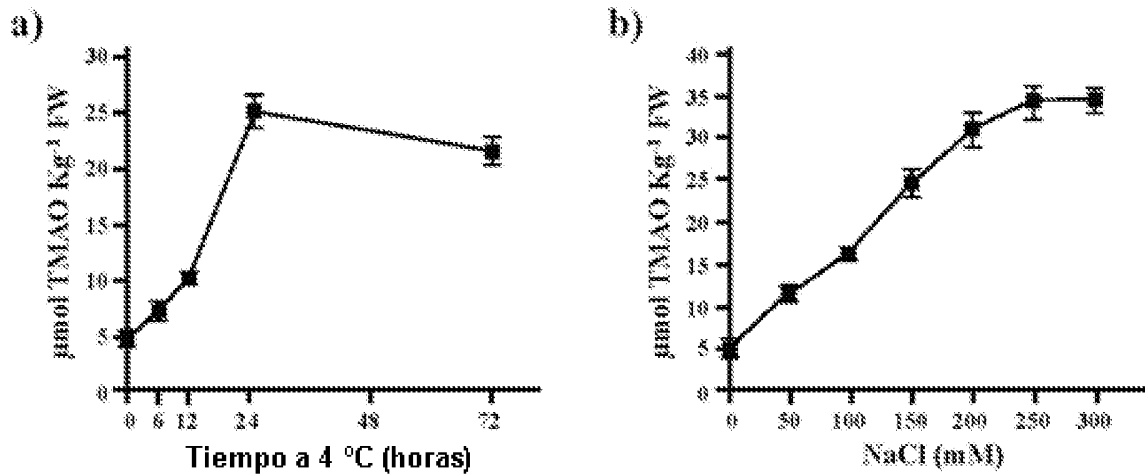


FIG. 8

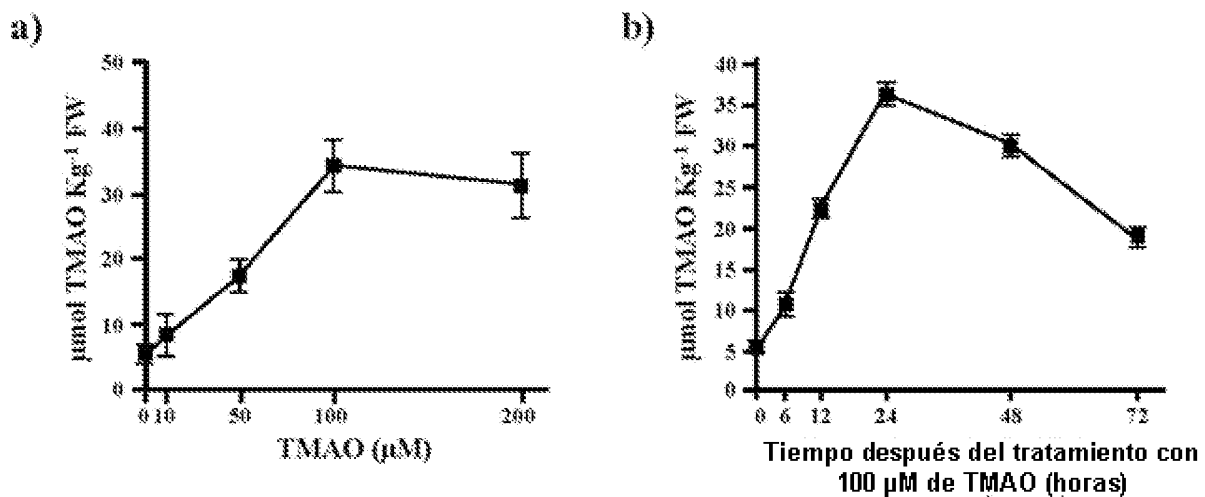


FIG. 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2009/070383

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01N, A01H, C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES,EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, EMBL-EBI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LI, J. et al., "Subclade of flavin-monoxygenases involved in aliphatic glucosinolate biosynthesis.", PLANT PHYSIOLOGY, 2008 Nov., Vol. 148, No. 3, pages 1721-1733, ISSN: 0032-0889, Epub.: 17.09.2008, Materials and Methods, Results, Discussion.	1-11
X	WO 2008/023263 A2 (UNIV. COPENHAGEN Y OTROS) 28.02.2008, page 5, line 25 - page 6, line 37; page 17, lines 10-16;page 17, line 35 - page 22, line 6;page 98, line 5 - page 99, line 31; figure 16; example 11.	1-11
X	SCHLAICH, N.L., "Flavin-containing monoxygenases in plants: looking beyond detox.", TRENDS IN PLANT SCIENCE, 2007, Vol. 12, No. 9, pages 412-418, ISSN: 1360-1385, the whole document, figure 2.	6, 7

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.		
"E" earlier document but published on or after the international filing date		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 December 2009 (28.12.2009)

Date of mailing of the international search report

(07/01/2010)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

J.L. Vizán Arroyo

Telephone No. +34 91 349 85 73

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/070383

C (continuation).		
DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HIBINO, T. et al., "Functional characterization of choline monooxygenase, an enzyme for betaine synthesis in plants.", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2002, Vol. 277, No. 44, pages 41352-41360, ISSN: 0021-9258, Results: 'Expression of Spinach CMO in Arabidopsis', figure 8; Discussion.	1-11
A	SCHLENK, D. et al., "Correlation of salinity with flavin-containing monooxygenase activity but not cytochrome P450 activity in the euryhaline fish (Platichthys flesus)", BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, 1996, Vol. 52, No. 5, pages 815-818, ISSN: 0006-2952, the whole document.	1-11
A	LARSEN, B.K. et al., "Effect of salinity on flavin-containing monooxygenase expression and activity in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss).", JOURNAL OF COMPARATIVE PHYSIOLOGY. B, BIOCHEMICAL, SYSTEMIC, AND ENVIRONMENTAL PHYSIOLOGY, Jun 2001, Vol. 171, No. 5, pages 421-429, ISSN: 0174-1578, the whole document.	1-11
A	LANG, D.H. et al., "Isoform specificity of trimethylamine N-oxygenation by human flavin-containing monooxygenase (FMO) and P450 enzymes: selective catalysis by FMO3.", BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, 1998, Vol. 56, No. 8, pages 1005-1012, ISSN: 0006-2952, the whole document.	1-11
A	YANCEY, P.H., "Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses.", JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY, 2005, Vol. 208, No. 15, pages 2819-2830, ISSN: 0022-0949, the whole document.	12-17
A	DOAN-NGUYEN, V. et al., "The effects of cosolutes on protein dynamics: the reversal of denaturant-induced protein fluctuations by trimethylamine N-oxide.", PROTEIN SCIENCE, 2007, Vol. 16, No. 1, pages 20-29, ISSN: 0961-8368, the whole document.	12-17
A	CUSHMAN, J.C., "Osmoregulation in Plants: Implications for Agriculture.", AMERICAN ZOOLOGIST, 2001 Vol. 41, No. 4, pages 758-769, ISSN: 0003-1569, the whole document.	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2009/070383

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008023263 A	28.02.2008	CA 2661325 A AU 2007287343 A EP 20070804894	28.02.2008 28.02.2008 17.08.2007 17.08.2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2009/070383

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01N 33/24 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 3/04 (2006.01)

ES2009/070383 - ISR

Continuation of Box III

The patent application does not satisfy the requirement of unity of invention. Multiple inventions or groups of inventions have been identified in the application, namely:

- 1. Invention 1: [claims 1-11] relating to a transgenic plant that is resistant to cold stress and salt stress and comprises a nucleotide sequence of SEQ. ID. No.: 1 of the RCI5 gene or a fragment thereof that allows the expression of a protein with flavin-containing monooxygenase activity (FMO), or relating an analogous nucleotide sequence; relating to a method for producing said transgenic plant; relating to the nucleotide sequence of SEQ. ID. No.: 1 of the RCI5 gene or a fragment thereof, or an analogous nucleotide sequence coding for a protein with FMO activity; relating to expression vectors bearing said nucleotide sequence; relating to cells bearing said nucleotide sequence or the expression vectors indicated; relating to plant seeds containing said nucleotide sequence.**
- 2. Invention 2: [claims 12-17] relating to the use of an aqueous composition comprising the compound trimethylamine oxide (TMAO) or a derivative thereof to induce resistance to salt stress and cold stress in plants and/or seeds.**

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ ES 2009/070383

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

A01N, A01H, C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, EMBL-EBI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	LI, J. et al., "Subclade of flavin-monooxygenases involved in aliphatic glucosinolate biosynthesis.", PLANT PHYSIOLOGY, 2008 Nov., Vol. 148, No. 3, páginas 1721-1733, ISSN: 0032-0889, Epub.: 17.09.2008, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión.	1-11
X	WO 2008/023263 A2 (UNIV. COPENHAGEN Y OTROS) 28.02.2008, página 5, línea 25 - página 6, línea 37; página 17, líneas 10-16; página 17, línea 35 - página 22, línea 6; página 98, línea 5 - página 99, línea 31; figura 16; ejemplo 11.	1-11
X	SCHLAICH, N.L., "Flavin-containing monooxygenases in plants: looking beyond detox.", TRENDS IN PLANT SCIENCE, 2007, Vol. 12, No. 9, páginas 412-418, ISSN: 1360-1385, todo el documento, Figura 2.	6, 7

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 28 Dicimembre 2009 (28.12.2009)	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 07-ENERO-2010 (07/01/2010)
--	--

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. N° de fax 34 91 3495304	Funcionario autorizado J.L. Vizán Arroyo N° de teléfono +34 91 349 85 73
--	--

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/070383

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. Las reivindicaciones N^{os}:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. Las reivindicaciones N^{os}:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

3. Las reivindicaciones N^{os}:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

VER HOJA ADICIONAL PCT/ISA/210

1. Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N^{os}:
4. Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N^{os}:

Indicación en cuanto a la protesta

- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido en el requerimiento.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

Continuación del Recuadro III:

La solicitud de patente no satisface la exigencia de unidad de invención. Se encontraron varias invenciones o grupos de invenciones en esta solicitud, a saber:

- 1) **Invencción 1:** [Reivindicaciones: 1-11]. Relativa a una planta transgénica tolerante al frío y al estrés salino que comprende una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1 del gen *RC15* o un fragmento de la misma que permite la expresión de una proteína con actividad flavín-monooxigenasa (FMO), o a una secuencia de nucleótidos análoga. A un procedimiento de obtención de dicha planta transgénica. A la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1 del gen *RC15* o un fragmento de la misma, o una secuencia de nucleótidos análoga, codificadora de una proteína con actividad FMO. A vectores de expresión portadores de dicha secuencia de nucleótidos. A células portadoras de dicha secuencia de nucleótidos o de los vectores de expresión indicados. A una semilla de una planta que contiene dicha secuencia de nucleótidos.
- 2) **Invencción 2:** [Reivindicaciones: 12-17]. Relativa al uso de una composición acuosa que comprende el compuesto óxido de trimetilamina (TMAO) o un derivado del mismo para inducir tolerancia al estrés salino y al frío en las plantas y/o semillas.

_____xxxXXXXxx_____

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070383

C (continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	HIBINO, T. et al., "Functional characterization of choline monooxygenase, an enzyme for betaine synthesis in plants.", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2002, Vol. 277, No. 44, páginas 41352-41360, ISSN: 0021-9258, Resultados: 'Expression of Spinach CMO in Arabidopsis', Figura 8; Discusión.	1-11
A	SCHLENK, D. et al., "Correlation of salinity with flavin-containing monooxygenase activity but not cytochrome P450 activity in the euryhaline fish (Platichthys flesus)", BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, 1996, Vol. 52, No. 5, páginas 815-818, ISSN: 0006-2952, todo el documento.	1-11
A	LARSEN, B.K. et al., "Effect of salinity on flavin-containing monooxygenase expression and activity in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss).", JOURNAL OF COMPARATIVE PHYSIOLOGY. B, BIOCHEMICAL, SYSTEMIC, AND ENVIRONMENTAL PHYSIOLOGY, Jun 2001, Vol. 171, No. 5, páginas 421-429, ISSN: 0174-1578, todo el documento.	1-11
A	LANG, D.H. et al., "Isoform specificity of trimethylamine N-oxygenation by human flavin-containing monooxygenase (FMO) and P450 enzymes: selective catalysis by FMO3.", BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, 1998, Vol. 56, No. 8, páginas 1005-1012, ISSN: 0006-2952, todo el documento.	1-11
A	YANCEY, P.H., "Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses.", JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY, 2005, Vol. 208, No. 15, páginas 2819-2830, ISSN: 0022-0949, todo el documento.	12-17
A	DOAN-NGUYEN, V. et al., "The effects of cosolutes on protein dynamics: the reversal of denaturant-induced protein fluctuations by trimethylamine N-oxide.", PROTEIN SCIENCE, 2007, Vol. 16, No. 1, páginas 20-29, ISSN: 0961-8368, todo el documento.	12-17
A	CUSHMAN, J.C., "Osmoregulation in Plants: Implications for Agriculture.", AMERICAN ZOOLOGIST, 2001 Vol. 41, No. 4, páginas 758-769, ISSN: 0003-1569, todo el documento.	1-17

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070383

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO 2008023263 A	28.02.2008	CA 2661325 A AU 2007287343 A EP 20070804894	28.02.2008 28.02.2008 17.08.2007 17.08.2007

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A01N 33/24 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 3/04 (2006.01)