

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 318**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05786997 .6**
96 Fecha de presentación: **28.09.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1794303**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.06.2007**

54 Título: **MODIFICACIÓN DEL DESARROLLO Y MORFOLOGÍA DE UNA PLANTA.**

30 Prioridad:
29.09.2004 GB 0421598

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.02.2012

73 Titular/es:
**ADVANCED TECHNOLOGIES (CAMBRIDGE)
LIMITED
210 CAMBRIDGE SCIENCES PARK
CAMBRIDGE, CB4 0WA, GB**

72 Inventor/es:
**THOMAS, Christopher, John y
WARD, Martin, Richard**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 373 318 T3

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

DESCRIPCIÓN

Modificación del desarrollo y morfología de una planta

CAMPO DE LA INVENCION.

5 La invención se refiere a un método para modificar el desarrollo y la morfología de una planta. La invención se refiere además al uso de una secuencia de DNA para regular la expresión génica exógena en los tejidos de una planta. La invención también se refiere a una secuencia de DNA identificada que actúa como promotor que es operativo para la expresión directa en células específicas de una planta.

FUNDAMENTO.

10 El control de la morfología de las plantas es de una gran importancia en la producción comercial de plantas para fines agrícolas u hortícolas, para potenciar la productividad y el rendimiento, para mejorar la eficacia de los cultivos y las cosechas, y para conseguir la estética que se desea. Los aspectos que requieren un control o modificación pueden incluir la morfología de las flores, frutos o tubérculos, la cantidad de flores, frutos, semillas o tubérculos, la extensión de las raíces primarias y laterales, la forma de los brotes aéreos o el tronco, y la presencia de espinas o pelos urticantes. Otros aspectos que es de desear que puedan ser controlados incluyen el adelanto o el retraso de la abscisión de las hojas, flores o fruto, la liberación de las semillas, y la producción de órganos de almacenamiento o glándulas secretoras.

15 Los cambios morfológicos ocurren con frecuencia como resultado del impacto ambiental sobre la planta, incluyendo los daños físicos, la predación por los herbívoros, las infecciones patógenas, el frío, el calor y la sequía. Frecuentemente pueden ser provocados deliberadamente por la intervención humana, bien sea físicamente (poda, flexión, atado, apilamiento o corte de órganos o estructuras particulares) o bien químicamente (aplicación de productos agroquímicos y sustancias para el crecimiento de las plantas). Sea cual sea el agente causante, los cambios morfológicos vienen decretados por la expresión de genes dentro de las células de la propia planta. El aparecer el cambio, la iniciación de la expresión de uno o más genes ocurre en aquellos tejidos particulares en los que se requiere que el crecimiento de la célula, la proliferación, el desarrollo o la necrosis culminen en el cambio físico en bruto.

20 La expresión de un gen depende de que su secuencia de DNA se transcriba en RNA por acción de la RNA polimerasa. Para lograr esto, la RNA polimerasa tiene que reconocer y unirse a una región de la secuencia de DNA situada secuencia arriba (es decir, 5') de la secuencia que codifica el gen, con el fin de que se inicie la transcripción. Tal región se denomina promotor del gen. La naturaleza intrínseca de la secuencia del promotor determina las circunstancias y la manera en la que se expresa el gen.

25 Expresándolo de una forma amplia, hay cuatro tipos de promotores que se encuentran en los tejidos vegetales: constitutivos, específicos del tejido, regulados por el desarrollo e inducibles-represibles, si bien se ha de entender que necesariamente estos tipos no son mutuamente excluyentes.

30 Un promotor constitutivo dirige la expresión de un gen a través de las diversas partes de una planta, continuamente durante el desarrollo de esa planta, aun cuando el gen no puede expresarse al mismo nivel en todos los tipos de células. Los ejemplos de promotores constitutivos conocidos incluyen los asociados con el transcripto 35S del virus del mosaico de la coliflor (Odell et al, 1985), el gen de la actina 1 del arroz (Zhang et al, 1991) y el gen de la ubiquitina 1 del maíz (Cornejo et al, 1993).

35 Un promotor específico del tejido es uno que dirige la expresión de un gen en una parte de la planta (o en unas pocas partes), normalmente a lo largo del tiempo de vida de esas partes de la planta. La categoría de promotor específico del tejido incluye también comúnmente promotores cuya especificidad no es absoluta, es decir, también pueden dirigir la expresión a un nivel más bajo en tejidos distintos de los del tejido preferido. Los ejemplos de promotores específicos del tejido conocidos en la técnica incluyen aquellos que están asociados con el gen de la patatina expresado en el tubérculo de la patata, y el gen de la glutenina de alto peso molecular expresado en el endospermo del trigo, la cebada o el maíz.

40 Un promotor regulado por el desarrollo dirige un cambio en la expresión de un gen en una o más partes de una planta en un momento específico durante el desarrollo de la planta. El gen puede expresarse en esa parte de la planta en otros momentos a un nivel diferente (normalmente más bajo), y puede también expresarse en otras partes de la planta.

45 Un promotor inducible es capaz de dirigir la expresión de un gen en respuesta a un inductor. En ausencia del inductor el gen no se expresará. El inductor puede actuar directamente sobre la secuencia del promotor, o puede actuar contrarrestando el efecto de una molécula de represor. El inductor puede ser un agente químico tal como un metabolito, una proteína, un regulador del crecimiento, o un elemento tóxico, una tensión fisiológica tal como calor, laceración, etc.

ración, o presión osmótica, o una consecuencia indirecta de la acción de un patógeno o una plaga. Un promotor regulado por el desarrollo podría describirse como un tipo específico de promotor inducible que responde a un inductor endógeno producido por la planta o a un estímulo ambiental en un punto concreto del ciclo de vida de la planta. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen los asociados con la respuesta a la laceración, tal como se describe en Warner et al (1993), respuesta a la temperatura como se describe en Benfey y Chua (1989), e inducido químicamente, como se describe en Gatz (1995).

Una secuencia promotora puede comprender cierto número de dominios definidos necesarios para su función. El primero de estos comprende aproximadamente 70 pares de bases situadas inmediatamente secuencia arriba (esto es, 5') del gen estructural y forma el promotor núcleo o core. El promotor núcleo contiene las cajas o secuencias CAAT y TATA y define el sitio de la iniciación de la transcripción para el gen. Una serie de secuencias reguladoras secuencia arriba del promotor núcleo constituyen el resto de la secuencia del promotor y determinan los niveles de expresión, los patrones espacial y temporal de la expresión, y la respuesta a los inductores. Además, algunos promotores contienen elementos de secuencia que actúan potenciando el nivel de expresión, por ejemplo el del promotor de la plastomicina del guisante, como se describe en la publicación de patente internacional nº WO 97/20056.

La modificación genética de las plantas depende de la introducción de genes quiméricos en las células vegetales y de su expresión controlada bajo la dirección de un promotor. Pueden obtenerse promotores de diferentes fuentes, entre las que se incluyen animales, plantas, hongos, bacterias y virus, y los distintos promotores pueden trabajar con eficacias distintas en tejidos distintos. Los promotores pueden también ser construidos sintéticamente.

Con frecuencia puede ser deseable expresar genes introducidos en cierto número de tejidos diferentes en una planta. Por ejemplo, la expresión de una resistencia contra un agente patógeno o una plaga, o la tolerancia a temperaturas extremas, puede expresarse de la mejor forma por todos los tejidos en una planta. Del mismo modo, podría ser deseable asegurar la expresión de los transgenes en todo instante a lo largo del desarrollo de la planta. También, un promotor que se expresa de una manera que es inmune a la influencia de inductores o represores resultantes de estímulos ambientales imprevistos, puede ser también útil para asegurar la expresión continuada de un rasgo. Con estos fines, sería de desear el uso de un promotor "constitutivo". Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen el promotor 35S del CaMV. Para cereales, el promotor de ubiquitina es un promotor constitutivo a elegir (Christensen y Quail, 1996).

Sin embargo, en algunos casos es más deseable controlar la localización de la expresión del gen en una planta transgénica. Esto puede potenciar el efecto de la expresión génica asegurando que la expresión ocurre preferentemente en aquellos tejidos en los que es más eficaz el efecto del producto génico. Por el mismo argumento, la expresión modulada puede reducir la pérdida potencial de rendimiento limitando el drenaje de recursos en la planta. Otras ventajas incluyen la limitación de la expresión genes agrónomicamente útiles pero generalmente nocivos para tejidos específicos por la localización y la compartimentación de la expresión génica en casos en los que el producto génico tendría que ser restringido, o excluido de ciertos tejidos. Por ejemplo, la expresión específica de la antera de los genes inhibidores *suc* (Mariani et al., 1990) ha sido usada en sistemas de esterilidad masculina, mientras que la expresión en otras partes de la planta podría provocar toxicidad. Un sistema de muerte celular similar se describe en la solicitud de patente internacional WO 89/10396 en la que se usa una proteína RNAsa en combinación con otro promotor específico de la antera para causar la necrosis de las células de la antera y conferir esterilidad masculina en la planta.

En las solicitudes de patente internacional WO 02/33106 y WO 02/33107 se describen sistemas de muerte de células vegetales que proporcionan resistencia contra la infección de nemátodos por la expresión de una proteína inactivadora del ribosoma (proteína inactivadora del ribosoma del maíz, proteína antiviral de la hierba carmesí [Maize Ribosome Inactivating Protein, Pokeweed Antiviral Protein, PAP]) bajo la regulación de promotores específicos para el sitio de alimentación de los nemátodos. En estos casos la especificidad de la expresión del gen nocivo está potenciada porque los promotores son tanto específicos del tejido como sensibles a la invasión de nemátodos.

En algunos casos pueden expresarse dos o más transgenes en una planta en posiciones similares o diferentes. Cada transgén puede expresarse bajo el control de un promotor diferente que expresa en más de una región de la planta. Los promotores pueden elegirse de forma que haya un solapamiento en sus respectivos sitios de expresión en una o más posiciones deseadas. Este o estos sitios de solapamiento dan una mayor especificidad y direccionamiento de la expresión génica. Mediante una selección inteligente del producto génico codificado por cada transgén, la expresión de solapamiento de ambos transgenes puede conducir a un efecto aditivo o potenciado sobre los tejidos diana, mientras que la expresión de tan solo uno u otro de los transgenes en otras localizaciones puede no causar efecto alguno sobre la planta. Por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO 02/33106, dos dominios de péptido separados derivados de la proteína inhibidora ribosómica del maíz (RIP) se expresan bajo la regulación de dos promotores específicos del tejido diferentes, que tienen perfiles diferentes de expresión pero que nunca tienen un sitio en común, resultando la producción de una proteína activa en el sitio de solapamiento.

En cambio, los dos transgenes pueden codificar una molécula efectora y una molécula agonista o protectora. En este caso, la molécula efectora afectará a la planta en todas las localizaciones en las que se expresa, excepto en

aquellas en las que el sitio de expresión se solapa con el de la expresión de la molécula agonista o protectora. En NZ 260511 se propone un sistema de muerte de células vegetales con mayor especificidad para el tejido. Este sistema comprende la expresión de una molécula citotóxica (bajo el control de un primer promotor, el cual primer promotor causa la expresión en células diana específicas y en uno o más de otros sitios en la planta), junto con una molécula protectora (bajo el control de un segundo promotor, el cual segundo promotor causa la expresión en todos los sitios en los que el primer promotor es activo, excepto en las células diana específicas). Ejemplos de moléculas citotóxicas y protectoras adecuadas son las proteasas e inhibidores de proteasa, respectivamente, o nucleasas e inhibidores de nucleasa, respectivamente. El documento WO 93/10251 describe el uso de una molécula de ribonucleasa citotóxica barnasa junto con la molécula protectora de inhibidor Barstar.

Otro ejemplo de sistema transgénico de dos componentes lo proporciona la solicitud de patente internacional nº WO 98/44138. Este sistema comprende la expresión de un producto génico bajo el control de un promotor, los cuales promotor y producto génico se eligen de forma que haya un solapamiento en sus respectivos sitios de expresión y efector en una localización deseada. El promotor dirige la expresión en las células específicas y también en uno o más de otros sitios en la planta, mientras que la diana molecular del producto génico ocurre en un segundo rango de células que incluyen también las células diana específicas. Este sitio o estos sitios de solapamiento dan una mayor especificidad y direccionamiento de la expresión génica a las células en la localización deseada. Mediante una cuidadosa selección del producto génico codificado por el transgén, la expresión en células no diana no produce efecto en la planta.

Una importante aplicación de la expresión localizada de un gen nocivo para un tejido particular estaría en la modificación de la morfología de la planta, por ejemplo mediante la necrosis controlada o prevención del desarrollo de ciertos tejidos u órganos, tales como las estructuras de floración, cuerpos fructíferos o esporocarpos, tejidos de almacenamiento, brotes, tejidos foliares, tejidos de la raíz, zonas de abscisión, glándulas secretoras, células urticantes, tricomas o espinas.

Una aplicación particular de la expresión localizada de un gen nocivo para modificar la morfología de la planta estaría en la prevención de las excrecencias de los brotes laterales de meristemos axilares de la hoja. La anatomía de los meristemos axilares y yemas laterales se describe en Esau (1960). La excrecencia de los brotes laterales surge comúnmente cuando se elimina o se reduce la dominancia del brote apical; por ejemplo, cuando el brote apical es dañado o eliminado, bien sea accidentalmente por el daño físico o la predación por herbívoros, o como parte de la práctica agrícola, por ejemplo la corta de renuevos. Otros cambios que modifican por ejemplo la producción, el transporte, la detección o el metabolismo de sustancias endógenas de crecimiento de la planta, pueden también causar excrecencias a partir de los meristemos axilares. Los brotes laterales, o "suckers (suctores)", pueden ser indeseables por razones meramente estéticas, pueden producir una planta con una morfología inutilizable, o pueden tener un efecto metabólico perjudicial sobre la planta como un todo, actuando como una fuente adicional o sumidero para varios metabolitos o sustancias de crecimiento de la planta.

Un ejemplo en el que ocurre la excrecencia de yemas laterales es en el cultivo comercial del tabaco, en el que el brote apical que comprende la inflorescencia y las hojas más altas es eliminado en un momento específico durante el crecimiento de la planta, en el proceso conocido como "topping (desmoche)", para estimular el crecimiento y el desarrollo de las hojas restantes, para potenciar el crecimiento de la raíz y para avivar la redistribución de metabolitos y compuestos secundarios a las hojas de la planta. Un inconveniente del proceso de desmoche es que también estimula la excrecencia de brotes laterales que de esta forma desvían la redistribución de metabolitos deseada. Este efecto se evita normalmente mediante la eliminación física de los brotes laterales, que es muy laboriosa, o mediante la aplicación de supresores químicos de brotes tales como hidrazida maleica, que es costosa en términos de materiales, y además puede tener como resultado la retención de residuos químicos en la planta cosechada. Un sistema que previene tal "succión" dirigiendo específicamente la rotura de las células implicadas en la excrecencia de las yemas laterales, proporcionaría por tanto un gran beneficio al cultivo del tabaco.

Las proteínas desactivadas del ribosoma (RIPs) son un grupo de proteínas vegetales tóxicas que desactivan catalíticamente los ribosomas eucarióticos (Stirpe y Barbieri 1986). Las RIPs funcionan como N-glicosidasas para eliminar una adenina específica en un lazo conservado del rRNA grande, y de esta manera previene la unión del Factor de Alargamiento 2, bloqueando así la síntesis celular de proteínas. Se han descrito tres formas de RIPs. Las RIPs de tipo 1, tal como la proteína antiviral de la hierba carmesí y el inhibidor de traducción de cebada están formadas cada una de ellas por una cadena de polipéptido simple, cada una con un valor de M_f aproximado de 30.000. Las RIPs de tipo 2, tales como ricina, abrina y modicina, comprenden cada una de ellas dos cadenas de polipéptidos, una con actividad de RIP, enlazada con un puente disulfuro a la otra cadena de lectina de unión con galactosa. Las RIPs de tipo 3, tales como RIP de maíz, comprenden una cadena de polipéptido única que subsiguientemente experimenta clivaje o segmentación proteolítica para liberar dos dominios de péptido activos.

La hierba carmesí (*Phytolacca americana*) produce tres proteínas antivirales distintas, que son PAP', PAPII y PAP-S que aparecen en hojas de primavera, hojas de verano y semillas, respectivamente. Se han observado similitudes de aminoácidos entre estas tres proteínas. Como se usa en el presente texto, la denominación "PAP" cubre las tres proteínas antivirales.

La patente de EE.UU. nº 6 015 940 describe la preparación de un clon de cDNA de PAP' preparado a partir de hojas de primavera, y el uso del mismo bajo el control de un promotor constitutivo (bien sea el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor o el promotor 35S del virus del mosaico de la escrofularia) en la producción de tabaco transgénico y plantas de patata resistentes a la infección por los virus PVX y PVY.

5 Plantas transgénicas que contienen la forma de hoja de verano de PAP, PAP-II, han sido descritas en el documento WO 99/60843. Varias secuencias génicas de PAP-II de longitud completa y truncadas, fueron cribadas con el fin de identificar las proteínas PAP-II variantes que conservaban la actividad antiviral pero que no mostraban fitotoxicidad. Las plantas transgénicas mostraron actividad tanto antiviral como antifúngica.

10 El gen PAP se expresa *in vivo* en las hojas inicialmente para producir una proteína Pro-PAP inactiva. Se sabe que después de la traducción, la molécula de proteína Pro-PAP' es direccionada a la pared de la célula. En alguna fase durante este proceso las extensiones N- y C-terminales de la molécula de Pro-PAP' son segmentadas para producir una molécula de PAP' activada (PAP' madura). En el caso de PAP-S (expresada en semillas) no se conoce la localización celular. Sin embargo, la región procesada N-terminal de PAP-S parece tener propiedades similares a las secuencias señal para el direccionamiento.

15 La estructura de la proteína PAP-S madura, es decir con las extensiones N- y C-terminales eliminadas, puede describirse en términos de dos dominios separados, que corresponden a los dos dominios de RIPs de tipo 3, o los dos polipéptidos de RIPs de tipo 2, esto es, el dominio de unión con el ribosoma y el dominio catalítico.

SUMARIO DE LA INVENCION.

20 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para modificar la morfología en una planta, que comprende introducir en una planta al menos un gen quimérico que comprende una secuencia promotora asociada operativamente con una secuencia de ácido nucleico, siendo la secuencia del promotor operativa para dirigir la expresión en células específicas de la planta, y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos un producto génico capaz de alterar el metabolismo de las células específicas y/o próximas, o de causar la muerte de las mismas, en donde la secuencia del promotor es operativa para dirigir la expresión de manera sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, y en donde la secuencia del promotor comprende la secuencia que se muestra en SEC ID Nº 1 o SEC ID Nº 7, o una parte funcional de la misma que es operativa para dirigir la expresión de manera sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, o una secuencia que tiene al menos un 65% de identidad con la secuencia mostrada en la SEC ID Nº 1 o la SEC ID Nº 7, que es operativa para dirigir la expresión de manera sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, en donde el porcentaje de identidad se determina sobre la totalidad de la longitud de las secuencias a comparar, y en donde expresión sustancialmente específica significa que el promotor dirige la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos asociada con dicho promotor predominantemente en yemas laterales y/o brotes laterales, de forma tal que menos del 50% del nivel de expresión global de dicha secuencia de ácidos nucleicos ocurre en cualquier otro tejido o célula de la planta respectiva.

35 En una realización, el producto génico puede ser capaz de potenciar el metabolismo de las células específicas y/o las células próximas, o promover su vigor.

En otra realización preferible, el producto génico es capaz de interferir el metabolismo de las células específicas y/o de las células próximas, o de causar la muerte de las mismas.

40 La expresión "de manera sustancialmente específica" que se usa en el presente texto significa que el promotor de acuerdo con la presente invención es operativo para dirigir la expresión predominantemente en la yema lateral y/o el brote lateral. El promotor de acuerdo con la presente invención, además de ser operativo para dirigir la expresión en la yema lateral y/o en el brote lateral, puede también ser operativo para dirigir la expresión en otros tipos de células o tejidos dentro de la planta, siempre y cuando la expresión predominante (es decir, más del 51% de la expresión global (total) en la planta) ocurra en la yema lateral y/o el brote lateral.

45 El promotor de acuerdo con la presente invención, además de ser operativo para dirigir la expresión en la yema lateral y/o el brote lateral, puede también ser operativo para dirigir la expresión en otros tipos de células o en otros tejidos dentro de la planta, siempre y cuando la expresión global no mate la planta.

50 Preferentemente, la expresión "de manera sustancialmente específica" que se usa en el presente texto significa que el promotor de acuerdo con la presente invención es operativo para dirigir la expresión predominantemente en las yemas laterales y/o brotes laterales, estando menos del 50%, preferentemente menos del 25%, preferentemente menos del 10%, más preferentemente menos del 5% del nivel de expresión global de dicha secuencia de ácidos nucleicos en cualquier otro tejido de la planta o célula de la planta.

Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos expresada bajo el control del promotor de acuerdo con la presente invención puede expresarse predominantemente en la yema lateral y/o en el brote lateral con menos del 25%, preferentemente menos del 10%, más preferentemente menos del 5% del nivel de expresión global en cualquier otro tejido.

- 5 Preferentemente la secuencia del promotor comprende la secuencia mostrada en SEC ID N° 1 o una parte funcional de la misma, o una secuencia que es al menos un 75%, preferentemente al menos un 80%, preferentemente al menos un 90%, preferentemente al menos un 97% idéntica a la misma.

En una realización de la presente invención, la morfología de una planta es afectada por uno o más productos génicos, preferentemente un producto génico.

- 10 En otra realización más de la presente invención, la morfología de una planta es afectada por dos o más productos génicos. Preferentemente la secuencia de ácidos nucleicos codifica dos o más productos génicos. Así pues, a título de ejemplo, solamente puede introducirse un gen quimérico en la planta, el cual gen quimérico comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica dos o más productos génicos. Alternativamente, pueden ser introducidos en la planta dos o más genes quiméricos, comprendiendo cada gen quimérico una secuencia de ácidos nucleicos que codifica uno o más productos génicos. Así, por ejemplo, un gen quimérico puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un producto génico y otro gen quimérico puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que codifica múltiples productos génicos, es decir 2, 3 o 4 productos génicos. Alternativamente, ambos genes quiméricos pueden comprender una secuencia o secuencias de ácidos nucleicos que codifican múltiples productos génicos. Preferentemente los dos o más productos génicos funcionan independientemente entre ellos para efectuar la interferencia del metabolismo de las células por un efecto aditivo. Alternativamente los dos o más productos génicos interactúan entre sí para efectuar la interferencia del metabolismo de las células por un efecto sinérgico o por un efecto antagonista.

Preferentemente se modifica la excrecencia de brotes laterales. La excrecencia de los brotes laterales puede ser potenciada. Adecuadamente, la excrecencia de los brotes laterales puede ser evitada o reducida y/o retrasada.

- 25 Preferentemente la excrecencia de brotes laterales se modifica interfiriendo el metabolismo o causando la muerte de células implicadas en el desarrollo de las yemas laterales.

- 30 Las células implicadas en el desarrollo de las células laterales pueden incluir las del promeristemo, protodermo, epidermis, estomas, células de guarda, endodermos, peridermo, parénquima del cortex, células urticantes, células de almacenamiento, endosperma del óvulo, polen, zona de abscisión, tricomas, células secretoras, felema, felógeno, felodermo, procambio, cambio, protoxilema, xilema, rayos, protofloema, floema, colénquima, esclerénquima, parénquima, clorénquima, túnica, corpus, cortex, estructuras del perfilo y estructuras foliares.

Se entiende que la expresión “células específicas” como se usa en el presente texto significa aquellas células en las que el promotor se expresa predominantemente, preferentemente aquellas células en las que el promotor se expresa de forma sustancialmente específica.

- 35 La expresión “células específicas de la planta” incluye células de yemas laterales y/o de brotes laterales, es decir aquellas células implicadas en la iniciación y/o el desarrollo de la yema lateral.

En una realización preferentemente las “células específicas de la planta” son las células de la yema lateral y/o del brote lateral.

- 40 En una realización las células específicas de la planta pueden ser una célula de uno o más de los elementos siguientes: promeristemo, protodermo, epidermis, estomas, células de guarda, endodermos, peridermo, parénquima del cortex, células urticantes, endosperma del óvulo, polen, zona de abscisión, tricomas, células secretoras, felema, felógeno, felodermo, procambio, cambio, protoxilema, xilema, rayos, protofloema, floema, colénquima, esclerénquima, parénquima, clorénquima, túnica, corpus, cortex, estructuras del perfilo y estructuras foliares.

- 45 La expresión “expresado predominantemente” como se usa en el presente texto significa que el promotor de acuerdo con la presente invención es operativo para dirigir principalmente (esto es, más del 51% de la expresión total) la expresión en las células específicas de la planta (tal como las células de la yema lateral y/o el brote lateral), aun cuando pueden encontrarse niveles de expresión más bajos en otro u otros tipos de células o en otro u otros tejidos.

- 50 Por ejemplo, se ha encontrado que el promotor de acuerdo con la presente invención es operativo para dirigir predominantemente la expresión en la yema lateral y/o el brote lateral, pero que también puede haber expresión en otro tejido o tipo de célula. Por ejemplo, puede haber también expresión en tejido lacerado y/o tallo y/o tejido foliar.

Adecuadamente la excrecencia de la yema lateral o del brote lateral puede ser prevenida o reducida y/o retrasada. Preferentemente la excrecencia de la yema lateral o del brote lateral se modifica interfiriendo el metabolismo o provocando la muerte de las células implicadas en el desarrollo de la yema lateral y/o el brote lateral.

5 La expresión "tejido de la yema lateral" como se usa en el presente texto incluye células de la yema lateral y/o células del brote lateral.

Preferentemente el producto génico de la secuencia de ácidos nucleicos capaz de interferir el metabolismo de las células específicas y/o las células próximas, o de causar la muerte de las mismas, es un producto nocivo, adecuadamente una molécula citotóxica.

10 Preferentemente el producto génico de la secuencia de ácidos nucleicos capaz de interferir el metabolismo de las células específicas y/o las células próximas, o de causar la muerte de las mismas, es una proteína desactivadora del ribosoma (RIP) o una variante o parte funcional de la misma. Por ejemplo, la RIP puede ser una RIP de tipo 1 y/o una RIP de tipo 2 y/o una RIP de tipo 3, o una variante o parte funcional de las mismas. Preferentemente el producto génico es una proteína antiviral de la hierba carmesí (PAP) o una variante o parte funcional de la misma. El producto génico puede ser PAP' o PAPII o una variante o parte funcional de la misma. Más preferentemente, el producto
15 génico es proteína antiviral S de la hierba carmesí (PAP-S) o una variante o parte funcional de la misma.

20 La presente invención proporciona también un ácido nucleico que comprende una secuencia promotora, siendo la secuencia promotora como se muestra en la SEC ID N° 1, o una parte funcional de la misma, que es capaz de regular la expresión de un gen en una yema lateral y/o un brote lateral, o una secuencia que tiene al menos un 65% de identidad con ella, más preferentemente al menos un 75% de identidad con ella, más preferentemente al menos un 85% de identidad con ella, más preferentemente al menos un 95% de identidad con ella, más preferentemente al menos un 97% de identidad con ella, más preferentemente al menos un 98% de identidad con ella, lo más preferentemente al menos un 99% de identidad con ella, y que es capaz de regular la expresión de un gen en una yema lateral y/o un brote lateral, en donde el porcentaje de identidad se determina sobre toda la longitud de las secuencias a comparar.

25 La presente invención proporciona también un ácido nucleico que comprende una secuencia promotora, siendo la secuencia promotora como se muestra en la SEC ID N° 7, o una parte funcional de la misma, que es capaz de regular la expresión de un gen en una yema lateral y/o un brote lateral, o una secuencia que tiene al menos un 65% de identidad con ella, más preferentemente al menos un 75% de identidad con ella, más preferentemente al menos un 85% de identidad con ella, más preferentemente al menos un 95% de identidad con ella, más preferentemente al menos un 97% de identidad con ella, más preferentemente al menos un 98% de identidad con ella, lo más preferentemente al menos un 99% de identidad con ella, y que es capaz de regular la expresión de un gen en una yema lateral y/o un brote lateral, en donde el porcentaje de identidad se determina sobre toda la longitud de las secuencias a comparar.

35 La presente invención proporciona también un gen quimérico que comprende una secuencia promotora, siendo la secuencia promotora asociada operativamente con una secuencia de ácido nucleico, comprendiendo la secuencia promotora la secuencia mostrada en la SEC ID N° 1, o una parte funcional de la misma, que es capaz de regular la expresión de un gen en una yema lateral y/o un brote lateral, o una secuencia que tiene al menos un 65% de identidad con ella, más preferentemente al menos un 75% de identidad con ella, más preferentemente al menos un 85% de identidad con ella, más preferentemente al menos un 95% de identidad con ella, más preferentemente al menos un 97% de identidad con ella, más preferentemente al menos un 98% de identidad con ella, lo más preferentemente al menos un 99% de identidad con ella, y que es capaz de regular la expresión de un gen en una yema lateral y/o un brote lateral, en donde el porcentaje de identidad se determina sobre toda la longitud de las secuencias a comparar.

45 La presente invención proporciona también un gen quimérico que comprende una secuencia promotora asociada operativamente con una secuencia de ácido nucleico, comprendiendo la secuencia promotora la secuencia mostrada en la SEC ID N° 7, o una parte funcional de la misma, que es capaz de regular la expresión de un gen en una yema lateral y/o un brote lateral, o una secuencia que tiene al menos un 65% de identidad con ella, más preferentemente al menos un 75% de identidad con ella, más preferentemente al menos un 85% de identidad con ella, más preferentemente al menos un 95% de identidad con ella, más preferentemente al menos un 97% de identidad con ella, más preferentemente al menos un 98% de identidad con ella, lo más preferentemente al menos un 99% de identidad con ella, y que es capaz de regular la expresión de un gen en una yema lateral y/o un brote lateral, en donde el porcentaje de identidad se determina sobre toda la longitud de las secuencias a comparar.

50 Preferentemente la secuencia de ácidos nucleicos y/o el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y/o el gen quimérico de acuerdo con la presente invención es una secuencia de DNA.

55 En una realización el gen quimérico de acuerdo con la presente invención puede obtenerse, y se obtiene preferentemente, a partir del clon pBNP 085-0501-001 (NCIMB 41343).

Preferentemente la secuencia de ácidos nucleicos es capaz de regular la expresión de una secuencia adicional. Adecuadamente la secuencia adicional codifica una proteína o RNA, una secuencia de cosupresión, una secuencia antisentido o una secuencia de inhibición de dsRNA (RNA de doble cadena).

5 Preferentemente la secuencia adicional puede obtenerse, y se obtiene preferentemente, a partir de una planta. La planta puede ser un miembro de la familia de las solanáceas. Preferentemente la planta puede ser un miembro de la subfamilia de las Cestroideas. Más preferentemente la planta es una o más del grupo del tomate, patata, berenjena, petunia o tabaco. Más preferentemente la planta es del género *Nicotiana*. Lo más preferentemente la planta es *Nicotiana tabacum*.

10 Se prefiere que la secuencia adicional sea capaz de interferir el metabolismo de las células específicas y/o células próximas, o causar la muerte de las mismas. Se prefiere que la secuencia adicional codifique una proteína antiviral de la hierba carmesí o una parte funcional de la misma.

Las secuencias de ácidos nucleicos y/o el ácido nucleico y/o el gen quimérico citado en el presente texto pueden ser secuencias aisladas o, alternativamente, pueden ser secuencias sintetizadas.

15 La presente invención proporciona además un DNA recombinante que comprende DNA vector y una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención y/o un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y/o una secuencia promotora de acuerdo con la presente invención, y/o un gen quimérico de acuerdo con la presente invención. El DNA recombinante puede comprender además adecuadamente una secuencia codificadora de un gen. Preferentemente el DNA vector comprende un plásmido, un cósmido, un virus o un fago. Adecuadamente el DNA recombinante puede comprender un promotor para dirigir la expresión de un gen marcador seleccionable.

20 Preferentemente el DNA recombinante reside en una célula hospedadora. Adecuadamente la célula hospedadora puede permitir la transcripción y la traducción del DNA recombinante.

25 La presente invención proporciona además una planta producida de acuerdo con el método de la presente invención. La presente invención proporciona además una planta construida por ingeniería genética que comprende una secuencia de ácidos nucleicos y/o un ácido nucleico y/o una secuencia promotora y/o un gen quimérico de acuerdo con la presente invención. Preferentemente el ácido nucleico y/o una secuencia promotora está asociada operativamente con una secuencia codificadora de un gen.

30 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una planta que comprende un DNA recombinante de acuerdo con la presente invención. La planta de acuerdo con la presente invención puede ser de interés para la industria de la horticultura, la industria de la floricultura, la industria forestal y/o la industria de la agricultura. La planta puede ser una planta que se cultiva con el fin de proporcionar cortes de flores. La planta puede ser tomate, pepino, Petunia, Dianthus, Picea, Eucaliptus, Pinus, Populus, una especie dicotiledónea tal como patata, tabaco, algodón, lechuga, berenjena, melón, calabaza, guisante, canola, soja, remolacha azucarera o girasol, o una especie monocotiledónea tal como trigo, cebada, centeno, arroz o maíz. Más preferentemente la planta es de la familia de las solanáceas. Más preferentemente la planta es de la subfamilia de las Cestroideas. Más preferentemente la planta es una o más del grupo del tomate, patata, berenjena, Petunia o tabaco. Más preferentemente la planta es del género *Nicotiana*. Lo más preferentemente la planta es *Nicotiana tabacum*.

35 La presente invención proporciona además una célula vegetal de una planta producida de acuerdo con el método de la presente invención, teniendo la célula vegetal un metabolismo alterado. La célula vegetal producida de acuerdo con el método de la presente invención puede tener un metabolismo que está alterado para potenciar su metabolismo. Preferentemente, la célula vegetal producida de acuerdo con la presente invención tiene un metabolismo interferido.

40 La presente invención proporciona también una célula vegetal construida mediante ingeniería genética, que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención. Preferentemente el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y/o la secuencia promotora de acuerdo con la presente invención está asociada operativamente con una secuencia codificadora de un gen.

45 En otro aspecto de la presente invención se proporciona una célula vegetal que comprende un DNA recombinante de acuerdo con la presente invención. Preferentemente el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y/o la secuencia promotora de acuerdo con la presente invención están asociados operativamente con una secuencia codificadora de un gen.

50 La presente invención proporciona también un método para regular la expresión de un gen en una planta, comprendiendo el método introducir en la planta un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y/o una secuencia promotora de acuerdo con la presente invención asociada operativamente con una secuencia codificadora de un gen cuya expresión se ha de regular.

La presente invención proporciona además un método para modificar el metabolismo dentro de una célula de una planta transgénica, comprendiendo el método introducir en una planta un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y/o una secuencia promotora de acuerdo con la presente invención y/o un gen quimérico de acuerdo con la presente invención. Preferentemente el método comprende introducir un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y/o una secuencia promotora de acuerdo con la presente invención y/o un gen quimérico de acuerdo con la presente invención, en la célula. Preferentemente el ácido nucleico o la secuencia promotora de acuerdo con la presente invención está asociado operativamente con una secuencia codificadora de un gen. Ventajosamente el gen está implicado en una ruta metabólica. Preferentemente un producto metabólico aumenta o disminuye en la célula.

La presente invención proporciona además un método para alterar la producción de un producto génico dentro de una célula vegetal, que comprende introducir un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y/o una secuencia promotora de acuerdo con la presente invención asociada operativamente con una secuencia de codificación de un gen, cuya producción de un producto génico se ha de alterar. Preferentemente se aumenta la producción del producto génico. Preferentemente el producto génico es una molécula de RNA que puede interactuar con el proceso de expresión del gen a través del mecanismo de RNAi, antisentido o cosupresión, o que puede ser traducida en un producto génico de proteína. Preferentemente el producto génico de proteína es una proteasa, una endonucleasa de restricción, una proteína de transporte en la membrana, una ribonucleasa o una proteína desactivadora del ribosoma. Preferentemente la proteína desactivadora del ribosoma es una proteína antiviral de la hierba carmesí (PAP). La PAP puede ser PAP' o PAPII. Pás preferentemente la proteína antiviral de la hierba carmesí es PAP-S o una variante o parte funcional de la misma.

También proporciona la presente invención el uso de un ácido nucleico que comprende una secuencia promotora como se muestra en la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 7, o una parte funcional de la misma, que es operativa para dirigir la expresión de forma sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, o una secuencia que tiene al menos un 65% de identidad con ella que es operativa para dirigir la expresión de forma sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral para modificar la morfología de una planta, en la que el porcentaje de identidad se determina sobre toda la longitud de las secuencias a comparar, y en donde la expresión sustancialmente específica significa que el promotor dirige la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos asociada con dicho promotor predominantemente en yemas laterales y/o brotes laterales, de forma tal que menos del 50% del nivel de expresión global de dicha secuencia de ácidos nucleicos ocurre en cualquier otro tejido o célula de la planta respectiva.

También se proporciona por medio de la presente invención el uso de una secuencia de ácidos nucleicos que comprende la secuencia promotora mostrada en la SEC ID N° 1 o una parte funcional de la misma que es operativa para dirigir la expresión de forma sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, o una secuencia que tiene al menos un 75%, preferentemente al menos un 80%, preferentemente al menos un 90%, preferentemente al menos un 97% de identidad con ella, que es operativa para dirigir la expresión de forma sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, para modificar la morfología de una planta, en la que el porcentaje de identidad se determina sobre toda la longitud de las secuencias a comparar, y en donde la expresión sustancialmente específica significa que el promotor dirige la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos asociada con dicho promotor predominantemente en yemas laterales y/o brotes laterales, de forma tal que menos del 50% del nivel de expresión global de dicha secuencia de ácidos nucleicos ocurre en cualquier otro tejido o célula de la planta respectiva.

También se proporciona por medio de la presente invención el uso de una secuencia de ácidos nucleicos que comprende la secuencia promotora mostrada en la SEC ID N° 7 o una parte funcional de la misma que es operativa para dirigir la expresión de forma sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, o una secuencia que tiene al menos un 75%, preferentemente al menos un 80%, preferentemente al menos un 90%, preferentemente al menos un 97% de identidad con ella, que es operativa para dirigir la expresión de forma sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, para modificar la morfología de una planta, en la que el porcentaje de identidad se determina sobre toda la longitud de las secuencias a comparar, y en donde la expresión sustancialmente específica significa que el promotor dirige la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos asociada con dicho promotor predominantemente en yemas laterales y/o brotes laterales, de forma tal que menos del 50% del nivel de expresión global de dicha secuencia de ácidos nucleicos ocurre en cualquier otro tejido o célula de la planta respectiva.

También se proporciona por medio de la presente invención el uso de una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una secuencia promotora como la mostrada en la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 7 o una parte funcional de la misma que es operativa para dirigir la expresión de forma sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, o una secuencia que tiene al menos un 65% de identidad con ella, que es operativa para dirigir la expresión de forma sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, para alterar el metabolismo en una célula vegetal, en la que el porcentaje de identidad se determina sobre toda la longitud de las secuencias a comparar, y en donde la expresión sustancialmente específica significa que el promotor dirige la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos asociada con dicho promotor predominantemente en yemas laterales y/o brotes late-

rales, de forma tal que menos del 50% del nivel de expresión global de dicha secuencia de ácidos nucleicos ocurre en cualquier otro tejido o célula de la planta respectiva.

5 También se proporciona por medio de la presente invención el uso de una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una secuencia promotora como la mostrada en la SEC ID N° 1 o una parte funcional de la misma que es operativa para dirigir la expresión de forma sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, o una secuencia que es al menos un 75%, preferentemente al menos un 80%, preferentemente al menos un 90%, preferentemente al menos un 97% idéntica a ella, que es operativa para dirigir la expresión de forma sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, para alterar el metabolismo en una célula vegetal, en la que el porcentaje de identidad se determina sobre toda la longitud de las secuencias a comparar, y en donde la expresión sustancialmente específica significa que el promotor dirige la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos asociada con dicho promotor predominantemente en yemas laterales y/o brotes laterales, de forma tal que menos del 50% del nivel de expresión global de dicha secuencia de ácidos nucleicos ocurre en cualquier otro tejido o célula de la planta respectiva.

15 También se proporciona por medio de la presente invención el uso de una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una secuencia promotora como la mostrada en la SEC ID N° 7 o una parte funcional de la misma que es operativa para dirigir la expresión de forma sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, o una secuencia que es al menos un 75%, preferentemente al menos un 80%, preferentemente al menos un 90%, preferentemente al menos un 97% idéntica a ella, que es operativa para dirigir la expresión de forma sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, para alterar el metabolismo en una célula vegetal, en la que el porcentaje de identidad se determina sobre toda la longitud de las secuencias a comparar, y en donde la expresión sustancialmente específica significa que el promotor dirige la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos asociada con dicho promotor predominantemente en yemas laterales y/o brotes laterales, de forma tal que menos del 50% del nivel de expresión global de dicha secuencia de ácidos nucleicos ocurre en cualquier otro tejido o célula de la planta respectiva.

25 La presente invención proporciona además el uso de un ácido nucleico que comprende una secuencia promotora como se muestra en la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 7, o una parte funcional de la misma que es operativa para dirigir la expresión de forma sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, o una secuencia que tiene al menos un 60% de identidad con ella, que es operativa para dirigir la expresión de forma sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, para alterar la producción de un producto génico en una célula vegetal.

30 La presente invención proporciona además el uso de una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una secuencia promotora como se muestra en la SEC ID N° 1, o una parte funcional de la misma que es operativa para dirigir la expresión de forma sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, o una secuencia que es al menos un 75%, preferentemente al menos un 80%, preferentemente al menos un 90%, preferentemente al menos un 97% idéntica a ella, que es operativa para dirigir la expresión de forma sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, para alterar la producción de un producto génico en una célula vegetal.

35 También se proporciona mediante la presente invención el uso de una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una secuencia promotora como se muestra en la SEC ID N° 7, o una parte funcional de la misma que es operativa para dirigir la expresión de forma sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, o una secuencia que es al menos un 75%, preferentemente al menos un 80%, preferentemente al menos un 90%, preferentemente al menos un 97% idéntica a ella, que es operativa para dirigir la expresión de forma sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, para alterar la producción de un producto génico en una célula vegetal.

40 La presente invención puede también proporcionar una parte de la SEC ID N° 1, en la que la parte es desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 1321 de la SEC ID N° 1 o una parte de la misma. La parte desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 1321 puede ser una "parte funcional" de la SEC ID N° 1.

45 La presente invención puede también proporcionar una parte de la SEC ID N° 7, en la que la parte es desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 1309 de la SEC ID N° 7 o una parte de la misma. La parte desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 1309 puede ser una "parte funcional" de la SEC ID N° 7.

50 Por "parte funcional" los autores de la presente invención entienden que la parte es operativa para dirigir la expresión en células específicas de una planta.

Cualquier aspecto de la presente invención puede referirse a solamente una, o a más de una, de las secuencias mencionadas en el presente texto.

La expresión "gen quimérico" como se usa en el presente texto significa cualquier molécula de ácido nucleico híbrido formada cuando secuencias de ácido nucleico de diferentes fuentes se ligan entre ellas.

En la presente invención, “células próximas” son aquellas células que son suficientemente cercanas a las células específicas que son afectadas por la expresión en las células específicas, es decir, “células próximas” pueden definirse como las células que pueden diferenciarse en tejido de yema lateral (es decir, una vez que las células de iniciación de la yema lateral han sido alteradas de acuerdo con la presente invención) o células que apoyan el crecimiento de la yema lateral y/o el brote lateral.

IDENTIFICADORES DE SECUENCIA.

En la lista de secuencias:

SEC ID N° 1 muestra la secuencia de DNA de un promotor aislado de la presente invención.

SEC ID N° 2 muestra el Oligonucleótido de PCR S2PCLOFWD.

10 SEC ID N° 3 muestra el Oligonucleótido de PCR S2PCLOREV.

SEC ID N° 4 muestra la secuencia de DNA de otro promotor aislado (conocido en el presente texto como el “promotor ATC 023”) (no de acuerdo con la invención reivindicada).

SEC ID N° 5 muestra el Oligonucleótido de PCR AT4G29190L.

SEC ID N° 6 muestra el Oligonucleótido de PCR AT4G29190R.

15 SEC ID N° 7 muestra la secuencia de DNA de un promotor aislado de la presente invención (conocido en el presente texto como el “promotor ATC 085”).

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS.

Para que la invención pueda ser llevada a efecto fácilmente, se hace ahora referencia, a título de ejemplo, de los dibujos que siguen, en los cuales:

20 La Figura 1 muestra el alineamiento de SEC ID N° 1 con el promotor Sar8.2b (registro de GenBank U648116).

La Figura 2 muestra el alineamiento de la secuencia promotora ATC 023 con el genoma de *Arabidopsis thaliana* alrededor del locus AT4g29190 [Cromosoma 4: 14396379-14392944 orientación inversa]. La región secuencia arriba 5' del gen AT4g29190 se muestra en cursivas, y las regiones no traducidas 5' y 3' se muestran en letras minúsculas. Las cajas indican los codones de iniciación y terminación del gen AT4g29190. Los sitios del cebador usados para clonar el promotor ATC 023 están subrayados. Los cambios de nucleótido se muestran con doble subrayado.

25 La Figura 3 muestra la localización de la expresión del gen informador GUS impulsada por el promotor ATC 085 en secciones del tallo del tabaco. (a) – (c) muestran secciones a través del tallo en la región de la iniciación de la yema lateral; (d) muestra las tres secciones en serie a través de la misma región de iniciación de la yema lateral; y (e) muestra una sección vertical a través de una axila foliar.

30 La Figura 4a muestra el efecto de expresión de la proteína antiviral de la hierba carmesí activada por el promotor ATC 085 sobre la excrecencia de las yemas laterales 17 y 18 en el tabaco después del desmoche, en comparación con plantas testigo (NCC).

La Figura 4b muestra el efecto de expresión de la proteína antiviral de la hierba carmesí activada por el promotor ATC 085 sobre la excrecencia de la yema lateral 16 en el tabaco después del desmoche, en comparación con plantas testigo (NCC).

35 La Figura 5 muestra la excrecencia de los brotes laterales en el tabaco al hacer el desmoche, y el efecto de la transformación con ATC 085-PAP; (a) muestra una planta testigo no transformada, mostrando la excrecencia alargada de los brotes laterales; (b) muestra una planta transgénica ATC 085-PAP no mostrando una excrecencia visible de la yema.

40 La Figura 6 muestra la localización de la expresión del gen informador GUS activado por el promotor ATC 023 en secciones del tallo del tabaco después del desmoche. (a) muestra una sección a través del tallo de una planta en la región de iniciación de la yema lateral; (b) y (c) muestran secciones en serie a través de las regiones de iniciación de la yema lateral tomadas de diferentes plantas; y (d) muestra una sección vertical a través de una axila foliar.

La Figura 7 muestra la localización de la expresión del gen informador GUS activado por el promotor ATC 023 en secciones del tallo de Arabidopsis. (a) muestra la expresión en el punto de excrecencia de la yema al inicio del desarrollo de la yema, y (b) a (d) muestran la subsiguiente expresión en yemas en desarrollo y tejidos próximos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION.

5 Adecuadamente, la secuencia promotora de acuerdo con la presente invención es operativa para dirigir la expresión de forma sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, y comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 65%, preferentemente al menos un 70%, más preferentemente al menos un 75%, más preferentemente al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, más preferentemente al menos un 90%, más preferentemente al menos un 95%, más preferentemente al menos un 97% de identidad, más preferentemente al menos un 98% de identidad, lo más preferentemente al menos un 99% de identidad con una cualquiera de las secuencias mostradas como SEC ID N° 1 o SEC ID N° 7, o una parte funcional de la misma, que es operativa para dirigir la expresión de una forma sustancialmente específica en una yema lateral y/o en un brote lateral.

El término "promotor" como se usa en el presente texto se emplea en el sentido normal de la técnica, p. ej. un sitio de unión de RNA polimerasa.

15 Como se usa en el presente texto, "alterar el metabolismo" de una célula significa afectar a la función metabólica de una célula de tal manera que cambie el normal funcionamiento del metabolismo de la célula, con el resultado de una función normal de la célula potenciada o bien inhibida.

20 Como se usa en el presente texto, la expresión "interferir el metabolismo" significa alterar la función metabólica de una célula de tal manera que interfiera con el normal funcionamiento del metabolismo de la célula, con el resultado de la muerte o la inhibición de la función normal de la célula.

Como se usa en el presente texto, la expresión "potenciar el metabolismo" de una célula significa alterar la función metabólica de una célula de tal manera que aumente el crecimiento o la viabilidad de la célula.

Como se usa en el presente texto, "célula de iniciación de la yema lateral" significa una célula asociada con la iniciación del crecimiento de una yema lateral.

25 Como se usa en el presente texto, "modificar la morfología" significa alterar el hábito de crecimiento normal de una planta que manifiesta un cambio físico en parte o en la totalidad de la planta. El crecimiento de los brotes laterales de la planta puede ser potenciado, por ejemplo. Preferentemente el crecimiento de las yemas laterales de la planta es inhibido o evitado. De cualquier forma, puede cambiarse la estructura física global y/o el aspecto de la planta.

30 Una secuencia de DNA de una planta puede ser recuperada de las células del hospedador natural, o puede ser sintetizada directamente *in vitro*. La extracción del hospedador natural permite el aislamiento *de novo* de secuencias nuevas, mientras que la síntesis de DNA *in vitro* requiere generalmente información de la secuencia preexistente. La síntesis química directa *in vitro* puede conseguirse mediante síntesis manual secuencial o por medio de procedimientos automáticos. Las secuencias de DNA pueden también construirse por técnicas estándar de "annealing" (reasociación o emparejamiento) de fragmentos, o por otros métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de tales procedimientos de clonación se dan en Sambrock et al. (1989).

35 La secuencia de DNA de la presente invención puede ser aislada por clonación directa de segmentos de DNA genómico de la planta. Los segmentos adecuados de DNA genómico de la planta pueden ser obtenidos por fragmentación usando endonucleasas de restricción, sonicación, cizalladura física u otros métodos conocidos en la técnica. Usando cribado predictivo de la secuencia de DNA del segmento clonado para la presencia de secuencias codificadoras (Baxevanis, 2001) pueden encontrarse motivos característicos de secuencias de promotor conocidas, secuencia arriba de tal secuencia diagnóstica.

40 La identificación del segmento clonado como secuencia promotora puede conseguirse alternativamente evaluando la funcionalidad, por ejemplo enlazando el segmento clonado con una secuencia de codificación derivada de un gen informador e introduciendo la construcción quimérica en una célula hospedadora o un sistema libre de células en el que pueda evaluarse la expresión del gen informador. Este proceso puede formar parte de otra estrategia de aislamiento de secuencias denominada "trapping" o captura del promotor, en el que los fragmentos de DNA genómico son clonados directamente en "vectores de expresión" que comprenden una región de codificación del gen informador y otras secuencias necesarias para la expresión en una célula hospedadora o un sistema libre de células. La expresión puede o no requerir la integración de la construcción quimérica en el DNA cromosómico del hospedador.

45 50 Un método alternativo de obtener una secuencia de DNA de la presente invención es por identificación y aislamiento de una secuencia que codifica DNA que se sabe que se expresa, y subsiguientemente usar esta técnica para obtener la secuencia promotora contigua, que es por definición dirigir la expresión de la secuencia de codificación. Alter-

nativamente, puede obtenerse una secuencia de DNA por la identificación de una secuencia que se sabe que se expresa en un organismo diferente, y después aislando la secuencia de codificación homóloga y subsiguientemente su secuencia promotora asociada, del organismo elegido. Una secuencia de codificación puede ser obtenida mediante el aislamiento del RNA mensajero (mRNA o polyA + RNA) del tejido vegetal o el aislamiento de una proteína y realizando la “traducción inversa” de su secuencia. El tejido usado para el aislamiento del DNA se elige sobre la base de que se cree que las secuencias de codificación de genes adecuadas se expresan en ese tejido a niveles óptimos para el aislamiento.

Hay varios métodos para aislar el mRNA del tejido vegetal que son bien conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, usar un oligonucleótido oligo-dT inmovilizado en una matriz inerte. El mRNA aislado puede ser utilizado para producir su secuencia de DNA complementaria (cDNA) mediante el uso de la enzima transcriptasa inversa (RT) u otras enzimas que tengan actividad de transcriptasa inversa. El aislamiento de una secuencia de cDNA individual de un *pool* o conjunto de cDNAs puede conseguirse clonando en vectores bacterianos o virales, o empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores de oligonucleótido seleccionados. La producción y el aislamiento de un cDNA específico a partir de mRNA pueden conseguirse mediante una combinación de pasos de transcripción inversa y de PCR, en un procedimiento conocido como RT-PCR.

Pueden emplearse varios métodos para mejorar la eficiencia de aislamiento de la secuencia deseada mediante métodos de enriquecimiento o selección que incluyen el aislamiento y la comparación de mRNA (o el cDNA monocatenario o bicatenario resultante) de más de una fuente, con el fin de identificar las secuencias expresadas predominantemente en el tejido elegido. Numerosos métodos de cribado diferencial, hibridación o clonación son conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen cDNA-AFLP, hibridación en cascada y *kits* comerciales para la clonación selectiva o diferencial.

En la presente invención, una secuencia de cDNA para una proteína SAR 8.2j (EMBL número de registro U64812) fue utilizada para aislar una nueva secuencia promotora. Ejemplos de otros genes de la proteína SAR se dan en EMBL números de registro U64816, U64807, U64808, U64809, U64810, U64811, U64813, U64814, U6481. Una segunda secuencia de cDNA para un factor de transcripción dedo de zinc (EMBL número de registro AL096692) fue también utilizada para aislar una secuencia promotora.

El cDNA elegido puede usarse entonces para evaluar las características genómicas de su gen de origen, por el uso como sonda de hibridación en una transferencia Southern de DNA genómico vegetal para revelar la complejidad del genoma con respecto a esa secuencia. Alternativamente, la información de secuencia del cDNA puede usarse para idear o concebir oligonucleótidos, y estos pueden ser usados de la misma forma que sondas de hibridación; para cebadores de PCR para producir sondas de hibridación o para cebadores de PCR para usarlos en el análisis directo del genoma.

Del mismo modo el cDNA elegido puede ser usado para evaluar el perfil de expresión de su gen de origen, por el uso como sonda de hibridación en una transferencia Northern de RNA extraído de varios tejidos vegetales, o de una serie del desarrollo o temporal. También aquí la información de secuencia del cDNA puede ser usada para concebir oligonucleótidos que pueden ser usados como sondas de hibridación, para producir sondas de hibridación, o directamente para RT-PCR.

El cDNA elegido, u oligonucleótidos derivados, pueden entonces ser usados como sonda de hibridación para cuestionar una librería de fragmentos de DNA genómico clonados e identificar secuencias de DNA. Por este medio puede ser identificado y aislado un promotor contiguo.

Por la naturaleza del método de aislamiento, un cDNA aislado comprende habitualmente el término 3' de la región de codificación y se extiende hacia el término 5'. Puede no comprender la secuencia de codificación de longitud completa. Es preferible asegurarse de que la secuencia terminal 5' está presente si el cDNA se va a usar para identificar el promotor contiguo. Esto puede realizarse por extensión de la secuencia del cDNA clonado en la dirección 5' por un proceso denominado 5' RACE (amplificación rápida de extremos de cDNA).

Si el análisis de la secuencia del cDNA clonado identifica una secuencia homóloga ya publicada en la bibliografía científica, esta información puede proporcionar una secuencia candidato adecuada para el término 5'. Sin embargo, la posibilidad de que haya diferentes miembros de la misma familia de genes con regiones de codificación similares, pero diferentes regiones intrón, secuencias de promotor y perfiles de expresión, puede conducir a la selección de una secuencia promotora incorrecta e inadecuada.

Una vez que el término 5' de la secuencia de codificación ha sido identificado, la región secuencia arriba contigua que contiene el promotor puede ser identificada si está presente en las bases de datos de nucleótidos públicas. Alternativamente el promotor puede ser aislado por posterior extensión en la dirección 5'. Esto puede conseguirse por métodos que incluyen PCR de ligación de vector, *genome walking* (desplazamiento o paseo genómico), PCR vectorette, y otros métodos. Si es necesario el proceso puede repetirse con un nuevo cebador complementario del

término 5' del primer fragmento de promotor para asegurarse de que son aisladas todas las secuencias de control de los promotores.

La homología puede determinarse sobre la base del porcentaje de identidad entre dos secuencias de DNA (o de polipéptido). En general, las dos secuencias a comparar son alineadas para dar una correlación máxima entre las secuencias. La alineación de las dos secuencias se examina y se determina el número de posiciones que dan una correspondencia de nucleótidos (o aminoácidos) exacta entre las dos secuencias determinadas, dividido por la longitud total de la alineación multiplicado por 100, para dar una cifra de porcentaje de identidad. Esta cifra de porcentaje de identidad puede ser determinada sobre la longitud completa de las secuencias a comparar, lo que es particularmente adecuado para secuencias de la misma longitud o de longitudes muy similares y que son altamente homólogas, o sobre longitudes definidas más cortas, lo que es más adecuado para secuencias de longitudes distintas o que tienen un nivel de homología más bajo.

Los métodos para comparar la identidad de dos o más secuencias son bien conocidos en la técnica. Así, por ejemplo, pueden usarse programas disponibles en Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 9.1 (Devereux J. et al, 1984) (disponible de Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, EE.UU.), por ejemplo los programas BESTFIT y GAP, para determinar el porcentaje de identidad entre dos polinucleótidos y el porcentaje de identidad entre dos secuencias de polipéptidos. El programa BESTFIT usa el algoritmo de "homología local" de Smith y Waterman (1981) y encuentra la mejor región individual de similitud entre dos secuencias. El programa BESTFIT es más apto para comparar dos polinucleótidos o dos secuencias de polipéptidos que son de longitudes distintas, suponiendo el programa que la secuencia más corta representa una porción de la más larga. En comparación, el programa GAP alinea dos secuencias encontrando una "similitud máxima" de acuerdo con el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970). El programa GAP es más apropiado para comparar secuencias que son aproximadamente de la misma longitud y se espera una alineación sobre la longitud entera. Preferentemente los parámetros "Peso de Gap" y "Peso de Longitud" usados en cada programa son 50 y 3 para secuencias de polinucleótidos y 12 y 4 para secuencias de polipéptidos, respectivamente. Preferentemente, el porcentaje de identidades y similitudes se determina cuando las dos secuencias que se comparan están alineadas óptimamente.

También son conocidos por los expertos en la técnica otros programas para determinar la identidad y/o la similitud entre secuencias, por ejemplo la familia de programas BLAST (Karlin y Altschul, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2264 - 2268, modificado como en Karlin y Altschul, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873 - 5877, disponible del National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, Maryland, EE.UU. y accesible a través de la página de NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov. Estos programas ejemplifican un ejemplo no limitante preferido de algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias. Tal algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul, et al., 1997, *J. Mol. Biol.* 215: 403 - 410. Las búsquedas de nucleótidos BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST para obtener secuencia de nucleótidos homólogas a una molécula de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteína BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína de la invención. Para obtener alineamientos separados para fines de comparación, puede usarse Gapped BLAST como se describe en Altschul et al, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25 : 3389 - 3402. Alternativamente, puede usarse PSI-Blast para llevar a cabo una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas (*Id.*). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (p. ej. XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Otro ejemplo no limitante de algoritmo matemático preferido utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, 1988, *CABIOS* 4: 11 - 17. Tal algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), que es parte del paquete de software de alineamiento de secuencias GCG.

Otro ejemplo no limitante de programa para determinar la identidad y/o la similitud entre secuencias conocido en la técnica es FASTA (Pearson W. R. y Lipman D. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85: 2444 - 2448, 1988, disponible como parte del Wisconsin Sequence Analysis Package [paquete de análisis de secuencias Wisconsin]). Preferentemente se usa la matriz de sustitución de aminoácidos BLOSUM62 (Henikoff S. y Henikoff J. G, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 89: 10915 - 10919, 1992) en comparaciones de la secuencia de polipéptidos incluyendo en donde las secuencias de nucleótidos son primero traducidas a secuencias de aminoácidos antes de la comparación.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede determinarse usando técnicas similares a las descritas anteriormente, con o sin permitir huecos. En el cálculo del porcentaje de identidad típicamente se cuentan las coincidencias exactas.

Preferentemente el programa BESTFIT se usa para determinar el % de identidad de un polinucleótido problema o una secuencia de polipéptidos con respecto a un polinucleótido o un polipéptido de la presente invención, estando la secuencia problema y la de referencia alineados óptimamente y los parámetros del programa ajustados en el valor por defecto.

En el contexto de la presente invención, secuencias sustancialmente homólogas son aquellas que tienen al menos un 50% de identidad de secuencia, preferentemente al menos 60%, 65% o 70% de identidad de secuencias, más

preferentemente al menos 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93% o 94% de identidad de secuencias y lo más preferentemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, o más, de identidad de secuencias.

5 Como se usa en el presente texto, el término “homólogo” significa una entidad que tiene una cierta homología con las secuencias de aminoácidos sujeto y las secuencias de nucleótidos sujeto. Aquí, el término “homología” puede hacerse equivalente a “identidad”.

Aunque la homología puede también ser considerada en términos de similitud (esto es, restos de aminoácidos que tienen propiedades o funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencias.

10 En el contexto de la presente invención el término utilizar incluye, entre otros, usar, introducir y expresar una secuencia o gen.

La presente invención incluye también secuencias de DNA que se hibridan con las secuencias de DNA de los promotores anteriores, incluyendo secuencias parciales y secuencias complementarias. Las condiciones bajo las cuales tales secuencias se hibridarán de esta forma pueden determinarse de una manera rutinaria.

15 La hibridación puede llevarse a cabo bajo condiciones de restricción baja, media o alta. Las condiciones bajo las cuales la hibridación y/o el lavado pueden llevarse a cabo están en el intervalo de 42°C a 68°C, y el tampón para lavado puede comprender de 0,1 x SSC, 0,5% SDS a 6 x SSC, 0,5% SDS. Típicamente la hibridación puede llevarse a cabo durante la noche a 65° C (condiciones de restricción alta), 60° C (condiciones de restricción media), o 55° C (condiciones de restricción baja). Los filtros pueden lavarse durante 2 x 15 minutos con 0,1 x SSC, 0,5% SDS a 65° C (lavado de restricción alta). Los filtros pueden lavarse durante 2 x 15 minutos con 0,1 x SSC, 0,5% SDS a 63° C (lavado de restricción media). Para el lavado de restricción baja, los filtros se lavan a 60° C durante 2 x 15 minutos a 2 x SSC, 0,5% SDS.

25 La presente invención incluye también secuencias de DNA que se hibridan con sondas de oligonucleótidos. Preferentemente las secuencias de DNA se hibridan con sondas de oligonucleótido bajo condiciones restrictivas. En casos en los que las moléculas de ácido nucleico son oligonucleótidos (“oligos”), las condiciones altamente restrictivas pueden referirse, por ejemplo, al lavado con 6 x SSC / pirofosfato sódico al 0,05% a 37°C (para 14 oligos de base), 48°C (para 17 oligos de base), 55°C (para 20 oligos de base), y 60°C (para 23 oligos de base). En una búsqueda BLAST frente a la base de datos de secuencias de nucleótidos EMBL (EMBL Nucleotide Sequence Database), versión 77 (Kulikova et al., 2004), el promotor ATC 085 tiene una identidad mayor que el 90% sobre sus últimas 220 bases con secuencias conocidas secuencia arriba del codón de inicio de la traducción de otros genes SAR tales como 8.2h y 8.2k. La única secuencia que muestra cualquier otra región de homología a lo largo de la longitud del promotor es la región de promotor Sar 8.2b (promotor Sar 8.2b, registro de GenBank U64816, bases 1 a 1907).

35 La Figura 1 muestra la alineación entre la SEC ID N° 1 (bases 1 a 1566) y la región del promotor SAR 8.2b con homología (bases 704 a 1907 de la secuencia de GenBank). La identidad se indica mediante puntos entre las secuencias alineadas. De la Figura 1 puede observarse que la SEC ID N° 1 tiene un 61% de identidad con el correspondiente promotor SAR 8.2b globalmente.

40 La figura 2, que no es de acuerdo con la invención reivindicada, muestra la alineación entre la secuencia del promotor ATC 023 (bases 1 a 1904) y la región de la secuencia de *Arabidopsis thaliana* alrededor del locus AT4g29190 (en orientación inversa). De la Figura 2 puede observarse que el promotor ATC 023 clonado tiene más del 99% de identidad con la secuencia genómica publicada.

45 La secuencia de codificación del gen que se usa bajo el control del promotor y se emplea en llevar a cabo la presente invención puede ser activa en algunos tejidos vegetales o en todos. La secuencia empleada puede codificar una proteína o un resto de RNA. Mediante técnicas de DNA recombinante, la secuencia puede codificar una variante sintética de una proteína o RNA, una secuencia parcial o una secuencia compuesta que comprende regiones de uno o más genes. Por ejemplo, el gen quimérico puede codificar una poliproteína. La secuencia puede comprender también secuencias repetidas, truncadas, inversas o complementarias, para conseguir la interrupción de la transcripción y la traducción de uno o más genes endógenos, por ejemplo mediante tecnología antisentido, de cosupresión o de inhibición de RNA.

50 Muchos genes vegetales, bacterianos y virales pueden expresarse activamente bajo el control del promotor. Preferentemente tales genes codifican:

(i) Enzimas GUS, GPF y luciferasa que pueden ser usadas como genes informadores para la función del promotor.

(ii) Genes para enzimas que producen componentes estructurales de la planta, tales como celulosa, hemicelulosas, pectinas y lignina.

5 (iii) Secuencias de DNA diseñadas para alterar el metabolismo en plantas y células vegetales. Tales genes incluyen los del metabolismo de carbohidratos, metabolismo del almidón, metabolismo de aminoácidos y proteínas, metabolismo de ácidos nucleicos y metabolismo de lípidos.

(iv) Secuencias de DNA reguladoras que pueden tener efectos sobre el control del metabolismo o el desarrollo, tal como la floración o la arquitectura vegetal, incluyendo aquellos genes que están implicados en el metabolismo o el transporte de sustancias de crecimiento de la planta.

10 (v) Secuencias de DNA que codifican productos tales como enzimas de restricción, proteasas, inhibidores de proteínasa y proteínas desactivadoras del ribosoma, que pueden usarse para conferir deliberadamente una función celular.

(vi) Resistencia al estrés ambiental, a agentes patógenos o a plagas.

El promotor de la presente invención es preferentemente operativo para dirigir la expresión en meristemos laterales y/o auxiliares.

15 El promotor de acuerdo con la presente invención, además de ser operativo para dirigir la expresión en yemas y/o brotes laterales, puede ser también operativo para dirigir la expresión en otros tejidos y/o células de la planta. Por ejemplo, puede observarse alguna expresión en tejido lacerado, y/o el tallo, y/o las hojas de la planta. Sin embargo, el promotor es operativo para dirigir la expresión de manera sustancialmente específica (como se define en el presente texto) en una yema lateral y/o un brote lateral.

20 El perfil de expresión de los promotores de la presente invención puede ser determinado por los expertos en la técnica usando una diversidad de métodos que son preferentemente:

(i) Expresión transitoria en la que el promotor es enlazado a un gen informador tal como GUS, GFP o luciferasa en una construcción apropiada, e introducido en el tejido vegetal mediante transformación escopeta. La expresión del promotor se detecta por la presencia o ausencia del producto del gen informador en diferentes tejidos vegetales.

25 (ii) Expresión transitoria en la que el promotor es enlazado a un gen informador tal como GUS, GFP o luciferasa, en una construcción binaria apropiada, e introducido en tejido vegetal mediante *Agrobacterium*. La expresión del promotor se detecta por la presencia o ausencia del producto del gen informador en diferentes tejidos vegetales. La actividad de GUS puede ser detectada visualmente usando sustratos apropiados tales como un colorante, o usando un colorímetro o un espectrofotómetro; la luciferasa y las proteínas marcadoras fluorescentes pueden ser detectadas a simple vista o fotográficamente, bien sea en película o en un medio digital, o cuantitativamente usando un luminómetro o un fluorómetro. Los genes marcadores pueden también ser detectados usando sistemas basados en anticuerpos.

30

(iii) Transformación y regeneración de la planta. La expresión del promotor se detecta por la presencia o la ausencia del gen informador en diferentes tejidos vegetales.

35 (iv) Transformación y regeneración de la planta. La expresión del promotor se detecta por la presencia o la ausencia de un producto génico específico producido por un gen efector en diferentes tejidos vegetales.

El producto génico de la presente invención puede ser producido por técnicas recombinantes, en las que clones de DNA genómico o clones de cDNA para la secuencia de codificación de cDNA, son producidos, aislados, multiplicados e incorporados a un vector de transformación de la planta de la presente invención.

40 En la presente invención se presenta por primera vez un promotor que es capaz de expresar un gen de manera sustancialmente específica en brotes laterales y/o yemas laterales.

Adecuadamente, el promotor de acuerdo con la presente invención es un "promotor inducido", es decir, un promotor que se pone en marcha en respuesta a un estímulo. Así, al igual que el promotor es operativo para dirigir la expresión en células específicas de la planta, el promotor puede también ser considerado como un promotor inducible.

45 Preferentemente, el promotor de acuerdo con la presente invención es inducido desmochando la planta, es decir, eliminado el brote o la yema apical de la planta.

Sin ánimo de vinculación con ninguna teoría, una posible manera en la que el promotor de la presente invención puede ser “conectado” es que puede ser activado o inducido por una señal que puede ser estimulada por la eliminación de la yema apical, por tanto después del desmoche. Por ejemplo, la señal puede ser una hormona del crecimiento de la planta. A título de ejemplo solamente, la señal puede ser una o varias citocinas.

- 5 Alternativamente, y también ahora sin desear vincularse a teoría alguna, puede ser posible que la yema apical libere una señal inhibidora que evita la excrecencia del meristemo lateral y/o la conexión del promotor de la presente invención, en cuyo caso, por ejemplo, la eliminación de la yema apical, p. ej. por desmoche, puede tener por resultado la pérdida de la señal inhibidora y por tanto la conexión del promotor de la presente invención. Por ejemplo, y tan solo a título de ejemplo, la señal inhibidora puede ser una o varias auxinas.

10 AISLADA.

En un aspecto, preferentemente la secuencia está en forma aislada. El término “aislada” significa que la secuencia es al menos sustancialmente libre de al menos otro componente con el cual la secuencia está asociada naturalmente en la naturaleza y como se encuentra en la naturaleza.

PURIFICADA.

- 15 En un aspecto, la secuencia está preferentemente en forma purificada. El término “purificada” significa que la secuencia está en estado relativamente puro, p. ej. al menos aproximadamente el 90% de pureza, o al menos aproximadamente el 95% de pureza, o al menos aproximadamente el 98% de pureza.

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS.

- 20 La expresión “secuencia de nucleótidos” como se usa en el presente texto es sinónima de “secuencia de ácidos nucleicos” y se refiere a una secuencia de oligonucleótidos o secuencia de polinucleótidos, y variantes, homólogos, fragmentos y derivados de las mismas (tal como porciones de las mismas). La secuencia de nucleótidos puede ser de origen genómico o sintético o recombinante, que puede ser de doble cadena o de cadena simple si representa la cadena sentido o antisentido.

- 25 La expresión “secuencia de nucleótidos” o “ácido nucleico” en relación con la presente invención incluye DNA genómico, cDNA, DNA sintético y RNA. Preferentemente significa DNA, más preferentemente secuencia de cDNA que codifica para la presente invención.

- Debido a la degeneración del código genético, pueden producirse fácilmente secuencias de nucleótidos en las que el uso del codón triplete, para algunos o todos los aminoácidos codificados por la secuencia de nucleótidos original, ha sido cambiado, produciendo así una secuencia de nucleótidos con baja homología con la secuencia de nucleótidos original, pero que codifica la misma secuencia de aminoácidos que la codificada por la secuencia de nucleótidos original, o una variante de la misma. Por ejemplo, para la mayoría de los aminoácidos, la degeneración del código genético es en la tercera posición del codón triplete (posición de bamboleo) (para referencia véase Stryer, Lubert, Biochemistry, Tercera Edición, Freeman Press, ISBN 0-7167-1920-7) por tanto una secuencia de nucleótidos en la que todos los codones triplete han sido “bamboleados” en la tercera posición sería aproximadamente un 66% idéntica a la secuencia de nucleótidos original, sin embargo la secuencia de nucleótidos corregida codificaría la misma secuencia de aminoácidos primaria que la secuencia de nucleótidos original, o una variante de la misma.
- 30
- 35

Por tanto la presente invención se refiere también a cualquier secuencia de nucleótidos que tenga uso de codón triplete alternativo para al menos un codón triplete que codifica un aminoácido, pero que codifica la misma secuencia de polipéptido, o una variante, que la secuencia de polipéptido codificada por la secuencia de nucleótidos original.

- 40 Además, los organismos específicos tienen típicamente una tendencia en cuanto a qué codones triplete son usados para codificar aminoácidos. Se dispone con facilidad de tablas de uso de codón preferido, y pueden usarse para preparar genes optimizados por codones. Tales técnicas de optimización por codones se usan rutinariamente para optimizar la expresión de transgenes en un hospedador heterólogo.

- 45 Típicamente, la secuencia de nucleótidos que codifica polipéptidos que tienen las propiedades específicas que se definen en el presente texto, se prepara usando técnicas de DNA recombinante (esto es, DNA recombinante). Sin embargo, en una realización alternativa de la invención, la secuencia de nucleótidos podría ser sintetizada, en su totalidad o en parte, usando métodos químicos bien conocidos en la técnica (véase Caruthers M H et al. (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 215 - 23 y Horn T et al. (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 225 - 232).

EVOLUCION MOLECULAR.

Una vez que la secuencia de nucleótidos que codifica el promotor ha sido aislada, o que ha sido identificada una secuencia de nucleótidos que codifica un promotor putativo, puede ser deseable modificar la secuencia de nucleótidos elegida, por ejemplo puede ser deseable mutar la secuencia con el fin de preparar un producto génico de acuerdo con la presente invención.

5 Las mutaciones pueden introducirse usando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias de nucleótidos que flanquean los sitios de mutación deseados.

Un método adecuado se describe en Morinaga et al (Biotechnology (1984) 2, p 646 - 649). Otro método de introducir mutaciones en secuencias de nucleótidos se describe en Nelson y Long (Analytical Biochemistry (1989), 180, p 147 - 151).

10 En vez de mutagénesis dirigida al sitio, tal como se describió antes, se pueden introducir mutaciones aleatoriamente, por ejemplo usando un *kit* comercial tal como el *kit* para mutagénesis GeneMorph PCR de Stratagene, o el *kit* para mutagénesis aleatoria Diversify PCR de Clontech. El documento EP 0 583 265 se refiere a métodos de optimizar la mutagénesis basada en la PCR, que puede también combinarse con el uso de análogos de DNA mutagénicos tales como los descritos en el documento EP 0 866 796.

15 Un tercer método de obtener secuencias nuevas es fragmentar secuencias de nucleótidos no idénticas, bien sea usando cualquier número de enzimas de restricción o una enzima tal como la DNasa I, y reensamblando secuencias de nucleótidos completas que codifican proteínas funcionales. Alternativamente, se pueden usar una o múltiples secuencias de nucleótidos no idénticas e introducir mutaciones durante el reensamblaje de la secuencia de nucleótidos completa. Métodos adecuados para llevar a cabo el "shuffling" (barajeo o reordenamiento) pueden encontrarse en los documentos EP 0 752 008, EP 1 138 763 y EP 1 103 606. El barajeo puede combinarse también con otras formas mutagénesis de DNA como se describe en la patente de EE.UU. n° 6.180.406 y WO 01/34835.

20 Así, es posible producir numerosas mutaciones dirigidas al sitio o aleatorias en una secuencia de nucleótidos, bien sea *in vivo* o *in vitro*, y a continuación hacer un cribado en cuanto a la funcionalidad mejorada del polipéptido codificado por varios medios. Usando métodos de recombinación mediados *in silico* y *ex vivo* (véanse el documento WO 00/58517, patente de EE.UU. n° 6.344.328, y patente de EE.UU. n° 6.361.974), por ejemplo, puede llevarse a cabo una evolución molecular en la que la variante producida retiene muy poca homología con proteínas conocidas. Tales variantes obtenidas de esta forma pueden tener una significativa analogía estructural con proteínas conocidas, pero tener muy poca analogía de secuencia de aminoácidos.

25 Como ejemplo no limitante, además, mutaciones o variantes naturales de una secuencia de polinucleótidos pueden ser recombinadas bien sea con el tipo silvestre o bien con otras mutaciones o variantes naturales para producir nuevas variantes. Tales nuevas variantes pueden también ser cribadas en cuanto a la funcionalidad mejorada del polipéptido codificado.

VECTORES DE TRANSFORMACION DE LA PLANTA.

35 Los vectores de transformación de la planta de la presente invención contendrán "cassetes de expresión" que comprenden 5'-3' en la dirección de la transcripción, una secuencia promotora como se describe en la presente invención, una secuencia de codificación de gen como se discutió anteriormente y, opcionalmente, una secuencia del terminador 3' no traducida que incluye una señal de parada para RNA polimerasa y una señal de poliadenilación para poliadenilasa.

40 La secuencia promotora puede estar presente en una o más copias, y tales copias pueden ser idénticas o variantes de la secuencia promotora como se describió anteriormente. Tales copias pueden también ser completas o secuencias parciales como se describió anteriormente.

45 La secuencia terminadora puede obtenerse de genes vegetales, bacterianos o virales. Secuencias terminadoras adecuadas son la secuencia terminadora *rbcS* Ep del guisante, la secuencia terminadora *nos* derivada del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* y la secuencia terminadora 35S del virus del mosaico de la coliflor, por ejemplo. Un experto en la técnica estará al tanto fácilmente de otras secuencias terminadoras adecuadas.

La cassette de expresión puede comprender también un mecanismo de potenciación de la expresión del gen para aumentar la fuerza del promotor. Un ejemplo de tal elemento potenciador es el que se deriva de una porción del promotor del gen de la plastocianina del guisante, y que es el objeto de la solicitud de patente internacional n° WO 97/20056.

50 Estas regiones reguladoras pueden derivarse del mismo gen que la secuencia de DNA promotora de la presente invención, o pueden derivarse de genes diferentes, de *Nicotiana tabacum* o de otros organismos, por ejemplo de una

planta de la familia de las solanáceas o de la subfamilia de las cestroideas. Todas las regiones reguladoras deben ser capaces de operar en células del tejido a transformar.

5 La secuencia de codificación del gen puede derivarse del mismo gen que la secuencia de DNA promotora de la presente invención o puede derivarse de un gen diferente, de *Nicotiana tabacum* o de otro organismo, por ejemplo de una planta de la familia de las solanáceas o de la subfamilia de las cestroideas.

10 La cassette de expresión puede ser incorporada en un vector de transformación de las plantas básico, tal como pBIN 19 Plus, pBI 101, u otro vector de transformación de las plantas adecuado conocido en la técnica. Además de la cassette de expresión, el vector de transformación de las plantas contendrá secuencias tales como las necesarias para el proceso de transformación. Estas pueden incluir los genes de *Agrobacterium vir*, una o más secuencias borde de T-DNA, y un marcador seleccionable u otro medio de identificar células de la planta transgénica.

La expresión "vector de transformación de la planta" significa una construcción capaz de expresión *in vivo* o *in vitro*.

Preferentemente, el vector de expresión se incorpora en el genoma del organismo. La expresión "se incorpora" cubre preferentemente la incorporación estable en el genoma.

15 Los vectores de la presente invención pueden ser transformados en una célula hospedadora adecuada como se describe más adelante para proporcionar la expresión de un polipéptido que tiene las propiedades específicas como se definen en el presente texto.

La elección del vector, p. ej. de plásmido, de cósmido, de virus o de fago, dependerá con frecuencia de la célula hospedadora en la cual ha de ser introducido.

20 Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, tales como genes que confieren resistencia a antibióticos, p. ej. resistencia a la ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Alternativamente, la selección puede realizarse por co-transformación (como se describe en el documento WO 91/17243).

Los vectores pueden usarse *in vitro*, por ejemplo para la producción de RNA, o usarse para trasfectar o transformar una célula hospedadora.

25 La expresión "asociado operativamente" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera que se pretende. Una secuencia reguladora "asociada operativamente" a una secuencia de codificación está ligada de tal forma que la expresión de la secuencia codificadora se consigue bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

CELULAS HOSPEDADORAS.

30 La expresión "célula hospedadora", en relación con la presente invención, incluye cualquier célula que comprenda un ácido nucleico, una secuencia promotora o un gen quimérico de acuerdo con la presente invención, o un vector de expresión como se describió anteriormente.

35 Así pues, otra realización de la presente invención proporciona células hospedadoras transformadas o trasfectadas con un ácido nucleico, una secuencia promotora o un gen quimérico de la presente invención. Las células se elegirán para que sean compatibles con dicho vector y pueden ser, por ejemplo, células procariotas (por ejemplo bacterianas), fúngicas, de levadura o vegetales. Preferentemente las células hospedadoras no son células humanas.

Ejemplos de organismos hospedadores bacterianos adecuados son las bacterias gram negativas o las bacterias gram positivas.

En una realización, pueden preferirse los hospedadores eucarióticos tales como levaduras u otros hongos. En general, las células de levadura son preferidas sobre las células de hongos porque son más fáciles de manipular.

40 El uso de células hospedadoras adecuadas, tales como las células hospedadoras de levaduras, hongos, y plantas, puede proporcionar modificaciones post-traduccionales (p. ej. miristoilación, glicosilación, truncación, lapidación y fosforilación de tirosina, serina o treonina), que pueden necesitarse para conferir una óptima actividad biológica en productos recombinantes de expresión de la presente invención.

La célula hospedadora puede ser una cepa deficitaria de proteasa o proteasa minus.

La expresión “planta transgénica” en relación con la presente invención incluye cualquier planta que comprenda un ácido nucleico, una secuencia promotora o un gen quimérico de la presente invención. Preferentemente el ácido nucleico, la secuencia promotora o el gen quimérico se incorporan en el genoma de la planta.

5 La expresión “planta transgénica” no cubre secuencias de codificación de nucleótidos nativas en su entorno natural cuando están bajo el control de su promotor nativo, que está también en su entorno natural.

La presente invención también abarca el uso de secuencias de nucleótidos que son complementarias con las secuencias discutidas en el presente texto, o cualquier derivado, fragmento o derivado de las mismas. Si la secuencia es complementaria de un fragmento de la misma, entonces esa secuencia puede usarse como sonda para identificar secuencias de codificación similares en otros organismos, etc.

10 El término “variante” como se usa en el presente texto significa una proteína expresada desde un código genético no endógeno que resulta en una o más alteraciones de aminoácidos (es decir, deleciones (borrados), adiciones o sustituciones de aminoácidos) cuando se compara con la secuencia natural o el tipo silvestre en la secuencia de la proteína madura.

TRANSFORMACION DE LA PLANTA.

15 Las técnicas para transformar plantas son bien conocidas en este campo e incluyen la transformación mediada por *Agrobacterium*, por ejemplo. El principio básico en la construcción de plantas modificadas genéticamente es insertar información genética en el genoma de la planta de forma que se obtenga un mantenimiento estable del material genético insertado. Una revisión de las técnicas generales puede encontrarse en publicaciones de Potrykus (*Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* [1991] 42: 205 - 225) y Christou (*Agro-Food-Industry Hi-Tech* marzo/abril de 1994 17 - 27).

20 Típicamente, en la transformación mediada por *Agrobacterium*, un vector binario que lleva un DNA extraño de interés, es decir un gen quimérico, es transferido desde una cepa apropiada de *Agrobacterium* a una planta diana mediante el co-cultivo del *Agrobacterium* con explantes de la planta diana. El tejido vegetal transformado es entonces regenerado en medio de selección, el cual medio de selección comprende un marcador seleccionable y hormonas de crecimiento de la planta. Una alternativa es el método de la inmersión floral (Clough y Bent, 1998) en el que las yemas florales de una planta intacta se ponen en contacto con una suspensión de la cepa de *Agrobacterium* que contiene el gen quimérico, y después de la puesta de la semilla los individuos transformados son germinados e identificados por crecimiento en medio selectivo.

25 La infección directa de tejidos vegetales por *Agrobacterium* es una técnica simple que ha sido empleada con profusión y que se describe en Butcher D. N. et al., (1980), *Tissue Culture Methods for Plant Pathologists*, eds.: D. S. Ingrams y J. P. Helgeson, 203 - 208.

Otros métodos de transformación adecuados incluyen la transferencia directa de genes a protoplastos usando polietileno glicol o técnicas de electroporación, bombardeo con partículas, microinyección, y el uso de fibras de carburo de silicio, por ejemplo.

35 La transformación de plantas usando transformación balística, incluyendo la técnica del pelo de carburo de silicio, se enseñan en Frame B R, Drayton P R, Bagnaall S V, Lewnau C J, Bullock W P, Wilson H M, Dunwell J M, Thompson J A y Wang K (1994). La producción de plantas de maíz transgénico fértiles mediante la transformación mediada por pelo de carburo de silicio se enseña en *The Plant Journal* 6: 941 - 948) y las técnicas de transformación viral se enseñan, por ejemplo, en Meyer P, Heidmann I y Niedenhof I (1992). El uso del virus del mosaico de la cassava como sistema vector para plantas se enseña en *Gene* 110: 213 - 217.

Otras enseñanzas acerca de la transformación de plantas pueden encontrarse en el documento EP-A-0449375.

40 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un sistema vector que lleva una secuencia de nucleótidos o construcción de acuerdo con la presente invención y que es capaz de introducir la secuencia de nucleótidos o la construcción en el genoma de un organismo, tal como una planta. El sistema puede comprender un vector pero también puede comprender dos vectores. En el caso de dos vectores, el sistema vector se denomina normalmente sistema vector binario. Los sistemas vector binarios se describen con más detalle en Gynheung An et al., (1980), *Binary Vectors*, *Plant Molecular Biology Manual* A3, 1 - 19.

45 Un sistema empleado con profusión para la transformación de células vegetales usa el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*, o un plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes* An et al., (1986), *Plan Physiol.* 81, 303 - 305 y Butcher D. N. et al, (1980), *Tissue Culture Methods for Plant Pathologists*, ed.: D. S. Ingrams y J. P. Helgeson, 203 - 208. Después de cada método de introducción del promotor deseado, o construcción o secuencia de nucleótidos de acuerdo con la presente invención en las plantas, puede ser necesaria la presencia y/o la inserción de otras secuen-

cias de DNA. Si, por ejemplo, para la transformación se usa el plásmido Ti o Ri de las células vegetales, pueden conectarse al menos al menos el límite derecho y frecuentemente sin embargo el límite derecho y el izquierdo del T-DNA del plásmido Ti y Ri, como áreas flanqueantes de los genes introducidos. El uso de T-DNA para la transformación de células vegetales ha sido intensamente estudiado y se describe en el documento EP-A-120516; Hoekema, en: *The Binary Plant Vector System* Offset-drukkerij Kanters B. B., Alblasserdam, 1985, Capítulo V; Fraley, et al., *Crit. Rev. Plant Sci.*, 4: 1 – 46; y An et al, *EMBO J.* (1985) 4: 277 – 284.

Las células vegetales pueden cultivarse y mantenerse de acuerdo con métodos de cultivo de tejidos bien conocidos, tales como cultivar las células en un medio de cultivo adecuado provisto de los factores de crecimiento necesarios tales como aminoácidos, hormonas vegetales, vitaminas, etc.

10 CULTIVO Y PRODUCCIÓN.

Células hospedadoras transformadas con el ácido nucleico, la secuencia promotora o el gen quimérico de la presente invención pueden ser cultivadas bajo condiciones que conduzcan al crecimiento del hospedador.

El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de la célula hospedadora en cuestión.

15 PRODUCCION DEL PRODUCTO GENICO.

La expresión de una secuencia de codificación de DNA o secuencia de ácidos nucleicos en la célula hospedadora vegetal producirá un transcrito de RNA. Este transcrito puede ser una molécula de RNA que subsiguientemente no es traducida en un producto de proteína, sino que puede interactuar con el proceso de expresión del gen a través del mecanismo del RNAi, antisentido o co-supresión. Si la secuencia de codificación se deriva de un gen estructural, el transcrito de RNA puede entonces ser traducido en un producto génico de proteína. Si se desea, el producto génico puede ser aislado por técnicas estándar para el aislamiento de proteínas de los sistemas biológicos, tales como precipitación salina, cromatografía en columna, técnicas de inmovilización, electroforesis, recristalización, centrifugación, y técnicas así.

EXPRESIÓN DE UN PRODUCTO GENICO NOCIVO PARA LAS CELULAS VEGETALES.

Si la secuencia de codificación de DNA o la secuencia de ácidos nucleicos es traducida en un producto génico de proteína que tiene un efecto nocivo sobre la célula hospedadora vegetal, este puede usarse en un sistema de muerte de células vegetales. Las proteínas adecuadas que tienen un efecto nocivo podrían incluir proteasas, endonucleasas de restricción, proteínas de transporte de la membrana, y ribonucleasas tales como la barnasa. Otros ejemplos incluyen proteínas desactivadoras del ribosoma (RIPs) tales como la proteína RIP b-32 del maíz, la ricina, la abrina, la modicina, el inhibidor de la traducción de la cebada y la proteína antiviral de la hierba carmesí (PAP). La hierba carmesí (*Phytolacca americana*) produce tres proteínas antivirales distintas, que son PAP', PAPII y PAP-S. La publicación de patente internacional N° WO 02/33107 demuestra el uso de variantes truncadas de la proteína PAP-S en un sistema de muerte celular. Por ello, el uso de una proteína desactivadora del ribosoma (PAP) o de variantes de la misma, proporcionaría un sistema de muerte celular a la planta.

La invención se describirá ahora, tan solo a título de ejemplo, con referencia a los Ejemplos que siguen.

EJEMPLO 1.

Aislamiento de la región promotora ATC 085 (SEC ID N° 7) y producción de construcciones transformadas.

Se aisló DNA genómico del tejido de las hojas del tabaco usando el equipo DNAeasy Plant Miniprep Kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, a partir de material de las hojas de tabaco K326. Una parte alícuota de un preparado diluido 1:10 de DNA genómico se usó para una PCR primaria, usando 1 µL de un cebador para PCR S2PCLOFW (SEC ID N° 2) a 10 pM/µL y 1 µL de un cebador para PCR S2PCLOREV (SEC ID N° 3) a 10 pM/µL en una reacción de 25 µL que contiene 0,5 µL de elongasa Taq DNA Polimerasa (Gibco BRL), 1 µL de tampón A para elongasa, 4 µL de tampón B para elongasa, 1 µL de dNTPs a 5 mM cada uno, 15,5 µL de agua bidestilada. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: un ciclo inicial a 94°C durante 2 minutos seguido por 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 4 minutos, seguido por un ciclo final de 68°C durante 10 minutos. La reacción PCR fue sometida a electroforesis en un gel de TBE con agarosa al 1,2%, que contiene trazas de bromuro de etidio, a 4 V/cm durante 2 horas. Se vieron dos productos de la PCR. El producto más grande, de aproximadamente 1600 pb, fue cortado del gel y el DNA se purificó usando el *kit* de extracción en gel QiaQuick (Qiagen) siguiendo los procedimientos del fabricante.

El producto de la PCR purificado fue clonado en un vector TOPO (Invitrogen) y transformado en *E. coli* químicamente competente TOP10 (Invitrogen) siguiendo los procedimientos estándar del fabricante. Una parte alícuota de la

reacción se cultivó en placa sobre agar LB estéril que contiene kanamicina, y las placas se cultivaron durante la noche a 37°C. Las colonias fueron cribadas mediante PCR usando las condiciones anteriores para identificar los clones que contenían el promotor. La secuencia se confirmó más mediante secuenciación.

5 El promotor ATC 085 se cortó del vector TOPO como un fragmento HindIII - BamHI y se clonó en el vector de transformación vegetal pBin 19 Plus basado en pGPTV-Kan (Becker et al, 1992) derivado de pBIN19 (Bevan et al, 1984) frente a tres genes informadores diferentes, para dar las construcciones GUS (ATC vector pBNP085-0040-001), GFP (ATC vector PBNPO85-0003-001), y Luciferasa (ATC vector pBNPO85-0017-001). El promotor fue también clonado frente a un gen efector, la forma activa de la proteína antiviral S de la hierba carmesí de *Phytolacca americana* (ATC vector pBNPO85-0501-001). pBNP085-0501-001 ha sido depositado por Advanced Technologies (Cambridge) Ltd, 210 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 0WA bajo el Tratado de Budapest de reconocimiento internacional del depósito de microorganismos con la finalidad de procedimiento de patente (Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the purposes of Patent Procedure) en la National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria (NCIMB) 23 St. Machar Street, Aberdeen Scotland, GB, el 20 de septiembre de 2005 bajo el número de registro NCIMB 41343.

15 EJEMPLO 2

Aislamiento de la región promotora ATC 023 y producción de la construcción de transformación (no de acuerdo con la invención reivindicada).

20 El promotor ATC023 fue aislado por PCR de DNA genómico de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia) usando PfuTurbo DNA Polimerasa (Stratagene), y los cebadores AT4G29190L (SEC ID N° 5) y AT4g29190R (SEC ID N° 6) que contienen sitios de restricción para HindIII y BamHI respectivamente, a una temperatura de reasociación de 63°C. Los sitios de restricción fueron después usados para clonar el fragmento aislado en el vector de transformación de plantas vector pBIOI frente a un gen informador GUS para dar la construcción pBIOI 023-0101 -001. La construcción fue después transformada en *E. coli* DH5α.

EJEMPLO 3.

25 **Producción de plantas de tabaco transformadas.**

30 Las construcciones producidas anteriormente fueron transferidas a la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, y se obtuvieron plantas de tabaco transgénico var. K326 mediante transformación *in vitro* de discos de hojas usando el método de co-cultivo de Horsch et al. (1985). Callo transformado y brotes regenerados fueron seleccionados en medio MS Agar que contiene 100 µg/mL de kanamicina, y se cultivaron en presencia de Claforan para eliminar las células de *Agrobacterium*. Las plantas se conservaron y se multiplicaron *in vitro* en medio sin Claforan para conformar la ausencia de *Agrobacterium*.

Las plantas fueron transferidas a la tierra del invernadero para su caracterización. Las plantas mostraron unas características de crecimiento indistinguibles de la planta de tabaco de tipo silvestre en el invernadero. El análisis de PCR se llevó a cabo para identificar las plantas transgénicas.

35 Para la producción de generaciones subsiguientes las plantas pueden ser fertilizadas y las semillas se recogen de cabezas de semillas maduras y se almacenan a 6°C. Las relaciones de segregación en la progenie a partir de plantas transgénicas fertilizadas pueden usarse para seleccionar tandas de semillas que contienen sitios de inserción únicos basándose en una relación 3:1. El número de insertos en el genoma del tabaco puede ser también determinado por hibridación Southern. La inserción en el genoma del tabaco puede ser caracterizada mediante desplazamiento o paseo genómico (*genome walking*).

EJEMPLO 4.

Producción de plantas de Arabidosis transgénicas.

45 Las construcciones descritas antes fueron transferidas a las cepas LBA4404 y GV3103 de *Agrobacterium tumefaciens* y usadas para transformar *Arabidopsis thaliana* por el método de inmersión floral de Clough y Bent (1998). Después de recoger las semillas de las plantas sumergidas, los transformantes T1 fueron cribados usando la selección en 40 µg/mL de kanamicina en ATS/Phytage™ o 50 µg/mL de kanamicina en medio MS/Agar. Los transformantes independientes fueron aislados de esta forma y estos fueron transferidos a la tierra y desarrollados bajo condiciones de día largo.

50 Las plantas se dejaron autopolinizar para generar semilla T2. Aproximadamente 60 semillas T2 de las líneas independientes se cribaron de nuevo para determinar si la relación de segregación observada era consistente con un

sitio único de inserción del transgén (3 resistente: 1 sensible). Se identificaron múltiples líneas independientes con relaciones consistentes con un único sitio de inserción, y las líneas restantes se desecharon.

EJEMPLO 5.

Caracterización de la expresión de promotor ATC 085 – GUS en plantas de tabaco.

5 Sesenta plantas transformadas con el vector pBNP085-0040-001 fueron usadas para análisis de GUS. Después de aproximadamente 6 a 8 semanas de crecimiento en el invernadero cuando la yema apical había alcanzado la fase de "botón floral", las plantas fueron desmochadas usando un bisturí en el internado por encima de la 18ª hoja (con-

10 tando desde la base), heridas cortando la mitad de los limbos de las hojas 16, 17 y 18, o bien se dejaron sin tratar. Al cabo de 24 horas, se tomaron varias muestras de tejidos, incluyendo secciones del tallo en la base de las yemas laterales 14, 15, 16, 17 y 18, secciones del tallo internodales, brotes de floración apicales cuando estaban presentes, limbos foliares y pecíolos, y las raíces primarias y secundarias. Todo el tejido recogido fue inmediatamente sumergido en tampón de fosfato potásico 0,1 M pH 7,0 que contiene 0,1% de β -mercaptoetanol para prevenir el pardeamiento.

15 La solución de tinción se preparó de la forma siguiente: se disolvieron 300 mg de polvo X-gluc en 3 mL de DMSO en un recipiente de vidrio y se llevaron a 1 L con tampón de fosfato potásico 0,1 M que contiene ferricianuro potásico 0,5 mM, ferrocianuro potásico 0,5 mM, EDTA 10 mM, 0,1% de Triton-X y 0,067% de Sarcosyl. Esta solución se guardó a 4°C en la oscuridad.

20 Para la tinción de las muestras de tejido, el tampón de fosfato potásico / β -mercaptoetanol fue reemplazado por solución de tinción fresca asegurándose de que el tejido estaba totalmente sumergido, y las muestras se incubaron durante la noche a 37°C en la oscuridad. La solución de tinción fue después reemplazada con etanol al 70%, y los tejidos se guardaron en la oscuridad a temperatura ambiente hasta que se aclararon. A veces fue necesario cambiar el etanol al menos una vez para el material foliar. Una vez aclarado el tejido, el etanol se reemplazó con glicerol acidificado. Las muestras fueron observadas y fotografiadas bajo un microscopio.

25 La expresión de GUS fue detectada en las plantas después de los tres tratamientos (desmochada, lacerada o no tratada) y esta fue localizada en la base de las yemas laterales y/o en el tallo próximo al punto de iniciación de la yema lateral en cada caso (Figura 3). Una gran proporción de las plantas mostraron expresión en cada posición de la yema muestreada. La expresión en las yemas laterales fue detectada al margen del pre-tratamiento (desmoche, laceración o sin tratamiento). En la gran mayoría de las plantas, no se detectó expresión en ningún otro tejido, solamente en una pocas plantas anómalas se observó algún otro sitio de expresión, predominantemente en los bordes

30 de corte de las hojas laceradas. Por tanto se demostró que el promotor ATC085 es un promotor que dirige la expresión sustancialmente específica en el punto de iniciación de la yema lateral o alrededor de dicho punto.

EJEMPLO 6.

Caracterización de la expresión del promotor ATC 085 – GFP en plantas.

35 Plantas transformadas con el vector pBNP085-0003-001 fueron usadas para análisis de la expresión de GFP. Plantas enteras, o parte de plantas, secciones de plantas o tejidos vegetales fueron irradiadas con luz azul e inspeccionadas por fluorescencia verde bien sea a simple vista o mediante un microscopio.

EJEMPLO 7.

Caracterización de la expresión del promotor ATC 085 – luciferasa en plantas.

40 Plantas transformadas con el vector pBNP085-0017-001 fueron usadas para análisis de la expresión de la luciferasa. Plantas enteras, o partes de plantas o secciones de plantas o tejidos vegetales, fueron humedecidas o rociadas con luciferina 1 mM (Sigma) e incubadas en la oscuridad durante 15 minutos. La expresión de la luciferasa pudo entonces visualizarse, bien mediante autorradiografía sobre película para rayos X, o bien mediante fotografía usando una cámara digital con un tiempo de exposición largo, o usando un dispositivo de captura de fotones tal como un intensificador de imagen conectado a un sistema de cámara.

EJEMPLO 8.

Caracterización de la expresión del promotor ATC 085 – PAP en plantas de tabaco.

Veintiuna plantas transgénicas y cinco plantas testigo no transformadas (no co-cultivadas o NCC) se desarrollaron en el invernadero y, al cabo de 6 a 8 semanas, las plantas fueron desmochadas usando un bisturí en el internado

por encima de la hoja 18^a, para eliminar la inflorescencia apical y las hojas más altas, como se describió antes. La excrecencia de los brotes laterales desde las axilas de las hojas 16^a, 17^a y 18^a fue controlada diariamente durante 29 días y puntuada en el siguiente sistema de clasificación de tamaños:

- 5 0 = yema lateral colindando con el tallo principal
 1 = yema lateral en el tallo lateral alargado (es decir 1 internodo)
 2 = brote lateral con 2 internodos
 3 = brote lateral con 3 internodos.
 etc.

10 A partir de estos datos se calculó la excrecencia media de las tras posiciones de yemas laterales cada día, para las plantas transgénicas y no transformadas. Estos datos se representan gráficamente en la Figura 4. Es evidente que la expresión localizada de la proteína antiviral de la hierba carmesí dirigida por el promotor ATC085 ha causado un importante retraso de la excrecencia de brotes laterales estimulada en el desmochado, y una reducción de la cantidad de excrecencia el día 29 si se compara con las plantas testigo. El efecto era particularmente acusado en las dos yemas más altas 17 y 18 (véase la Figura 4a). La yema lateral 16 mostró menos excrecencia (Figura 4b) en el desmoche que las yemas 17 y 18, pero esto se redujo más por la expresión de la construcción ATC 085-PAP.

15 La Figura 5 muestra la excrecencia reducida de los brotes laterales en plantas transgénicas ATC 085-PAP comparadas con las plantas testigo.

EJEMPLO 9.

Caracterización de la expresión del promotor ATC 085 – GUS en plantas de *Arabidopsis*.

20 La construcción pBNP085-0040-001 fue usada para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana*. Cuarenta plantas T1 fueron usadas para análisis de GUS. Las plantas se desarrollaron en tierra bajo condiciones de día largo durante 3 a 4 semanas hasta después de la transición floral cuando el eje primario había “desbocado” a una longitud entre 20 y 40 mm. Las plantas fueron después decapitadas eliminando el tallo principal en un punto a aproximadamente 10 mm de la parte superior de la roseta. Después se dejó que continuaran creciendo durante 24 horas antes de sacarlas de la tierra, se lavaron intensamente en agua destilada, y se analizaron en cuanto a la actividad de GUS. La tinción de GUS se realizó como se describió antes para las plantas de tabaco, excepto que se usaron plantas enteras.

25 La expresión de GUS fue detectada en las plantas mediante la tinción muy intensa en la base de la planta en el sitio de la formación de la yema lateral y en el tallo cerca. Sin embargo, la expresión se vio también en otros tejidos en algunas de las plantas, incluyendo los tejidos foliares y las venas, pecíolos, tallo y raíces primarias.

30 **EJEMPLO 10** (no de acuerdo con la invención reivindicada).

Caracterización de la expresión del promotor ATC 023 – GUS en plantas de tabaco.

35 Cuarenta y dos plantas de tabaco transformadas con la construcción pBI101 023-0101-001 fueron desarrolladas en el invernadero y tratadas como se describió antes para el análisis de GUS.

40 La expresión de GUS fue detectada en las yemas laterales del 85% de las plantas, al margen del tratamiento (desmochadas, laceradas o no tratadas), y la mayor parte de las plantas mostraron expresión en cada posición de yema muestreada. En muchos casos se vio también expresión localizada en el tallo cerca del punto de iniciación de la yema lateral. También se detectó expresión en otros tejidos en algunas plantas, predominantemente en los tejidos florales, pero en ocasiones en raíz, tallo, hoja o pecíolos.

45 La localización específica de la expresión en las yemas laterales y cerca del tallo fue observada en el 17% de las plantas (Figura 6). Por ello el promotor ATC023 puede usarse solo para proporcionar expresión específica del tejido. También puede usarse en combinación con otro promotor que expresa en la yema lateral, tal como ATC 085, para proporcionar perfiles de expresión complementaria con un sitio de acción solapado en el tejido de la yema lateral.

50 **EJEMPLO 11** (no de acuerdo con la invención reivindicada).

Caracterización de la expresión del promotor ATC 023 – GUS en plantas de *Arabidopsis*.

55 Cinco líneas T2 transgénicas independientes que llevan insertos simples de la cassette 023-0101-001 fueron desarrolladas en tierra, decapitadas y teñidas para análisis de GUS como se describió antes.

La expresión de GUS fue observada en las yemas axilares y tallo adyacente, y en tejidos florales (Figura 7). La expresión asociada con las yemas más pequeñas fue la más intensa, y disminuyó constantemente a medida que se desarrollaban las yemas. Esto indica que el promotor ATC 023 está asociado con la iniciación de la yema lateral. También se detectó algo de expresión en otros tejidos en algunas plantas, incluyendo los tejidos florales.

- 5 Todas las publicaciones mencionadas en la anterior memoria se incorporan en el presente texto como referencia. Varias modificaciones y variaciones de los métodos y del sistema de la presente invención descritos serán evidentes para los expertos en la técnica, sin apartarse del alcance de la presente invención. Aunque la presente invención ha sido descrita en conexión con realizaciones específicas preferidas, ha de entenderse que la invención que se reivindica no debe verse limitada de forma indebida a tales realizaciones específicas. En realidad, se entiende que varias modificaciones de los modos de llevar a cabo la presente invención que se han descrito, que son evidentes para los expertos en bioquímica y en biotecnología o en campos relacionados con ellas, están dentro del alcance de las reivindicaciones que siguen.
- 10

Referencias

- Altschul, S. E, Madden, T. L, Schaffer, A. A, Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25 3389-3402.
- 5 Ausubel, F. M. Bent, R. Kingston, R. E. Moore, D. D. Seidman, J. G. Smith J. A. y Struhl K. (1989). *Current protocols in molecular biology*. New York: Greene and Willy Interscience.
- Baxevanis, A. D. (2001). Predictive Methods using DNA Sequences. In "Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins ."Editors A. D. Baxevanis y B. F. Ouellette. John Wiley and Sons Inc., New York. Pp. 233-252.
- Becker et al, (1992) *Plant Molec. Biol.* 20 11951197.
- 10 Benfey, P. N, y Chua, N-H. (1989) Regulated genes in transgenic plants. *Science* 244 174-181.
- Bevan, M. (1984) Binary *Agrobacterium* Vectors for Plant Transformation. *Nucleic Acids Research* 12 8711-8721.
- Christensen, A. H. y Quail, P. H. (1996). Ubiquitin promoter-based vectors for which level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research* 5 213-218.
- 15 Clough, S J. y Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16 735-743.
- Comejo M J, Luth D, Blankenship K M, Anderson O D, Blechl A E. (1993). Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice. *Plant Molec. Biol.* 23 567-81.
- Delaporta, S. L. Wood J. R. y Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: version 2. *Plant Molecular Biology Reporter* 1 19-22.
- 20 Devereux J, Haeberli P, Smithies O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12 387-95.
- Esau K. (1960) *Anatomy of seed plants*. New York y London. John Wiley y Sons Inc.
- Gatz, C. (1995) Novel inducible/repressible gene expression systems. *Methods in Cell Biol.* 50 411-424.
- 25 Horsch, R. B, Fry, J. E., Hoffman, N X, Eichholtz, D., Rogers, S. G. y Fraley, R. T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227 1229-1231.
- Jefferson, R. A. (1987) Assaying Chimeric Genes in Plants: The GUS Gene Fusion System. *Plant Molec. Biol. Repr.* 5 387-405.
- 30 Kulikova T., Aldebert P., Althorpe N., Baker W, Bates K., Browne P., van den Broek A., Cochrane G., Duggan K., Eberhardt R., Faruque N., Garcia-Pastor M., Harte N., Kanz C, Leinonen R., Lin Q., Lombard V, Lopez R., Mancuso R., McHale M., Nardone F., Silventoinen V, Stoehr P., Stoesser G., Tuli M. A., Tzouvara K., Vaughan R, Wu D., Zhu W., y Apweiler R. (2004) The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Res.* 32 D27-30.
- Mariani C, De Beuckeleer M, Truettner J, Leemans J, Goldberg R B (1990). Induction of male sterility in plants by a chimeric ribonuclease gene. *Nature* 347737-741.
- 35 Needleman S B, Wunsch C D. (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Molec. Biol.* 48 443-53.
- Odell J T, Nagy F, Chua N H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature.* 313 810-2.
- Sambrook, J., Frisch, E. F. y Maniatis, T. (Eds.) (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 40 Smith, T. y Waterman, M. S. (1981). Comparison of biosequences. *Advances in Applied Mathematics*, 2 482-489.

Stirpe, F. y Barbieri. T. (1986) Ribosome-inactivating proteins up to date. FEBS Lett. 195 1-8.

Warner S A, Scott R, Draper J. (1993). Isolation of an asparagus intracellular PR gene (AoPRI) wound-responsive promoter by the inverse polymerase chain reaction and its characterization in transgenic tobacco. Plant J. 3 191-201.

Zhang W, McElroy D. Wu R. (1991). Analysis of rice Act1 5' region activity in transgenic rice plants. Plant Cell 3 1155-65.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Advanced Technologies (Cambridge) Limited
- <120> Modificación del desarrollo y morfología de una planta
- <130> p022825WO
- 10 <150> GB0421598.4
- <151> 2004-09-29
- <160> 7
- 15 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 1566
- 20 <212> DNA
- <213> Promotor de Nicotiana tabacum

```

<400> 1
gctatcaagc tttattaaag tgc caataa gtgcaagcct attagttgaa atgtcaaaag      60
ttggatcaa atttagggag ttatttatgc tcccgtttg ccagatttcg gttactat    120
tttaagtta atttgtttt tcaagtttca agatttatga cagtttttga gtgatattt    180
tccatttact cacaaaactt taactttttt ttttcaaata aaatacatgt acaaatacaa    240
tttaatttt caaatattat tttccaacat aacttcaaaa actctttttt caagtgttaa    300
ttaaataat gtttaactat gtattcattt gtgcttatgt tttatcatgc atttcataa    360
gtgaatttca tactcatctt catgcaaca cttatactat aaaagatata ttattcctat    420
atacaacatg tttatacgag atcattacat tgtaagtgta ccttattatt ggtaaatttt    480
ggacttcacc aaaaataatt aaggaagtaa tgatatgcaa taaataaata aataaataaa    540
gttaaaaata ttatacttga ctcaagacac attatgggga acacgwtctt ttcacgatcc    600
atcttatcct ttcacgata gaagttagca atagcattat tctcatatta gcggaattat    660
ggttgtttgt ctctttatat ggtcatagac tctcgagata attcatattt caagactagt    720
tatttttag agctgaatta agtttaaaat ttatttcttc gttcgagcgt gcaaggggtg    780
taagcagggg ctgaggaaga gcattagtcg cgggttcgaa cgaactcagc ttaattctta    840
tatttgtatt agaaaataca taaaatatgt ataaatatct aattacgaac ataataacta    900
agataaacta tgagttcctg ataaattgaa aatctataaa caccaaatcc tagctagtct    960
ctggtgttaa ggtgtcccac atttgttgag ggatggggtg ttatatggtc ttgggcaaga   1020
gttgagatca ctcgccacc aattatctat atttggcca ttgtttcca ttaaacaat    1080
tcctccaag ttgatctagt tactgttctc atttataatc caagttgata ctatttgtca   1140
tgtggctggc tatacgacat tgtttttggt tttttttgga aaatttctag gaaaccgtag   1200
ccgcttccat tcgggtgtgc atttgataac taactcactg tgcaattgct cgcaaatcac   1260

```

25

ES 2 373 318 T3

acagaagata taaatcgc at taggcacgcc cggtagcact agggggagac tactggtgag 1320
gagaatcgat ctcagatctc ccatatgata aaccactcac ccaactaact caatcaaccc 1380
cggcggcggg ygtgacttca cagtaagtct ttgtgaaggc tttctttttg tcattttctc 1440
ccttgtttag aacaagttgt tcttgcacga gaaactatta agtyatataa ataggggaga 1500
racattgttt tcctttttac agcaaaaaat tgraactcca aatagctcat caaaggatcc 1560
tactcg 1566

5 <210> 2
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido de PCR S2CLOFWD

<400> 2
gctartcaagc ttattaaag tgtccaagct caagcc 36

15 <210> 3
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido de PCR S2CLOREV

<400> 3
cgagtaggat ccttgatga gctattgga gttcaatt 39

25 <210> 4
<211> 1904
<212> DNA
<213> Promotor ATC 023 de Nicotiana tabacum

30 <400> 4
cgaagacatt gtgtcgtaat cgtgtgtaat ttcactatct tccaaataaa gaaatataat 60
aattgcttct tgaatcggat gagctacacg tttttagata tttcgcaacc tgtcttcttc 120
gttagatcta ggaaacattg atttatagaa atatgtttct attatttctc tattattcat 180
tcaacatggt aatatcgcca ccaactcaaat atattgacca tgtcaattgt ttgattgaac 240
tataagtttg ataaacaatt gtcaaattta taaaaattta aaagagaaaa tacatttata 300
tgaaagaaaa gaaaagtgc aaaaagaaag acaaaggat aatgagagg tcgattttgt 360
ttaggaggat atggaattgc ttccaaattt agcaaagaaa cataaatggt tttgccccta 420
taaagtcttt aaacgttatt ccaaatctgt tccaacatgt cctcttcac cgacacattt 480
cttatcctct tctctaattt tttttgctaa aattaaatcg aaaattgaaa acgaattttt 540
gagaactatg taagatattt tttttcttcc aataacaaca aattaccaa caactttttg 600

ES 2 373 318 T3

tcgttttggt actaataag tgggtacaatg aaattataag tgatacaata aaatcatttg 660
 acttagatat aataatattc aaattaaaat gacaacaata cacaataaaa ttatgagaat 720
 tcttcgaatc atatcaaaaa ttaatttttt tttttcgata acaataaatt attaaacaac 780
 tttttgctcg aagattattt tttcctgata acaataaatt attaaataat tttcgatcgt 840
 tttgttgtta gataaatgat acaatgaatt catttcaaca acttagatac aacaatattt 900
 ggatcaaaat gaaaattata aacaagatg catatatctt tgtatcatat caaaaacaag 960
 atcatttttt ccgataacaa taaattatta aacaactttt tgctgttttg ttgctagata 1020
 agtgaacaa taaaatcatt ttgacgaatt agatataaca atattaagat cacaatgaac 1080
 aatagtaaac acaaaattat cagatatttt ggtattaaaa ataagattat ttttccgata 1140
 ataacaatt attaaacaat ttttttatag ttttgatgct aaataagtga tataatgaaa 1200
 ttgttttgac gatttagata caataatatt aggttcaaaa tgacaatact aaacaacaaa 1260
 ttatcagatc atatcaaaaa taaaattatt tttttcgata acagcaaatt attaaacaac 1320
 ttttttttta ttgctagata aatgatacaa taacctcatt cgatatatat aataatattc 1380
 aaatcaaaat gacaataata aacaataaat tattatattg aatcatataa aaaataagag 1440
 atacatgcaa cgaataatta aacaacaaa ttaagtaata aggcaatgga tagactaatt 1500
 aatgaaacta aaactgtgga ttatctattt tgctgctttt cggagaatct aaacttcgac 1560
 cgacttcaac gtatctaata atcctaaagt aaccttacgc tcacagttcg gttactttaa 1620
 acttcgtcaa agtcattttg ataaacgtcc acatcacgaa acggtccacg tacgtctatc 1680
 tcgtggataa gtctccagcc gctgttcac atgcttatct cacagctttg ttacgataac 1740
 ctagtcctat gctaatatct ttaaccatag ttaataaatt ttaaccaaac cacggttaag 1800
 tgtttcaact acataagtag ctttgccggt gtattacaaa caaacaacac aaacaaaaaa 1860
 aaagaactct ttcgctgact aatgtgattt attgttcacc ggat 1904

5 <210> 5
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido de PCR AT4G29190L

<400> 5
 ggcaagcttc gaagacattg tgcgtaatc g 31

15 <210> 6
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido de PCR AT4G29190R

<400> 6
 gcggatccg tgaacaata atcacattag tc 32

25 <210> 7
 <211> 1541
 <212> DNA
 <213> Promotor ATC 085 de Nicotiana tabacum

ES 2 373 318 T3

<400> 7

tattaaagtg tccaataagt gcaagcctat tagttgaaat gtcaaaagtt ggtatcaaat	60
ttagggagtt atttatgctc ccgtttgcc agatttcggt tactatTTTT taagtttaat	120
ttgtTTTTTC aagtttcaag atttatgaca gtttttgagt gatatTTTTC catttactca	180
caaaacttta actTTTTTT tcaaataaaa tacatgtaca aatacaattt taattttcaa	240
atattatTTT ccaacataac ttcaaaaact cTTTTTcaa gtgttaatta aatatatggt	300
taactatgta ttcatttggt cttatgTTTT atcatgcatt ttcataagtg aatttcatac	360
tcactttcat gcaaacactt atactataaa agatatatta ttcctatata caacatgttt	420
atacgagatc attacattgt aagtgtacct tattattggt aaatTTTgga cttcaccaaa	480
aataattaag gaagtaatga tatgcaataa ataaataaat aaataaagtt aaaaatatta	540
tacttgactc aagacacatt atggggaaca cgtttctttc acgatccatc ttatcctttc	600
atcgatagaa gttagcaata gcattattct catattagcg gaattatggt tgtttgtctc	660
tttactatgg tcatagactc tcgagataat tcatatttca agactagtta ttttttagag	720
ctgaattaag tttaaaattt atttcttcgt tcgagcgtgc aaggggttta agcaggggct	780
gaggaagagc attagtcgcy ggttcgaacg aactcagctt aattcttata tttgtattag	840
aaaatacata aaatatgtat aaatatctaa ttacgaacat aataactaag ataaactatg	900
agttcctgat aaattgaaaa tctataaaca ccaaatccta gctagtctct ggtgttaagg	960
tgtcccatat ttgttgaggg atgggttggt atatggtctt gggcaagagt tggagtcact	1020
cggccaccaa ttatctatat ttggccatt gtttccatt aaaacaattc ctccaagtt	1080
gatctagtta ctgttctcat ttataatcca agttgatact atttgtcatg tggctggcta	1140
tacgacattg tttttgtttt ttttgaaaa tttctaggaa accgtagccg cttccattcg	1200
ggtgtgcatt tgataactaa ctcaactgtc aattgctcgc aaatcacaca gaagatataa	1260
atcgcattag gcacgcccgg tacgactagg gggagactac tggtgaggag aatcgatctc	1320
agatctcca tatgataaac cactcaccca actaactcaa tcaaccccgg cggcgggtgt	1380
gacttcacag taagtctttg tgaaggcttt cTTTTgtca ttttctccct tgtttagaac	1440
aagttgttct tgcacgagaa actattaagt tatataaata ggggagaaac attgttttcc	1500
tttttacagc aaaaaattgg aactcfaat agctcatcaa a	1541

REIVINDICACIONES

- 5 1ª. Un método para modificar la morfología en una planta, que comprende introducir en una planta al menos un gen quimérico que comprende una secuencia promotora asociada operativamente con una secuencia de ácido nucleico, siendo la secuencia promotora operativa para dirigir la expresión en células específicas de la planta, y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos un producto génico capaz de alterar el metabolismo de las células específicas y/o próximas, o de causar la muerte de las mismas, en donde la secuencia promotora es operativa para dirigir la expresión de manera sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, y en donde la secuencia promotora comprende la secuencia que se muestra en SEC ID N° 1 o SEC ID N° 7, o una parte funcional de la misma que es operativa para dirigir la expresión de manera sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, o una secuencia que tiene al menos un 65% de identidad con la secuencia mostrada en la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 7, que es operativa para dirigir la expresión de manera sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, en donde el porcentaje de identidad se determina sobre la totalidad de la longitud de las secuencias a comparar, y en donde expresión sustancialmente específica significa que el promotor dirige la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos asociada con dicho promotor predominantemente en yemas laterales y/o brotes laterales, de forma tal que menos del 50% del nivel de expresión global de dicha secuencia de ácidos nucleicos ocurre en cualquier otro tejido o célula de la planta respectiva.
- 10 2ª. Un método según la reivindicación 1ª, en el que el producto génico de la secuencia de ácidos nucleicos es una molécula citotóxica.
- 15 3ª. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el producto génico de la secuencia de ácidos nucleicos es una proteína desactivadora del ribosoma (RIP) o una variante o una parte funcional de la misma.
- 20 4ª. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1ª o 2ª, en el que el producto génico de la secuencia de ácidos nucleicos es una proteína antiviral de la hierba carmesí o una variante o una parte funcional de la misma.
- 25 5ª. Un método según la reivindicación 4ª, en el que la proteína antiviral de la hierba carmesí (PAP) es proteína antiviral de la hierba carmesí S (PAP-S) o una variante o parte funcional de la misma.
- 6ª. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se modifica la excrecencia de una yema lateral y/o un brote lateral.
- 30 7ª. Un método según la reivindicación 6ª, en el que la excrecencia de una yema lateral y/o un brote lateral se reduce, se evita o se retrasa.
- 8ª. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 2ª a 7ª, en el que la excrecencia de una yema lateral y/o un brote lateral se modifica interfiriendo el metabolismo o causando la muerte de células implicadas en el desarrollo de la yema lateral.
- 35 9ª. Un ácido nucleico que comprende una secuencia promotora, siendo dicha secuencia promotora la secuencia que se muestra como SEC ID N° 1 o SEC ID N° 7, o una parte de las mismas que es capaz de regular la expresión de un gen en una yema lateral y/o un brote lateral, o una secuencia que tiene al menos un 65% de identidad con SEC ID N° 1 o SEC ID N° 7, y que es capaz de regular la expresión de un gen en una yema lateral y/o un brote lateral, en donde el porcentaje de identidad se determina sobre la longitud completa de las secuencias a comparar.
- 40 10ª. Un ácido nucleico según la reivindicación 9ª, en el que dicha secuencia tiene al menos un 70%, preferentemente al menos un 85%, más preferentemente al menos un 90%, más preferentemente al menos un 97% de identidad con SEC ID N° 1 o SEC ID N° 7.
- 11ª. Un ácido nucleico según la reivindicación 9ª o la reivindicación 10ª, en el que el ácido nucleico comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula citotóxica.
- 45 12ª. Un ácido nucleico según la reivindicación 11ª, en el que la secuencia de ácido nucleico codifica una proteína desactivadora del ribosoma (RIP) o una variante citotóxica o parte funcional citotóxica de la misma.
- 13ª. Un ácido nucleico según la reivindicación 11ª, en el que la secuencia de ácido nucleico codifica una proteína antiviral de la hierba carmesí o una variante citotóxica o parte funcional citotóxica de la misma.
- 14ª. Un ácido nucleico según la reivindicación 13ª, en el que la proteína antiviral de la hierba carmesí (PAP) es proteína S antiviral de la hierba carmesí o una variante citotóxica o parte funcional de la misma.

- 5 15^a. Un gen quimérico que comprende una secuencia promotora asociada operativamente con una secuencia de ácido nucleico, comprendiendo la secuencia promotora la secuencia que se muestra en SEC ID N° 1, SEC ID N° 7, o parte de las mismas que es capaz de regular la expresión de un gen en una yema lateral y/o un brote lateral, o una secuencia que tiene al menos un 65% de identidad con SEC ID N° 1 o SEC ID N° 7, y que es capaz de regular la expresión de un gen en una yema lateral y/o un brote lateral, en donde el porcentaje de identidad se determina sobre la longitud completa de las secuencias a comparar.
- 16^a. Un gen quimérico según la reivindicación 15^a, en el que la secuencia tiene al menos un 70%, preferentemente al menos un 85%, preferentemente al menos un 90%, preferentemente al menos un 97% de identidad con SEC ID N° 1 o SEC ID N° 7.
- 10 17^a. Un gen quimérico según la reivindicación 15^a o la reivindicación 16^a, en el que el ácido nucleico comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una molécula citotóxica.
- 18^a. Un gen quimérico según la reivindicación 17^a, en el que la secuencia de ácidos nucleicos codifica una proteína desactivadora del ribosoma (RIP) o una variante citotóxica o parte funcional citotóxica de la misma.
- 15 19^a. Un gen quimérico según la reivindicación 17^a, en el que la secuencia de ácidos nucleicos codifica una proteína antiviral de la hierba carmesí o una variante citotóxica o parte funcional citotóxica de la misma.
- 20^a. Un gen quimérico según la reivindicación 19^a, en el que la proteína antiviral de la hierba carmesí (PAP) es proteína antiviral de la hierba carmesí S (PAP-S) o una variante citotóxica o parte funcional citotóxica de la misma.
- 21^a. Un DNA recombinante que comprende DNA vector y un ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 9^a a 14^a, o un gen quimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 15^a a 20^a.
- 20 22^a. Una planta producida según el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 8^a.
- 23^a. Una planta que comprende el ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 11^a a 14^a, o un gen quimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 17^a a 20^a.
- 24^a. Una planta según las reivindicaciones 22^a o 23^a, en donde la planta es de la familia de las solanáceas.
- 25^a. Una planta según la reivindicación 24^a, en donde la planta es de la subfamilia de las cestroideas.
- 25 26^a. Una planta según la reivindicación 25^a, en donde dicha planta es del género *Nicotiana*.
- 27^a. Una planta según la reivindicación 25^a, en donde dicha planta es *Nicotiana tabacum*.
- 28^a. Una planta según la reivindicación 22^a o la reivindicación 23^a, en donde dicha planta se elige entre el grupo consistente en tomate, pepino, *Petunia*, *Dianthus*, *Picea*, *Eucaliptus*, *Pinus*, *Euacalyptus*, *Populus*, patata, tabaco, algodón, lechuga, berenjena, melón, calabaza, guisante, canola, soja, remolacha azucarera, girasol, trigo, cebada, centeno, arroz y maíz.
- 30 29^a. Una célula vegetal que comprende el ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 11^a a 14^a, o un gen quimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 17^a a 20^a, o un DNA recombinante según la reivindicación 21^a.
- 35 30^a. Un método para regular la expresión de un gen en una planta, comprendiendo el método introducir en una planta un ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 9^a a 14^a asociado operativamente con una secuencia de codificación de un gen cuya expresión se ha de regular.
- 31^a. Un método para modificar el metabolismo dentro de una célula de una planta transgénica, comprendiendo el método introducir en una planta un ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 9^a a 14^a o un gen quimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 15^a a 20^a.
- 40 32^a. El uso de un ácido nucleico que comprende una secuencia promotora que tiene una secuencia como se muestra en SEC ID N° 1 o SEC ID N° 7, o una parte funcional de la misma que es operativa para dirigir la expresión de manera sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, o una secuencia que tiene al menos un 65% de identidad con la secuencia mostrada en la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 7, que es operativa para dirigir la expresión de manera sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, para modificar la morfología de una planta, en donde el porcentaje de identidad se determina sobre la totalidad de la longitud de las secuencias a comparar, y en donde expresión sustancialmente específica significa que el promotor dirige la expresión de la
- 45

secuencia de ácidos nucleicos asociada con dicho promotor predominantemente en yemas laterales y/o brotes laterales, de forma tal que menos del 50% del nivel de expresión global de dicha secuencia de ácidos nucleicos ocurre en cualquier otro tejido o célula de la planta respectiva.

5 33ª. El uso de un gen quimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 15ª a 20ª, o de un ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 9ª a 14ª, para transformar una planta para modificar la morfología de la planta.

10 34ª. El uso de un ácido nucleico que comprende una secuencia promotora que tiene una secuencia como se muestra en SEC ID N° 1 o SEC ID N° 7, o una parte de la misma que es operativa para dirigir la expresión de manera sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, o una secuencia que tiene al menos un 65% de identidad con la secuencia mostrada en la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 7, que es operativa para dirigir la expresión de manera sustancialmente específica en una yema lateral y/o un brote lateral, para alterar el metabolismo en una planta, en donde el porcentaje de identidad se determina sobre la totalidad de la longitud de las secuencias a comparar, y en donde expresión sustancialmente específica significa que el promotor dirige la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos asociada con dicho promotor predominantemente en yemas laterales y/o brotes laterales, de forma tal que menos del 50% del nivel de expresión global de dicha secuencia de ácidos nucleicos ocurre en cualquier otro tejido o célula de la planta respectiva.

15 35ª. Un gen quimérico que se puede obtener a partir del clon pBNP 085-0501-001 (NCIMB 41343).

FIGURA 1

```

SEQ ID No. 1      1      -----GCTATCAAGCTTTTATT 16
                               : : : : :
sar8.2b promoter 661      cttgtcttgtagtctattagcattgaggtagcatgtatccaagaacaataaagtaaatatt 720

SEQ ID No. 1      17      AAAGTGTCCAATAAGTGCAAGCCTATTAGTTGAAATGTCAAAAGTTGGTATCAAAATTAG 76
                               : : : : :
sar8.2b promoter 721      gaagtat-c--taagagcaagcctattagttgaaatgacaaaaggtaggtataaaaaatttg 777

SEQ ID No. 1      77      GGAGTTATTATTATGCTCCCGTTTGGCCA--GATTTCCGGTTACTATTTTTTAAGTTTAATTT 134
                               : : : : :
sar8.2b promoter 778      ggagttattttatgctcccgtttggccattgatttttggctactatttttccaag-ttaaaatt 836

SEQ ID No. 1      135      GTTTTTTCAAGTT-TC---AA-GATTTATGACAGTTTTTGGAGTGATATTTTCCATTTA 188
                               : : : : :
sar8.2b promoter 837      cttttttcaacttcccacaaaattgatttatgacattttttggataaaaagtttt-tttcca 895

SEQ ID No. 1      189      CTCACAAAACITTTTAACTTTTTTTTTTCAAAATAAAATACATGTACAATAACAATTTTAATT 248
                               : : : : :
sar8.2b promoter 896      cctacaaaa-tttaacttctttttttccaataaaaaatgcatgtcccacaaacaacttccaact 954

SEQ ID No. 1      249      TTCAAATATTATTTTCCAACATAAAGTTCATAAACTCTTTTTTCAAGTGTAAATTAATAT 308
                               : : : : :
sar8.2b promoter 955      ttcaaata-tattttttaacataacttcaaaaactctttttttccaagtttttaattatacat 1013
    
```

```

SEQ ID No. 1      309  ATGTTTAACTATGTATTCATTTGGCTTAAGTTTATCATGCAATTTTCATAAGTGAATTT 368
Sar8.2b promoter 1014 atgttcaactatgtattcatttcttagttatg-tttatcacgca-tttcataagtgaattt 1071
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

SEQ ID No. 1      369  CATACTCATCTTCATGCAAAACACTTATATACTATAAAAGATAATATTTCCCTATATACAACA 428
Sar8.2b promoter 1072 catacttattcttcatgcaaacacatatatactataaaaag--ata-ta-t--tat-t-c--c- 1120
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

SEQ ID No. 1      429  TGTTTATACGAGATCATTACATTTGTAAGTGTACCTTATTATTGGTAAATTTTGGACTTCA 488
Sar8.2b promoter 1120 -----t-----a--aatac-----a-----a-----a-----t-g----- 1133
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

SEQ ID No. 1      489  CCAAAAATAATTAAGGAAGTAATGATATGCAATAATAATAATAATAATAAAGTTAAAAA 548
Sar8.2b promoter 1133 -----tga-t-----acg--a-g--at-c-----a-----a-----a----- 1145
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

SEQ ID No. 1      549  TATTATACTTGACTCAAGACACACATTAATGGGGAACACGWTTCCTTTCACGATCCATCTTATC 608
Sar8.2b promoter 1145 -----a--t-----t-----aca-t-t---g--caa-----ct-g---acctta-- 1166
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

SEQ ID No. 1      609  CTTTCATCGATAGAAAGTTAGCAATAGCAATTAATTCATATATTAGCGCAATTAATGGTTGTTT 668
Sar8.2b promoter 1166 ---t--t--at-----ttt-----ta--a--a---t--t--tt---gg-----a----- 1184
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
    
```

```

SEQ ID No. 1      669  GTCCTCTTATATGGTCAATAGACTCTCGAGATAAATTCATATTTCAAGACTAGTTATTTTT 728
Sar8.2b promoter 1184  ---c-----t--tc---a--c-c-a-a--aa---atagtt---g---gg-----tttt 1208

SEQ ID No. 1      729  AGAGCTGAATTAAGTTAAATTTATTTCTTCGTTTCGAGCGTCAAGGGTGTAAAGCAGG 788
Sar8.2b promoter 1209  t----t-aatcga-tttg--atttaatttttcggttt--ggtgc---ggttttccgattt 1255

SEQ ID No. 1      789  GGCTGAGGAAGAGCATTAGTCGGGGTTCGAAACGAACACTCAGCTTAATTCTTATATTTGTA 848
Sar8.2b promoter 1256  ggttt--gaacacccta---tct-ggt-g---gta---ag-gtg--tcccacatttgt- 1298

SEQ ID No. 1      849  TTAGAAAATACATAAAAATATGTATAAAATCTTAATTCGAAACATAATAACTAAGATAAAC 908
Sar8.2b promoter 1299  tgaggg-----atgggtggtactatggtctt--gg--gcaa-gagttggagt--c 1341

SEQ ID No. 1      909  TATGAGTTCCTGATAAAATTGAAAATCTATAAACACCAAATCCTAGCTAGTCTCTGGTGT 968
Sar8.2b promoter 1342  act-cgg--c-caccaatt---a--tct-----a-cg---tcaa--gag--t-tggagtc 1378

SEQ ID No. 1      969  AAGGTGTCCACATTGTGAGGGATGGGTTGTTATATGGTCTTGGGCAAGAGTTGGAGT 1028
Sar8.2b promoter 1379  act-cg--ccac-----caattatctacgtcaagagtttggagt 1413

```

```

SEQ ID No. 1    1029 CACTCGGCCACCAATAATCTATAATTTGGCCCATTTCCCAATTTAAACAATTCCTCCCA 1088
Sar8.2b promoter   : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
1414 cactcggccaccaattgtctacatttggccatttggccattgtttcccattaaacaa-t--t--c- 1467

SEQ ID No. 1    1089 AGTTGATCTAGTACTGTTCTCATTTTATAATCCAAAGTTGATACTAATTGTTCATGTGGCTG 1148
Sar8.2b promoter   : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
1467 ----gcc-----taa-g-----taacaatccaaattgatacaatttgtcaagtggcca 1512

SEQ ID No. 1    1149 GCTATACGACATGTGTTTGTGTTTTT-TTGGAAAATTTCTAGGAAA-CCGTAGCCGCTT 1206
Sar8.2b promoter   : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
1513 tgta-acgacattgttttttcttcttcttggaagtctcactgataatttagctcacaattacacaaga 1571

SEQ ID No. 1    1207 CCATTGGGTGTCATTTGATAAATACTCCTGCAATTGCTCGCAATCACACAGAA 1266
Sar8.2b promoter   : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
1572 cccttcgggtgcgcacgggtaattcgcctcactgtatatttagctcacaattacacaaga 1631

SEQ ID No. 1    1267 GATATAAATCGCATTAGGCACGCCCG--GT-ACG-A--C-TA-GGGGAGACTACTGGTG 1318
Sar8.2b promoter   : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
1632 gatataaatcgcattaggtacacccgatatgacgaactctgactgaggagactgctagtg 1691

SEQ ID No. 1    1319 AGGAGAATCGATCTCAGATCTCCCATATGATAAACCCTCACCCAACTAACTCAATCAAC 1378
Sar8.2b promoter   : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
1692 agg-gaatccatctcagggtttcttatgtgggaatcactcgcaccaactaactcagtccta- 1749

SEQ ID No. 1    1379 CCCGGCGGGYGTGACTTCACAGTAAGTC-TTTGTGAAGGCTTT-CTTTTGTCA-TT 1435
Sar8.2b promoter   : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
1749 -cc-ttggcgtgcgtgactttaaagttaagtcttttgtgaaggctttcccttttttgcattt 1807

```

```

SEQ ID No. 1      1436 TTCCTCCCTTGTATTAGAACAAAGTTTGTTCCTTCACGAGAAACTATTAAAGTYATATAAATAGG 1495
                 : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
sar8.2b promoter 1808 ttctcccttggttcagagcaagttg---tt-----c-----tataaatagg 1844

SEQ ID No. 1      1496 GGAGARACATGTGTTTCCTTTTACAGCAAAAATTTGRAACTCCAATAGCTCA---TC 1551
                 : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
sar8.2b promoter 1845 ggagaaacattatttcccttttcacagcaaaaaatttaaaactcgatatagctcatcttcc 1904

SEQ ID No. 1      1552 AAAGGATCCTACTCG 1566
                 : :
sar8.2b promoter 1905 aaa----- 1907

```

FIGURA 2

AT4g29190	TATGCATATATATAAATCGCTTTTCAATCAAAATTGTGTGCCCTTGTCTTTTATAAAAAGAA	14396320
AT4g29190	TACAAATTCAGCCCTCGTAGGAGCTGAGCCTACGACATTTGAAGATATTTTTTGGTCCCGTACGTA	14396260
AT4g29190	TTACTATGGTTTTAATAGGTTAAAGTGACTATGAAAACGGAAGACATTTGTGTCTGTAATCGTGT	14396200
ATC023 promoter	<u>CGAAGACATTTGTGTCTGTAATCGTGT</u>	25
AT4g29190	GTAATTTCACATACTTCCAAAATAAAGAAAATAATAATTGCTTCTTGAATCGGATGAGCT	14396140
ATC023 promoter	GTAATTTCACATACTTCCAAAATAAAGAAAATAATAATTGCTTCTTGAATCGGATGAGCT	85
AT4g29190	ACACGTTTTTAGATAATTTCGCAACCTGTCTTCTTTCGTTAGATCTAGGAAAACATTTGATTTA	14396080
ATC023 promoter	ACACGTTTTTAGATAATTTCGCAACCTGTCTTCTTCTTTCGTTAGATCTAGGAAAACATTTGATTTA	145
AT4g29190	TAGAAAATATGTTTTCTATATATTTCTCTATATTTCAATTCACACATGTAAATAATCGCCACCCT	14396020
ATC023 promoter	TAGAAAATATGTTTTCTATATATTTCTCTATATTTCAATTCACACATGTAAATAATCGCCACCCT	205
AT4g29190	CAAAATATATGACCATGTCAAATTTGTTTGAATTGAACTATAAGTTTGATATAACAATTTGTCAA	14395960
ATC023 promoter	CAAAATATATGACCATGTCAAATTTGTTTGAATTGAACTATAAGTTTGATATAACAATTTGTCAA	265
AT4g29190	ATTTATAAAAATTTAAAAGAGAAAATACATTTATAATGAAAAGAAAAGAAAAGTGCAAAAAA	14395900
ATC023 promoter	ATTTATAAAAATTTAAAAGAGAAAATAATGCAATTTATAATGAAAAGAAAAGAAAAGTGCAAAAAA	325

AT4g29190	GAAAGAAACAAGGATAAATGAGAGGTCGATTTTGTGTTTAGAGGATATGGAAATTGCTTCCA	14395840
ATC023 promoter	GAAAGAAACAAGGATAAATGAGAGGTCGATTTTGTGTTTAGAGGATATGGAAATTGCTTCCA	385
AT4g29190	AAATTAGCAAAAGAAACAATAAATGTTTTGGCCCTATAAAGTCTTTAAACGTTATTCCTAAA	14395780
ATC023 promoter	AAATTAGCAAAAGAAACAATAAATGTTTTGGCCCTATAAAGTCTTTAAACGTTATTCCTAAA	445
AT4g29190	TCTGTTCCAAACATGTCTCTTCAATCCGACACATTTCTTTATCCCTCTCTCTAAATTTTTTTTT	14395720
ATC023 promoter	TCTGTTCCAAACATGTCTCTTCAATCCGACACATTTCTTTATCCCTCTCTCTAAATTTTTTTTT	505
AT4g29190	GCTAAAATTAAATCGAAAATTGAAAACGAAATTTTGGAGAACTATGTAAAGATAATTTTTTTT	14395660
ATC023 promoter	GCTAAAATTAAATCGAAAATTGAAAACGAAATTTTGGAGAACTATGTAAAGATAATTTTTTTT	565
AT4g29190	CTTCCAAATAACAACAATTACCACAACTTTTTTGTCTGTTTTTGTACTTAAATAAGTGGTA	14395600
ATC023 promoter	CTTCCAAATAACAACAATTACCACAACTTTTTTGTCTGTTTTTGTACTTAAATAAGTGGTA	625
AT4g29190	CAATGAAATTATAAGTGATACAAATAAAATCAATTTGACTTAGATAATAATAATTCAAAATTT	14395540
ATC023	CAATGAAATTATAAGTGATACAAATAAAATCAATTTGACTTAGATAATAATAATTCAAAATTT	685
AT4g29190	AAAAATGACAAACAATAACAATAAAATTATGAGAAATCTTCTCGAAATCATATCAAAAAATTAAT	14395480
ATC023	AAAAATGACAAACAATAACAATAAAATTATGAGAAATCTTCTCGAAATCATATCAAAAAATTAAT	745
AT4g29190	TTTTTTTTTTTCGATAACAATAAATTAATAACAACCTTTTTTGTCTGTAAGATAATTTTTTTTCC	14395420
ATC023	TTTTTTTTTTTCGATAACAATAAATTAATAACAACCTTTTTTGTCTGTAAGATAATTTTTTTTCC	805

AT4g29190	TCATAACAATAAATAATTAATAAATAATTTTCGATCGTTTTGTTGTTAGATAAAATGATACAAT	14395360
ATC023 promoter	TCATAACAATAAATAATTAATAAATAATTTTCGATCGTTTTGTTGTTAGATAAAATGATACAAT	865
AT4g29190	GAATTCATTTCAACAACTTAGATACAACAATAATTTGGATCAAAAATGAAAATTAATAACAA	14395300
ATC023 promoter	GAATTCATTTCAACAACTTAGATACAACAATAATTTGGATCAAAAATGAAAATTAATAACAA	925
AT4g29190	AGTATCATATATCTTTTGTATCATATCAAAAAACAAGATCATTTTTTCCGATAACAATAAAT	14395240
ATC023 promoter	AGTATCATATATCTTTTGTATCATATCAAAAAACAAGATCATTTTTTCCGATAACAATAAAT	985
AT4g29190	TATTAACAACCTTTTGTCTGTTTGTGTTAGATAAAGTGAAAACAATAAAATCATTTTGAC	14395180
ATC023 promoter	TATTAACAACCTTTTGTCTGTTTGTGTTAGATAAAGTGAAAACAATAAAATCATTTTGAC	1045
AT4g29190	GAATTAGATATAAACAATAATTAAGATCAACAATGAACAATAAGTAAACAACAATAATATCAGAT	14395120
ATC023 promoter	GAATTAGATATAAACAATAATTAAGATCAACAATGAACAATAAGTAAACAACAATAATATCAGAT	1105
AT4g29190	ATTTTTGGTATTAATAAATAAGATTAATTTTCCGATAAATAACAATTAATAACAATTTTTTT	14395060
ATC023 promoter	ATTTTTGGTATTAATAAATAAGATTAATTTTCCGATAAATAACAATTAATAACAATTTTTTT	1165
AT4g29190	TATAGTTTTGATGCTAAATAAAGTGAATAATAATGAATAATTTGTTTTGACCGATTTAGATACAATA	14395000
ATC023 promoter	TATAGTTTTGATGCTAAATAAAGTGAATAATAATGAATAATTTGTTTTGACCGATTTAGATACAATA	1225
AT4g29190	ATATTAGGTTCAAAAATGACAAATACATAAACAACAATAATTAATCAGATCATATCAAAAAATAAAA	14394940
ATC023 promoter	ATATTAGGTTCAAAAATGACAAATACATAAACAACAATAATTAATCAGATCATATCAAAAAATAAAA	1285

AT4g29190	TTATTTTTTTTCGGATAA CAGCAAAATTAATAAACAACTTTTTTTTTTTTATTGCTAGATAAAATGA	14394880
ATC023 promoter	TTATTTTTTTTCGATAAACAGCAAAATTAATAAACAACTTTTTTTTTTTTATTGCTAGATAAAATGA	1345
AT4g29190	TACAAATAACCTTCATTCGGATATATATAATAATAATAATCAAAAATCAAAATGACAATAATAAACAA	14394820
ATC023 promoter	TACAAATAACCTTCATTCGGATATATATAATAATAATAATCAAAAATCAAAAATGACAATAATAAACAA	1405
AT4g29190	TAAAATTATTTAATTGAATCATATAAAAAATAAGAGATACATGCACCGAATAATTAACAA	14394760
ATC023 promoter	TAAAATTATTTAATTGAATCATATAAAAAATAAGAGATACATGCACCGAATAATTAACAA	1465
AT4g29190	ACAAAATTAAGTAATAAGGCAATGGATAGACTAATAATAATGAAAACATAAACTGTGGATATATC	14394700
ATC023 promoter	ACAAAATTAAGTAATAAGGCAATGGATAGACTAATAATAATAATGAAAACATAAACTGTGGATATATC	1525
AT4g29190	TATTTTGTCTCGTCTTTCCGGAGAACTTAAACTTCCGACCGACTTCAAACGTTATCTAATAATCTCT	14394640
ATC023 promoter	TATTTTGTCTCGTCTTTCCGGAGAACTTAAACTTCCGACCGACTTCAAACGTTATCTAATAATCTCT	1585
AT4g29190	AAAGTAACCTTTACGGCTCACAGTTCGGTTACTTTTAAACTTCGTCAAAGTCAATTTTGATATAA	14394580
ATC023 promoter	AAAGTAACCTTTACGGCTCACAGTTCGGTTACTTTTAAACTTCGTCAAAGTCAATTTTGATATAA	1645
AT4g29190	CGTCCACATCCAGAAACGGTCCACGGTCTATCTCGTGGATAAAGTCTCCAGCCGCTGT	14394520
ATC023 promoter	CGTCCACATCCAGAAACGGTCCACGGTCTATCTCGTGGATAAAGTCTCCAGCCGCTGT	1705
AT4g29190	TTCACATGCTTTATCTCACAGCTTTGTTTACCGATAAACCTAGTCCCTATGCTAATAATCTTTTAAAC	14394460
ATC023 promoter	TTCACATGCTTTATCTCACAGCTTTGTTTACCGATAAACCTAGTCCCTATGCTAATAATCTTTTAAAC	1765

AT4g29190	CATAGTTAAATAATTTTAA	14394400
ATC023 promoter	CATAGTTAAATAATTTTAA	1825
AT4g29190	CCGGTGTATTACAAACAA	14394340
ATC023 promoter	CCGGTGTATTACAAACAA	1885
AT4g29190	gatttattgttcaccggag	14394280
ATC023 promoter	<u>GATTTATTGTTCACCGGAT</u>	1904
AT4g29190	CCCAC TGTGAAAATACCT	14394220
AT4g29190	TC TCCGGTGAATGAAAT	14394160
AT4g29190	TATTTGCCGTCTAACGAA	14394100
AT4g29190	CCAA TCGATGCTTACTCA	14394040
AT4g29190	GCTCGTGGCCGGAGTCAT	14393980
AT4g29190	CGCCGGAGAGATCCGAGA	14393920
AT4g29190	GGTGGCTGCAAGAAAGGT	14393860

AT4g29190	CATCCAGCTCGTTACCGTACTCAGCCGTTAAAGACGGTGGTAACTGTCTCCGGAAAATT	14393800
AT4g29190	TGTTTCTTTGCTCATTTACCCGGATCAGCTTAGGTTTTTACATACTCGGAGCCCTGACAGA	14393740
AT4g29190	GTTGATTTCTTTTGACGTTTCGTCTCCGATTCGTGCTAGAGCATTTTCAGCTGTCGATTTTCT	14393680
AT4g29190	CCGGTTTCTGGTTCCGCCACCAGATGAGTCCAAGAGCTGACTCGGAGTCTTCTCCGATGACT	14393620
AT4g29190	CAGTCACTGAGTCGATCTCTCGGGTCTTGTTCGATAAACGACGTCGTTCTTCCGTTTAGG	14393560
AT4g29190	AATTTACAGTTTAAATTCGGTAAATAATCATTTCTCTGTAACAATCTTTAATTCGGATTCGGG	14393500
AT4g29190	TGCCCCGTGGATCGAATCTTGGTCTCTGGTTTCAGTCTCTGCCTACAAACCCGACCCGA	14393440
AT4g29190	CCAGGGAACTCGGATATTTGGGAGTATGGTTTGGAGGAAGAACCCCGTAAATGGAGCGTGTCTC	14393380
AT4g29190	GTTGAGTCGGGTCGTGAGCTACGAGAAAGATGCGCGGAGAAACTGCCACAAGGAGAAATTGC	14393320
AT4g29190	ATGGATCGAGTTGCCCAGGATCCGGATCAGAAATTTGGGTGAGGCTCCTGATGTCGGGTGG	14393260
AT4g29190	GTAATCGACCTGCTCATG TAA agaaaaaaaaatctgaccgtatttcgaagtctcattggctt	14393200
AT4g29190	ttttggatatctccaagaaaaggaaggatcttagtgttcatattattttttt	14393140

AT4g29190	actaatctcgtatcttttctctgctaataagaataaattatggatttttggggcctgattttt	14393080
AT4g29190	ctaagatgacggttgatagatgtgccttagggttttaaattatgaaatagtagtataata	14393020
AT4g29190	atcgtgtttataagactataatgttagattgtaaccacttggtaactaatctatgaatga	14392960
AT4g29190	atgcaaatattatct	14392944

Figura 3

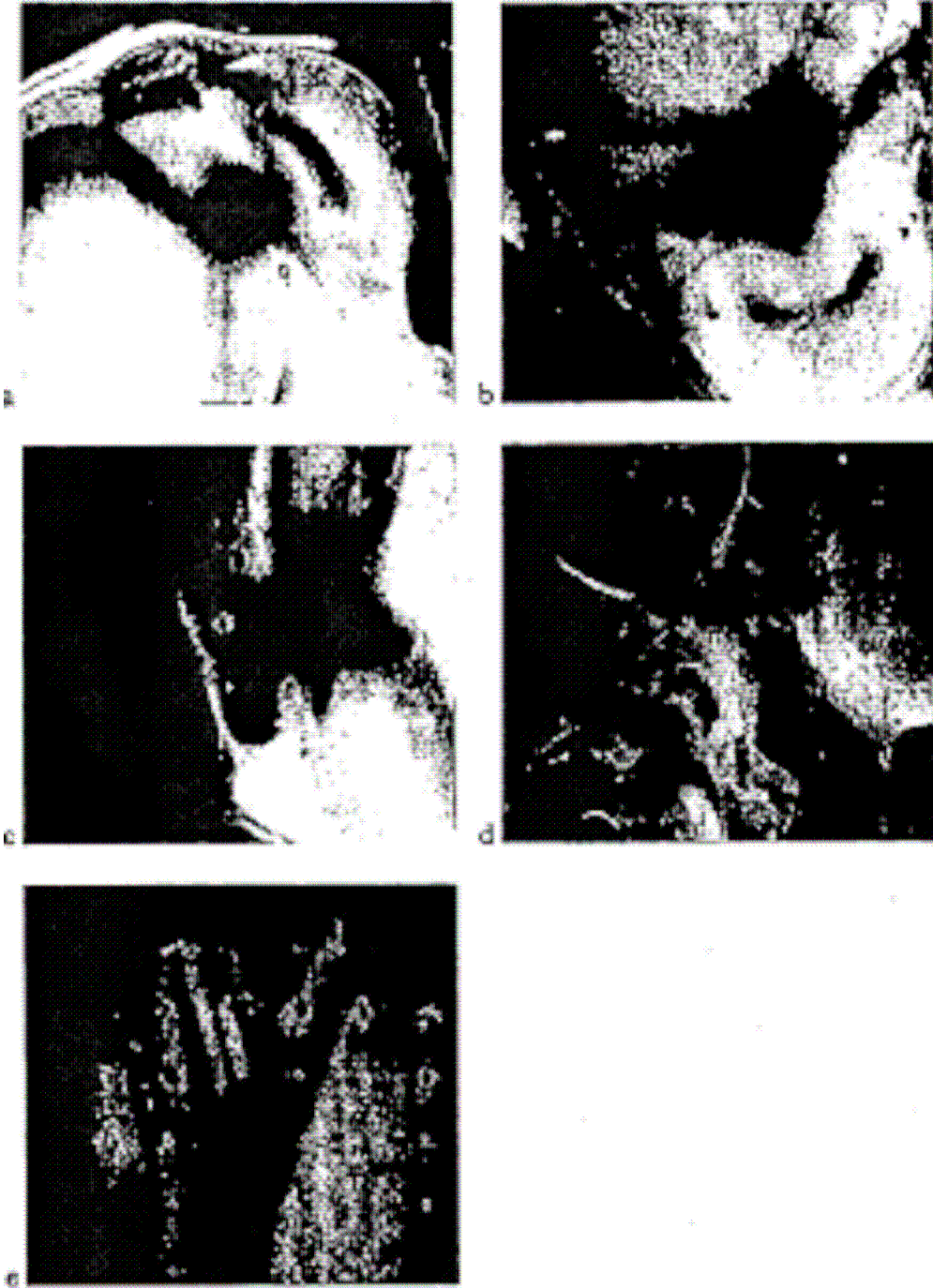


FIGURA 4a

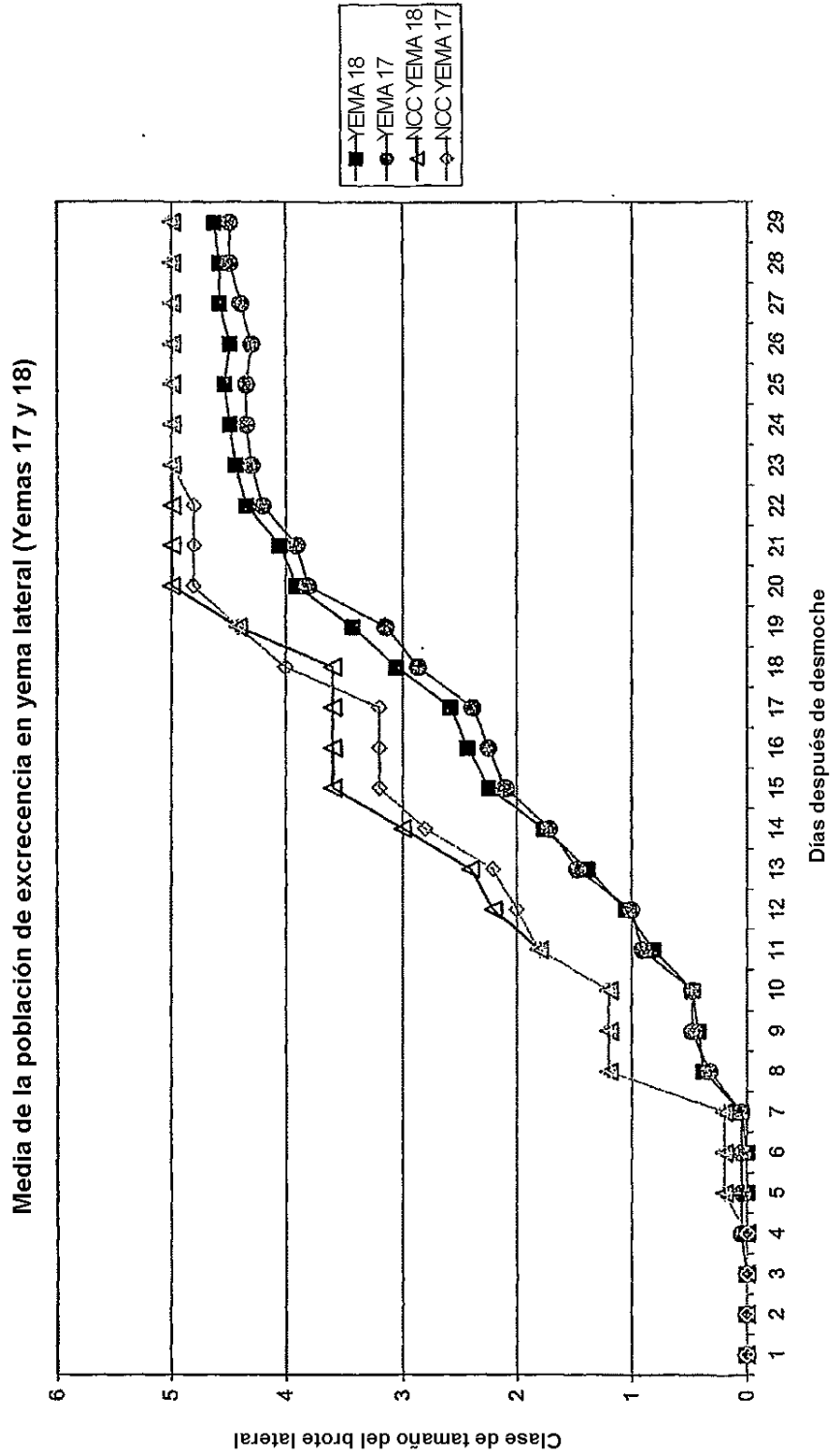


FIGURA 4b

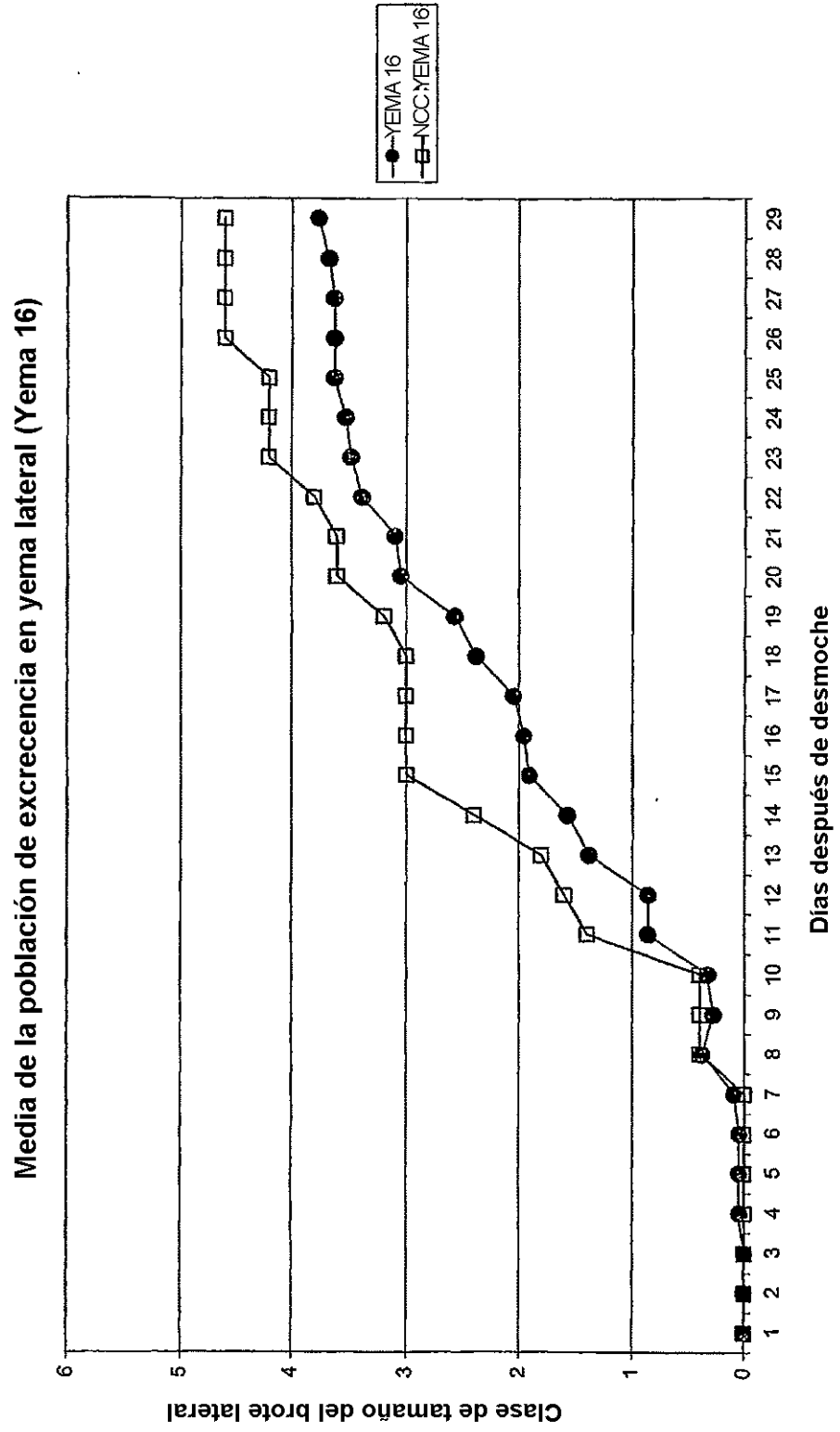
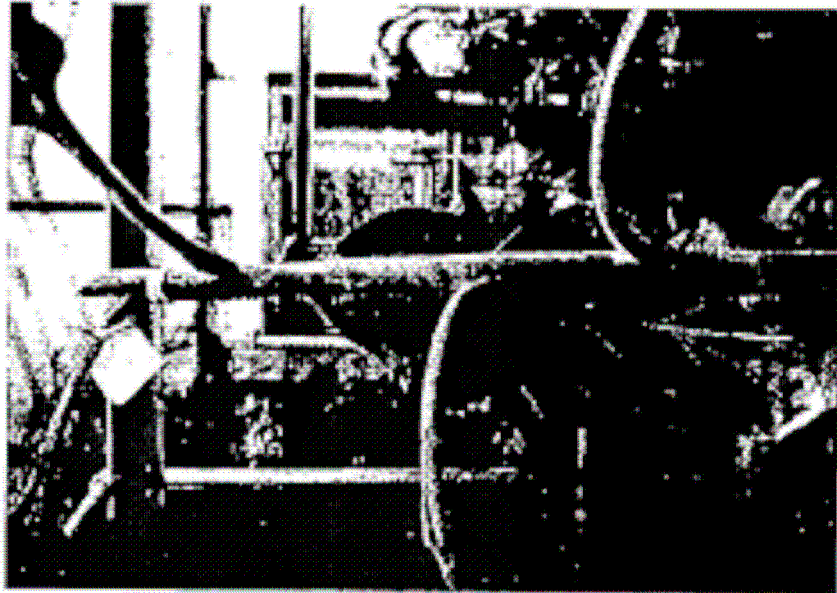


Figura 5



Ⓒ



Ⓒ

Figura 6

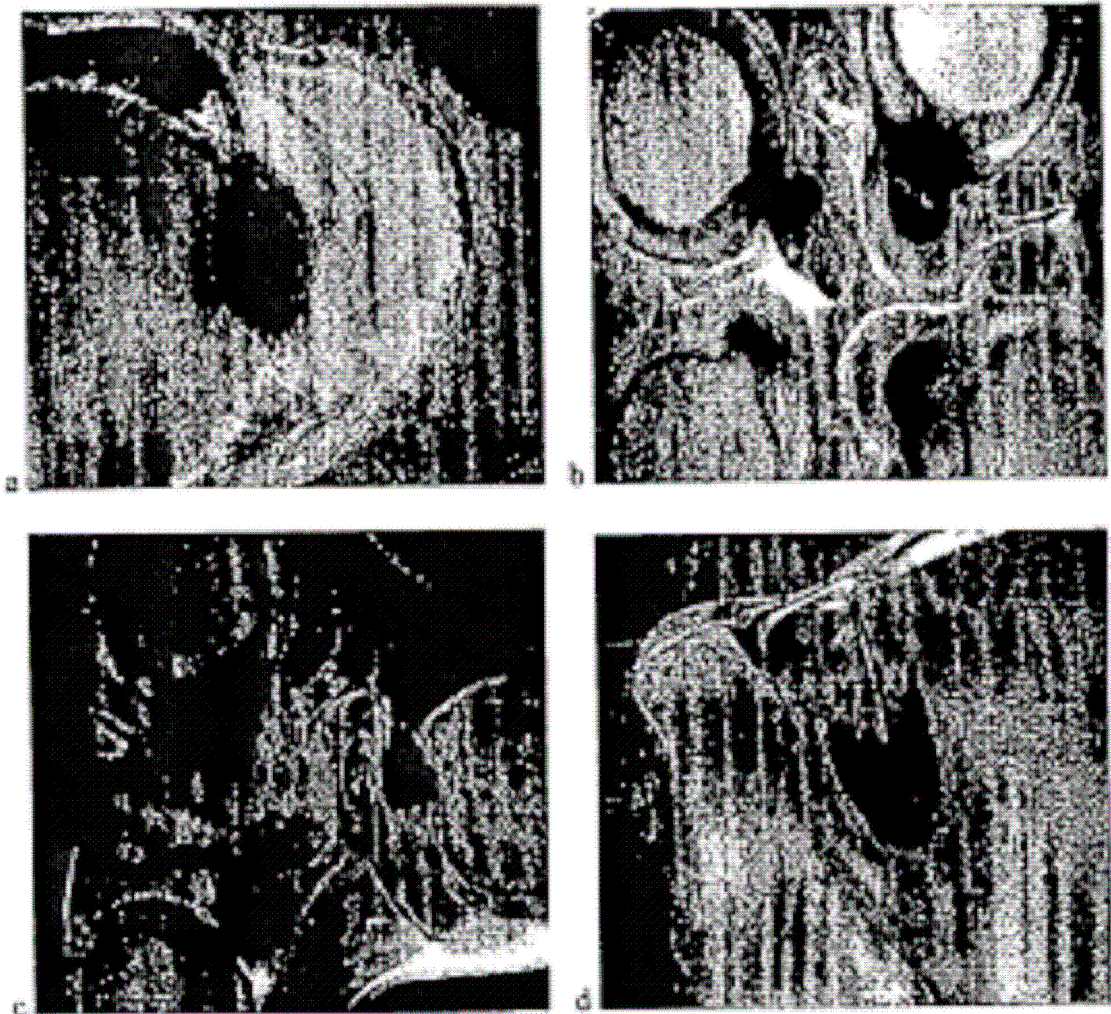


Figura 7

