

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 826**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **99957304 .1**
- 96 Fecha de presentación: **12.11.1999**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1131450**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.09.2001**

54 Título: **Promotores quiméricos capaces de mediar en la expresión génica en plantas tras una infección por patógenos y usos de los mismos**

30 Prioridad:
12.11.1998 EP 98121160
27.08.1999 EP 99116981

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.04.2012

73 Titular/es:
**Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften e.V.
Hofgartenstrasse 8
80539 München, DE**

72 Inventor/es:
**KIRSCH, Christoph;
LOGEMANN, Elke;
HAHLBROCK, Klaus;
RUSHTON, Paul y
SOMSSICH, Imre**

74 Agente/Representante:
Miltenyi, Peter

ES 2 377 826 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

Promotores quiméricos capaces de mediar en la expresión génica en plantas tras una infección por patógenos y usos de los mismos.

5 La presente invención se refiere a promotores sintéticos capaces de mediar en la expresión génica en plantas tras una infección por patógenos. La presente invención se refiere también a genes y vectores recombinantes que comprenden dichos promotores quiméricos así como a las células hospedadoras transformadas con dichos promotores quiméricos, genes o vectores recombinantes. La presente invención se refiere adicionalmente a composiciones de diagnósticos y kits que comprenden promotores quiméricos, genes recombinantes, vectores o células.

10 La presente invención se refiere también a procedimientos para la identificación de compuestos que son capaces de activar o inhibir genes que se expresan específicamente en plantas tras una infección por patógenos empleando los medios anteriormente descritos. Además, la presente invención se refiere a células de plantas transgénicas, tejido vegetal y plantas que contienen los promotores quiméricos, genes y vectores recombinantes, vectores y/o compuestos quiméricos anteriormente mencionados identificados mediante el procedimiento de la invención en células de plantas y cultivos de tejidos, reproducción de plantas y/o agricultura.

15 El diseño de la resistencia a la enfermedad en las cosechas es una preocupación importante de la biotecnología vegetal. Uno de los enfoques más prometedores a este problema es diseñar reacciones defensivas que estén estrechamente relacionadas con los mecanismos de defensa natural tales como la muerte de células hipersensibles en los sitios de infección, donde las células que rodean las proximidades de un sitio de infección mueren con el fin de evitar la diseminación adicional del patógeno (Strittmatter, Bio/Technology 13 (1995), 1085-1089). La generación controlada de lesiones necróticas muy localizadas depende, sin embargo, de la restricción de cualquier actividad citotóxica en los sitios de infección. Esto requiere por tanto promotores que sean rápida y localmente sensibles al ataque patógeno pero que también muestren una actividad insignificante en tejidos no infectados.

20 Los intentos iniciales que utilizaron fragmentos grandes de promotores de genes relacionados con la patogénesis tales como *pp1-1* han padecido la desventaja de que es difícil aislar un promotor que sea totalmente específico del patógeno sin actividad sustancial en tejido no infectado (Strittmatter, 1995). Parece probable, por tanto que muy pocos promotores que se producen naturalmente, si acaso existe alguno, sean adecuados para este objetivo.

25 Recientes avances en el estudio detallado de los genes relacionados con la defensa han identificado numerosos elementos reguladores del ADN que actúan en *cis* funcionalmente definidos en promotores inducibles patógenos (Korfhage, The Plant Cell 6 (1994), 695-708, Raventos, Plant J. 7 (1995), 147-155, Rushton, EMBO J. 15 (1996), 5690-5700). Se han definido numerosos elementos que actúan en *cis* que son necesarios para la respuesta a los patógenos. Entre estos se incluyen las Secuencias P y L de los genes PAL del perezil (Logemann, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 5905-5909), las Secuencias H y G de los genes PAL y 4CL de la soja (Loake, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 9230-9234, junto con numerosos elementos menos bien definidos. Sin embargo, aunque se han mostrado numerosos elementos actuantes en *cis* que son necesarios para estimular la inducibilidad, no se sabe si estos elementos son suficientes para dirigir la expresión inducida por patógenos en células vegetales y en las propias plantas. Recientemente, se ha demostrado que, únicamente en la Secuencia W1 del perezil (Rushton, EMBO J. 15 (1996) 5690-5700, y en la secuencia ERE del maíz *Prms* (Raventos, Plant J (1995), 147-155), son suficientes únicamente cuatro copias de estos elementos para dirigir el inductor de una expresión sensible en alguna extensión en los ensayos de la expresión transitoria del gen. Sin embargo, la inducibilidad y el nivel de expresión de las construcciones investigadas en Rushton, 1996 y Raventos, 1995 varió mucho y se observó como máximo en el mejor de los casos una inducción de aproximadamente 10 veces de la expresión del gen indicador puede no ser suficiente para suministrar las necesidades biotecnológicas anteriormente descritas. De acuerdo con esto, está poco claro si estos o cualesquiera otros elementos que actúan en *cis* pueden ser útiles para suprimir o conferir específicamente la expresión génica local en plantas tras la infección del patógeno.

30 El documento WO95/03690 da a conocer elementos promotores sensibles a patógenos del promotor HMG2 y promotores quiméricos con estos elementos. El documento WO96/36697 da a conocer un promotor quimérico que comprende elementos reguladores del promotor EAS4 que permiten la expresión génica mediada por patógenos. El documento WO98/03536 identifica elementos promotores del promotor PR-1 que son responsables de la inducibilidad del promotor y del promotor quimérico que comprenden estos elementos. El documento WO96/28561 da a conocer secuencias del promotor *pp-1* que son responsables de la expresión génica mediada por la infección con hongos.

35 De esta manera, el problema técnico de la presente invención es proporcionar promotores que sean rápida y localmente sensibles al ataque patógeno pero que muestren actividad insignificante en partes no infectadas de la planta y que se puedan usar para diseñar cultivos resistentes a la enfermedad.

La solución a este problema técnico se consigue proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

40 De acuerdo con esto, la invención se refiere a un promotor quimérico capaz de mediar en la expresión génica local

en plantas tras una infección por patógenos que comprende

(i) al menos un elemento que actúa en *cis* lo suficiente para dirigir la expresión específica del inductor que comprende la secuencia de nucleótidos de las SEC ID N°: 3 o 4

5 (ii) al menos un elemento que actúa en *cis* lo suficiente para dirigir la expresión específica del inductor que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEC ID N°: 3 a 16, y

(iii) un promotor mínimo.

10 El término “capaz de mediar en la expresión génica local en plantas tras una infección por patógenos” tal como se usa en la presente memoria descriptiva significa que dicho promotor es capaz de controlar la expresión de una secuencia de ADN heteróloga en los sitios de infección, de manera análoga o estrechamente relacionada con la expresión controlada de genes relacionados con patógenos que están implicados en la resistencia natural en las interacciones de hospedador/patógeno más incompatibles, tales como la muerte de células hipersensibles en los sitios de infección de una parte de una planta. De esta manera, el promotor quimérico de la invención se caracteriza por su capacidad de mediar en la activación transcripcional localizada selectivamente en respuesta al ataque de un patógeno o en el respuesta a inductores que imitan el ataque de un patógeno tales como el inductores preparados por ejemplo, a partir de patógenos tales como hongos o bacterias o derivados de los mismos. La activación transcripcional mediante el promotor quimérico de la invención se puede producir también en células que rodean el sitio de infección real debido a las interacciones célula-célula. El promotor quimérico de la invención puede ventajosamente no ser inducible o ser inducible solo en una pequeña extensión tras otros inductores tales como estrés abiótico. Preferiblemente, la inducción del promotor quimérico tras el ataque de un patógeno o el tratamiento estimulante es al menos aproximadamente 10 veces mayor, preferiblemente 20 veces mayor y particularmente 30 veces mayor que su activación, si es que se produce, debida al estrés abiótico.

20 Sin embargo la especificidad de expresión conferida por los promotores quiméricos de la invención puede no limitarse a la expresión génica local debida a patógenos, por ejemplo, se puede combinar con secuencias reguladoras adicionales que proporcionan la expresión génica específica de tejido. El modelo de expresión particular puede depender también del sistema planta/vector empleado. Sin embargo, la expresión de las secuencias de ADN heterólogo impulsadas por las promotores quiméricos de la invención se produce predominantemente tras la infección de un patógeno o el tratamiento correspondiente con un inductor a no ser que el técnico experto tome y diseñe algunos elementos de la invención para controlar la expresión de una secuencia de algunos tipos de secuencias de ADN heterólogo.

30 El término “elemento que actúa en *cis* lo suficiente para dirigir la expresión específica del inductor” denota un tramo corto de un ADN, preferiblemente de entre 6 y 35 nucleótidos de longitud que cuando se combina con un promotor mínimo tal como el promotor mínimo CAMV 35S (posiciones -46 a +8) es capaz de dirigir la expresión específica del inductor a un nivel elevado de una secuencia de ADN heterólogo. Preferiblemente, dicho inductor es un inductor fúngico que se puede preparar por medios convencionales; véanse, por ejemplo, *Plant Physiol.* 57 (1976), 760-765; Grosskopf, J. *Plant Physiol.* 138 (1991), 741-746; Kombrink, *Plant. Physiol.* 81 (1986), 216-221; West, *Naturwissenschaften* 68 (1981), 447-457.

35 El término “promotor mínimo” dentro del significado de la presente invención se refiere a las secuencias de nucleótidos necesarias para el inicio de la transcripción, es decir, la unión de la ARN polimerasa, y puede incluir también, por ejemplo, la secuencia TATA.

El término “patógeno” incluye, por ejemplo, bacterias, virus, hongos y protozoos, así como los inductores preparados a partir de los mismos.

40 De acuerdo con la presente invención, se han identificado numerosos elementos que actúan en *cis* que por sí solos son suficientes para dirigir la expresión específica del inductor fúngico a un elevado nivel y que se pueden usar para construir promotores sintéticos novedosos que por primera vez cumplen los requerimientos para diseñar cultivos resistentes a la enfermedad.

45 Se han llevado a cabo estudios de acuerdo con la presente invención que emplean un sistema homólogo de expresión transitoria que usa protoplastos de perejil (*Petroselinum crispum*) derivados de células cultivadas. Este sistema es uno de los escasos sistemas en el que los protoplastos responden a moléculas inductoras fúngicas de manera casi idéntica a las células de la planta intacta (Dangl, *EMBO J.* 6 (1987), 2551-2556; Hahlbrock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995), 4150-4157). Esto permite el estudio de elementos que actúan en *cis* sensibles al inductor, algo que es difícil en otros muchos sistemas experimentales.

50 Se han identificado once elementos sensibles a inductor que actuaban en *cis* (las SEC ID N°: 3 a 13) de acuerdo con la presente invención. Se construyeron monómeros y multímeros de cada elemento además de promotores sintéticos constituidos por dos o más de estos elementos en combinación. Se sintetizó cada construcción tanto con extremos BamHI como con un sitio SpeI en el extremo 5' y en un sitio XbaI en el extremo 3' y a continuación se clonó en el correspondiente sitio de restricción frente a un promotor CaMV 35S mínimo (-46 a +8) en el vector MS23-pBT10-GUS (Sprenger, Tesis Doctoral, Universidad de Köln, Köln, Alemania (1997); véanse la Figura 1 (SEC ID N°: 17) y la Figura 2). La distancia entre el

sitio de inserción y la secuencia TATA varió entre 25 y 70 pb dependiendo del sitio de inserción empleado y solo se observaron ligeras diferencias, si acaso se produjo alguna, cuando se insertó el mismo elemento en diferentes sitios de restricción.

Adicionalmente, se identificó el elemento de la Secuencia E17 (SEC ID N°: 15) sensible al inductor que actúa en *cis*, de acuerdo con la presente invención. Se construyeron los promotores sintéticos que comprendían un monómero un dímero o el complemento inverso de este elemento. Se ensayaron varias distancias entre 5 y 131 pb de la Secuencia E17 insertada en el promotor mínimo usando monómeros y dímeros (véase el Ejemplo 7). Se obtuvo una inducibilidad útil en el sentido de la presente invención para las distancias de al menos 12 pb y la inducibilidad óptima para las distancias de 40 a 60 pb en el extremo 5' del promotor mínimo. Otro elemento que actúa en *cis* de la presente invención, el fragmento 3' de 21 pb de longitud de la Secuencia E17 (SEC ID N°: 16) confiere una similar sensibilidad al inductor en comparación con la Secuencia E17 (véase el Ejemplo 6).

Los experimentos llevados a cabo de acuerdo con la presente invención demuestran que los elementos que actúan en *cis* dirigen la expresión inducida por el patógeno *in vivo*, siendo activos en forma de monómeros, multímeros, y en combinación entre sí dentro de los promotores sintéticos. Pueden por tanto cumplir los requerimientos biotecnológicos para el diseño de la resistencia a la enfermedad.

De acuerdo con la presente invención, estos promotores quiméricos novedosos clonados frente a la región de codificación de GUS y los genes quiméricos resultantes se introdujeron por medio de transferencia génica mediada por infiltración a vacío e plantas de *Arabidopsis*; véase el Ejemplo 8. El modelo de expresión observado en las plantas transgénicas que contenían el gen marcador GUS bajo el control del promotor quimérico de la invención, reveló la expresión en tejidos infectados por bacterias (*Pseudomonas syringae*) así como mediante patógenos fúngicos (*Peronospora parasítica*), mientras que la expresión local en tejidos cicatrizados parece ser inactiva.

El promotor quimérico de la invención puede estar preferiblemente constituido solo por los elementos que actúan en *cis* anteriormente definidos y un promotor mínimo. Como se discutirá a continuación, se pueden añadir o estar presentes otras secuencias reguladoras dependiendo del uso previsto del promotor quimérico de la invención. Sin embargo, preferiblemente el promotor quimérico de la invención carece de elementos que interfieren con la expresión específica del inductor y/o que son responsables de la expresión no selectiva del promotor del elemento que actúa en *cis* de la invención que se deriva de la interior.

Para obtener la posible expresión de todos los tejidos de una planta transgénica, se usan a menudo las secuencias reguladoras mínimas de los promotores constitutivos, tales como el promotor 35 S de CaMV (Odell, Nature 313 (1985), 810-812) o los promotores de los genes de la poliubiquitina del maíz (Christensen, Plant Mo. Biol. (1982, 675-689). Es también inmediatamente evidente para la persona experta en la materia que se pueden añadir elementos reguladores adicionales a las secuencias quiméricas de la invención. Por ejemplo, se pueden emplear potenciadores de la transcripción y/o secuencias que permitan la expresión inducida adicional del promotor quimérico de la invención. Las secuencias potenciadoras funcionales en plantas incluyen, por ejemplo, un elemento ocs (Ellis, EMBO J. 6 (1987), 3203-3208); la familia de elementos ACGT (motivo hex, secuencia G como elemento 1) (Williams, Plant Cell 4 (1992), 485-496) y el elemento cyt-1 (Neuteboom, Plant J. 4 (1993), 525-534). Con el fin de conseguir la expresión en tejidos específicos de una planta transgénica es posible usar promotores específicos de tejidos (véase, por ejemplo, EMBO J. 8 (1989), 2245-2251). Se conocen también promotores que son activos específicamente en los tubérculos de las patatas o en las semillas de diferentes especies de plantas, tales como maíz, *Vicia*, trigo, cebada, etc. Además, se puede emplear el sistema Tet inducible químicamente (Gatz, Mol. Gen. Genet. 227 (1991); 229-237). La persona experta en la materia conoce promotores adecuados adicionales y se describen, por ejemplo, en Ward (Plant Mol. Biol. 22 (1993), 361-366).

Preferiblemente, el promotor quimérico de la invención comprende además un elemento que actúa en *cis* que tiene la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 1 o 2; véase el Ejemplo 5.

En una realización particularmente preferida de la invención el promotor quimérico comprende formas homo y/o heteromultiméricas de dicho(s) elemento(s) que actúa(n) en *cis*; véase también el Ejemplo 5 adjunto. Preferiblemente, dicha forma multimérica es un dímero o tetrámero. Se prefieren particularmente aquellas combinaciones de elementos que actúan en *cis* que se describen en el Ejemplo 5 y cuya combinación proporciona una inducción de al menos preferiblemente 20 veces, de al menos preferiblemente 30 veces y de manera particularmente preferida al menos aproximadamente 50 veces.

En una realización preferida del promotor quimérico de la invención, el promotor mínimo procede del promotor CaMV35S, el promotor CHS, el promotor PR1, o el promotor hcbt2. Sin embargo, se pueden emplear también otros promotores mínimos de otras fuentes.

En otra realización preferida del promotor quimérico de la invención la distancia entre dicho elemento que actúa en *cis* y dicho promotor mínimo es de 12 a 300 pares de bases, más preferiblemente de 25 a 70 pares de bases, y lo más preferible de 40 a 60 pares de bases. Adicional o alternativamente, una región separadora, compuesta preferiblemente de 4 a 10 pares de bases separa al menos dos de dichos elementos que actúan en *cis* en el promotor quimérico. Igualmente, se prefiere que al menos dos de dichas formas multiméricas en el promotor quimérico descrito anteriormente estén separados

por un separador de entre aproximadamente 50 a 1000 pares de bases.

En una realización particularmente preferida del promotor quimérico de la invención, la inducción de la expresión génica tras el tratamiento del inductor o la infección del patógeno es de al menos de 15 veces. Tal como se ha discutido anteriormente, los elementos que actúan en *cis* investigados hasta ahora en la técnica anterior solo proporcionan inducción tras un tratamiento con el inductor de aproximadamente 10 veces. Sin embargo, una inducción de 10 veces de un gen recombinante que codifica, por ejemplo, una proteína antivírica puede no ser suficiente para combatir rápida y eficazmente al patógeno. La presente invención proporciona algunos elementos que actúan en *cis* que son capaces de inducir un elevado nivel de expresión de una secuencia de ADN dada con hasta una inducción de 400 veces; véase, por ejemplo, el Ejemplo 1. Además, la invención demuestra que la combinación de elementos que actúan en *cis*, por otra parte débilmente, puede proporcionar un aumento sustancial de la inducibilidad global del promotor quimérico; véase el Ejemplo 5. De esta manera, la presente invención proporciona por primera vez un procedimiento aplicable en general de cómo construir y usar los promotores quiméricos en el campo de la biotecnología vegetal. Como será evidente a partir de los Ejemplos adjuntos, el valor inicial de los promotores quiméricos de la invención puede variar en alguna extensión. La persona experta en la técnica puede emplear por tanto diferentes promotores quiméricos con diferentes niveles de fondo y la inducibilidad, dependiendo del uso pretendido. Por ejemplo, si se usa el enfoque de una protección frente a la infección vírica mediada por una proteína revestida, el promotor quimérico empleado puede tener un elevado nivel de expresión que podría no perjudicar la planta y que tras la infección vírica podría aumentar hasta niveles elevados de tal manera que se pueda conseguir la resistencia al virus. Se podría aplicar la misma idea a, por ejemplo una protección de sentido contrario o mediada por ribozima o el diseño de resistencia a patógenos fúngicos mediante la expresión de proteínas antifúngicas, etc. Por otra parte, si se pretende la generación de genes resistentes específicos de raza y la generación artificial de la muerte en células hipersensibles, se usa preferiblemente un promotor quimérico que tenga una actividad de fondo baja o prácticamente sin actividad y que solo se activa tras el ataque del patógeno en una extensión en que se consigue el nivel suficiente de proteína tóxica que hace que la célula muera. La selección del promotor quimérico apropiado de la invención depende de que su uso quede bien comprendido dentro de los conocimientos de la persona experta en la técnica.

Los ejemplos de las diferentes aplicaciones posibles del promotor quimérico de acuerdo con la invención así como de sus elementos que actúan en *cis* se describirán en detalle en lo sucesivo.

Por tanto, en una realización adicional, la presente invención se refiere a un gen recombinante que comprende el promotor quimérico anteriormente descrito. Preferiblemente, el gen recombinante se configura de tal manera que el promotor quimérico está enlazado operativamente a una secuencia de ADN heterólogo.

El término "heterólogo" con respecto a la secuencia de ADN que está operativamente enlazada al promotor quimérico de la invención significa que dicha secuencia de ADN no está enlazada naturalmente al promotor quimérico de la invención.

El término "enlazado de manera operativa" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos de esta manera están en una relación que les permite funcionar en su manera prevista. El promotor quimérico "enlazado de manera operativa" a una secuencia de ADN heterólogo está ligado de tal manera que se consigue la expresión de una secuencia de codificación en condiciones compatibles con las secuencias del control. La expresión comprende la transcripción de la secuencia de ADN heterólogo preferiblemente en un ARNm traducible. Los elementos reguladores que aseguran la expresión en eucariotas, es decir, de células vegetales, son bien conocidos de las personas expertas en la técnica. En el caso de células eucariotas, estas comprenden opcionalmente señales poli-A que aseguran la terminación de la transcripción y la estabilización del transcrito, por ejemplo, las del ARN de 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) y el gen de la Nopalino Sintasa procedente de *Agrobacterium tumefaciens*. Los elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores de la transcripción así como potenciadores de la traducción. Un potenciador de la traducción usado frecuentemente es el constituido por las secuencias omega de CAMV, se ha demostrado que la inclusión de un intrón (el Intron-1 del gen Shrunken del maíz, por ejemplo) aumenta los niveles de expresión en hasta 100 veces (Mait, Transgenic Research 6 (1997), 143-156, Ni, Plant Journal 7 (1995), 661-678). A este respecto, debe señalarse que en una realización del gen recombinante de la invención al menos uno de dichos elementos que actúan en *cis* se localiza en la región 5' o 3' no traducida o en un intrón del gen recombinante.

En una realización preferida del gen recombinante de la invención dicha secuencia de ADN heterólogo codifica un (poli) péptido, proteína citotóxica, anticuerpo, ARN de sentido contrario, ARN de sentido directo, ribozima, factor de transcripción, proteasa, nucleasa, lipasa, o polimerasa.

El gen recombinante de la invención se puede usar solo o como parte de un vector que expresa secuencias de ADN heterólogo que, por ejemplo, codifica proteínas para, por ejemplo, el control de la resistencia a la enfermedad o el diagnóstico de patógenos inducibles o de la expresión génica relacionada. El gen recombinante o el vector que contiene la secuencia de ADN que codifica un ARN o una proteína de interés se introduce en las células que a la vez producen el ARN o la proteína de interés. Por ejemplo, el promotor quimérico de la invención puede enlazarse operativamente que codifican la Barnasa para uso en la producción de la muerte de células localizada en plantas tras el ataque de un patógeno.

Por otra parte, dicha proteína puede ser un marcador puntuable, por ejemplo, luciferasa, proteína fluorescente

verde o β galactosidasa. Esta realización es particularmente útil en procedimientos de cribado sencillos y rápidos de compuestos y sustancias descritas a continuación en la presente memoria descriptiva y capaces de modular la expresión génica de específica de patógenos o inducible mediante de inductor. Por ejemplo, se pueden cultivar células de plantas transgénicas en presencia y ausencia de un compuesto candidato con el fin de determinar si el compuesto afecta la expresión de los genes que están bajo el control de los promotores quiméricos de la invención, lo que se puede medir, por ejemplo, controlando la expresión del marcador anteriormente mencionado. Es inmediatamente evidente para los expertos en la materia que se pueden emplear también otros genes marcadores, que codifican, por ejemplo, un marcador seleccionable que se proporciona para dirigir la selección de compuestos que inducen o inhiben la expresión de dicho marcador.

Se pueden usar también los promotores quiméricos de la invención en procedimientos con enfoque de sentido contrario. El ARN de sentido contrario puede ser una secuencia corta (generalmente de al menos 10, preferiblemente de al menos 14 nucleótidos, y opcionalmente de hasta 100 o más nucleótidos) de nucleótidos formulada para que sea complementaria de una porción de una secuencia de ARNm específica y/o una secuencia de ADN del gen de interés. Se han descrito procedimientos normalizados que se refieren a tecnologías de sentido contrario; véase, por ejemplo, Klann, *Plant Physiol.* 112 (1966), 1321-1330. Tras la transcripción de la secuencia de ADN en el ARN de sentido contrario, el ARN de sentido contrario se une a su secuencia diana en el interior de una célula, inhibiendo de este modo la traducción del ARNm e infrarregulando la expresión de la proteína codificada por el ARNm.

Además, se pueden emplear las ribozimas apropiadas (véanse, por ejemplo, los documentos EP-A1 0 291 533, EP-A1 0 321 201, EP-A2 0 360 257) que escinden específicamente el (pre)ARNm de un gen diana. Se puede llevar a cabo la selección de los sitios diana apropiados y de las enzimas correspondientes tal como se ha descrito, por ejemplo en Steinecke, *Ribozymes, Methods in Cell Biology* 50, Galbraith, eds Academic Press, Inc. (1995), 449-460. Son evidentes para la persona experta en la materia aplicaciones adicionales del promotor quimérico y se pueden derivar de la bibliografía, por ejemplo, Strittmatter y Wegener, *Zeitschrift für Naturforschung* 48c (1993), 673-688; Kahl, *J. Microbiol. Biotechnol.* 11 (1995), 449-460 y las referencias citadas en el anterior.

Dicho factor de transcripción puede ser por ejemplo un factor regulador maestro que controla la expresión de una cascada de genes implicada en la defensa de la planta frente a patógenos (Grotewold, *Plant Cell* 10 (1998), 721-740; Rushton y Somssich, *Curr. Opin. Plant Biol.* 1 (1998), 311-315). Alternativamente, puede ser un factor de transcripción híbrido que contiene un dominio de unión al ADN (por ejemplo de GAL4 o del bacteriófago 434) y un dominio activador (por ejemplo, de VP16 o de cualquier dominio activador funcional de la planta) que, cuando se expresa en plantas transgénicas que contienen un gen diana de sentido contrario bajo el control de un promotor sintético que contiene el elemento que actúa en *cis* apropiado que reconoce el factor híbrido, conduce a una represión específica (inactivación) de la función del gen endógeno deseado (Wilde, *Plant Mol. Biol.* 24 (1994), 381-388; Guyer, *Genetics* 149 (1998), 633-639).

Las lipasas adecuadas comprenden por ejemplo fosfolipasas, por ejemplo, fosfolipasas de tipo C o A₂ (Scherer, *Plant Growth regulation* 18 (1996), 125-133). Las lipasas son capaces de liberar ácidos grasos libres procedentes de los lípidos de la membrana, en donde estos ácidos grasos pueden funcionar como transductores de la señal por la cual se estimulan las reacciones de defensa celular. La creciente importancia de los ácidos grasos libres en la defensa frente al patógeno se ha documentado, por ejemplo, en Scherer (1996), Roy (*Plant Sci.* 107 (1995), 17-25 y en las referencias citadas de los anteriores) y en Tavernier (*Plant Sci.* 104 (1995), 117-125).

Se pueden emplear también nucleasas, es decir, RNasas y DNasas de las cuales Barnasa es una candidata entre otras. Se puede aplicar el uso de proteasas en el contexto de esta realización para los efectos citotóxicos.

Se puede construir un sistema de amplificación de la señal usando polimerasas. En un modelo en dos etapas, una polimerasa inducida por un inductor, por ejemplo ARN polimerasa SP6, T7 o T3, puede transcribir un segundo gen recombinante que está controlado por un promotor cuya polimerasa sea muy específica. El segundo gen puede codificar por ejemplo una proteína citotóxica que se expresa a continuación de forma amplificada. McBride (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994), 7301-7305) describió un sistema vegetal basado en la ARN polimerasa T7.

Las proteínas citotóxicas comprenden, por ejemplo, las RIP de plantas (proteínas inactivadoras de ribosomas; (Stripe, *Bio/technology* 10 (1992), 405-412), defensinas (Broekaert, *Plant Physiol.* 108 (1995), 1353-1358), toxina Bt, inhibidor de la α -amilasa, lisozima T4, productos del gen de la avirulencia, o enzimas tales como la glucosa oxidasa que generan especies de oxígeno reactivo (Shah, *Trends Biotechnol.* 13 (1995), 362-368; Shah, *Curr. Opin. Biotech.* 8 (1997), 208-214; Beachy, *Curr. Opin. Biotech.* 8 (1997), 215-220; Cornelissen, *Plant Physiol.* 101 (1993), 709-712; Estruch, *Nucleic Acid Res.* 22 (1994), 3983-3989).

Es en principio posible modificar la secuencia de codificación de tal manera que la proteína se ubique en cualquier compartimento deseado de la célula vegetal. Esto incluye el núcleo, el retículo endoplásmico, las vacuolas, las mitocondrias, los plástidos, el apoplasto, el citoplasma, etc. La persona experta en la materia conoce bien los procedimientos sobre cómo llevar a cabo estas modificaciones y las secuencias de la señal que aseguran la localización en un compartimento deseado (Görlich, *Science* 271 (1996), 1513-1518; Hicks, *Plant Physiol.* 107 (1995), 1055-1058; Rachubinski, *Cell* 83 (1995), 525-528; Schatz, *Science* 271 (1996), 1519-1526; Schnell, *Cell* 83 (1995), 521-524; Verner, *Science* 241 (1988), 1307-1313; Vitale,

BioEssays 14 (1992), 151-160).

La presente invención se refiere también a vectores, particularmente plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos usados convencionalmente en ingeniería genética que comprenden un promotor quimérico o un gen recombinante de la invención. Preferiblemente, dicho vector es un vector de expresión en plantas, que comprende preferiblemente además un marcador de selección de vegetales. Para un ejemplo de marcadores selectores adecuados, véase más arriba. Se pueden usar procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la materia para construir vectores recombinantes; véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N. Y. y Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y. (1989). Alternativamente, se pueden reconstituir los promotores quiméricos y los genes recombinantes de la invención en liposomas para la liberación en células diana.

Ventajosamente, los vectores de la invención anteriormente descritos comprenden un marcador seleccionable y/o puntuable. Los expertos en la materia conocen y comprenden los genes marcadores seleccionables útiles para la selección de células vegetales transformadas, callos, tejidos vegetales y plantas, por ejemplo, la resistencia a antimetabolitos como la base para la selección de dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Reiss, *Plant Physiol. (Life Sci. Adv.)* 13 (1994), 143-149); npt, que confiere resistencia a los aminoglicósidos neomicina, kanamicina y paromicina (Herrera-Estrella, *EMBO J.* 2 (1983), 987-995) e higr, que confiere resistencia a higromicina (Marsh, *Gene* 32 (1984), 481-485). Se han descrito genes seleccionables adicionales, concretamente trpB, que permite a las células utilizar indol en lugar de triptófano; hisD, que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina (Hartman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988), 8047); manosa-6-fosfato-isomerasa, que permite a las células utilizar manosa (documento WO 94/20627) y ODC (ornitina decarboxilasa) que confiere resistencia al inhibidor de la ornitina decarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue, 1987, en: *Current Communications in Molecular Biology* Cold Spring Harbor Laboratory ed.) o desaminasa de *Aspergillus terreus*, que confiere resistencia a Blastidina S (Tamura, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59 (1995), 2336-2338).

Los expertos en la técnica conocen también un marcador puntuable útil y que está comercialmente disponible. Ventajosamente, dicho marcador es un gen que codifica luciferasa (Giacomin, *Pl.* 116 (1996), 59-72; Scikantha, *J.Bact.* 178 (1996), 121), proteína fluorescente verde (Gerdes, *FEBS Lett.* 389 (1996), 44-47) o β -glucuronidasa (Jefferson, *EMBO J.* 6 (1987), 3901-3907). Esta realización es particularmente útil para un cribado sencillo y rápido de las células, tejidos y plantas que contienen un vector de la invención.

La presente invención se refiere además a células hospedadoras que comprenden un promotor quimérico, gen recombinante o un vector de acuerdo con la invención en el que el promotor quimérico es extraño a la célula hospedadora.

Por "extraño" se entiende que el promotor quimérico es tanto heterólogo con respecto a la célula hospedadora, esto significa procedente de una célula u organismo con antecedentes genómicos diferentes, o que es homólogo con respecto a la célula hospedadora pero localizado en un entorno genómico diferente del homólogo que se produce naturalmente de dicho elemento que actúa en *cis*. Esto significa que, si el elemento que actúa en *cis* es homólogo con respecto a la célula hospedadora, no está localizado en su localización natural en el genoma de dicha célula hospedadora, en particular, está rodeado por diferentes genes. El vector o gen recombinante de acuerdo con la invención que está presente en la célula hospedadora puede estar tanto integrado en el genoma de la célula hospedadora como puede mantenerse en alguna forma extracromosómicamente. A este respecto, debe entenderse también que se puede usar el promotor quimérico del gen recombinante de la invención para restaurar o crear un gen mutante mediante recombinación homóloga (Paszkowski (ed.), *Homologous Recombination and Gene Silencing in Plants*. Kluwer Academic Publishers (1994)). La célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota o eucariota, tal como células bacterianas de insectos, fúngicas, vegetales o animales. Las células preferidas son las células vegetales.

En una realización preferida adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de plantas transgénicas, células vegetales, o tejidos vegetales que comprende la introducción de un promotor quimérico, gen o vector recombinante de la invención en el genoma de dicha planta, célula vegetal o tejido vegetal. Para la expresión de la secuencia de ADN heterólogo bajo el control de promotor quimérico de acuerdo con la invención en células vegetales, se pueden fusionar secuencias reguladoras adicionales de tal manera que se pueden fusionar otras secuencias reguladoras tales como la cola de poli A, preferiblemente en 3' respecto de la secuencia de ADN heterólogo, véase también más arriba. Las posibilidades adicionales pueden ser añadir Sitios de Unión a la Matriz en los límites del transgén para actuar como "delimitadores" y aislar frente a la diseminación de la metilación procedente de las secuencias heterocromáticas más cercanas.

Se conocen también bien en la materia procedimientos para la introducción de genes extraños en plantas. Estos incluyen por ejemplo, la transformación de células o tejidos vegetales con ADN-T, usando *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*, la fusión de protoplastos la transferencia génica directa (véase, por ejemplo, el documento EP-A 164 575), la inyección, la electroporación, la infiltración a vacío, procedimiento biolísticos del tipo bombardeo de partículas, la transformación mediada por polen, la transformación mediada por ARN vírico vegetal, la transformación mediada por liposomas, la transformación mediada por embriones inmaduros degradados con enzimas o cicatrizados, o de callos embriogénicos degradados con enzimas o cicatrizados y otros procedimientos conocidos en la técnica. Los vectores usados

5 en el procedimiento de la invención pueden contener elementos funcionales adicionales, por ejemplo, las secuencias del “borde izquierdo” y del “borde derecho” del ADN T de *Agrobacterium* que permiten la integración estable en el genoma de la planta. Además, las personas expertas en la materia conocen procedimientos y vectores que permiten la generación de plantas transgénicas libres de marcadores, es decir, el gen marcador seleccionable o puntuable se pierde en una determinada etapa del desarrollo de la planta o de la reproducción del vegetal. Se puede conseguir esto mediante, por ejemplo, transformación simultánea (Lyznik, Plant Mol. Biol. 13 (1989), 151-161; Peng, Plant Mol. Biol. 27 (1995), 91-104) y/o mediante el uso de sistemas que utilizan enzimas capaces de promover la recombinación homóloga en plantas (véanse, por ejemplo, documento WO97/08331; Bayley, Plant, Mol. Biol. 18 (1992), 353-361); Lloyd, Mol. Gen. Genet. 242 (1994), 653-657; Maeser, Mol. Gen. Genet. 230 (1991), 170-176; Onouchi, Nucl. Acids Res. 19 (1991), 6373-6378). Procedimientos para la preparación de vectores apropiados se describen en, por ejemplo, Sambrook (Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 2ª Edición (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

10 Son bien conocidas por los expertos en la técnica las cepas y vectores adecuados de *Agrobacterium tumefaciens* así como la transformación de *Agrobacteria* y el crecimiento apropiado y los medios de selección y se describen en la técnica anterior (GV3101 (pMK90RK), Konck, Mol. Gen. Genet. 204 (1986), 383-396; C58C1 (pGV 3850Kan), Deblaere, Nucl. Acid Res. 13 (1985), 4777; Bevan, Nucleic. Acid Res. 12(1984), 8711; Koncz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 8467-8471; Koncz, Plant Mol. Biol. 20 (1992), 963-976; Koncz, Specialized vector for gene tagging and expression studies. En: Plant Molecular Biology Manual Vol 2, Gelvin y Schilperoort (Eds.), Dordrecht, Países Bajos: Kluwer Academic Publ. (1994), 1-22; documento EP-A-120 516; Hoekema; The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanter B. V., Alblasterdam (1985), capítulo V, Fraley, Crit. Rev. Plant. Sci., 4, 1-46; An, EMBO J. 4 (1985), 277-287). Aunque en el procedimiento de la invención se prefiere el uso de *Agrobacterium tumefaciens*, se pueden usar otras cepas de *Agrobacterium*, tales como *Agrobacterium rhizogenes*, por ejemplo, si se desea un fenotipo conferido por dicha cepa.

15 Son bien conocidos por las personas expertas en la materia procedimientos para la transformación usando procedimientos biolísticos; véanse, por ejemplo, Wan, Plant Physiol. 104 (1994), 37-48; Vasil, Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558 y Christou (1996) Trends in Plant Science 1, 423-431. Se puede llevar a cabo la microinyección tal como se describe en Potrykus y Spangenberg (eds.), Gene Transfer To Plants. Springer Verlag, Berlin, NY (1995).

20 La transformación de la mayor parte de plantas dicotiledóneas es posible con los procedimientos descritos anteriormente. Pero para la transformación de algunas plantas monocotiledóneas se han desarrollado también técnicas de transformación satisfactorias. Estas incluyen la transformación usando procedimientos biolísticos como, por ejemplo, los descritos anteriormente así como la transformación de protoplastos, la electroporación de células parcialmente permeabilizadas, la introducción de ADN usando fibras de vidrio, etc.

25 La célula vegetal resultante transformada se puede usar a continuación para regenerar una planta transformada de una manera conocida por una persona experta.

30 Alternativamente, se puede usar una célula vegetal y modificarse de tal manera que dicha célula vegetal exprese un gen endógeno bajo el control del promotor quimérico. La introducción del promotor quimérico de la invención que no controla naturalmente la expresión de un gen dado o de las secuencias genómica usando, por ejemplo, vectores que se dirigen a genes, se puede llevar a cabo de acuerdo con procedimientos normalizados, véanse más arriba y, por ejemplo, Hayashi, Science 258 (1992), 1350-1353; Fritze y Walden, Gene activation by T-DNA tagging. En *Methods in Molecular Biology* 44 (Gartland, K.M.A. y Davey, M.R., eds). Totowa: Human Press (1995), 281-294) o el etiquetado del transposón (Chandlee, Physiologia 78 (1990), 105-115)

35 En general, las plantas que se pueden modificar de acuerdo con la invención se pueden obtener de cualquier especie vegetal deseada. Pueden ser plantas monocotiledóneas o plantas dicotiledóneas, preferiblemente comienzan por especies de plantas de interés en agricultura, cultivos forestales u horticultura de interés tales como plantas de cultivos (por ejemplo, maíz, arroz, cebada, trigo, centeno, avena, etc), patatas, plantas oleaginosas (por ejemplo, aceite de colza, girasol, cacahuets, soja, etc.), algodón, remolacha azucarera, caña de azúcar, plantas leguminosas (por ejemplo, judías, guisantes, etc.), plantas productoras de madera, preferiblemente árboles, etc.

40 De esta manera, la presente invención se refiere también a células de plantas transgénicas que comprenden, preferiblemente integrados de manera estable en el genoma, un promotor quimérico, un gen o vector recombinante de acuerdo con la invención o que se puede obtener mediante el procedimiento anteriormente descrito.

45 Además, la presente invención se refiere también a plantas transgénicas y a tejido vegetal que comprende las células de plantas transgénicas anteriormente descritas o que se pueden obtener mediante el procedimiento anteriormente descrito. Estas plantas pueden mostrar, por ejemplo, resistencia aumentada a la enfermedad.

50 En una realización preferida de la invención, la planta transgénica tras la presencia del promotor quimérico del gen recombinante de la invención consigue resistencia o resistencia mejorada frente a un patógeno al que la planta natural correspondiente era susceptible.

55 El término “resistencia” cubre el intervalo de protección desde un retraso hasta la completa inhibición del desarrollo

de la enfermedad. Los ejemplos de patógenos de importancia comprenden *Phytophthora infestans*, el agente causal del mildiu de la patata, *Phytophthora sojae*, patógeno de la raíz podrida de la soja, *Peronospora parasitica* (mildiu vellosa), *Magnaporthe grisea*, agente causal de la enfermedad del hongo del arroz, *Erysiphe* spp (oidio), *Pseudomonas syringae* (agente del mildiu bacteriano), *Erwinia amylovora* (tizón), *Erwinia caratovora* (podredumbre blanda), *Botrytis cinerea* (mildiu de la uva), *Rhizoctonia solani* y *Pythium debaryanum* (agentes del mildiu de las semillas o de la enfermedad del marchitamiento fúngico)

En otro aspecto más, la invención se refiere también a partes cosechables y al material de propagación de las plantas transgénicas de acuerdo con la invención que contienen las células de plantas transgénicas descritas anteriormente. Las partes cosechables pueden ser en principio cualquier parte útil de una planta, por ejemplo, hojas, tallos, frutos, semillas, raíces, etc. El material de propagación incluye, por ejemplo, semillas, frutos, esquejes, plantas de semillero, tubérculos, rizomas, etc.

Tal como se ha discutido anteriormente, se han identificado elementos que actúan en *cis* novedosos de acuerdo con la presente invención que son capaces de conferir la expresión génica específica inducible por inductor o patógeno en células vegetales y plantas. Por tanto, la presente invención se refiere también a elementos que actúan en *cis* tal como se ha definido anteriormente o formas multiméricas de una cualquiera de aquellas que se han discutido anteriormente en la presente memoria descriptiva.

Debido a la estrecha regulación de los promotores quiméricos de la invención, es evidente que son particularmente adecuados para la identificación de los compuestos que bien interactúan específicamente con estos elementos que actúan en *cis* o bien que actúan por la parte de arriba de la ruta de transducción de la señal que conduce a la activación de los genes de los que se derivaron los elementos que actúan en *cis*.

De esta manera, la presente invención se refiere adicionalmente a un procedimiento para la identificación de un activador o inhibidor de genes expresado específicamente en plantas tras una infección por patógenos que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar una planta, célula vegetal, o tejido vegetal que comprende una molécula de ADN recombinante que comprende un sistema de lectura enlazado operativamente al promotor quimérico de la invención;
- (b) cultivar dicha célula o tejido vegetal o mantener dicha planta en presencia de un compuesto o una muestra que comprende una pluralidad de compuestos en condiciones que permitan la expresión de dicho sistema de lectura;
- (c) identificar o verificar una muestra y un compuesto, respectivamente, que conduzca a la supresión o activación y/o potenciación de la expresión de dicho sistema de lectura en dicha planta, célula vegetal, o tejido vegetal.

Para identificar inhibidores, es ventajoso incluir un inductor u otro activador conocido que sea capaz de inducir la actividad de promotores que contienen los elementos que actúan en *cis* de los promotores quiméricos de la invención en la etapa (b) del procedimiento anteriormente descrito, y para determinar si el compuesto que se va a cribar suprime la inducción del sistema de lectura mediante dicho inductor o activador.

El término "sistema de lectura" en el contexto de la presente invención significa una secuencia de ADN que tras la transcripción y/o la expresión en una célula, tejido u organismo proporciona un fenotipo puntuable y/o seleccionable. Dichos sistemas de lectura son bien conocidos de las personas expertas en la técnica y comprenden, por ejemplo, genes recombinantes y genes marcadores tal como se han descrito anteriormente y en los ejemplos adjuntos.

El término "pluralidad de compuestos" en un procedimiento de la invención debe entenderse como una pluralidad de sustancias que pueden ser o no idénticas.

Dicho compuesto o pluralidad de compuestos pueden estar comprendidos en, por ejemplo, muestras de moléculas inorgánicas u orgánicas o, por ejemplo, extractos celulares de, por ejemplo, plantas, animales o microorganismos. Además dicho(s) compuesto(s) puede(n) ser conocido(s) en la técnica pero que hasta el momento no se conozca que sean capaces de suprimir o activar genes relacionados con el patógeno. La persona experta en la materia conoce configuraciones adecuadas del procedimiento de la invención. Se puede añadir la pluralidad de compuestos, por ejemplo, a la célula o medio de cultivo de tejidos o suelo, inyectarse en la célula o pulverizarse sobre la planta.

Si una muestra que contiene un compuesto o una pluralidad de compuestos se identifica en el procedimiento de la invención, entonces es también posible bien aislar el compuesto procedente de la muestra original identificada que contiene el compuesto capaz de suprimir o activar el promotor quimérico de la invención, o bien se puede dividir adicionalmente la muestra original, por ejemplo, si consiste en una pluralidad de compuestos diferentes, con el fin de reducir el número de sustancias diferentes por muestra y repetir el procedimiento con las subdivisiones de la muestra original. Dependiendo de la complejidad de las muestras, se pueden llevar a cabo varias veces las etapas descritas anteriormente, preferiblemente hasta que la muestra identificada de acuerdo con el procedimiento de la invención comprenda únicamente un número limitado o únicamente una sustancia(s). Preferiblemente dicha muestra comprende sustancias de propiedades químicas y/o físicas similares, y lo más preferible, dichas sustancias son idénticas. Preferiblemente, el compuesto identificado de acuerdo con el

procedimiento anteriormente descrito o su análogo o derivado se formula adicionalmente en una forma adecuada para la aplicación en la reproducción vegetal o de células vegetales y cultivo de tejidos. Por ejemplo, se puede combinar con un vehículo agrícolamente aceptable conocido en la técnica.

5 Los compuestos que se pueden ensayar e identificar de acuerdo con un procedimiento de la invención pueden ser bibliotecas de expresión, por ejemplo, bibliotecas de expresión de ADNc, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, pequeños compuestos orgánicos, hormonas, peptidomiméticos, PNAs o similares (Milner, *Nature Medicine* 1 (1995), 879-880; Hupp, *Cell* 83 (1995), 237-245; Gibbs, *Cell* 79 (1994), 193-198 y las referencias citadas más arriba). Además, se pueden identificar los genes que codifican un presunto regulador génico controlado por los elementos que actúan en *cis* de la invención y/o que ejercen sus efectos en la dirección 5' o 3' de dichos genes, usando, por ejemplo, la mutagénesis de inserción que utiliza, vectores que dirigen los genes conocidos en la materia (véanse, por ejemplo, Hayashi, *Science* 258 (1992), 1350-1353; Fritze y Walden, *Gene activation by T-DNA tagging*. En *Methods in Molecular Biology* 44 (Garland, K.M.A. y Davey, M.R., eds). Totowa: Human Press (1995), 281-294) o el etiquetado del transposón (Chandlee, *Physiologia Plantarum* 78 (1990), 105-115).

10 Dichos compuestos pueden igualmente ser derivados o análogos funcionales de inhibidores o activadores conocidos. Los expertos en la materia conocen bien los procedimientos para la preparación de derivados y análogos químicos y están descritos en, por ejemplo, Beilstein, *Handbook of Organic Chemistry*, Springer edición Nueva York Inc., 175 Fifth Avenue, Nueva York, N.Y. 10010 EEUU y en *Organic Synthesis*, Wiley, Nueva York, USA. Además, se pueden ensayar dichos derivados y análogos para comprobar sus efectos de acuerdo con los procedimientos conocidos en la materia o como se describen en los ejemplos adjuntos. Además, se pueden usar peptidomiméticos y/o el diseño asistido por ordenador de los derivados o análogos apropiados la célula o tejido que se puede emplear en el procedimiento de la invención preferiblemente en una célula vegetal, tejido vegetal o planta de la invención descritos anteriormente en la presente memoria descriptiva.

15 En una realización adicional, se pueden comparar las características de un compuesto dado con las de una célula que se ha puesto en contacto con un compuesto que es conocido tanto por ser capaz como por ser incapaz de suprimir o activar el promotor químérico de la invención o el promotor del elemento que actúa en *cis* del que se deriva el promotor químérico.

20 El inhibidor o activador identificado mediante el procedimiento anteriormente descrito puede probar ser útil como agente protector o herbicida o pesticida de la planta. Un compuesto obtenido o identificado de acuerdo con el procedimiento de la invención puede ser un activador o un inhibidor de genes específicamente inducidos tras la infección por patógenos.

30 Además, la identificación de factores que actúan en *trans* que interactúan con los elementos que actúan en *cis* de la invención puede constituir la base del desarrollo de agentes novedosos para modular las condiciones asociadas a las enfermedades vegetales. La identificación de factores que actúan en *trans* se lleva a cabo usando procedimientos normalizados en la técnica (véanse, por ejemplo, Sambrook, más arriba y Ausebel, más arriba). Para determinar si una proteína de la invención se une a los elementos que actúan en *cis*, se pueden llevar a cabo los análisis de desplazamiento en gel de la huella estándar y/o natural del ADN. Con el fin de identificar el factor que actúa en *trans* que se une a los elementos que actúan en *cis* de la invención, se pueden usar estos elementos como un reactivo de afinidad, en los procedimientos convencionales de purificación de proteínas, o como una sonda para el cribado de una biblioteca de expresión, una vez que se identifica el factor que actúa en *trans*, se puede hacer el seguimiento de la modulación de su unión con los elementos de la invención que actúan en *cis*, comenzando, por ejemplo, con el cribado de los inhibidores del factor de unión que actúa en *trans*.

35 La activación o represión de los genes implicados en las reacciones de defensa de las plantas podrían a continuación conseguirse en las plantas aplicando el factor que actúa en *trans* (o su inhibidor) o el gen que codifica el mismo, por ejemplo, en un vector para las plantas transgénicas. Además, si la forma activa del factor que actúa en *trans* es un dímero, se podrían preparar mutantes negativos dominantes del factor que actúa en *trans* con el fin de inhibir su actividad. Además, tras la identificación del factor que actúa en *trans*, se pueden identificar componentes adicionales en la ruta que conduce a la activación (por ejemplo, la transducción de la señal), o bien genes relacionados con la represión de la patogénesis. A continuación se puede hacer el seguimiento de la modulación de las actividades de estos componentes, con el fin de desarrollar agentes y procedimientos adicionales para modular la respuesta de las plantas tras el ataque de un patógeno en plantas.

45 De acuerdo con esto, la presente divulgación se refiere también a una composición de protección para plantas que comprende el compuesto identificado y obtenido mediante los procedimientos anteriormente descritos. Se puede preparar la composición de protección para plantas empleando el procedimiento anteriormente descrito y sintetizando el compuesto identificado como inhibidor o activador en una cantidad suficiente para uso en agricultura. De esta manera, la presente divulgación se refiere también a un procedimiento para la preparación de una composición de protección agrícola para plantas que comprende las etapas anteriormente descritas del procedimiento y la síntesis del compuesto identificado de esta manera o de un análogo o derivado del mismo. En la composición de protección para plantas, el compuesto identificado mediante el procedimiento anteriormente descrito se puede formular preferentemente mediante los medios convencionales

comúnmente usados para la aplicación de, por ejemplo, herbicidas y pesticidas o agentes capaces de inducir resistencia sistémica adquirida (RSA). Por ejemplo, determinados aditivos conocidos por los expertos en la materia son estabilizantes o sustancias que facilitan la captación por la célula vegetal, tejido vegetal o plantas, por ejemplo, harpinas, elicitinas, ácido salicílico (AS), ácido benzol(1,2,3)tiadiazol-7-carbotioico (BTH), ácido 2,6-dicloro isonicotínico (AIN), ácido jasmónico (AJ), metiljasmonato.

Se da a conocer también un anticuerpo que reconoce específicamente el compuesto que se puede obtener mediante el procedimiento dado a conocer anteriormente o el elemento que actúa en *cis* descrito anteriormente. Se pueden usar los anticuerpos para identificar y aislar otros activadores e inhibidores de genes que están implicados en la defensa de la planta. Estos anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales o anticuerpos sintéticos así como fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos Fab, Fv o scFv, etc. Se pueden preparar anticuerpos monoclonales, por ejemplo, mediante las técnicas que se describen originalmente en Köhler y Milstein, Nature 256 (1975), 495, y Galfré, Meth. Enzymol. 73 (1981), 3, que comprende la fusión de células de mieloma de ratón con esplenocitos derivados de mamíferos inmunizados. Además, se pueden obtener anticuerpos o sus fragmentos de los péptidos anteriormente mencionados usando los procedimientos que se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane "Antibodies, A laboratory Manual", CHS Press, Cold Spring Harbor, 1988.

Además, la presente invención se refiere a una composición de diagnóstico que comprende el promotor quimérico, el gen recombinante, el vector, el compuesto o el anticuerpo de la invención, y opcionalmente, los medios adecuados para la detección. Se pueden usar dichas composiciones de diagnósticos para, por ejemplo, procedimientos para cribar activadores o inhibidores que se han descrito anteriormente.

Adicionalmente, la presente invención se refiere a un kit que comprende el promotor quimérico, el gen recombinante, el vector, el compuesto o el anticuerpo de la invención. El kit de la invención puede contener ingredientes adicionales tales como marcadores de selección y componentes de medios selectivos adecuados para la generación de células de plantas transgénicas, tejido vegetal o plantas. Además, el kit puede incluir tampones y sustratos de genes indicadores que pueden estar presentes en el gen o vector recombinante de la invención. Adicionalmente, el kit de la invención puede contener compuestos tales como inductores, preferiblemente inductores fúngicos, que se pueden usar como patrones para los ensayos de expresión. Se puede usar ventajosamente el kit de la invención para llevar a cabo el procedimiento de la invención, y podría, entre otras, emplearse en una variedad de aplicaciones referidas en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, en el campo diagnóstico o como herramienta de investigación. Las partes del kit de la invención se pueden envasar individualmente en viales o en combinación en recipientes o unidades multirecipientes. La fabricación del kit sigue preferiblemente los procedimientos normalizados que conocen las personas expertas en la técnica.

El kit o sus ingredientes de acuerdo con la invención se pueden usar en una célula vegetal y en cultivos de tejidos vegetales, por ejemplo, para cualquiera de los procedimientos anteriormente descritos para detectar inhibidores y activadores de los genes relacionados con la patogénesis. El kit de la invención y sus ingredientes se espera que sean muy útiles de la reproducción de nuevas variedades de, por ejemplo, plantas que muestren propiedades mejoradas tales como resistencia a la enfermedad.

Es también inmediatamente evidente para la persona experta en la materia que se pueden emplear los promotores quiméricos, genes recombinantes y vectores de la presente invención para producir plantas transgénicas con un rasgo deseado (véase para una revisión TIPTEC Plant Product & Crop Biotechnology 13 (1995), 312-397) que comprende (i) resistencia a insectos (Vaek, Plant Cell 5 (1987), 159-169), (ii) resistencia a virus (Powell, Science 232 (1986), 738-743; Pappu, World Journal of Microbiology & Biotechnology 11 (1995), 426-437, Lawson, Phytopathology 86 (1996), 56 suppl.), (iii) resistencia a bacterias, insectos y hongos (Overing, Molecular Breeding 2 (1996), 297-305; Strittmatter, Bio/Technology 13 (1995), 1085-1089; Estruch, Nature Biotechnology 15 (1997), 137-141), (iv) inducir y mantener la esterilidad de machos y/o hembras (documentos EP-A1 0 412 006, EP-A1 0 223 399, WO 93/25695) o se pueden usar como sistemas de producción muy inducibles de proteína o biopolímeros heterólogos en análogos de plantas para sistemas inducibles en bacterias.

La presente invención demuestra por primera vez que se puede usar una serie de elementos que actúan en *cis* que son responsables de la inducibilidad de los genes relacionados con la patogénesis tanto en solitario como en combinación con ellos mismos o con otros elementos que actúan en *cis* para construir promotores quiméricos que sean capaces de mediar en la expresión génica muy inducible en células vegetales tras el tratamiento con inductor. Es por tanto evidente que se pueden usar elementos que actúan en *cis* derivados, por ejemplo, de promotores relacionados con patógenos diferentes de los específicamente descritos anteriormente, de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, los promotores de la quitinasa; véase, por ejemplo, Kellmann, Plant. Mol. Biol. 30 (1996), 351-358. Se pueden usar promotores apropiados que proporcionan una fuente de dichos elementos que actúan en *cis* y obtenerse de cualquier especie de planta, por ejemplo, de maíz, patata, sorgo, mijo, lágrimas de Job, cebada, trigo y arroz. Dichos promotores están caracterizados por la inducibilidad tras la infección de un patógeno.

Por ejemplo, usando como sondas el ADNc de proteínas que se expresan específicamente en plantas tras el ataque de un patógeno, una persona experta en la materia puede cribar una genoteca constituida por ADN genómico de

plantas clonado en un fago o en vectores bacterianos.

Dicha genoteca está constituida por ejemplo, por ADN genómico preparado a partir del tejido de las hojas de la planta fraccionado en fragmentos que varían de 5 kb a 50 kb, clonado en vectores lambda, tales como vectores lambda EMBL3 o 4, Lambda ZAP, Lambda DASH o Lambda GEM. Se pueden purificar los fagos que se hibridan con las sondas. Se puede extraer y secuenciar ADN de los fagos purificados. Tras aislar las secuencias genómicas que corresponden a los genes que codifican las proteínas PR, es posible fusionar secuencias de ADN heterólogo con estos promotores o sus secuencias reguladoras mediante fusiones transcripcionales o traduccionales de acuerdo con procedimiento bien conocidos por los expertos en la materia. Con el fin de identificar las secuencias reguladoras y los elementos específicos de estos genes, se pueden clonar fragmentos genómicos en la dirección 5' frente a genes marcadores tales como luc, gfp o la región que codifica GUS y se pueden introducir los genes quiméricos resultantes por medio de transferencia génica mediada por *Agrobacterium tumefaciens* en plantas o transfectarse en células vegetales o tejido vegetal para la expresión transitoria. El modelo de expresión observado en las células de plantas transgénicas o de las plantas transfectadas que contienen el gen marcador bajo el control de las secuencias reguladoras aisladas desvela los límites del promotor y de sus elementos que actúan en *cis*. Se puede llevar a cabo el aislamiento de los elementos que actúan en *cis* con las propiedades anteriormente definidas mediante técnicas convencionales conocidas en la materia, por ejemplo, mediante el uso de la DNasa I y los experimentos de pérdida y ganancia de funciones. A continuación es posible aislar la región promotora correspondiente mediante técnicas convencionales y ensayar ésta para su modelo de expresión. Para este objetivo, es por ejemplo posible fusionar el presunto elemento que actúa en *cis* con un promotor mínimo de un gen indicador, tal como GUS, luciferasa o la proteína fluorescente verde (GFP) y evaluar la expresión del gen indicador en ensayos de expresión transitoria o en plantas transgénicas; véanse también los ejemplos adjuntos.

De esta manera, la presente invención se refiere al uso de un elemento que actúa en *cis* suficiente para dirigir la expresión específica de un inductor y en particular, el uso del promotor quimérico, el gen recombinante, el vector, el elemento que actúa en *cis* y/o el compuesto de la presente invención, para la producción de plantas resistentes a patógenos o para identificar y/o producir compuestos capaces de conferir resistencia inducida a un patógeno en una planta.

En otra realización adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para convertir un gen en sensible a patógenos que comprende insertar al menos un elemento que actúa en *cis* lo suficiente para dirigir la expresión específica del inductor en el promotor de dicho gen. Como es evidente para la persona experta en la materia, se puede obtener también un promotor que muestra las capacidades del promotor quimérico de la invención introduciendo el elemento que actúa en *cis* tal como se ha definido anteriormente en un promotor de un gen, preferiblemente en estrecha proximidad al sitio de inicio de la transcripción del gen.

En otra realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar un promotor capaz de mediar en la expresión génica local en plantas tras la infección por un patógeno, que comprende enlazar de manera operativa un elemento que actúa en *cis* lo suficiente para dirigir la expresión específica de un inductor en una secuencia de inicio de la transcripción de un promotor. Preferiblemente, dicho elemento que actúa en *cis* que se va a insertar en los procedimientos anteriormente descritos es un elemento que actúa en *cis* de la presente invención o como se define en las realizaciones anteriores o una de sus formas multiméricas tal como se ha definido anteriormente en la presente memoria descriptiva. Tal como se ha mencionado anteriormente, los elementos sensibles que actúan en *cis* son preferiblemente sensibles al inductor fúngico.

En una realización preferida de la invención, los procedimientos anteriormente descritos comprenden adicionalmente la eliminación de elementos no específicos que actúan en *cis* en el promotor. La introducción del elemento que actúa en *cis* de la invención en un promotor dado por sí mismo puede no ser suficiente para obligar al promotor a mediar exclusivamente en la expresión génica local en plantas tras la infección por un patógeno. En este caso, se pueden eliminar los elementos preexistentes que pueden ser sensibles, por ejemplo, a la luz, las hormonas, las bajas temperaturas, la sequía o el estrés salino.

Los anteriores procedimientos descritos facilitan la aparición de promotores quiméricos novedosos que son al menos de manera parcial, preferiblemente de manera completa, controlados por la interacción planta/patógeno.

De acuerdo con esto, la presente invención se refiere también al promotor que se pueda obtener mediante un procedimiento que se ha descrito anteriormente. A continuación se puede emplear dicho promotor para las realizaciones descritas anteriormente en la presente memoria descriptiva.

Estas y otras realizaciones se dan a conocer y quedan abarcadas por la descripción y los ejemplos de la presente invención. Se puede encontrar bibliografía adicional referida a alguno de los procedimientos, usos y compuestos que se van a emplear de acuerdo con la presente invención en bibliotecas públicas, usando, por ejemplo, dispositivos electrónicos. Por ejemplo, se puede utilizar la base de datos pública "Medline" que está disponible en Internet, por ejemplo, en <http://www.fmi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>. La persona experta en la materia conoce bases de datos y direcciones adicionales tales como <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.infobiogen.fr/>, http://www.fmi.ch/biology/research_tools.html, <http://www.tigr.org/>, y se pueden obtener también usando, por ejemplo, www.lycos.com. Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364, ofrece una visión general sobre la información de patentes en biotecnología y un panorama de las fuentes relevantes de

información de patentes útil para la búsqueda retrospectiva y para el interés actual.

La presente invención se describe adicionalmente por referencia a las siguientes figuras y ejemplos no limitantes.

Las Figuras muestran:

Figura 1. Mapa de restricción del plásmido ms23 (Sprenger, 1997);

5 Figura 2. Dibujo general del plásmido ms23. Se muestran el gen indicador Gus y el promotor mínimo -46 CaMv de 35S, ya que se trata de sitios de restricción que se encuentran en la secuencia de poliengarce situada en la dirección 5' del promotor mínimo. Se muestran también las distancias (en pares de bases) entre los sitios de restricción;

10 Figura 3. Dibujo general de plásmido pGPTV. Se muestran el gen indicador Gus y el promotor mínimo -46 CaMV de 35S ya que se trata de los sitios SpeI y XbaI usados en la preparación de las construcciones empleadas. Se indica también el marcador de selección *nptII*, ya que se trata de los bordes izquierdo y derecho del ADN-T (L y R). Se muestran también los terminadores (pA_{pnos} y pnos) y el promotor que impulsa el gen *nptII* (pAg7);

15 Figura 4. Inducibilidad por inductor de promotores quiméricos que contienen la Secuencia E17 y sus derivados. Se han subrayado los motivos GTAV en la orientación directa e inversa. Se representan gráficamente las bases eliminadas como Ø. Los fragmentos representados gráficamente se localizan 12 pb en la dirección 5' del promotor mínimo de 35S. Los monómeros de la construcción dimerica A109 están separados por un sitio de restricción de 6 pb;

20 Figura 5. Inducibilidad por inductor de promotores quiméricos que contienen elementos diseccionados de la Secuencia E17. Comenzando a partir de una Secuencia E17 que contenía el promotor quimérico (H149), se construyeron promotores quiméricos que tenían 6 nucleótidos eliminados del extremo 5' de la Secuencia E17 (B175), 7 nucleótidos de su extremo 3' (C175) o que comprendían ambas eliminaciones (C175). Adicionalmente, se ensayó un promotor que comprendía un fragmento del promotor Eli17 de 445 pb del que se eliminó el elemento de la Secuencia de Eli17 de 27 pb (A175). Se proporcionan los valores de inducción por inductor relativos y absolutos que se midieron en los ensayos de expresión transitoria;

Figura 6. Corte del poliengarce del vector ms23. Para medir la influencia de la distancia al promotor mínimo de 35S, la Secuencia E17 o su dímero se insertaron en ocho sitios de restricción diferentes;

25 Figura 7. Inducibilidad por inductor de la Secuencia E17 en función de la distancia al promotor mínimo de 35S. Se proporciona la inducción tras el tratamiento con el inductor para las construcciones tal como se ilustra en la Figura 6. Ms23 representa el vector que contiene únicamente el promotor mínimo como control negativo;

30 Figura 8. Características de la expresión de las plantas transgénicas transformadas con las construcciones génicas que comprenden promotores quiméricos con tetrámeros de algunos elementos *cis* de la presente invención. Para comparación, se incluye el elemento de la Secuencia GCC (véase el Ejemplo 1). Se cuantificaron los niveles de fondo de la expresión como bajo (expresión de fondo apenas detectable), medio (expresión de fondo visible pero la inducción por patógenos es claramente visible sobre el fondo) o muy alto (expresión extremadamente alta, de tal manera que la inducción por patógenos es difícil de detectar). Un menos indica expresión no detectable, un más indica expresión inducible y "nt" no ensayado.

35 Los ejemplos ilustran la invención:

Configuración experimental

1. Técnicas de ADN recombinante

40 A no ser que se indique otra cosa en los ejemplos, todas las técnicas de ADN recombinante se llevan a cabo de acuerdo con los protocolos que se describen en Sambrook (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY o en los Volúmenes 1 y 2 de Ausubel (1994), Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols. Se describen materiales y procedimientos convencionales para trabajo molecular en Plant Molecular Biology Labfase (1993) por R.D.D. Croy, publicado conjuntamente por BIOS Scientific Publications Ltd. (Reino Unido) y Blackwell Scientific Publications (Reino Unido).

2. Vector de expresión transitoria

45 Todas las construcciones, a no ser que se proporcione un protocolo diferente en los ejemplos, se clonaron entre los sitios SpeI y XbaI en pbt10-GUS (ms23) (Sprenger, 1997). En el extremo 3' de cada construcción se encuentra un sitio XbaI intacto (6 pb) seguido inmediatamente por un promotor mínimo CaMV de 35S (-46 a +8) El extremo 3' de todas las inserciones tiene por tanto 28 pb en la dirección 5' de la Secuencia TATA de CaMV y 52 pb en la dirección 5' del inicio de la transcripción. Se separaron múltiples copias de los elementos por 6 pares de bases (TCTAGT) creadas por la ligadura de un extremo pegajoso SpeI con un extremo pegajoso XbaI. Se proporcionan la secuencia de ms23 (SEC ID N°: 17) como mapa

50

de restricción y un dibujo general (Figuras 1 y 2).

3. Vector de planta transgénica

5 El vector empleado fue pGPTV-GUS-kan (Becker, Plant Mol. Biol. 20 (1992), 1195-1197). El polienlazante, el promotor mínimo de CaMV de 35S y el gen indicador GUS son idénticos a ms23. Todas las separaciones y órdenes de elementos *cis* en las construcciones son por tanto idénticas a las de las construcciones de expresión transitoria correspondientes en ms23. Se proporciona un dibujo de pGPTV (Figura 3).

4. Transfección transitoria y ensayos de expresión

10 Los ensayos de transfección y expresión transitoria se llevaron a cabo esencialmente tal como se describe en Dangl, EMBO J. 6 (1987), 2551-2556; Schulze-Lefert, EMBO J. 8 (1989), 651-656; van de Löcht, EMBO J. 9 (1990), 2945-2950. De manera breve, se utilizaron células de perejil subcultivadas durante cinco días para el aislamiento de los protoplastos. Se consigue la subdivisión de las paredes de la célula mediante incubación durante la noche de las células en CaCl₂ 0,24 M que contiene 0,25% (p/v) de celulasa y 0,05% (p/v) de macerozima a 24°C. Se recogieron los protoplastos mediante centrifugación (7 min., 100g), se lavaron con CaCl₂ 0,24 M, y a continuación se hicieron flotar en medio B5 (GIBCO/BRL) que contenía sacarosa 0,4 M y 1 mg/ml de ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Los protoplastos que flotaban después de la centrifugación (5 min, 100 g) se cosecharon, se contaron y se ajustaron a 2 x 10⁶ ml.

15 Se transfirió ADN plasmídico superenrollado o linealizado (5 – 20 µg) que contenía la construcción del promotor indicador quimérico (GUS) en los protoplastos mediante el procedimiento del polietilenglicol (PEG) (Krens, Nature 296 (1982), 72-74). Cada ensayo de transformación se dividió y se colocó en placas de 3 ml. Se añadió el inductor Pep25 (Nürnberg, Cell 78 (1994), 449-460) a uno mientras que el otro sirvió como control. Ambas muestras se cosecharon tras 8 horas, se congelaron en nitrógeno líquido, se prepararon los extractos de proteína bruta y se evaluó la actividad de GUS (Jefferson, Plant Mol. Biol. Rep. 5 (1987), 387-405). Se utilizaron los ensayos Bradford (Bio-Rad) para la determinación de las proteínas. Se proporcionan los datos de la expresión como valores promedio de veces de inducción ± desviación estándar (SD) y actividad promedio de GUS (pmol/min/mg) de seis ensayos de transfección transitoria independientes tratados con o sin inductores Pep25.

25 5. Generación de plantas transgénicas

Se generaron plantas transgénicas de acuerdo con los procedimientos descritos en Bechtold, Mol. Biol. Genet. 316, (1993), 1194-1199; Grant, Science 269 (1995), 843-846 y Dangl, Science 269 (1995), 843-846. De manera breve, se clonaron los elementos promotores al frente del gen indicador del vector binario PGPTV-GUS-Kan (Becker, Plant. Mol. Biol. 20 (1992), 1195-1197) y se introdujeron las construcciones en la cepa GV3101 de *Agrobacterium* (pMP90; (Koncz y Schell, en el lugar citado) que contenía el plásmido PMP90 auxiliar. Se hicieron crecer 500 ml de los cultivos en medio YEB que contenía kanamicina (50 µg/ml), rifampicina (100 µg/ml) y gentamicina (25 µg/ml). Se volvieron a suspender las células en medio de infiltración (0,5 x sales de Murashige-Skoog; 1 x vitaminas B5; sacarosa al 5,0% y benzaminopurina 0,044 µM) y se infiltró a vacío en plantas de *Arabidopsis* mediante el procedimiento de Grant (1995). Se esterilizaron superficialmente semillas T1 y se seleccionaron los transformantes en medio MS que contenía 50 µg/ml de kanamicina. Se transfirieron los transformantes primarios al suelo y se ensayaron para la expresión de GUS durante la patogénesis y el estrés biótico o abiótico.

Ejemplo 1: La Secuencia S es capaz de mediar en la expresión génica inducida por inductor.

40 La Secuencia S (CAGCCACCAAAGAGGCCAGAAT; SEC ID N°: 7) ha demostrado ser necesaria para la expresión sensible al inductor de los genes *eli 7* de perejil (Takamiya-Wik, Tesis Doctoral, Universidad de Köln, Köln, Alemania (1995)). Junto con los resultados que se refieren a la Secuencia N (véase el Ejemplo 4.3), se ha definido por primera vez la secuencia del núcleo de este tipo de elemento que parece ser AGCCACCANA. El elemento no es idéntico a ningún elemento sensible a inductor aunque es muy similar a numerosos elementos de respuesta al etileno que tienen la secuencia AGCCGCC de la secuencia del núcleo (Secuencias GCC) (Ohme-Takagi y Shinsi, The Plant Cell 7 (1995), 173-182). En los promotores investigados (*eli7-1*, *eli7-2* y *Prp1*) existe siempre un resto A en lugar de un resto G. Lo que diferencia esta diferencia en las secuencias no está claro actualmente y no se sabe si la Secuencia S es sensible al etileno. Se ha demostrado, sin embargo, por primera vez, que los elementos de la secuencia S con la secuencia AGCCACC son elementos sensibles al inductor. Los datos actuales muestran también por primera vez que las Secuencias GCC son también elementos de respuesta del inductor así como que son elementos de respuesta al etileno. La Secuencia S es un elemento sensible a inductor muy fuerte. Un monómero de la Secuencia S proporciona una inducibilidad de 11 veces y un tetrámero una inducibilidad de hasta 560 veces. Esto demuestra claramente que la Secuencia S es un elemento extremadamente prometedor para objetivos biotecnológicos.

55 La secuencia del elemento monómero usada es: 5'-actagtCAGCCACCAAAGAGGCCAGAATtctaga-3' con el elemento en letras mayúsculas y los extremos SpeI/XbaI en letras minúsculas. Se construyeron construcciones que contenían 1, 2, 4 y 8 copias de la Secuencia S y se sometieron a un ensayo de expresión transitoria tal como se ha descrito anteriormente. Los resultados fueron los siguientes:

	Inductor menos	Inductor más	Veces de inducción
1 x S	168	2058	12
2 x S	118	10781	91
4 x S	187	76904	441
8 x S	781	102211	130

Estas construcciones de la secuencia S son novedosas y tienen una elevada inducibilidad. Cuatro copias de la Secuencia S parecen ser lo mejor con un valor de fondo muy bajo (187) un nivel inducido elevado (76904) y una inducción muy alta de veces (441 x, la más elevada de cualquiera de las construcciones ensayadas).

Ejemplo 2: La Secuencia D es capaz de mediar en la expresión génica inducible por el inductor

5 La secuencia D (TACAATTCAAACATTGTTCAAACAAGGAACCM SEC ID N°: 11) está presente en el promotor PR2 del perezil y no se había informado nunca que fuera un elemento que actúa en *cis*. Se identificó la Secuencia D mediante el procedimiento de la huella genética con DNasa I, mediante experimento de pérdida de funciones en el contexto del promotor PR2 y mediante experimentos de ganancia de funciones con monómeros y multímeros. La Secuencia D es un elemento sensible a inductor muy fuerte, un tetrámero que dirige una inducibilidad combinada con un nivel muy alto de expresión, mientras que un dímero es menos fuerte, pero proporciona 15-20 veces de inducibilidad. Esto demuestra claramente que la Secuencia D es un elemento prometedor para objetivos biotecnológicos.

10 La secuencia del elemento usada es: 5'-actagtTACAATTCAAACATTGTTCAAACAAGGAACtctaga-3' con el elemento en letras mayúsculas y los extremos SpeI/XbaI en letras minúsculas. Se construyeron construcciones que contenían 1, 2 y 4 copias de la Secuencia D y se sometieron al ensayo de la expresión transitoria descrito anteriormente. A continuación, se muestran los resultados.

	Inductor menos	Inductor más	Veces de inducción
1 x D	346	4002	11
2 x D	1562	31331	20
4 x D	5519	61552	11

15 Estas construcciones de la Secuencia D son novedosas. Dos copias de la Secuencia D pueden ser lo mejor, con un valor de fondo moderado (1562), un nivel inducido alto (31331) y unas veces de inducción buenas (20 x).

Ejemplo 3: La Secuencia U proporciona la expresión génica inducible por inductor

20 La Secuencia U (ATGAAGTTGAAATTCAATAG; SEC ID N°: 13) está presente en el promotor PR2 del perezil y nunca se había informado de que fuese un elemento que actuase en *cis*. La secuencia U se ha definido mediante el procedimiento de la huella genética con DNasa I, por la pérdida de funciones de los experimentos en el contexto del promotor PR2 y por la ganancia de funciones de los experimentos con monómeros y multímeros. La secuencia U es un elemento sensible a inductor razonablemente fuerte, un tetrámero que dirige la inducibilidad por el inductor en 40 veces.

25 La secuencia del elemento usado es 5'-actagtAGTTGAAATTCAATAAGTTGAAATTCAATAtctaga-3' con el elemento en letras mayúsculas y los extremos SpeI/XbaI en letras minúsculas.

Se construyeron construcciones que contenían 2 copias de la secuencia U anterior. A continuación se muestran los resultados de un ensayo de expresión transitoria. Este contiene por tanto 4 copias del elemento de la Secuencia U (AGTTGAAATTCAATA; SEC IDN°: 12). Son también activas 1 o 2 copias de la secuencia U.

	Inductor menos	Inductor más	Veces de inducción
4 x U	100	3947	39

30 Estas construcciones de la Secuencia U son novedosas. La secuencia U parece ser un elemento sensible al patógeno moderadamente fuerte con una inducción buena en una vez (aproximadamente 40 x).

Ejemplo 4: Algunas secuencias W son capaces de mediar en la expresión génica inducible por inductor

Los resultados obtenidos de acuerdo con la presente invención demuestran claramente que existen grandes diferencias entre las diferentes Secuencias W que se han ensayado. Algunas son muy fuertes (Secuencia W2), algunas débiles (Secuencia W1), algunas no son nada activas por sí mismas (Secuencia W3) y algunas están presentes como

elementos compuestos junto con otros elementos que actúan en *cis* (Secuencia N). Las secuencias W tienen también diferencias en el exterior de las secuencias TGAC del núcleo:

Secuencia W1: TTTGACC (SEC ID N°: 1)

Secuencia W2: TTCAGCC-N₇-TTGACC (SEC ID N°: 3)

5 Secuencia W3: TGAC-N₆-GTCA (SEC ID N°: 5)

Secuencia N: TTTGACC más GCCACC (Secuencia S) (SEC ID N°: 8)

Secuencia W_{Amy}: TTGACC en el palíndromo TGAC-N₆-GTCA (SEC ID N°: 6)

4.1 Secuencia W1

10 Previamente se había identificado la Secuencia W1 (CACACTTAATTTGACCGAGTAACATTGCGCC; SEC ID N°: 2) como un elemento *cis* sensible a inductor débil en los promotores PR1 del perejil, y se había demostrado que un tetrámero es suficiente para dirigir la expresión sensible al inductor en el sistema de expresión transitoria del perejil (Rushton, 1996) la secuencia W1 contiene la secuencia TTGACC de la secuencia W y la evidencia sugiere que estos elementos se encuentran en el tipo WRKY de los factores de transcripción. Ya que se había encontrado también que las secuencias W se encuentran en las monocotiledóneas avena (Rushton, 1995) y maíz naturales (Raventos, 1995) y se habían encontrado las proteínas WRKY en un número creciente de especies de plantas, esto sugiere que los elementos de la secuencia W pueden ser elementos que actúan en *cis* en todas las especies de plantas. La propia secuencia W1 nunca se había ensayado anteriormente para la actividad como un monómero o en combinación con otros elementos y se observó que un monómero dirigía la expresión inducible por el inductor (inducibilidad de 5 veces) y que la Secuencia W1 era también activa en combinación con otros elementos (véase a continuación).

20 Los resultados actuales muestran que la propia secuencia W1, sin embargo, es un elemento débil. La secuencia del elemento usada (el monómero) es: 5'-actagtCACACTTAATTTGACCGAGTAACATTGCGCtctaga-3' con el elemento en letras mayúsculas y los extremos SpeI/XbaI en letras minúsculas. Esta construcción es ligeramente diferente de la construcción publicada anteriormente (Rushton, 1996) ya que el elemento se inserta en los sitios SpeI/XbaI y no en BamHI/BglII. Se construyeron construcciones que contenían 1, 2 y 4 copias de la Secuencia W1 y se sometieron al ensayo de la expresión transitoria. Los resultados fueron como sigue.

	Inductor menos	Inductor más	Veces de inducción
1 x W1	362	1495	4,1
2x W1	299	2433	8,1
4 x W1	56	870	<15

Las veces de inducción con 4 x W1 son similares a los valores anteriormente informados (Rushton, 1996). La comparación con los valores de otros elementos demuestra que la Secuencia W1 es un elemento débil.

4.2 Secuencia W2

30 Previamente se había identificado la Secuencia W2 (TTATTCAGCCATCAAAGTTGACCAATAAT; SEC ID N°: 4) como elemento que actúa en *cis* requerido para la expresión sensible a inductor de los promotores PR1 del perejil en el sistema de expresión transitoria (Rushton, 1996). Sin embargo, se había demostrado en primer lugar la ganancia de funciones de acuerdo con la presente invención. La Secuencia W2, de manera similar a la Secuencia W1, contiene un elemento TTGACC, pero el resto del elemento es totalmente diferente y estas otras secuencias juegan un importante papel, ya que un tetrámero de la Secuencia W1 es un elemento débil con aproximadamente una inducibilidad por el inductor de 10 veces mientras que la Secuencia W2 dirige niveles de expresión hasta 100 veces mayores que la Secuencia W1 con una inducibilidad por el inductor de 50 veces. Se demuestra por primera vez que la Secuencia W2 sola como monómero o como multímero, es un elemento sensible a inductor muy fuerte y que es también activa en combinación con otros elementos.

40 La secuencia del elemento usada (el monómero) es: 5'-actagtTTATTCAGCATCAAAGTTGACCAATAATtctaga-3' con el elemento en letras mayúsculas y los extremos SpeI/XbaI en letras minúsculas. Se construyeron construcciones que contenían 1, 2, 4 y 8 copias de la Secuencia W2 y se sometieron al ensayo de la expresión transitoria. Se obtuvieron los siguientes resultados.

	Inductor menos	Inductor más	Veces de inducción
1 x W2	770	8914	11
2 x W2	998	46651	46
4 x W2	2375	105685	44
8 x W2	7680	164454	21

W2 es el elemento que actúa en *cis* sensible al inductor más fuerte que se ha ensayado hasta ahora, ocho copias de W2 proporcionan valores de GUS de aproximadamente 164.000.

4.3 Secuencia N

5 La Secuencia N proviene del gen *gst1* de la patata (TTCTAGCCACCAGATTTGACCAAAC; SEC ID N°: 9) y no se había definido nunca anteriormente. Contiene tanto una secuencia (AGCCACCAGA) de la Secuencia S como una secuencia (TTGACC) de la Secuencia W con exactamente 25 pares de bases, y de esta forma representa un elemento *cis* novedoso compuesto por dos elementos de respuesta al inductor en un tramo muy pequeño de ADN. Un tetrámero de la Secuencia N proporciona al menos una inducibilidad del inductor de 75 veces. Esta observación sugiere tres importantes conclusiones; en primer lugar que la Secuencia N puede ser extremadamente útil para aplicaciones biotecnológicas, en segundo lugar, que la Secuencia S de núcleo es AGCCACCANA (SEC ID N°: 14) y que en tercer lugar, las Secuencias S y W pueden representar un tema común en los promotores de plantas que responden a patógenos, ya que estos elementos están presentes en el perejil y la patata. La secuencia N sola es un elemento sensible a inductor fuerte y extremadamente interesante, ya que consiste en una Secuencia S (GCCACC) seguida por una Secuencia W (TTTGACC). La secuencia del elemento usado (el monómero) es: 5'-actagtTTCTAGCCACCAGATTTGACCAAAtctaga-3' con el elemento en letras mayúsculas y los extremos SpeI/XbaI en letras minúsculas. Se ensayó una construcción con cuatro copias de la Secuencia N en el ensayo de la expresión transitoria. Los resultados fueron como sigue.

	Inductor menos	Inductor más	Veces de inducción
4 x N	1085	92980	85

La Secuencia N es un elemento fuerte y que muestra una inducibilidad muy alta de veces. Esta novedosa combinación y la separación de los elementos de la secuencia W y de la secuencia S puede probar ser muy útil para objetivos biotecnológicos.

4.4 Secuencia W_{Amy}

25 La Secuencia W_{Amy} procede de los genes α -Amy2/A de avena y α -Amy2/54 de trigo naturales y se había publicado anteriormente con el nombre de Secuencia 2 u O2S (véase Rushton, Plant Mol. Biol. 29 (1995), 691-702). Es un elemento que actúa en *cis* requerido para la activación de la transcripción de estos genes durante la germinación pero no se le había relacionado nunca anteriormente con un papel en la patogénesis. La Secuencia W_{Amy} consiste en dos elementos de la Secuencia W: un hexámero 5'-TTGACC-3' incluido en una secuencia 5'-TGAC-N₆-GTCA-3' palindrómica. Ya que ésta contiene ambos tipos de secuencias juntas, constituye un nuevo tipo de Secuencia W y puede ser una "Secuencia súper W".

La secuencia del elemento usado (el monómero) es: 5'-actagtGGATTGACTTGACCGTCATCGGCTtctaga-3' con el elemento en letras mayúsculas y los extremos SpeI/XbaI en letras minúsculas. Se construyó una construcción que contenía 7 copias de la Secuencia W_{Amy} y el ensayo de la expresión transitoria. A continuación, se muestra el resultado.

	Inductor menos	Inductor más	Veces de inducción
7 x W _{Amy}	168	43867	260

30 W_{Amy} es un elemento que actúa en *cis* sensible a inductor fuerte y tiene las veces de inducción más alta de cualquier Secuencia W ensayada hasta ahora. Este elemento podría ser por tanto una Secuencia W particularmente eficaz y podría ayudar al diseño de Secuencias W sintéticas que sean incluso más eficaces.

Ejemplo 5: Promotores sintéticos constituidos por combinaciones de los elementos anteriormente descritos

35 Los promotores sintéticos compuestos de combinaciones de los anteriores elementos sensibles a inductor no se han construido o ensayado nunca. Todos los elementos (Secuencias W1, W2, S, U, D, N y W_{Amy}) son activos en combinación entre sí. El elemento en la dirección 3' más adicional (más cercano a la secuencia TATA) tiene el efecto más fuerte sobre el promotor sintético con elementos adicionales en la dirección 5' que tienen un efecto mucho menor. Sin embargo, la combinación de dos o más tipos diferentes de elementos *cis* puede tener un efecto mucho más profundo sobre la expresión en plantas. Además de la inserción de una región separadora compuesta por entre 100 pares de bases y 1000

5 pares de bases parece aumentar la contribución de más elementos cis en la dirección 5'. Todos estos promotores sintéticos son buenos promotores candidatos que pueden ser sensibles rápida y localmente al ataque de patógenos pero que también muestran una actividad insignificante en tejidos no infectados. Estos promotores pueden por tanto permitir la ingeniería de las reacciones de defensa que están estrechamente relacionadas con los mecanismos de defensa naturales sin actividad apreciable en células no infectadas de la planta.

Se han ensayado un gran número de combinaciones. Se detallan a continuación los resultados de algunas de éstas. Todas estas combinaciones son novedosas y estas construcciones representan los promotores sintéticos. Los elementos se insertan en los sitios SpeI/XbaI, como con todas las construcciones, y se leen desde el extremo 5' hasta el extremo 3', es decir, 4 x W2/ 4 x S es: SpeI – W2 – W2 – W2 – W2 – S – S – S – S – XbaI.

10 Generalmente, los elementos más cercanos a la Secuencia TATA (es decir, en el extremo 3') tienen el mayor efecto a nivel de la expresión y de las veces de inducción. El efecto sobre los elementos e la dirección 5' es a menudo mínimo y existe también un efecto inhibitor debido probablemente al impedimento estérico cuando se ponen estrechamente juntos diferentes elementos; comparar 4 x S/4 x W2 con (2 x S/2 x W2) x 2. Se recomienda por tanto la inserción de las regiones separadoras entre los elementos para aliviar los problemas debidos al impedimento estérico. A continuación se muestran los resultados de los ensayos de expresión transitoria.

15

	Inductor menos	Inductor más	Veces de inducción
1 x S/1 x W2	1732	85126	49
2 x S/2 x W2	1529	95872	62
4 x S/4 x W2	2654	64105	24
(2 x S/2 x W2) x 2	483	9832	20
4 x W2/4 x S	2753	205826	74
1 x W2/1 x S	146	2690	18
2 x S/2 x D	191	15541	81
4 x S/4 x D	9775	100265	10
1 x D/1 x S	32	1246	38
4 x D/4 x S	6795	204115	30
2 x W2/ 2 x D	1762	32462	18
4 x W2/4 x D	22042	92875	4,2
4 x D/4 x W2	18857	276456	14
1 x D/1 x W2	295	4369	14

20 Añadir más copias de un elemento en una construcción compuesta aumenta a menudo el nivel absoluto de la expresión (por ejemplo 2 x W2/2 x D y 4 x W2/4 x D) pero disminuye a menudo las veces de inducción. En algunos casos incluso, el nivel absoluto de la expresión disminuye (por ejemplo, 2 x S/2 x W2 y 4 x S/4 x W2) y una comparación con (2 x S/2 x W2) x 2 sugiere que es debido al impedimento estérico ya que el número de copias de los elementos es el mismo, es justamente el orden lo que se cambia.

Ejemplo 6. La Secuencia E17 es capaz de mediar en la expresión génica inducida por inductor

25 Se aisló la secuencia E17 (TCAATATGTCAATGGTCAACATTCAAC; SEC ID N°: 15) procedente del promotor del gen Eli17 del perezil, que es conocido por reaccionar al tratamiento con inductor con la acumulación del transcrito (Somssich, Plant Mol. Biol. 12 (1989), 227-234). Recientemente se ha demostrado que el gen Eli17 reacciona muy rápida y transitoriamente al tratamiento con inductor y a la infección del patógeno. Esto no se había descrito nunca anteriormente

30 La secuencia del elemento monomérico usada es 5'-actagtTCAATATGTCAATGGTCAACATTCAACtctaga-3' con el elemento en letras mayúsculas y los extremos SpeI/XbaI en letras minúsculas. Se construyeron construcciones que contenían 1 y 2 copias de la Secuencia E17 así como un complemento inverso monomérico de la Secuencia E17 (Figura 4, construcciones B109, A109, y 18S102, respectivamente) y se sometieron a un ensayo de expresión transitoria como se ha descrito anteriormente. Tal como se muestra en la Figura 4, el monómero tiene una inducibilidad de 5 veces y el dímero 50 veces. En comparación con los otros elementos cis de la presente invención, la Secuencia E17 consiguió una inducción

moderada. Igualmente se sometió un tetrámero de la Secuencia E17 a ensayos transitorios (no se muestran los datos), que dieron como resultado una inducción de 5 a 20 veces de inducción tras el tratamiento del inductor. Sin embargo, no se puede comparar este resultado con los valores de inducción de las construcciones de la Secuencia E17 que se han mencionado anteriormente debido a la disminución de la calidad de los protoplastos de perejil usados. Presumiblemente, el tetrámeros de la Secuencia E17 media al menos una inducción elevada en tantas veces como el dímero respectivo.

De manera similar a los elementos *cis* del Ejemplo 4, la Secuencia E17 contiene 2 copias del motivo TGAC del núcleo de la Secuencia W, en orientación inversa (GTCA) como repetición en tándem separada por un separador de 3 pb. Se puede inferir la importancia de este motivo del núcleo de los experimentos de mutagénesis preliminares (Figura 4, construcciones C109, 17S102, y 15S102). Una delección de 1 pb en el motivo de la Secuencia W dio como resultado una pérdida completa de funciones en contraste a las delecciones en dos tipos diferentes que no tenían efecto en la inducibilidad. Con el fin de estrechar adicionalmente la estructura mínima capaz de mediar en la sensibilidad del estudio, los elementos de la Secuencia E17 diseccionados se ensayaron en los ensayos de expresión transitoria que se han descrito anteriormente. Se eliminó la Secuencia E17 inicial (SEC ID N°: 15) de extremo 5' en 6 pb, a partir del extremo 3' en 7 pb, y a partir de ambos extremos en 6 y 7 pb, respectivamente. Se ligó cada uno de estos oligonucleótidos en el sitio BamHI del vector MS23, que se cortó a continuación con la enzima de restricción y los salientes enromados, proporcionando un aumento de las construcciones promotoras H149, B175, C175 y D175 (Figura 5). Las construcciones promotoras mostraron diferencias remarcables con respecto a su sensibilidad al inductor. C175 y D175, que tenían el extremo 3' truncado, no mostraron inducción significativa tras el tratamiento del inductor. Por otra parte, B175 truncada proporcionó valores que fueron similares a los del elemento de la Secuencia E17 de 27 pb. De esta manera, también el elemento B175 de 21 pb (SEC ID N°: 16) es un elemento *cis* funcional en el sentido de la presente invención.

Además, la Secuencia E17 no es solo suficiente, sino también necesaria para prestar el promotor Eli17, o al menos una parte funcional del mismo de 445 pb que comprende dicho elemento naturalmente, su inducibilidad al inductor. Se podría mostrar esto en los ensayos de la expresión transitoria que se llevaron a cabo con una construcción MS23 que contenía el tramo de 445 pb que tenía el elemento de 27 pb eliminado. La pérdida completa resultante de la inducibilidad dependiente del inductor (véase la Figura 5) indica el papel crucial de la Secuencia E17 para el inductor y la regulación génica relacionada con la patogénesis en su entorno natural y que soporta además su aplicabilidad para conferir inducibilidad tras la estimulación o la patogénesis a un promotor quimérico de la presente invención.

Ejemplo 7: Los promotores quiméricos con distancias variables entre el elemento de la Secuencia E17 y el promotor mínimo son inducibles.

Con el fin de elucidar la posición óptima del elemento de la Secuencia E17 en el promotor quimérico, se ensayaron algunas construcciones con distancias variables al promotor mínimo de 35S (Figuras 6 y 7). Para este objetivo, se insertó la Secuencia E17 en diferentes sitios de restricción del polienlazante ms23. Tras la digestión del vector y el relleno de los salientes, se ligó el elemento *cis* enromado en el sitio respectivo en forma de monómero o como un dímero. Los ensayos transitorios se llevaron a cabo tal como se ha descrito anteriormente. Los resultados (Figura 7) indican una distancia óptima de la Secuencia E17 al extremo 5' del promotor mínimo de 40 a 60 pb (correspondiente a los sitios de restricción BamHI, ClaI, EcoRI). Se siguió observando una buena inducción para el sitio SapI en una distancia de 131 pb mientras que se obtuvo una respuesta más débil cuando se insertó la Secuencia E17 en el sitio Sall que tiene 5 pb en el lado 5' del promotor mínimo.

Ejemplo 8: Plantas transgénicas que transportan promotores quiméricos

Se ensayaron transformantes para la respuesta de los promotores sintéticos a patógenos. Se hicieron crecer cultivos de la bacteria *Pseudomonas* (cepas *Rpt2* o *Rpm1*) en medio B de King que contenía 30 µg/ml de kanamicina y 100 µg/ml de rifampicina. Se volvieron a suspender las bacterias en MgCl₂ 10 mM a una DO₆₀₀ de 0,2 y se infiltraron en hojas mediante una jeringa. Se llevaron a cabo controles usando solo MgCl₂ 10 mM. Después de 6 horas, se retiraron las hojas de las plantas y se tiñeron para ver la actividad de GUS usando X-Gluc. El modelo de expresión observado en las plantas transgénicas que contenían el gen marcador GUS bajo el control del promotor quimérico de la invención desveló la expresión en el tejido infectado por *Pseudomonas syringae* y en algunos casos también la expresión local en tejidos cicatrizados.

Con respecto a la Secuencia E17, se utilizó un promotor quimérico que comprendía el dímero de este elemento (A109, Figura 4) y el promotor mínimo de 35S para la transformación de plantas de *Arabidopsis*. Se infiltraron plantas de semillero y hojas de dos o tres semanas con una disolución acuosa 10 µM del inductor bacteriano Flagellin 22 mediante una jeringa (Felix, Plant Journal 18 (1999) 262-276; Gómez-Gómez, Plant Journal 18 (1999) 277-284) lo que condujo a una activación clara de GUS. Se observó también una elevada inducción tras la infección por un hongo (*Peronospora parasitica*) y un patógeno bacteriano (*Pseudomonas syringae*)

Se llevaron a cabo infecciones de *Peronospora* de acuerdo con Dangl y col. (definición genética de loci implicada en las interacciones de Arabidopsis-patógeno. En: Methods in Arabidopsis Research (Koncz, Chua y Schell, eds), Singapur. World Scientific Publishing Co. (1992), 393-418) o Koch (Plant Cell 2 (1990), 437-446).

Por otra parte, el estrés mecánico inducido por ejemplo por la cicatrización no activa el promotor quimérico. Y, sorprendentemente, no solamente se observó la mera expresión y la activación del gen indicador en la raíz, que es el órgano en el que el gen Eli17 se expresa predominantemente en el perejil. De esta manera, la especificidad del órgano parece no estar mediada por la Secuencia E17.

5 Además, se llevaron a cabo estudios de expresión, los resultados de los cuales se resumen en la Figura 8. Se evaluaron 7 tetrámeros diferentes de los elementos *cis* para su expresión de fondo en las partes aéreas y en las raíces, respectivamente, y para su inducibilidad tras la cicatrización, la senescencia, la infección por *Peronospora* incompatible y compatible. Se pueden extraer algunas conclusiones importantes de estos experimentos.

10 Todos estos promotores quiméricos que son inducibles por cepas incompatibles de *Peronospora* parasítica son también inducibles por cepas compatibles. Esto es una importante observación con respecto a la presente invención y muestra que estas construcciones podrían ser inducibles por todos los potenciales patógenos y no solo aquellos para los cuales ya hay un sistema de defensa funcional operativo en la planta.

15 Aunque muchas construcciones muestran la expresión inducida alrededor de los sitios de la infección, las características de la expresión son diferentes con, por ejemplo, algunas Secuencias W (por ejemplo W2) que se expresan en una zona alrededor del sitio de la infección mientras que otras se expresan en el propio sitio de la infección. Esto es un hallazgo inesperado que muestra que en un tipo de elementos que actúan en *cis* (Secuencias W: o Secuencias GCC/S) existen diferencias en el exterior de la secuencia de la secuencia del núcleo que conducen a diferencias en la funcionalidad.

20 Todos los elementos que actúan en *cis* de la presente invención muestran expresión inducible en una planta heteróloga (*Arabidopsis*). Ya que estos elementos provienen del perejil, la patata y el trigo, esto muestra claramente que estos elementos podrían ser funcionales en todas las plantas. Esta funcionalidad general de dichos elementos es una importante nueva observación.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.

25 <120> Promotores quiméricos capaces de mediar la expresión génica local en plantas tras una infección por patógenos y usos de los mismos

<130> C 1078 PCT

<140>

<141>

<160> 17

30 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 7

<212> ADN

<213> *Petroselinum crispum*

35 <400> 1

tttgacc

7

<210> 2

<211> 30

<212> ADN

40 <213> *Petroselinum crispum*

<400> 2

cacacttaat ttgaccgagt aacattcgcc

30

	<210> 3	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Petroselinum crispum	
5	<400> 3	
	ttcagccnnn nnnnttgacc	20
	<210> 4	
	<211> 29	
	<212> ADN	
10	<213> Petroselinum crispum	
	<400> 4	
	ttattcagcc atcaaagttg accaataat	29
	<210> 5	
	<211> 14	
15	<212> ADN	
	<213> Triticum aestivum	
	<400> 5	
	tgacnnnnnn gtca	14
	<210> 6	
20	<211> 14	
	<212> ADN	
	<213> Triticum aestivum	
	<400> 6	
	tgacttgacc gtca	14
25	<210> 7	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Petroselinum crispum	
	<400> 7	
30	cagccaccaa agaggacca gaat	24
	<210> 8	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Solanum tuberosum	

	<400> 8		
	gccaccnnt ttgacc		16
	<210> 9		
	<211> 25		
5	<212> ADN		
	<213> Solanum tuberosum		
	<400> 9		
	ttctagccac cagattgac caaac		25
	<210> 10		
10	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Triticum aestivum		
	<400> 10		
	ggattgactt gaccgtcatc ggct		24
15	<210> 11		
	<211> 31		
	<212> ADN		
	<213> Petroselinum crispum		
	<400> 11		
20	tacaattcaa acattgttca aacaaggaac c		31
	<210> 12		
	<211> 15		
	<212> ADN		
	<213> Petroselinum crispum		
25	<400> 12		
	agttgaaatt caata		15
	<210> 13		
	<211> 30		
	<212> ADN		
30	<213> Petroselinum crispum		
	<400> 13		
	agttgaaatt caataagttg aaattcaata		30
	<210> 14		
	<211> 10		

	<212> ADN	
	<213> Petroselinum crispum	
	<400> 14	
	agccaccana	10
5	<210> 15	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Petroselinum crispum	
	<400> 15	
10	tcaatatgtc aatgggtcaac attcaac	27
	<210> 16	
	<211> 11	
	<212> ADN	
	<213> Petroselinum crispum	
15	<400> 16	
	tgtcaatggt caacattcaa c	21
	<210> 17	
	<211> 4299	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sintética, no de origen natural	
	<400> 17	

```

aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccttatt tgtttatttt tctaaataca 60
ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa 120
aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt ttgcggcatt 180
ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca 240
gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag 300
ttttcgcccc gaagaacggt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc tatgtggcgc 360
ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggg cgccgcatac actattctca 420
gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt 480
aagagaatta tgcagtgctg ccataacat gatgataac actgcccga acttacttct 540
gacaacgacg ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt 600
aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga 660
caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact 720
tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcgataaag ttgcaggacc 780
acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccgggtga 840
gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggcccagat ggtaagccct cccgtatcgt 900
agtatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga 960
gataggtgcc tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact 1020
ttagattgat ttaaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga 1080
taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccgt 1140
agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca 1200
aacaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct 1260
ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtgtg 1320
gccgtagtta ggcaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct 1380
aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttgactc 1440
aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt cgtgcacaca 1500
gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agcattgaga 1560
aagcggccag cttcccgaag ggagaaaggg ggacaggat ccggtaagcg gcagggtcgg 1620
aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatctt atagtcctgt 1680
cgggtttcgc caectctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag 1740
cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt gctggccttt 1800
tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt 1860

```

tgagtgagct	gataccgctc	gccgcagccg	aacgaccgag	cgcagcgagt	cagtgagcga	1920
ggaagcggaa	gagcgcccaa	tacgcaaacc	gcctctcccc	gcgcggtggc	cgattcatta	1980
atgcagcggg	tcaagcttgg	atccatcgat	gaattcggcg	cgccactagt	gccggcctgc	2040
agtctagagt	cgaccgcaag	acccttcttc	tatataagga	agttcatttc	atttggagag	2100
gacacgctcg	agtggccacc	atgggtccgtc	ctgtagaaac	cccaaccctg	gaaatcaaaa	2160
aactcgacgg	cctgtgggca	ttcagtctgg	atcgcgaaaa	ctgtggaatt	gatcagcggt	2220
ggtgggaaag	cgcgttacaa	gaaagccggg	caattgctgt	gccaggcagt	tttaacgatc	2280
agttcgccga	tgcagatatt	cgtaattatg	cgggcaacgt	ctgggatcag	cgcgaagtct	2340
ttataccgaa	aggttgggca	ggccagcgta	tcgtgctgcy	tttcgatgcy	gtcactcatt	2400
acggcaaagt	gtgggtcaat	aatcaggaag	tgatggagca	tcagggcggc	tatacgccat	2460
ttgaagccga	tgtcacgccc	tatgttattg	ccgggaaaag	tgtacgtatc	accgtttgtg	2520
tgaacaacga	actgaactgg	cagactatcc	cgccgggaat	ggtgattacc	gacgaaaacg	2580
gcaagaaaaa	gcagtcttac	ttccatgatt	tctttaacta	tgccggaatc	catcgcagcg	2640
taatgtctta	caccacgccc	aacacctggg	tggacgatat	caccgtggty	agcagatgcy	2700
cgcaagactg	taaccacgcy	tctgttgact	ggcaggtggt	ggccaatggt	gatgtcagcy	2760
ttgaactgcy	tgatgcygat	caacaggtgg	ttgcaactgg	acaaggcact	agcgggactt	2820
tgcaagtggg	gaatccgcac	ctctggcaac	cgggtgaagg	tatctctat	gaactgtgcy	2880
tcacagccaa	aagccagaca	gagtggtgata	tctaccgct	tcgcytcggc	atccggtcag	2940
tgccagtgaa	gggccaacag	ttcctgatta	accacaaacc	gttctacttt	actggctttg	3000
gtcgtcatga	agatgcggac	ttgcgtggca	aaggattcga	taacgtgctg	atggtgcagcy	3060
accacgcatt	aatggaactgg	attggggcca	actcctaccg	tacctcgcac	tacccttacg	3120
ctgaagagat	gctcgactgg	gcagatgaac	atggcatcgt	ggtgattgat	gaaactgctg	3180
ctgtcggctt	taacctctct	ttaggcattg	gtttcgaagc	gggcaacaag	ccgaaagaac	3240
tgtacagcga	agaggcagtc	aacggggaaa	ctcagcaagc	gcacttacag	gcgattaaag	3300
agctgatagc	gcgtgacaaa	aaccacccaa	gcgtggatgat	gtggagtatt	gccaacgaac	3360
cggatacccg	tccgcaaggt	gcacgggaa	atttcgcgcc	actggcggaa	gcaacgcgta	3420
aactcgaccc	gacgcgtccg	atcacctgcy	tcaatgtaat	gttctgcgac	gctcacaccg	3480
ataccatcag	cgatctcttt	gatgtgctgt	gcctgaaccg	ttattacgga	tggtatgtcc	3540
aaagcggcga	tttggaaacg	gcagagaagg	tactggaaaa	agaacttctg	gcctggcagg	3600
agaaaactgca	tcagccgatt	atcatcaccg	aatacggcgt	ggatacgtta	gccgggctgc	3660
actcaatgta	caccgacatg	tggagtgaag	agtatcagtg	tgcatggctg	gatatgtatc	3720
accgcgtctt	tgatcgcgctc	agcgcctgcy	tcggtgaaca	ggtatggaat	ttcgccgatt	3780
ttgcgacctc	gcaaggcata	ttgcgcgttg	gcggtaaaca	gaaagggatc	ttcactcgcg	3840
accgcaaacc	gaagtccggc	gcttttctgc	tgcaaaaacg	ctggactggc	atgaacttcg	3900
gtgaaaaacc	gcagcagggg	ggcaacaat	gaatcaaca	ctctcctggc	gcaccatcgt	3960
cgctacagcc	tccgggaattg	ctaccgagct	cccgggtacc	tgatcatgag	taattagctc	4020
gaatttcccc	gatcgtttcaa	acatttggca	ataaagttc	ttaagattga	atcctgttgc	4080
cggctcttgc	atgattatca	tataatttct	gttgaattac	gtaagcatg	taataattaa	4140
catgtaatgc	atgacgttat	ttatgagatg	ggtttttatg	attagagtcc	cgcaattata	4200
catttaatac	cgcatagaaa	acaaaatata	gcgcgcaaac	taggataaat	tatcgcgcgc	4260
ggtgtcatct	atgttactag	atcgggaatt	agatctgct			4299

REIVINDICACIONES

- 1.- Un promotor quimérico capaz de mediar en la expresión génica local de plantas tras una infección por patógenos que comprende
- 5 (i) al menos un elemento que actúa en *cis* lo suficiente para dirigir una expresión específica del inductor que comprende la secuencia de nucleótidos de las SEC ID N°: 3 o 4
- (ii) al menos un elemento que actúa en *cis* lo suficiente para dirigir una expresión específica del inductor que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEC ID N°: 3 a 16, y
- (iii) un promotor mínimo.
- 10 2.- El promotor quimérico de la reivindicación 1, en el que una región separadora compuesta de 4 a 10 pares de bases separa al menos dos de los elementos que actúan en *cis*.
- 3.- El promotor quimérico de la reivindicación 1 o 2 que comprende además un elemento que actúa en *cis* que tiene la secuencia de nucleótidos de las SEC ID N°: 1 o 2.
- 4.- El promotor quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo dicho promotor quimérico de plantas formas homo- y/o heteromultiméricas de dicho(s) elemento(s) que actúa(n) en *cis*(s).
- 15 5.- El promotor quimérico de la reivindicación 4, en el que dicha forma multimérica es un dímero o tetrámero.
- 6.- El promotor quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el promotor mínimo procede del promotor CaMV35S, del promotor CHS, del promotor PR1 o del promotor hcbt2.
- 7.- El promotor quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la distancia entre dicho elemento que actúa en *cis* y dicho promotor mínimo es de 12 a 300 pares de bases, más preferiblemente de 25 a 70 pares de bases, y lo más preferiblemente de 40 a 60 pares de bases.
- 20 8.- El promotor quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que al menos dos de dichas formas multiméricas están separadas por un separador de entre aproximadamente 50 y 1000 pares de bases.
- 9.- El promotor quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la inducción de la expresión génica tras el tratamiento con el inductor o la infección por patógenos es al menos de 15 veces.
- 25 10.- Un gen recombinante que comprende el promotor quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 11.- El gen recombinante de la reivindicación 10, en el que el promotor quimérico está unido de manera operativa a una secuencia de ADN heterólogo.
- 12.- El gen recombinante de la reivindicación 10 o 11, en el que al menos uno de dichos elementos que actúan en *cis* está ubicado en la región 5' o 3' no traducida o en un intrón del gen recombinante.
- 30 13.- El gen recombinante de la reivindicación 11 o 12, en el que dicha secuencia de ADN heterólogo codifica un (poli) péptido, proteína citotóxica, anticuerpo, ARN antisentido, ARN de sentido directo, ribozima, factor de transcripción, proteasa, nucleasa, lipasa, o polimerasa.
- 14.- Un vector que comprende el promotor quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el gen recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13.
- 35 15.- Un procedimiento para producir plantas transgénicas, células vegetales o tejido vegetal que comprende la introducción de un promotor quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, un gen recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 o el vector de la reivindicación 14 en el genoma de dicha planta, célula vegetal o tejido.
- 40 16.- Células vegetales que comprenden un promotor quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, el gen recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 o el vector de la reivindicación 14 o que se puedan obtener mediante el procedimiento de la reivindicación 15.
17. Una planta o tejido vegetal transgénico que comprende células vegetales de la reivindicación 16.
- 18.- La planta transgénica de la reivindicación 17, que en presencia del promotor quimérico o el gen recombinante ha conseguido resistencia o ha mejorado la resistencia contra un patógeno al que es susceptible la planta natural correspondiente.
- 45 19. Partes cosechables de una planta transgénica de la reivindicación 17 o 18 que comprende células vegetales de la reivindicación 16.
20. Material de propagación de una planta transgénica de la reivindicación 17 o 18 que comprende células vegetales de la reivindicación 16.

21.- Una combinación de elementos que actúan en *cis* como se han definido en una cualquiera de la reivindicaciones 1-3 o una forma multimérica de uno cualquiera de los definidos de las reivindicaciones 1-3.

22.- Un procedimiento para identificar un activador o inhibidor de genes expresados específicamente en plantas tras una infección por patógenos que comprende las etapas de:

5 (a) proporcionar una planta, célula vegetal, o tejido vegetal que comprende una molécula de ADN recombinante que comprende un sistema de lectura unido operativamente al promotor quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9;

(b) cultivar dicha célula o tejido vegetal o mantener dicha planta en presencia de un compuesto o de una muestra que comprende una pluralidad de compuestos en condiciones que permitan la expresión de dicho sistema de lectura;

10 (c) identificar o verificar una muestra y un compuesto, respectivamente, que conduzca a la supresión o activación y/o potenciación de la expresión de dicho sistema de lectura en dicha planta, célula vegetal, o tejido vegetal.

23. El procedimiento de la reivindicación 22 que comprende además la etapa de:

(d) subdividir las muestras identificadas en la etapa (c) y repetir las etapas (a) a (c) una o más veces.

24.- El procedimiento de la reivindicación 22 o 23 que comprende además la etapa de:

15 (e) identificar y/o aislar a partir de la muestra identificada el compuesto responsable de dicha supresión o activación y/o potenciación de la expresión de dicho sistema de lectura en dicha planta, célula vegetal, o tejido vegetal.

25.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, en el que

(a) dicha molécula de ADN recombinante es un gen recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 o un vector de la reivindicación 14;

20 (b) dicha célula vegetal es una célula vegetal de la reivindicación 16;

(c) dicho tejido vegetal es un tejido vegetal de la reivindicación 17, o

(d) dicha planta es una planta de la reivindicación 17 o 18.

26.- Una composición de diagnóstico que comprende un promotor quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, el gen recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, o el vector de la reivindicación 14, y opcionalmente medios de detección adecuados.

25

27.- Un kit que comprende un promotor quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, el gen recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, o el vector de la reivindicación 14.

28.- Uso del elemento que actúa en *cis* de la reivindicación 21, un promotor quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, el gen recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 y/o el vector de la reivindicación 14 para la producción de plantas resistentes a patógenos.

30

29.- Uso del elemento que actúa en *cis* de la reivindicación 21, el promotor quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, un gen recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, un vector de la reivindicación 14, la célula vegetal de la reivindicación 16, el tejido vegetal de la reivindicación 17, o la planta de la reivindicación 17 o 18 para identificar y/o producir compuestos capaces de conferir resistencia inducida a un patógeno en una planta.

35

30.- Un procedimiento para conseguir que un gen responda a patógenos que comprende insertar el elemento que actúa en *cis* de la reivindicación 21 en el promotor de dicho gen.

31.- Un procedimiento para preparar un promotor capaz de mediar en la expresión génica local en plantas tras una infección por patógenos que comprende unir operativamente el elemento que actúa en *cis* de la reivindicación 21 a una secuencia de inicio de la transcripción de un promotor.

40

32.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 30 a 31, que comprende además eliminar los elementos que actúan en *cis* no específicos del promotor.

33.- El promotor que se puede obtener de acuerdo con el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 32.

Fig. 1

Mapa de restricción del plásmido ms23

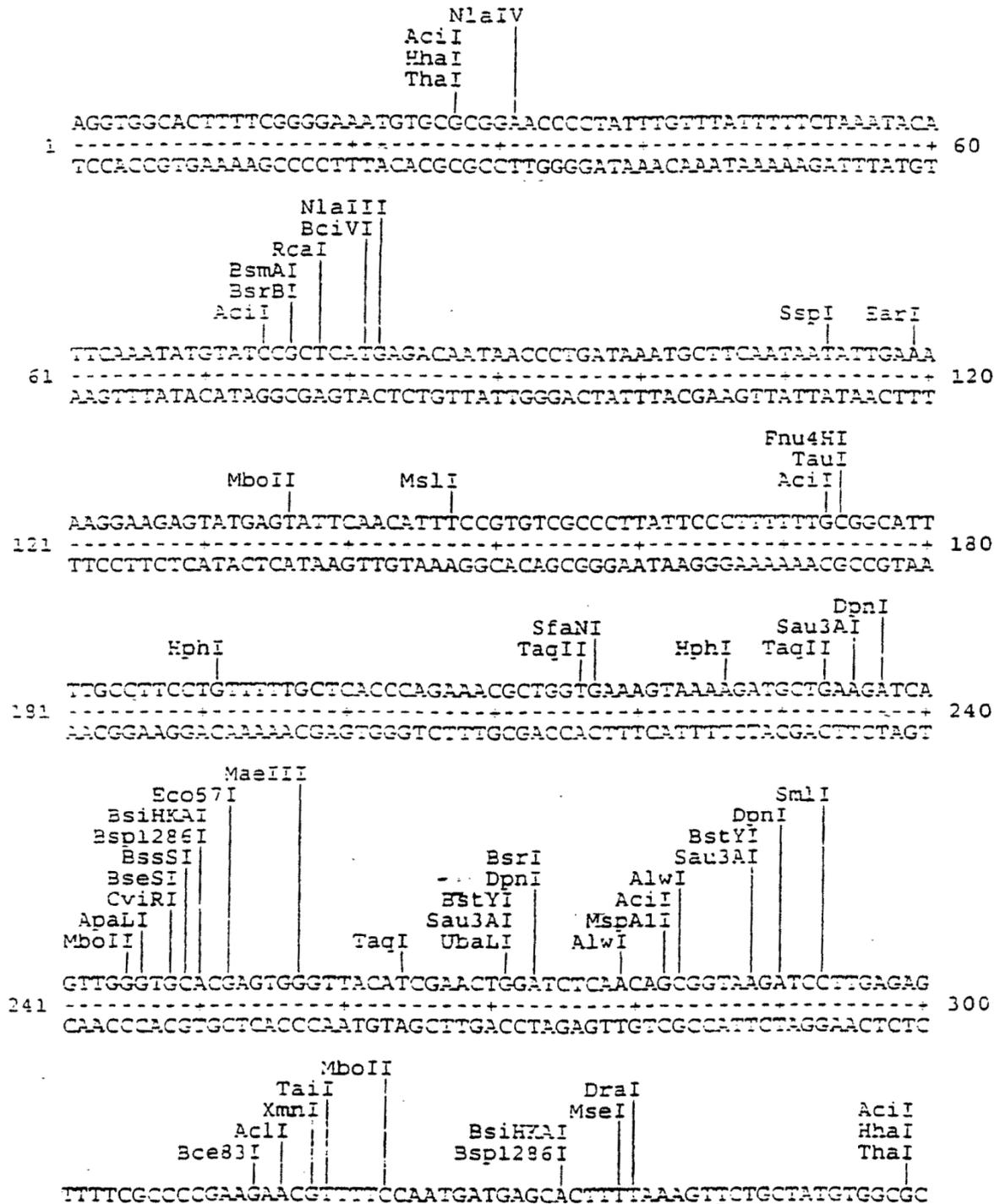


Fig. 1 (cont.)

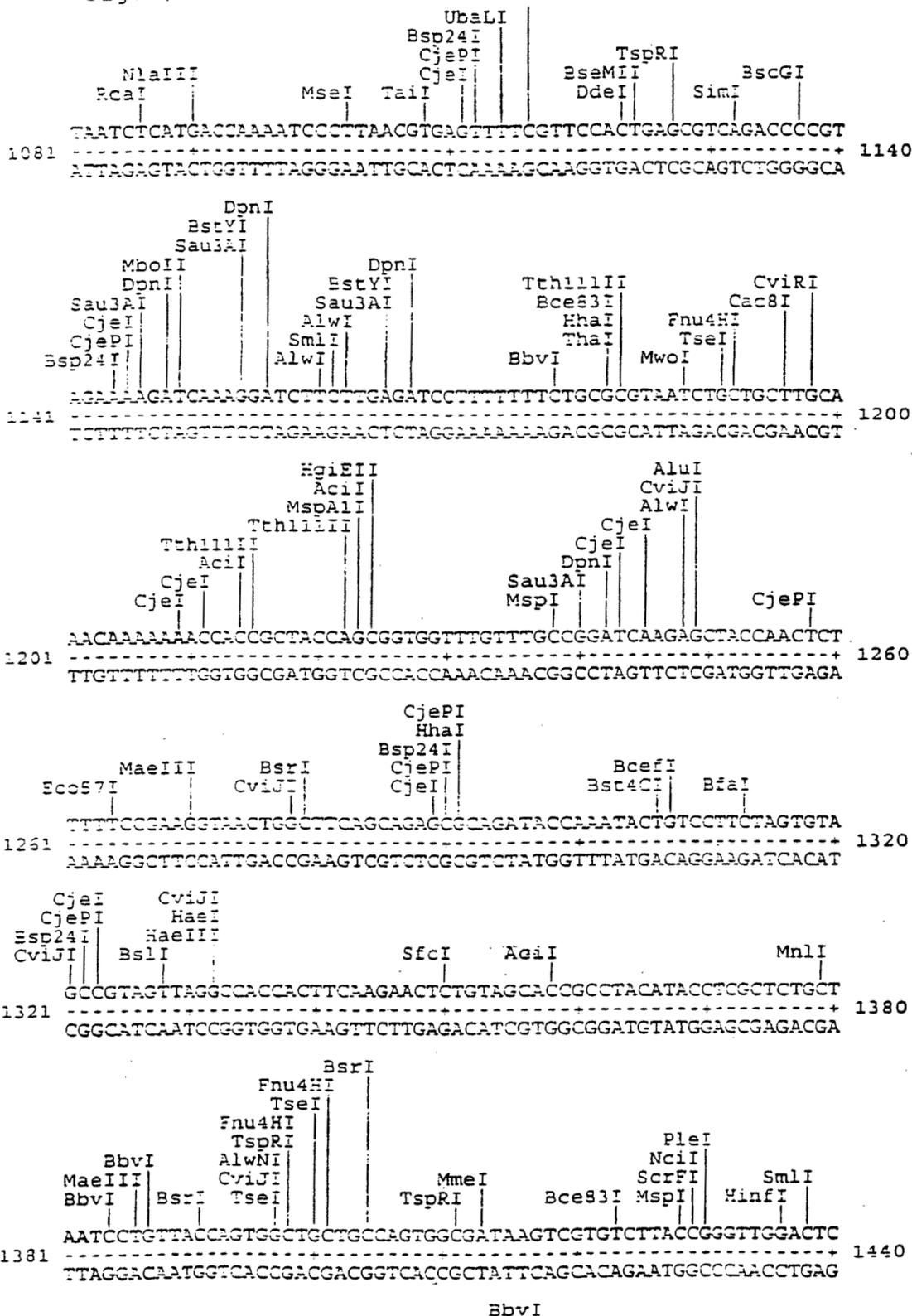


Fig. 1 (cont.)

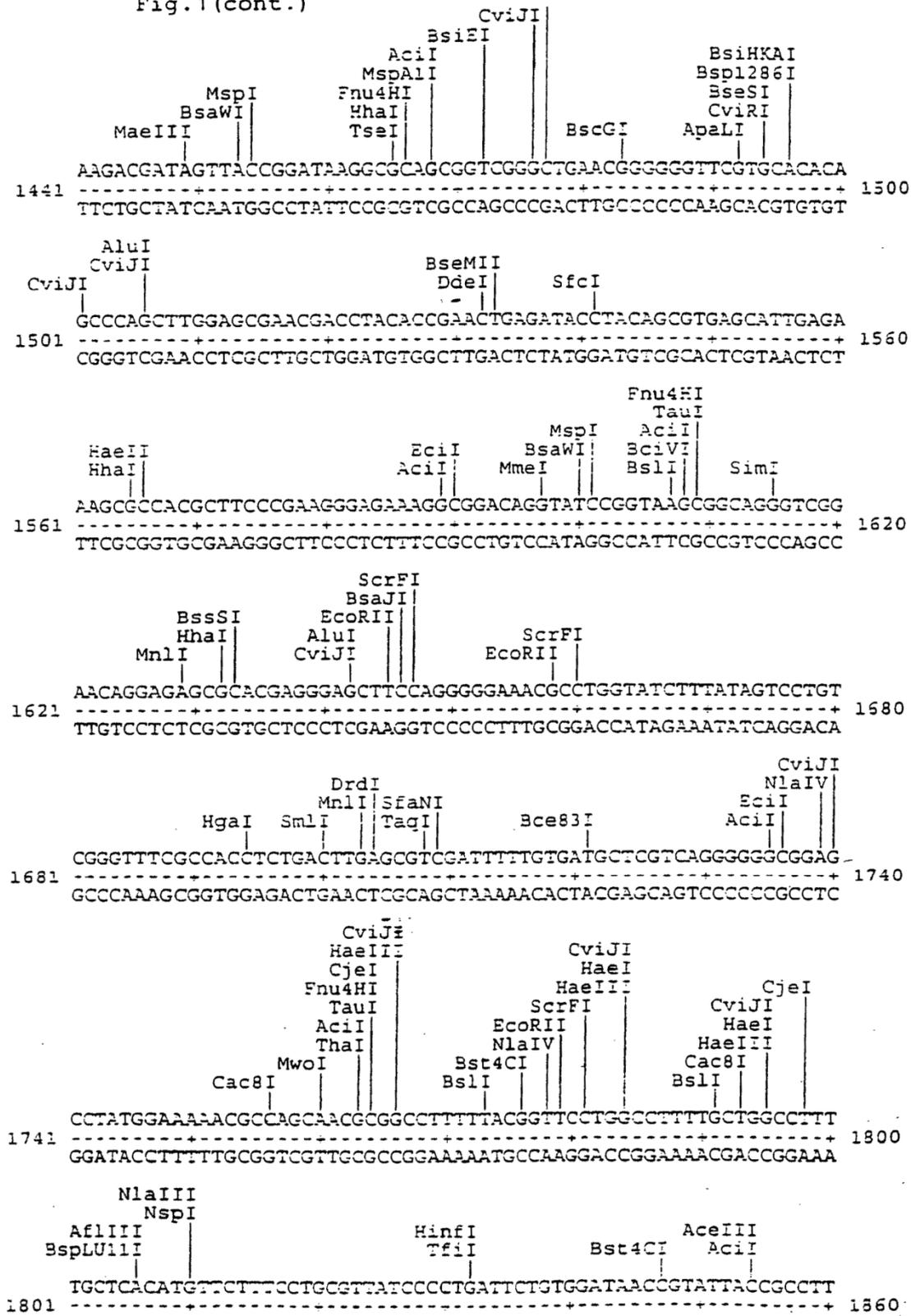


Fig.1 (cont.)

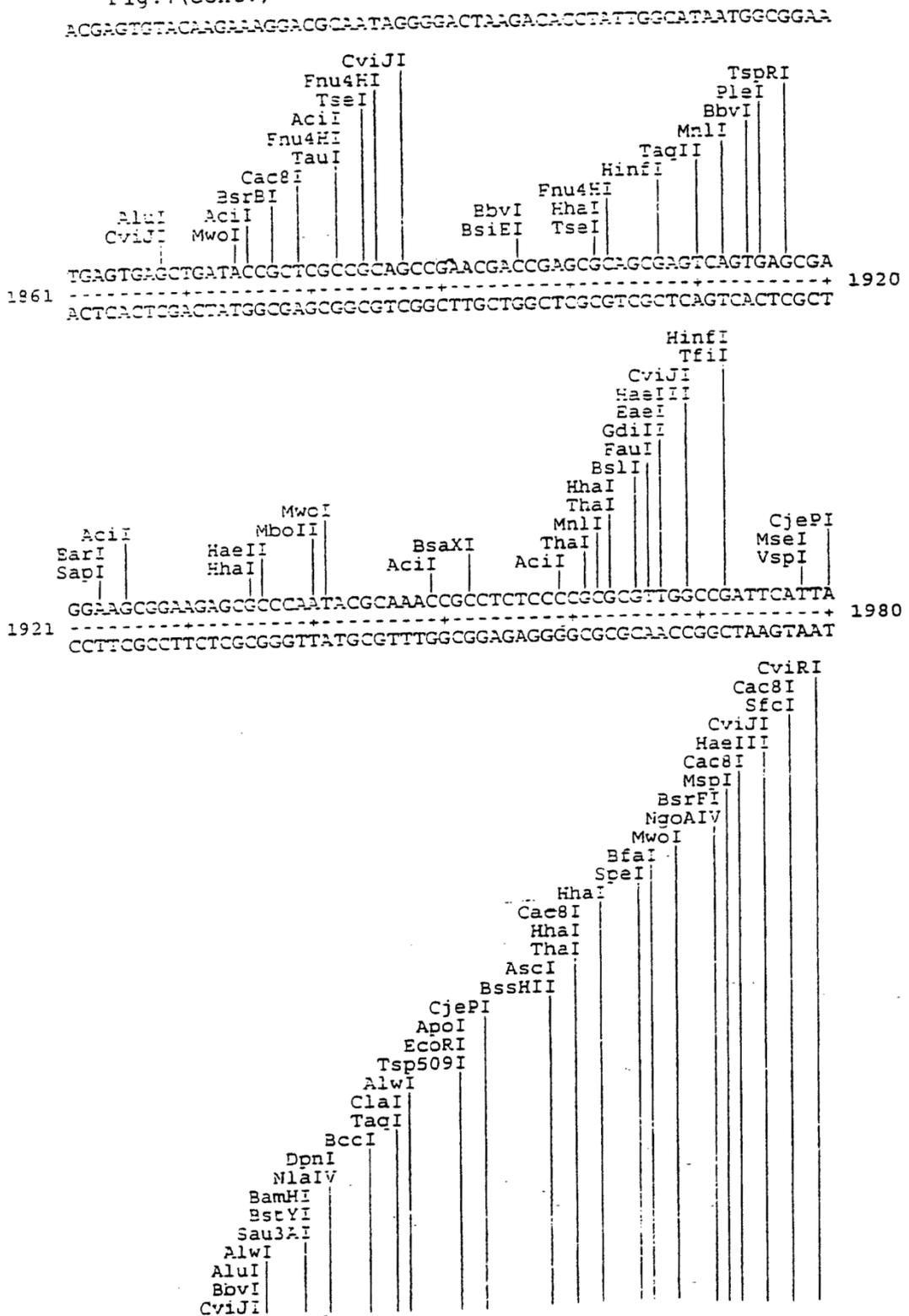


Fig. 1 (cont.)

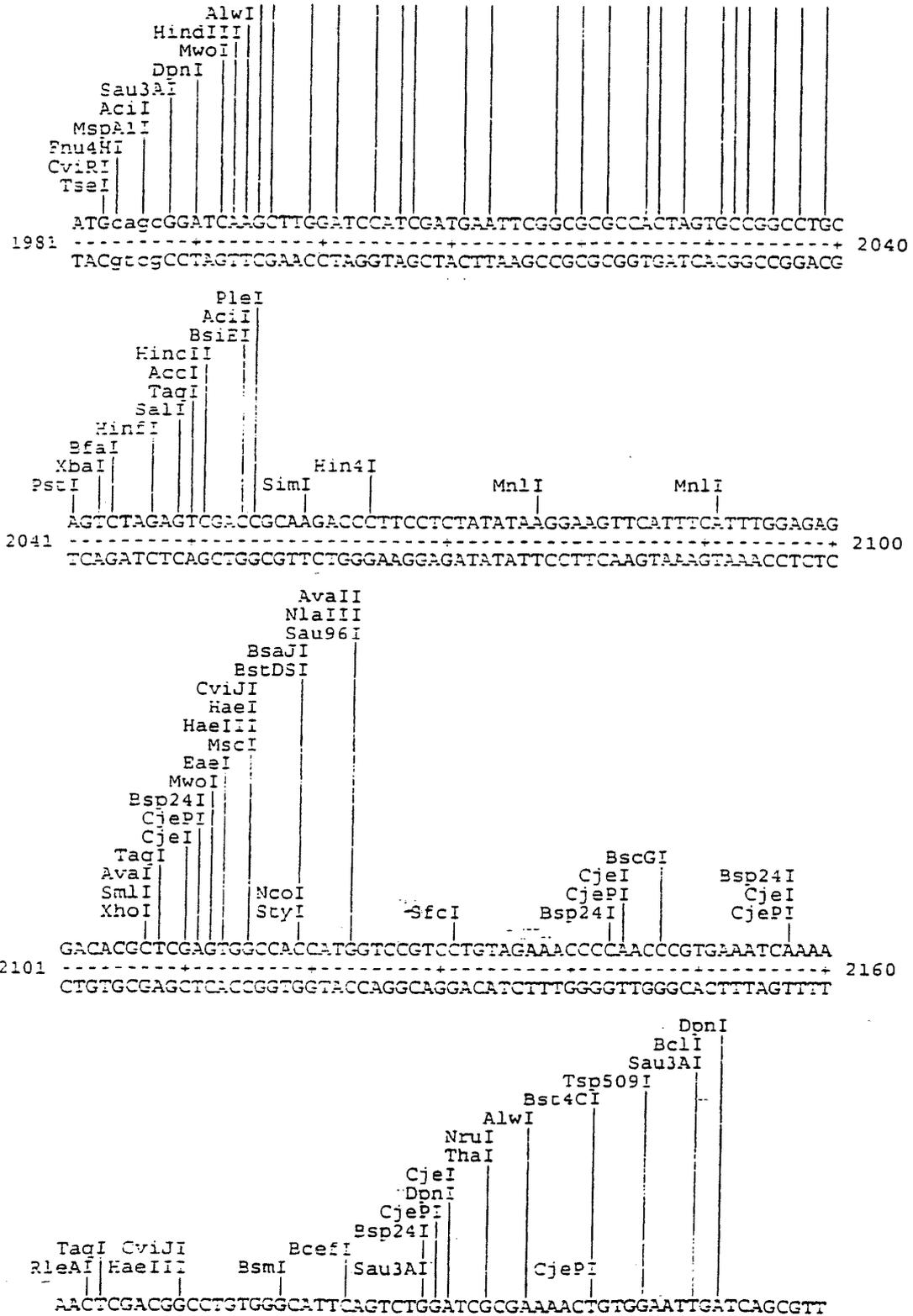


Fig.1 (cont.)

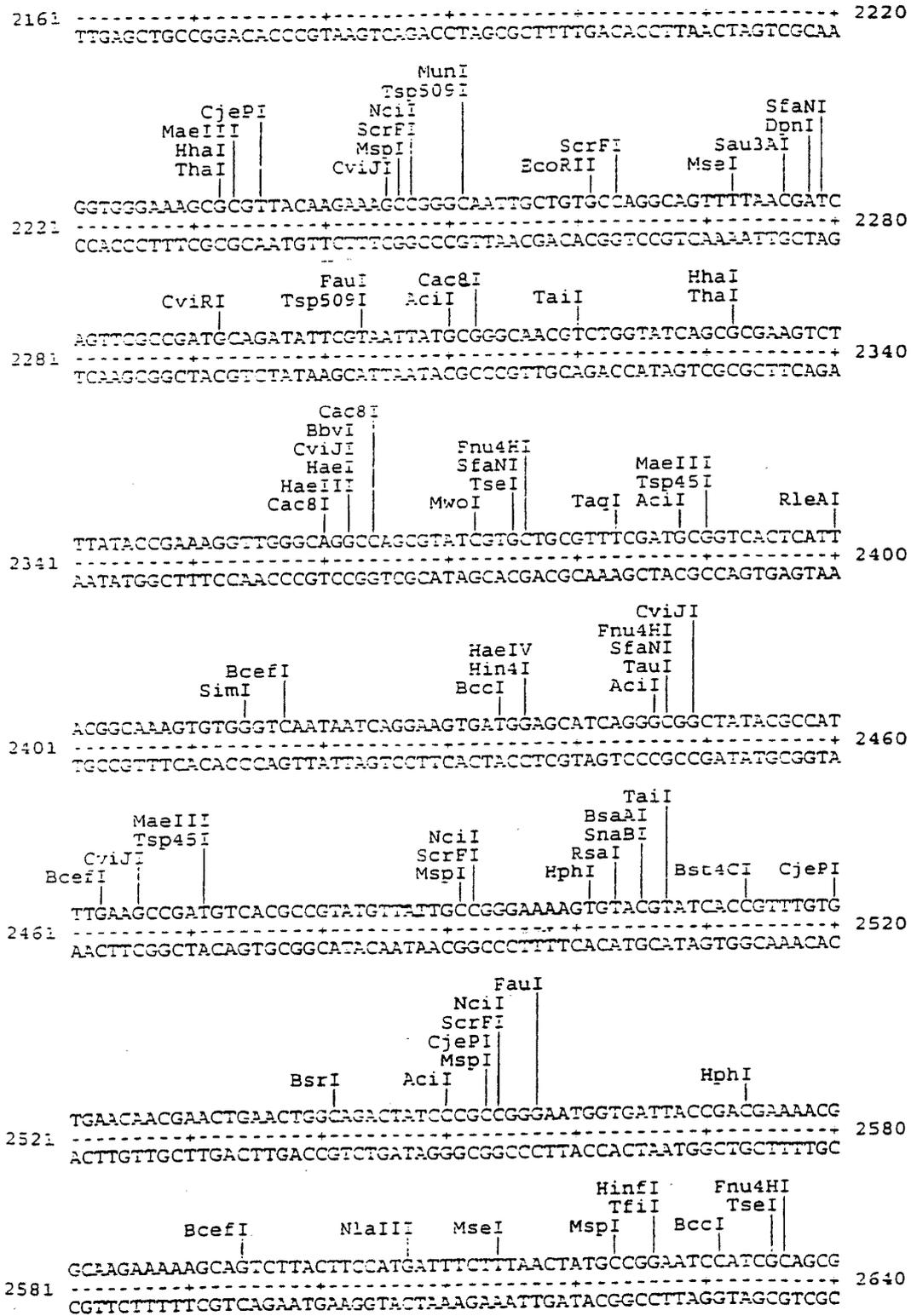


Fig.1 (cont.)

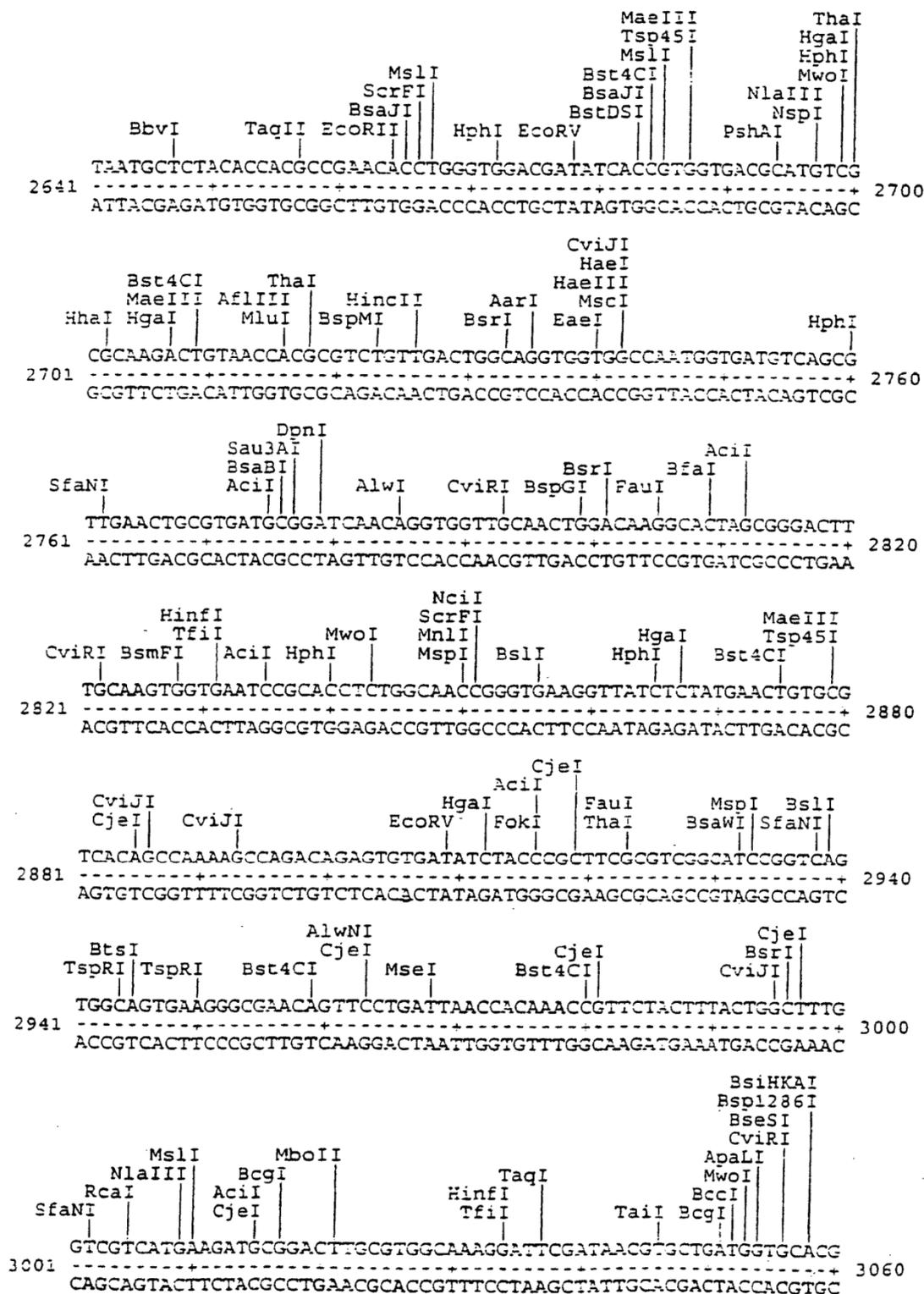


Fig.1(cont.)

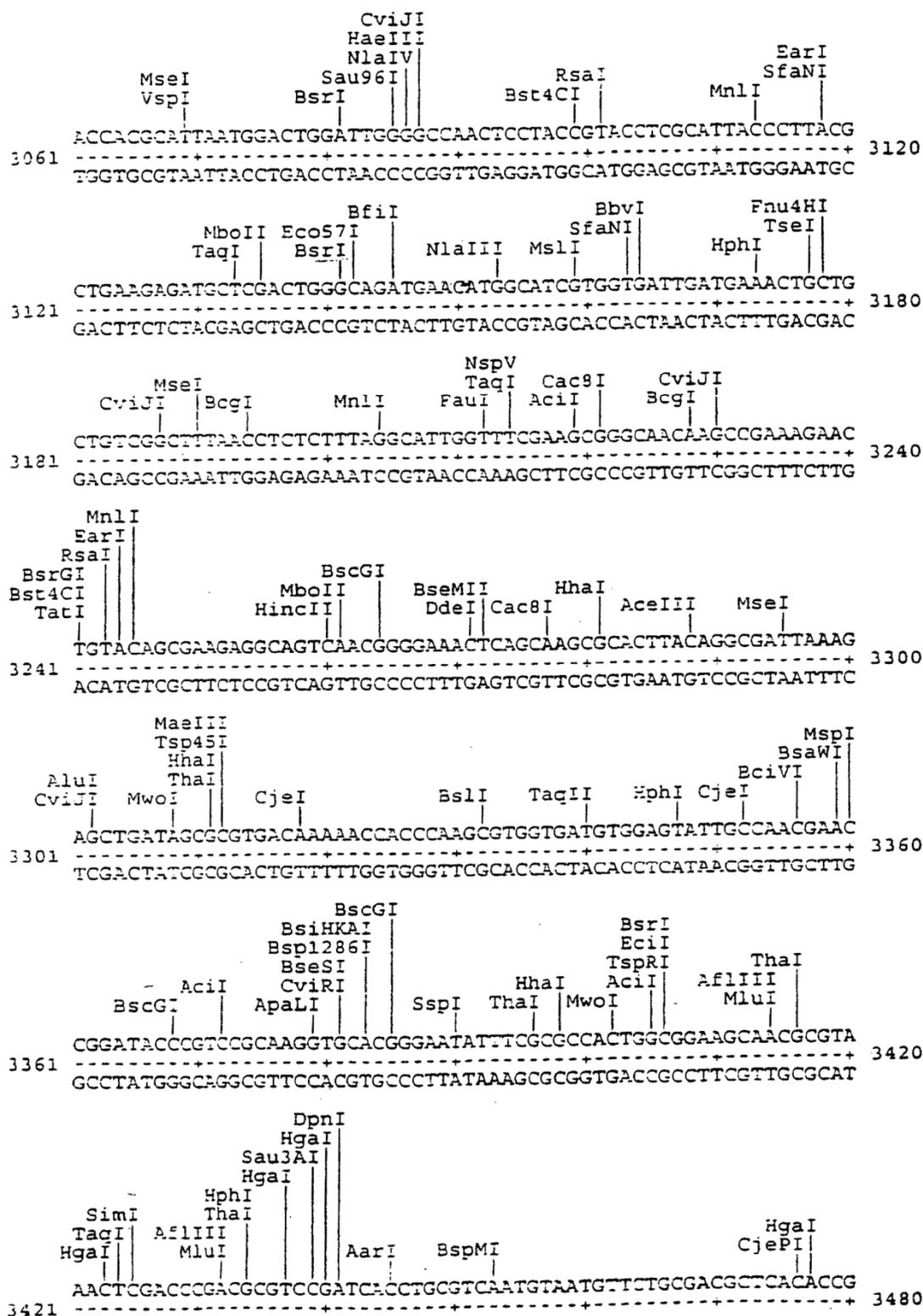


Fig.1 (cont.)

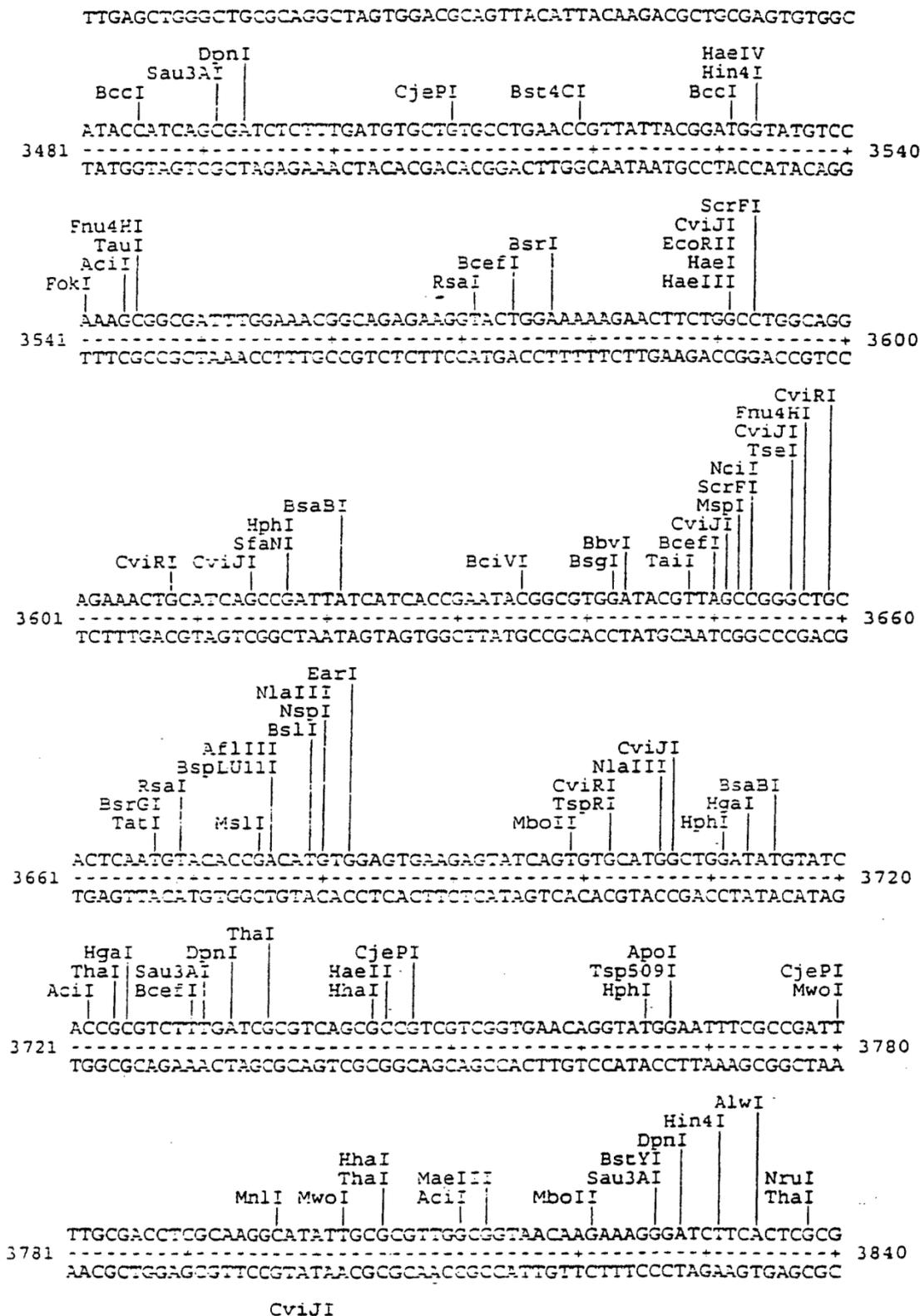


Fig.1 (cont.)

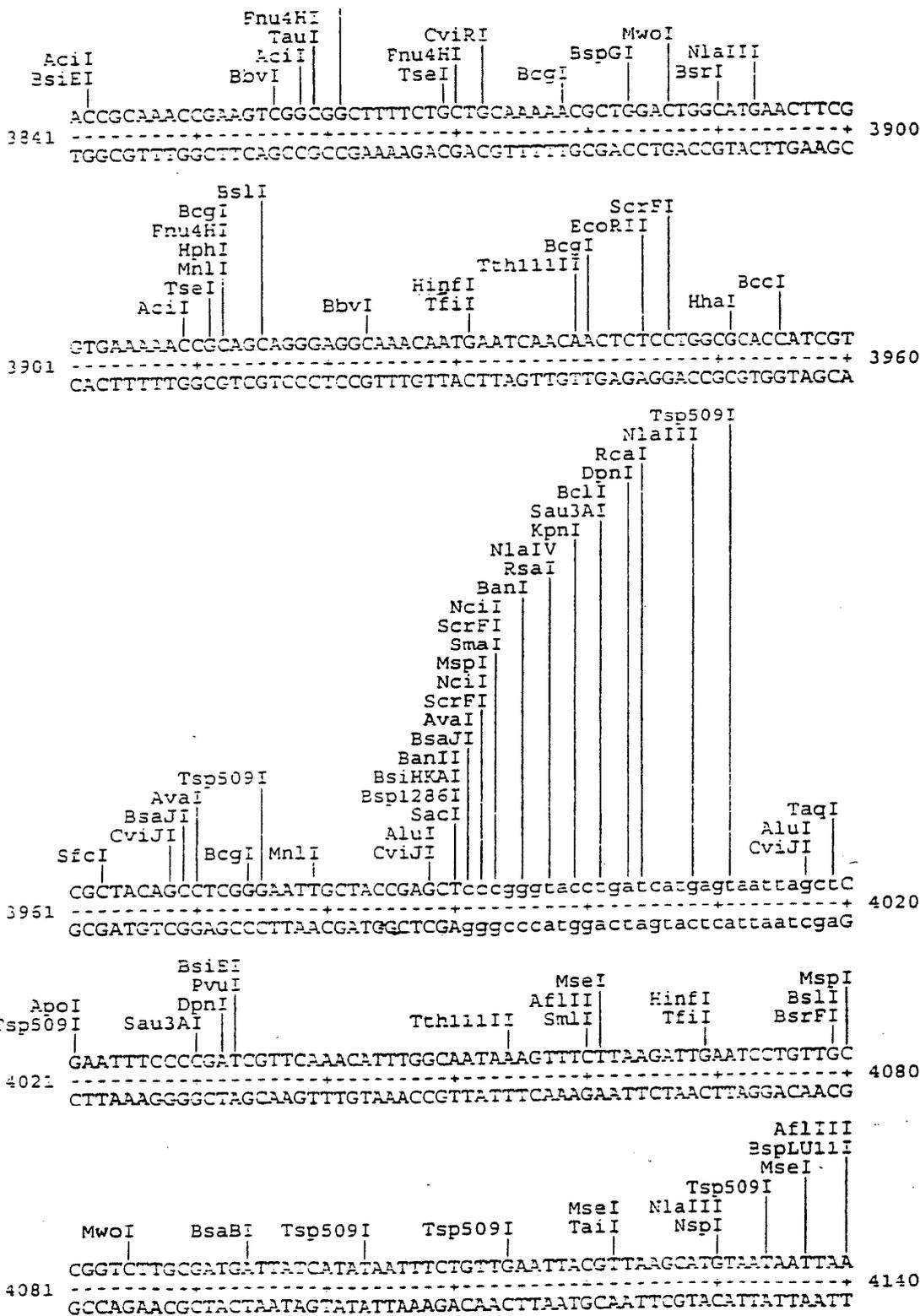
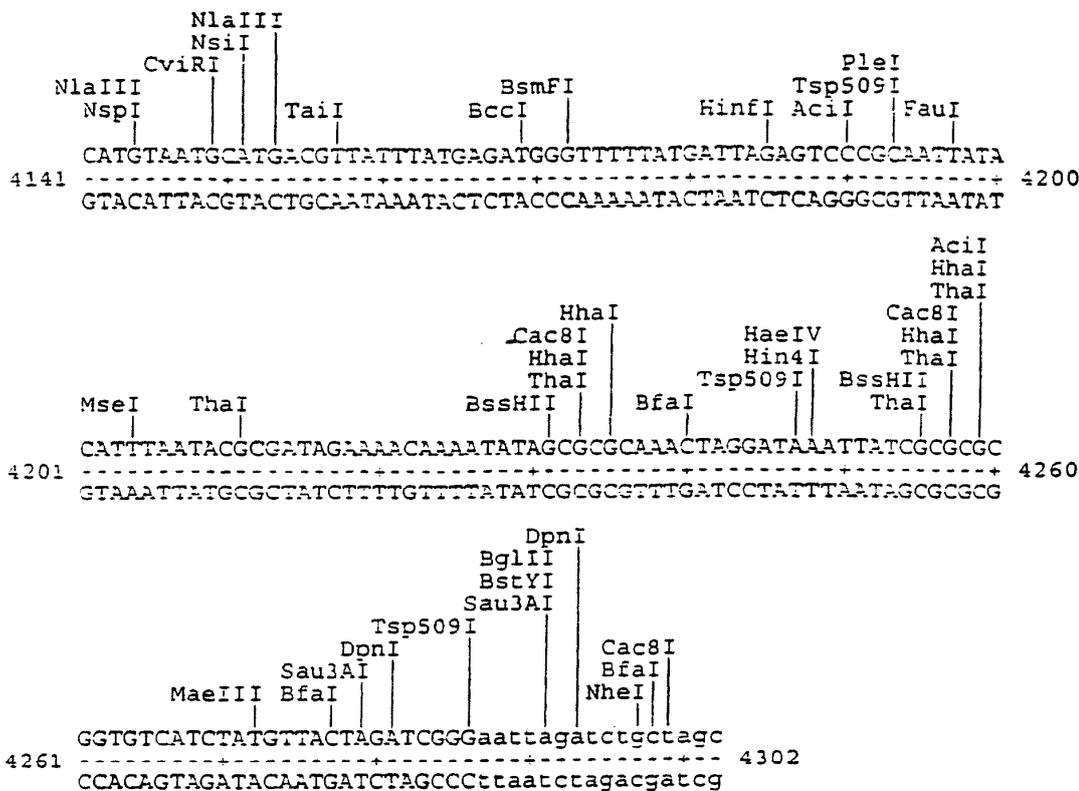


Fig. 1 (cont.)



Enzimas que cortan :

AarI	AccI	AceIII	AciI	AclI	AflII	AflIII	AhdI
AluI	AlwI	AlwNI	ApaLI	ApoI	AscI	AvaI	AvaII
BamHI	BanI	BanII	BbvI	BccI	Bce83I	BcefI	BcgI
BciVI	BclI	BfaI	BfiI	BglI	BglII	BpmI	BsaI
BsaAI	BsaBI	BsaHI	BsaJI	BsaWI	BsaXI	BscGI	BseMII
BseSI	BsgI	BsiEI	BsiHKAI	BslI	BsmI	BsmAI	BsmFI
Bsp24I	Bsp1286I	BspGI	BspLU11I	BspMI	BsrI	BsrBI	BsrDI
BsrFI	BsrGI	BssHII	BssSI	Bst4CI	BstDSI	BstYI	BtsI
Cac8I	CjeI	CjePI	Clal	CviJI	CviRI	DdeI	DpnI
DraI	DrdI	EaeI	EarI	EciI	Eco57I	EcoRI	EcoRII
EcoRV	FauI	Fnu4HI	FokI	FspI	GdiII	HaeI	HaeII
HaeIII	HaeIV	HgaI	HgiEII	HhaI	Hin4I	HincII	HindIII
HinfI	HphI	KpnI	MaeIII	M50II	MluI	MmeI	MnlI
MscI	MseI	MslI	MspI	MspAI	MunI	MwoI	NciI
NcoI	NgoAIV	NheI	NlaIII	NlaIV	NruI	NsiI	NspI
NspV	Pfl1108I	PleI	PshAI	PstI	PvuI	RcaI	RleAI
RsaI	SacI	SalI	SapI	Sau96I	Sau3AI	ScaI	ScrFI
SfaNI	SfcI	SimI	SmaI	SmlI	SnaBI	SpeI	SspI
StyI	TaiI	TaqI	TaqII	TatI	TauI	TfiI	ThaI
TseI	Tsp45I	Tsp509I	TspRI	Tth111II	UbaLI	VspI	XbaI
XhoI	XmnI						

Enzimas que no cortan :

AatII	AloI	ApaI	AvrII	BaeI	BbsI	BbvCI	BmgI
BplI	Bpu10I	Bpu1102I	BsbI	BseRI	BsmBI	BspEI	BstAPI
BstEII	BstXI	Bst217I	Bsu36I	DraIII	DrdII	EagI	Eco47III
EcoNI	EcoO109I	FseI	HpaI	NarI	NdeI	NotI	PacI
PflMI	PinAI	PmeI	PmlI	Psp5II	PvuII	RsrII	SacII
SanDI	SbfI	SexAI	SfiI	SgfI	SgrAI	SphI	SrfI
Sse8647I	StuI	SunI	SwaI	Tth111II	XcmI		

MS23

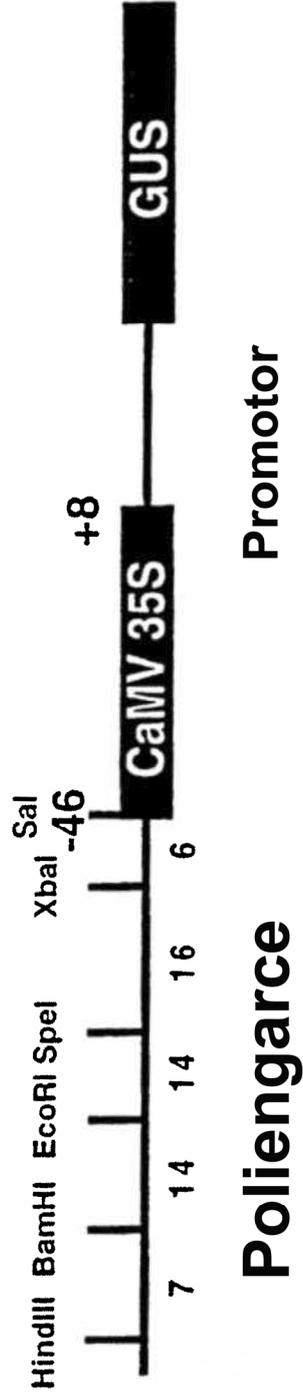


Fig. 2

pGPTV-GUS-kan

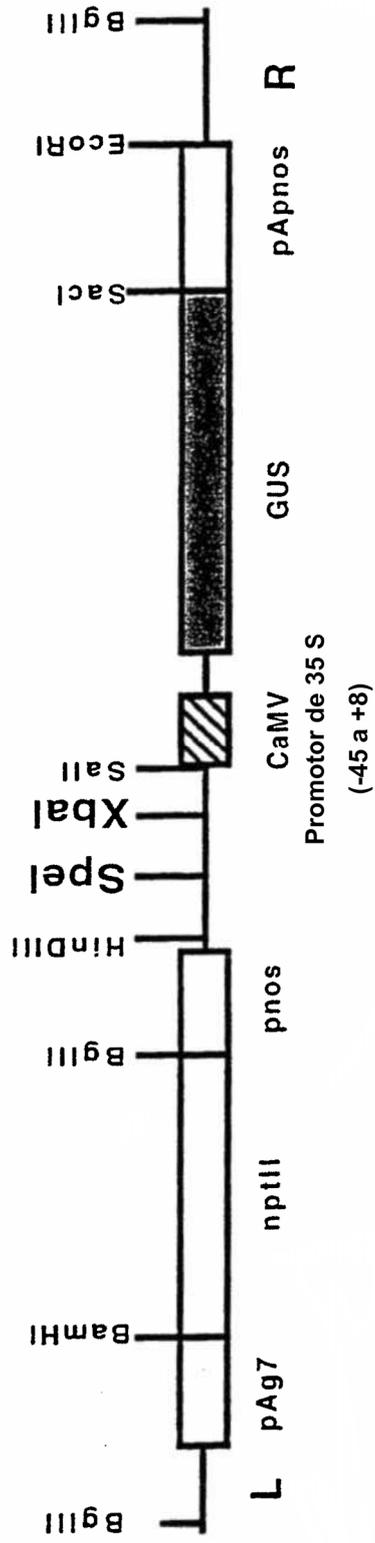


Fig. 3

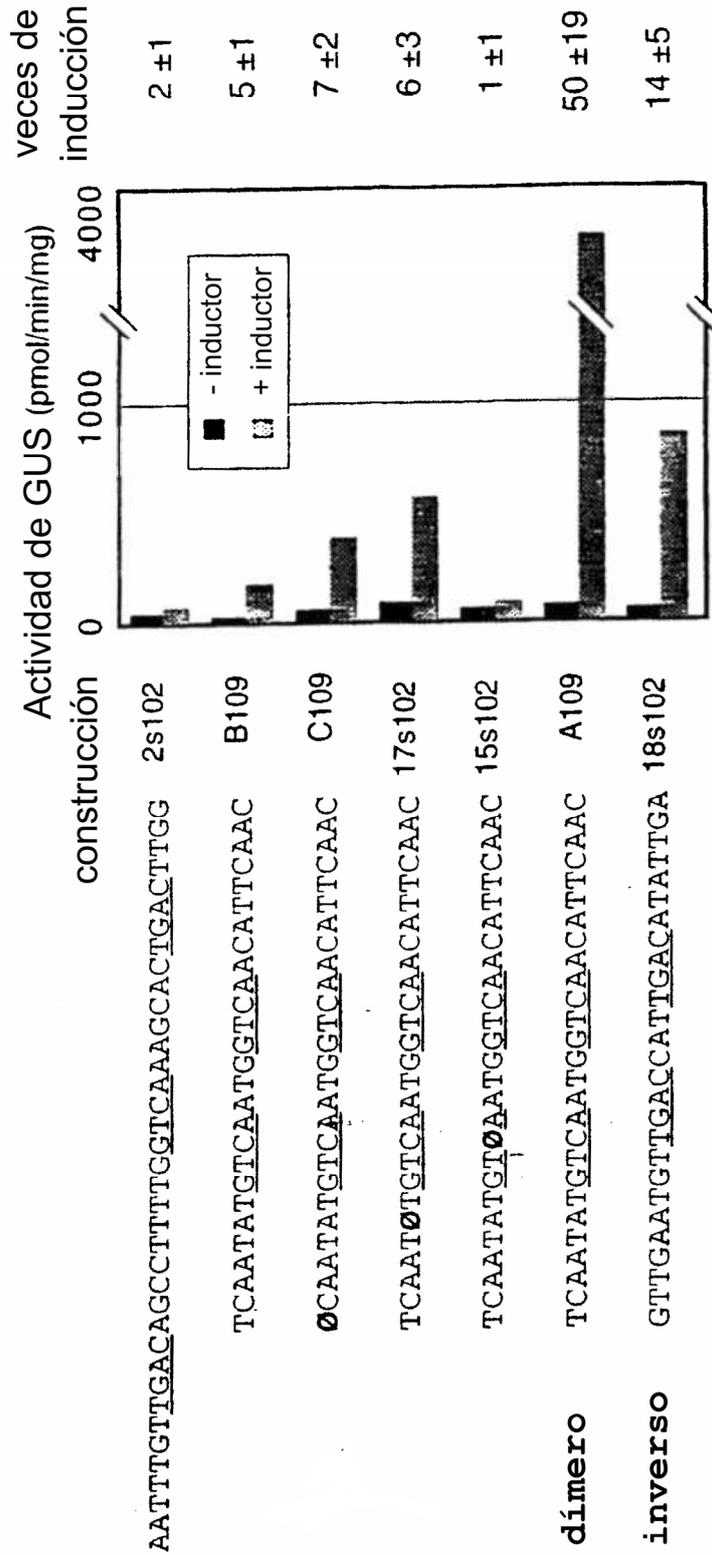


Fig. 4

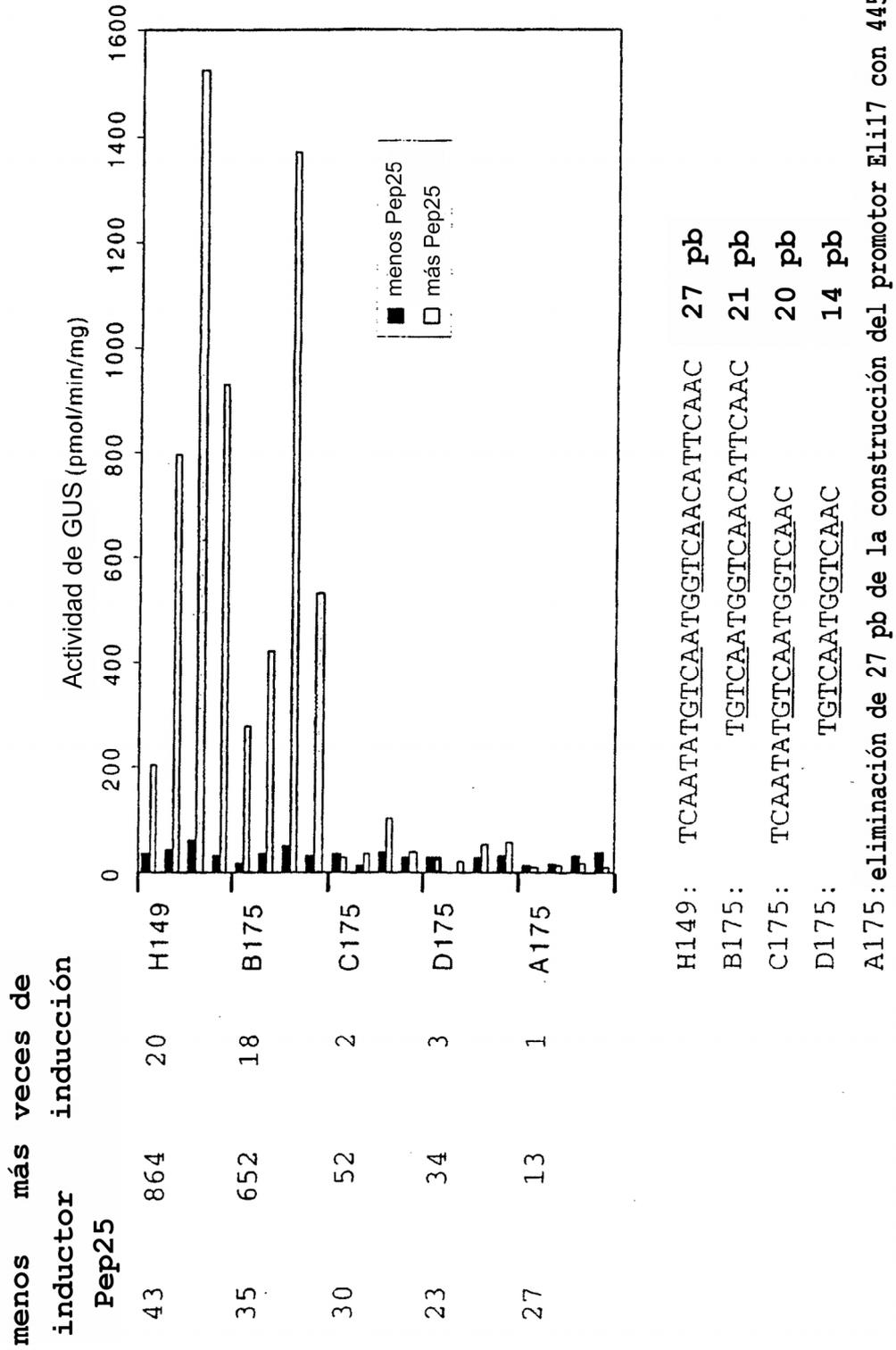


Fig. 5

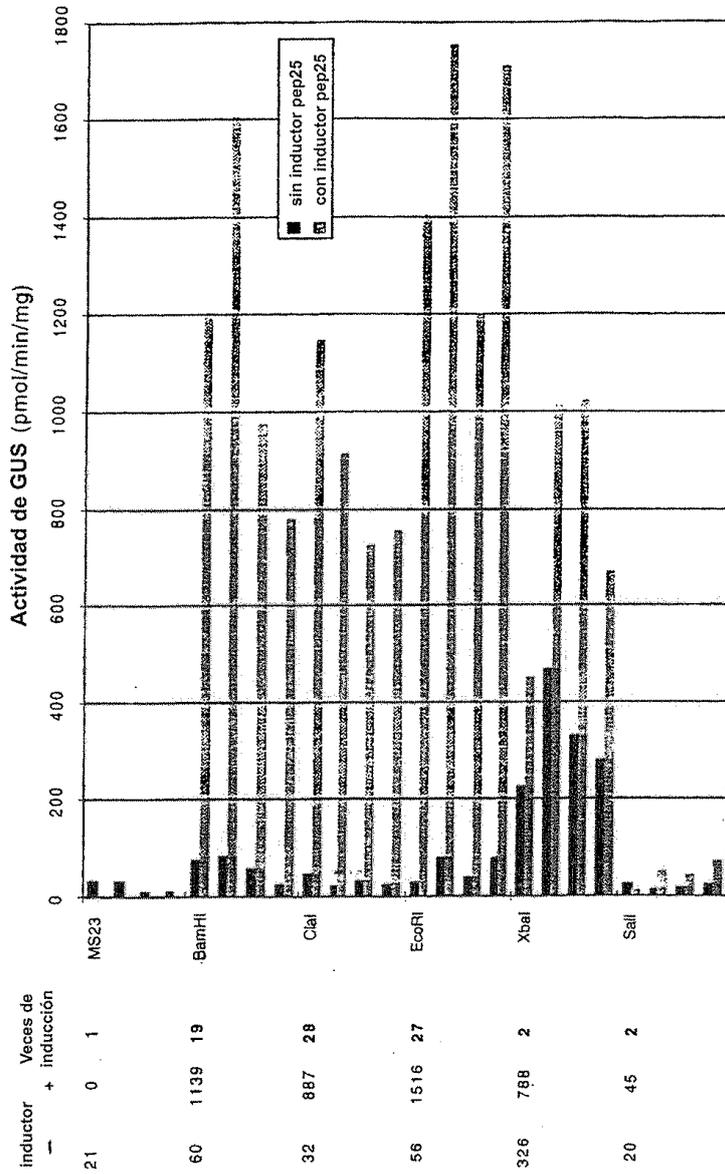


Fig. 7a

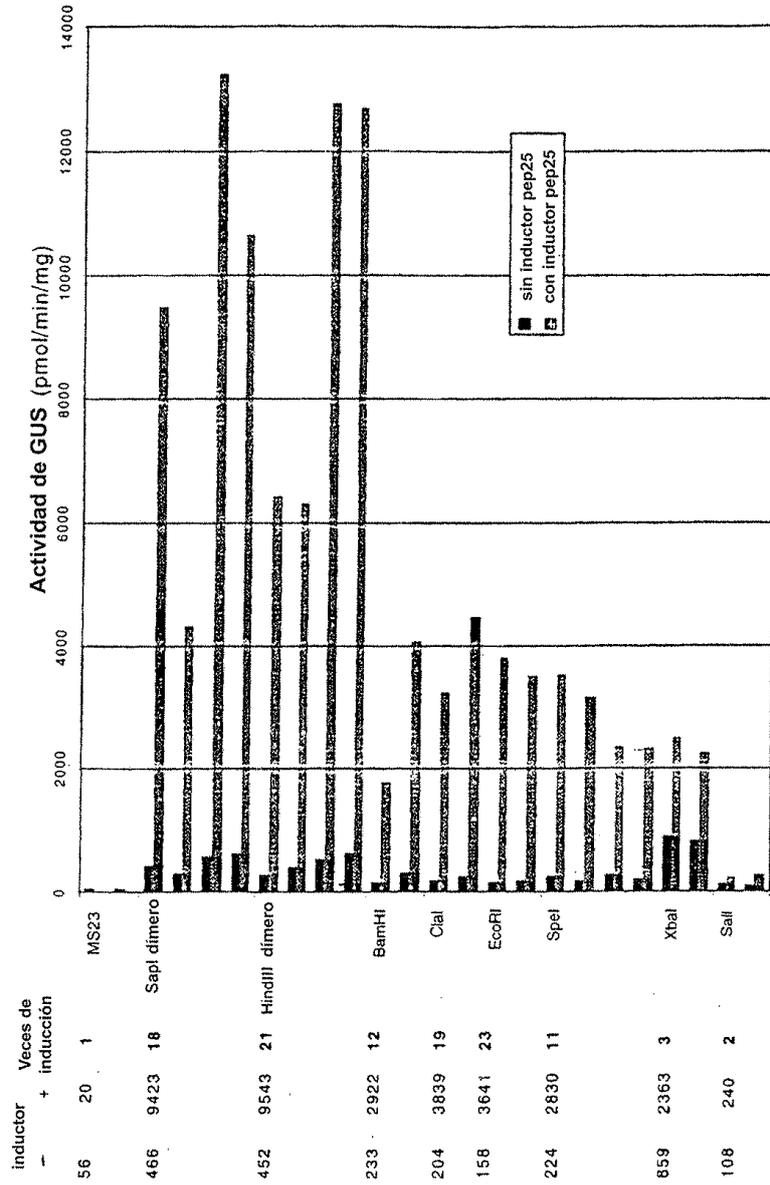


Fig. 7b

Resumen de características de expresión

	Partes aéreas	Raíces	Cicatrización	Senescencia	<i>Peronospora</i>	
					Incompatible	Compatible
4 x S	Medio	Medio	+	nt	+	+
4 x W2	Medio	Muy alto	+	nt	+	+
4 x GCC	Muy alto	Muy alto	+	nt	nt	nt
4 x D	-	-	-	+	+	+
4 x N	Medio	Medio	+	nt	+	+
4 x WAmy	Bajo	Bajo	nt	nt	+	+
4 x W1	Medio	Medio	+	nt	+	+

Fig. 8