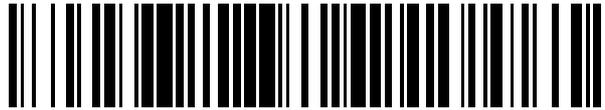


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 323**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.1997 E 97932190 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2012 EP 0964927**

54 Título: **Promotores del virus del mosaico de las nervaduras de la mandioca y sus usos**

30 Prioridad:

**20.06.1996 US 20129 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**06.03.2013**

73 Titular/es:

**THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (100.0%)  
10550 NORTH TORREY PINES ROAD  
LA JOLLA, CA 92037, US**

72 Inventor/es:

**VERDAGUER, BERTRAND;  
DE KOCHKO, ALEXANDRE;  
BEACHY, ROGER, N. y  
FAUQUET, CLAUDE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 397 323 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 del virus del mosaico de las nervaduras de la mandioca y sus usos

### Campo técnico

5 La presente invención se refiere a composiciones y a procedimientos útiles en la producción de plantas transgénicas. En particular, la invención se refiere a las secuencias de los promotores de virus de plantas (CsVMV) y a casetes de expresión que contienen las secuencias de los promotores del CsVMV (virus del mosaico de las nervaduras de la mandioca, *Cassava Vein Mosaic Virus*). La invención también se refiere a vectores y a plantas transgénicas que contienen las secuencias de los promotores del CsVMV que están unidas operativamente a secuencias de ADN heterólogo. Adicionalmente, la invención se refiere a procedimientos de producción de plantas transgénicas usando vectores que contengan las secuencias de los promotores del CsVMV.

### Antecedentes de la invención

15 Los promotores de virus de plantas aislados son útiles en la modificación de plantas por ingeniería genética para producir plantas transgénicas con características fenotípicas deseadas. Para producir dichas plantas transgénicas, un promotor aislado se inserta en un vector y se une operativamente a una secuencia de ADN heterólogo. Después, las células de las plantas pueden transformarse de diversas maneras mediante construcciones de ADN que contengan un promotor aislado fusionado a las secuencias de ADN heterólogo. El resultado de esta transformación es, que el promotor, unido operativamente al ADN heterólogo, se inserta en el genoma de la célula de la planta transformada. Además, el promotor controla la regulación de la expresión del ADN heterólogo en la célula de la planta transformada.

20 Dependiendo de la naturaleza de las secuencias heterólogas acopladas al promotor aislado, existen diversas estrategias diferentes para producir un fenotipo deseado en una planta transgénica. Por ejemplo, la expresión de un nuevo gen, que normalmente no se expresa en una planta o en un tejido particular de una planta, puede conferir un cambio fenotípico. Como alternativa, la expresión de una construcción, en sentido o en antisentido, introducida en plantas transgénicas, puede producir la inhibición de la expresión de los genes de las plantas endógenos. Esta inhibición de expresión puede, a su vez, producir el cambio fenotípico deseado.

30 Existe una necesidad de usar diversos promotores diferentes en la modificación de plantas por ingeniería genética. Estos promotores son de diversos tipos. Los promotores constitutivos constituyen uno de estos tipos de promotores normalmente usados. Los promotores constitutivos pueden expresar secuencias de ADN unidas operativamente en todos los tejidos de una planta a través del desarrollo normal. A diferencia de los promotores constitutivos, los promotores específicos de tejido, son promotores que pueden expresar de manera selectiva secuencias de ADN heterólogo en determinados tejidos de plantas. Los promotores también pueden ser inducibles, por ejemplo, aplicando agentes inductores externos. Los promotores constitutivos, inducibles y específicos de tejido se usan en la modificación de las plantas por ingeniería genética, y son valiosos en ese campo para muchas posibles aplicaciones diferentes.

35 Los promotores constitutivos de plantas pueden obtenerse aislando la región reguladora de un operón de una planta que se expresa de manera constitutiva. Además de los promotores obtenidos a partir de genes de plantas, también existen promotores de origen bacteriano y viral, que se han usado para expresar, de manera constitutiva, nuevas secuencias en tejidos de plantas. Son ejemplos de dichos promotores de bacterias los que incluyen el promotor de octopina sintasa (ocs), el promotor de nopalina sintasa (nos) y otros derivados de plásmidos Ti naturales (véase Herrera-Estrella y col, Nature, 303: 209-213, 1983). Los promotores 35S y 19S del virus del mosaico de la coliflor son ejemplos de promotores virales normalmente usados (véase Odel y col, Nature, 313: 810-812, 1985).

45 A diferencia de los promotores constitutivos, los promotores específicos de tejido están generalmente aislados de las regiones promotoras de los genes de plantas que se expresan de manera selectiva en un tejido específico de planta. Estos promotores pueden fusionarse con una secuencia de ADN heterólogo y usarse para transformar una célula de planta para crear plantas transgénicas que expresen de manera selectiva el ADN heterólogo en un tejido específico. Por ejemplo, las regiones promotoras de los genes E4 y E8 regulados por etileno, específicos de frutos, y del gen de poligalacturonasa, específico de frutos, se han usado para dirigir la expresión específica de frutos de una secuencia de ADN heterólogo en plantas de tomate transgénicas. (Véase Cordes y col, Plant Cell, 1; 1025-1034, 1989; Deikman y col, EMBO J., 7; 3315-3320, 1988; y Della Penna y col, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 6420-6424, 1986).

50 Se han descrito aspectos de caracterización, incluyendo clonación genómica, caracterización molecular y secuenciación, y la descripción de los promotores, de diversos virus de plantas diferentes, incluyendo el virus del mosaico de la coliflor (CaMV), Hull, en "Virus Taxonomy", eds. Murphy y col., Wein, Nueva York, Springer-Verlag, páginas 189-192, 1995; el virus del moteado amarillo de la *Commelina* (ComYMV), Medberry y col, Nuc. Acid Res., 18: 5505-5513, 1990; el virus baciliforme del tungro del arroz (RTBV), Hay y col, Nuc. Acids Res., 19: 2615-2621, 1991; el virus baciliforme de la caña de azúcar (ScBV), Bouhida y col, J. Gen. Virol., 74: 15-22, 1993; el virus del moteado clorótico de la soja (SbCMV) Hasegawa y col, Nuc. Acids Res., 17: 9993-10013, 1989; el virus del mosaico de la higuera (FMV), Richins y col, Nuc. Acids Res., 15: 8451-8466, 1987; el virus de la mancha en anillo del grabado del clavel (CERV), Hull y col, EMBO J., 5: 3083-3090, 1986; el virus del veteado clorótico del cacahuete

(PCSV), Reddy y col, *Phytopathol.*, 83: 129-133, 1993; el virus de banda de la nervadura de la fresa (SVBV), N° de Acceso a GeneBank X97304; y el virus de la hinchazón de los brotes del cacao (CSSV), N° Acceso GeneBank L14546.

5 Calvert y col, *J. Gen. Virol.*, 76: 1271-1276, 1995, describieron el virus del mosaico de la nervadura de la mandioca (anteriormente denominado CVMV, actualmente denominado CsVMV) y también se publicaron datos de secuencias como Nos de Acceso a GeneBank U59751 y U20341. Además, Verdaguer y col, *Plant Mol. Biol.*, 31: 1129-1139, 1996, describieron recientemente el promotor del CsVMV.

10 Se desea el descubrimiento, tanto de nuevos promotores constitutivos como de nuevos promotores específicos de tejido, para la expresión controlada de diversas secuencias de ácido nucleico que se modifican, por ingeniería genética, en plantas transgénicas. Existen muchas posibles aplicaciones valiosas de modificación de plantas por ingeniería genética. Para poner en práctica estas posibles aplicaciones, es deseable que exista una diversidad de promotores de plantas con diferentes características y que sean eficaces en diferentes especies de plantas.

### Sumario breve

15 Actualmente, como promotor para la expresión de genes heterólogos, se ha clonado y caracterizado molecularmente un promotor derivado del CsVMV que puede usarse en una diversidad de tipos de células de plantas transgénicas. El promotor del CsVMV, y los promotores derivados descritos en el presente documento, proporcionan diversas ventajas y beneficios.

20 Se demuestra que los promotores son activos en especies de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, y por lo tanto, pueden aplicarse fácilmente a una diversidad de cultivos cultivados. Aunque en el presente documento, se describen promotores generalmente constitutivos, los promotores derivados incluyen promotores que pueden regular la expresión de una manera específica de tejido, y son, por lo tanto, útiles para controlar la expresión de genes heterólogos de una manera específica de tejido.

25 Por tanto, en una realización la divulgación contempla una molécula de ácido nucleico aislada que, en una célula de planta, comprende una secuencia de nucleótidos del promotor que puede iniciar la transcripción de una secuencia de ácido nucleico heterólogo unida operativamente, en la que la secuencia de nucleótidos tiene una identidad de al menos el 80% con 18 nucleótidos secuenciales del virus del mosaico de las nervaduras de la mandioca (CsVMV) mostrado en la SEC ID N°: 3 (pA).

Una molécula de ácido nucleico preferida comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en CVP1, CVP2, pA, pB, pC, pD, pE, pΔB, pΔC, pΔD1, pΔD2, pΔD3, pΔDE1, pΔDE2, pΔDE3 y pΔE.

30 También se contempla un vector que comprende una secuencia de nucleótidos del promotor de la descripción que está unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico heterólogo. También se describe un gen quimérico que comprende el promotor unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico heterólogo.

La divulgación también contempla una planta transgénica que comprende una secuencia de nucleótidos del promotor de la descripción que está unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico heterólogo.

35 La divulgación también describe un procedimiento para expresar, en una célula de planta, una secuencia de ácido nucleico heterólogo que comprende:

- a) transformar una célula de planta con un vector de la invención; y
- b) cultivar la célula de planta en condiciones en las que la secuencia de ácido nucleico heterólogo se exprese en la célula de planta.

40 La invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos del promotor que, en una célula de planta, puede iniciar la transcripción de una secuencia de ácido nucleico, que no sea del CsVMV, unida operativamente, en la que dicha secuencia de nucleótidos del promotor se selecciona entre la SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15 y SEC ID N°: 16, en la que la molécula de ácido nucleico aislada no contiene otras partes del genoma del CsVMV.

45 La invención también proporciona un vector que, en una célula de planta, comprende una secuencia de nucleótidos del promotor que puede iniciar la transcripción de una secuencia de ácido nucleico, que no sea del CsVMV, unida operativamente, en la que dicha secuencia de nucleótidos del promotor se selecciona entre la SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15 y SEC ID N°: 16, y en la que dicha secuencia de nucleótidos del promotor está unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico que no sea del CsVMV.

50 La invención también proporciona una planta transgénica que, en una célula de planta, comprende una secuencia de nucleótidos del promotor que puede iniciar la transcripción de una secuencia de ácido nucleico, que no sea del CsVMV, unida operativamente, en la que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona entre la SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15 y SEC ID N°: 16, y en la que dicha secuencia de nucleótidos del promotor está unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico que no sea del CsVMV.

La invención también proporciona un procedimiento para expresar una secuencia de ácido nucleico, que no sea del CsVMV, en una célula de planta que comprende:

- 5 a) transformar dicha célula de planta con un vector de acuerdo con la invención; y  
 b) cultivar dicha célula de planta en condiciones en las que la secuencia de ácido nucleico, que no sea del CsVMV, se exprese en dicha célula de planta.

La invención también proporciona un gen quimérico que expresa una secuencia de ácido nucleico, que no sea del CsVMV, en una célula de planta que comprende, unida operativamente en la secuencia, en dirección de 5' a 3':

- 10 a) una secuencia de nucleótidos del promotor que, en una célula de planta, puede iniciar la transcripción de una secuencia de ácido nucleico, que no sea del CsVMV, unida operativamente, en la que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona entre la SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15 y SEC ID N°: 16, y  
 b) una secuencia de ácido nucleico estructural que no sea del CsVMV

Basándose en la divulgación del presente documento, otras ventajas y beneficios resultarán fácilmente evidentes para un experto en la materia.

### **Breve descripción de los dibujos**

15 Los dibujos constituyen parte de la divulgación:

La Figura 1 ilustra un diagrama esquemático de la estructura de un promotor del CsVMV en el genoma viral del CsVMV y la construcción de un gen de fusión uidA que contiene los fragmentos CVP1 o CVP2 del promotor del CsVMV, como se describe en el Ejemplo 1. Las posiciones de los fragmentos del promotor se numeran en el ADN genómico del CsVMV. El fragmento CVP1 se aisló usando sitios de restricción AluI mientras que el fragmento CVP2, que incluía 75 nucleótidos adicionales en el extremo 5' y 52 nucleótidos en el extremo 3', se obtuvo por amplificación PCR usando cebadores como se describe. El extremo 3' del fragmento CVP2 se localiza aguas arriba del primer codón ATG en el genoma viral. También se indica el sitio de inicio de la transcripción ("Tsp", flecha hacia la derecha) y la posición del sitio de unión del ARNt consenso ("ARNtmet"). El esquema no está dibujado a escala.

20 La Figura 2 ilustra la determinación del sitio de inicio de la transcripción del promotor del CsVMV como se describe en el Ejemplo 2. Las reacciones de ampliación con cebador se realizaron como se describe y los productos de las reacciones de ampliación obtenidos con dos temperaturas de hibridación (30 °C y 40 °C) y las reacciones de secuenciación de referencia de la construcción del gen uidA del fragmento CVP1 (carril A, C, G y T) realizada con el mismo cebador marcado, se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 7,5%, urea 7 M. Se muestra la secuencia de ADN de cadena positiva (complementaria a la lectura de secuencia en el gel) y el sitio de inicio de la transcripción (A\*) se indica mediante una flecha en el número de nucleótido (nt.) 7604. Los números se corresponden con los números de secuencia de nucleótidos del genoma del CsVMV, Calvert y col, J Gen Viro1, 76: 1271-1276, 1995.

25 La Figura 3 ilustra la secuencia de nucleótidos de la región del promotor del CsVMV, también mostrada en la SEC ID N°: 3, incluyendo los fragmentos CVP1 y CVP2 promotores como se describe en el Ejemplo 2. Usando un sistema de numeración basado en transcripción que es diferente del sistema de numeración de la secuencia genómica, el sitio de inicio de la transcripción se indica con +1. La caja TATA consenso, la secuencia as1, Lam y col, Proc Natl Acad of Sci USA, 86: 7890-7894, 1989, y la región homóloga con el promotor del ComYMV, Medberry y col, Plant J, 6: 619-626, 1993, se incluyen en recuadros. Los sitios AluI (flechas) indican los extremos 5' y 3' del promotor del CVP1. Los motivos de secuencias similares a elementos cis, previamente caracterizados, en promotores de plantas se indican subrayados (se indican los motivos con similitudes con el elemento caja I, Donald y col, EMBO J, 9: 1717-1726, 1990, del promotor de rbcS, el sitio de unión a MNF1, Yanagisawa y col, Plant Mol Biol, 19: 545-553, 1992, el potenciador del núcleo del SV40, Ondek y col, EMBO J, 6: 1017-1025, 1987).

35 La Figura 4 ilustra la comparación de la organización genómica del CsVMV con los genomas virales caulimovirus y badnavirus, como se describe en el Ejemplo 2. Todos los mapas comienzan al inicio de la región intergénica. Las ORF o segmentos ORF que codifican supuestas funciones similares están unidos por líneas verticales. El número "1" indica el origen de replicación del ADN. ♣: sitio activo MP; ♦: sitio activo RT; ▲: centro activo TAV; \*: sitio de unión al ARN; ◇: sitio activo PR; ↓: secuencia consenso de RNAsa H.

40 La Figura 5 ilustra la expresión de los promotores del CsVMV en protoplastos de tabaco y de mandioca como se describe en el Ejemplo 7 a). Con un plásmido, se introdujeron conjuntamente, mediante electroporación, construcciones de genes uidA quiméricos, para expresar luciferasa en protoplastos de mandioca (barras con puntos) y de tabaco (barras con entramado). La actividad de los promotores se expresa como una proporción entre la actividad de GUS y la actividad de LUC del mismo extracto de proteína. Como consecuencia, la actividad de GUS se mide como pmoles de 4-metilumbeliferil-β-D-glucuronido (MUG) por hora por unidad de luz emitida. Las barras representan la media de cuatro experimentos independientes +/- errores típicos. Cada experimento se realizó con una preparación diferente de protoplastos. pe35GN es una construcción en la que el promotor 35S "potenciado", Kay y col, Science, 236: 1299-1302, 1987, controla la transcripción del gen uidA. pGN100 es un plásmido de control que contiene un gen uidA sin promotor.

Las Figuras 6A-6J ilustran la localización histoquímica de la expresión de GUS en plantas transgénicas de tabaco y arroz que contienen un gen quimérico uidA promotor del CsVMV como se describe en el Ejemplo 7 b). La actividad de GUS se indica en los tejidos transgénicos mediante un precipitado de colorante de añil oscuro tras tinción con X-Gluc. A: corte de hoja de tabaco; B: detalle de corte de hoja de tabaco mostrando tejidos vasculares de la nervadura central (x10); C: corte transversal a través de láminas de hoja de tabaco (x30); D: tejidos vasculares en corte transversal de tallo de tabaco (x30); E: raíces de tabaco (x10) F: corte transversal a través de ovarios de tabaco (x10); G: corte transversal de hoja de arroz (x50); H: corte transversal de una vaina de hoja del arroz (x50); I: flor de arroz dividida axialmente y posteriormente teñida para detectar la actividad de GUS (x10); J: expresión transitoria de GUS en el tallo de mandioca de plántulas *in vitro* (x5). bs: haz vascular; cy: clorénquima; ep: floema externo; ip: floema interno; mx: metaxilema; p: floema; ph: parénquima; pm: mesófilo en empalizada; pp: parénquima del floema; py: parénquima; rt: punta radicular; sc: esclerénquima; sm: mesófilo esponjoso; x: xilema; xp: parénquima del xilema.

Las Figuras 7A y 7B ilustran la distribución cuantitativa de la actividad de GUS en diferentes tejidos orgánicos entre líneas de plantas transgénicas de tabaco (A) y arroz (B) expresada por el gen quimérico CsVMV/uidA como se describe en el Ejemplo 7 b). La actividad de GUS específica se expresa como picomoles (pmol de 4-metil umbeliferona (4MU) por miligramo de proteína por minuto. Se ensayaron líneas transgénicas de tabaco o de arroz que contenían CVP1 (círculos punteados) o CVP2 (círculos blancos) en un gen quimérico para detectar la actividad GUS en hojas jóvenes (J) de 3 a 5 cm de longitud, hojas maduras (M) de 10 o más cm de longitud, tallos (T), raíces (R) y explantes de vaina de hoja (ST). Para la extracción de proteínas, se cogieron muestras de plantas de tabaco transgénicas R1 (de 5-7 semanas de vida) maduras, cultivadas en un invernadero. Las plantas de arroz usadas eran transformantes R0 (de 2 meses de vida) cultivadas en un invernadero. Cada círculo representa una sola línea transgénica independiente. En la figura se indica el número de líneas ensayadas. El nivel medio de actividad GUS en los diferentes órganos y para cada construcción se indica mediante una flecha en negrita. Se usó una escala logarítmica para incluir la gran variación entre líneas.

La Figura 8 ilustra una representación esquemática de las diversas construcciones de expresión de la fusión del gen quimérico promotor del CsVMV/uidA preparado como se describe en el Ejemplo 9. Los nombres de los diferentes plásmidos que contienen las construcciones y los criterios de valoración de las deleciones en el extremo 5' e internas en las construcciones se indican en el lado izquierdo de la figura. Las deleciones internas se indican mediante el símbolo "Δ". pA contiene el promotor de longitud completa del CsVMV ilustrado en la Figura 3. Todos los promotores delecionados en el extremo 5' tienen un sitio BamHI en sus extremos 5'. Se crearon deleciones internas por ligamiento con BamHI de los promotores truncados en el extremo 5' con fragmentos de promotores delecionados en el extremo 3'.

Las Figuras 9A-9I ilustran la localización histoquímica de la expresión de GUS en plantas de tabaco transgénicas que contienen construcciones de deleción del gen quimérico promotor del CsVMV/uidA como se describe en el Ejemplo 10 b). Todos los dibujos son secciones transversales de hojas jóvenes ampliadas de plantas de tabaco transgénicas de 5 semanas de vida, excepto las Figuras h e l. a) pB; b) pD; c) pE; d) pΔC; e) pΔD1; f) pΔDE1; g) pΔDE2; h) hojas de plántulas transgénicas de 10 días de vida que llevan la construcción pB (derecha) o la construcción pD (izquierda); l) raíces de plantas de tabaco transgénicas que contienen la construcción pC (parte superior) o la construcción pD (parte inferior). m: mesófilo; v: nervadura; py: parénquima; RT: punta radicular.

La Figura 10 ilustra la actividad enzimática de GUS en hojas de tabaco transgénicas expresadas por construcciones de deleción del gen quimérico promotor del CsVMV/uidA como se describe en el Ejemplo 10 c). Las proteínas se extrajeron de discos foliares recogidos de hojas jóvenes explantadas de plantas transgénicas de 5 semanas de vida. Para cada construcción, se ensayaron 6 - 10 líneas transgénicas independientes para detectar la actividad de GUS. Los datos se expresan como se describe en la Figura 7. Los resultados de cada planta se muestran como un círculo en blanco. Cada construcción de promotor diferente se indica por separado. El nivel medio de GUS se indica mediante una flecha vertical. Se usó una escala logarítmica para incluir la gran variación entre líneas.

La Figura 11 ilustra la expresión transitoria de GUS por las construcciones del gen quimérico promotor del CsVMV/uidA en protoplastos de células BY-2 (barras con entramado) y del mesófilo de la hoja (barras con rayas diagonales) como se describe en el Ejemplo 10 e). Para detectar la actividad de GUS después de 24 horas de cultivo se analizaron protoplastos sometidos a electroporación procedentes de una suspensión de células BY-2 o de hojas de tabaco. Con un plásmido de luciferasa, como patrón interno, se cotransfectaron diversas construcciones de los promotores indicados. Los niveles de expresión de GUS se normalizaron en relación con la expresión de luciferasa y se expresaron como un porcentaje relativo con respecto a la expresión de GUS usando la actividad del promotor de longitud completa en la que a la construcción pA se le asignó un valor del 100%. Cada barra representa la media de cuatro experimentos independientes +/- los errores típicos.

La Figura 12 ilustra una representación esquemática del mapa funcional del promotor del CsVMV como se describe en el Ejemplo 11. Los números indican posiciones relativas y características usando el sistema de numeración del sitio de inicio de la transcripción de la Figura 3. Las flechas verticales indican funciones específicas de tejidos, indicando la importancia relativa del dominio, para el que se indica la función, mediante el tamaño relativo de la flecha. Las flechas en la parte superior de la figura representan las interacciones sinérgicas analizadas en el Ejemplo 11. Se identifican los motivos as1, GATA y GTAA y

desempeñan funciones importantes en la función reguladora del promotor.

### **Descripción detallada**

#### **A. Definiciones**

5 La expresión “ácidos nucleicos”, como se usa en el presente documento, se refiere a ADN o ARN. Una “secuencia de ácido nucleico” o “secuencia polinucleotídica” se refiere a un polímero mono- o bicatenario de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos leídas en dirección 5’ a 3’. Esto incluye plásmidos autorreplicantes, polímeros infecciosos de ADN o ARN y ADN o ARN no funcional. En la anotación de polinucleótido usada en el presente documento, salvo que se especifique de otra manera, el extremo izquierdo de las secuencias polinucleotídicas monocatenarias es el extremo 5’; la dirección izquierda de las secuencias polinucleotídicas bicatenarias se refiere a la dirección 5’.

15 El término “promotor” se refiere a una región de ADN aguas arriba del codón de inicio traduccional y que está implicada en el reconocimiento y unión de la ARN polimerasa y otras proteínas para iniciar la transcripción. Un “promotor de plantas” es un promotor capaz de iniciar la transcripción en células de plantas. Las expresiones “promotor de planta del CsVMV” o “promotor del CsVMV”, como se usa en el presente documento, se refiere a promotores derivados de la región promotora de un genoma del CsVMV, y como se define adicionalmente en el presente documento.

20 Las expresiones “promotor constitutivo” o “promotor de planta constitutivo”, como se usa en el presente documento, se refiere a un promotor de planta que es capaz de expresar secuencias de ADN unidas operativamente en todos los tejidos o casi en todos los tejidos de una planta durante el desarrollo normal. Las expresiones “promotor inducible” o “promotor de planta inducible”, como se usa en el presente documento, se refiere a promotores de planta que son capaces de expresar, de manera selectiva, secuencias de ADN unidas operativamente en momentos particulares o en tejidos particulares en respuesta a estímulos endógenos o externos.

25 La expresión “promotor específico de tejido”, como se usa en el presente documento, se refiere a promotores que, en tejidos particulares, son capaces de expresar selectivamente secuencias de ADN unidas operativamente. Esto significa que la expresión de las secuencias de ADN unidas operativamente es mayor en uno o más tejidos de la planta que lo es en los otros tejidos de la planta. Por ejemplo, el promotor del CsVMV presente en la construcción p $\Delta$ DE1 es un promotor específico de tejido que expresa selectivamente secuencias de ADN heterólogo unidas operativamente en tejido de punta radicular.

30 La expresión “operativamente o unido operativamente” como se usa en el presente documento se refiere a la unión del promotor 5’ con respecto a la secuencia de ácido nucleico heterólogo de tal manera que el promotor media la transcripción de la secuencia de ADN unida. Se entiende que la secuencia promotora también incluye secuencias transcritas entre el inicio transcripcional y el codón de inicio transcripcional.

35 La frase “casete de expresión”, se refiere a secuencias de nucleótidos que son capaces de dirigir la expresión de una secuencia de ácido nucleico o de un gen estructural en huéspedes compatibles con dichas secuencias. Dichos casetes incluyen al menos promotores y señales de terminación de la transcripción. También pueden usarse factores adicionales necesarios o útiles para efectuar la expresión, como se describe en el presente documento.

40 El término “vector”, se refiere a sistemas de expresión, vehículos lanzadera basados en ácido nucleico, moléculas de ácido nucleico adaptadas para la administración de ácido nucleico, y a ADN circular autorreplicante autónomo (por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagémidos y similares). Cuando un microorganismo recombinante o un cultivo celular se describe como hospedador en un “vector de expresión”, esto incluye ADN circular extracromosómico (tal como ADN mitocondrial o de cloroplastos), ADN que se ha incorporado en el cromosoma (o cromosomas) del huésped, o ambos. Cuando una célula huésped mantiene a un vector, las células pueden replicar establemente el vector durante la mitosis como una estructura autónoma, incorporarse dentro del genoma del huésped, o mantenerse en el núcleo o citoplasma del huésped.

45 El término “plásmido” se refiere a una molécula de ADN circular autónoma que puede replicarse en una célula, e incluye tipos de expresión y tipos que no son de expresión. Cuando se describe un microorganismo recombinante o un cultivo celular como huésped de un “plásmido de expresión”, este incluye moléculas de ADN circular extracromosómicas y ADN que se ha incorporado en el cromosoma (o cromosomas) del huésped. Cuando una célula huésped está manteniendo un plásmido, durante la mitosis, las células replican de manera estable el plásmido como una estructura autónoma o lo incorporan dentro del genoma del huésped.

55 Una “secuencia heteróloga”, una “secuencia de ADN heteróloga” o una “secuencia de ácido nucleico heteróloga”, como se usa en el presente documento, es una secuencia que se origina de una fuente (o especie) extraña o, si se origina de la misma fuente, se modifica de su forma original. Por tanto, una secuencia que codifica un ADN heterólogo, unida operativamente a un promotor, se origina de una fuente diferente de la cual derivó el promotor, o, si se origina de la misma fuente, se modifica de su forma original. La modificación de la secuencia de ADN heterólogo puede producirse, por ejemplo, tratando el ADN con una enzima de restricción para generar un fragmento de ADN que pueda unirse operativamente al promotor. La modificación también puede producirse mediante técnicas

tales como la mutagénesis dirigida.

La frase "se hibrida selectivamente con" se refiere a una sonda de ácido nucleico que se hibrida, forma dúplex o se une solo a una secuencia de ADN o ARN diana particular cuando las secuencias diana están presentes en una preparación de ADN o ARN celular total. Las secuencias de ácido nucleico "complementarias" o "diana" se refieren a aquellas secuencias de ácido nucleico que se hibridan selectivamente con una sonda de ácido nucleico. Las condiciones de hibridación apropiadas dependen, por ejemplo, de la longitud de la sonda, temperatura, composición de bases y del número de emparejamientos erróneos y su posición en la sonda, y con frecuencia deben determinarse empíricamente. Para un análisis sobre diseños de sondas de ácido nucleico y condiciones de hibridación, véase, por ejemplo, Sambrook y col, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989) o *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel y col, ed. Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York (1987).

La frase "secuencia codificante de ácido nucleico" se refiere a un ácido nucleico que codifica la expresión de una proteína, péptido o ácido nucleico específicos. Las secuencias de ácido nucleico incluyen tanto la secuencia de cadena de ADN que se transcribe en ARN como la secuencia de ARN que se traduce en proteína. Las secuencias de ácido nucleico incluyen tanto secuencias de ácido nucleico de longitud completa como secuencias de longitud no completa derivadas de la secuencia de longitud completa. También debe entenderse que la secuencia incluye los codones degenerados de la secuencia o secuencias naturales que pueden introducirse para proporcionar preferencia de codón en una célula huésped específica.

El término "aislado", cuando se hace referencia a secuencias y a moléculas de ácido nucleico, se refiere a ácidos nucleicos objeto que no contienen las secuencias homólogas adyacentes de origen natural, tal como el promotor del CsVMV en el contexto del genoma del CsVMV, pero en su lugar se manipulan para separarse de otras partes del genoma del CsVMV, o para recombinarse con secuencias heterólogas.

La frase "sustancialmente puro", cuando se hace referencia a ácidos nucleicos, indica que el ácido nucleico objeto está purificado de su fuente biológica y es la especie molecular predominante en la composición en cuestión, y preferentemente tiene una pureza al menos del 50% y más preferentemente al menos del 90% de ácido nucleico en comparación con otros materiales, tales como proteínas, carbohidratos, lípidos y similares.

El término "planta" incluye plantas completas, órganos de plantas (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas y células de plantas y su progenie. La clase de plantas que puede usarse en el procedimiento de la invención es generalmente tan amplia como la clase de plantas superiores que es sensible a las técnicas de transformación, incluyendo tanto monocotiledóneas (monocots) como dicotiledóneas (dicots). Esto incluye plantas de diversos niveles ploides, incluyendo poliploide, diploide y haploide.

El término "planta transgénica" se refiere a una planta que se ha producido por técnicas de modificación por ingeniería genética. Por ejemplo, células de plantas transformadas con vectores que contienen promotores del CsVMV unidos operativamente a secuencias de ADN heterólogo que pueden usarse para producir plantas transgénicas con características fenotípicas modificadas.

Los siguientes términos se usan para describir la relación de secuencia entre dos o más ácidos nucleicos o polinucleótidos: "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida usada como una base para una comparación de secuencia; una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande como, por ejemplo, un segmento de una secuencia génica de longitud completa proporcionada en un listado de secuencias, tal como la secuencia de ácido nucleico o puede comprender una secuencia génica completa.

El alineamiento óptimo de secuencias para alinear una ventana de comparación puede realizarse mediante el algoritmo de homología local de Smith y col, *Adv. Appl. Math.*, 2: 482, 1981, mediante el algoritmo del alineamiento de homología de Needleman y col, *J. Mol. Biol.*, 48: 443, 1970, mediante la búsqueda del procedimiento de similitud de Pearson y col, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 85: 2444, 1988, o mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete Informático de Wisconsin Genetics edición 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.). En el presente documento se describen otros procedimientos.

Los términos "identidad sustancial" o "identidad de secuencia sustancial" se aplican a secuencias de ácido nucleico y, como se usan en el presente documento, indican una característica de una secuencia de polinucleótidos, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos el 85 por ciento, preferentemente al menos del 90 al 95 por ciento y más preferentemente al menos el 99 por ciento de identidad de secuencia, en comparación con una secuencia de referencia sobre una ventana de comparación de al menos 20 posiciones de nucleótidos, frecuentemente sobre una ventana de al menos 25-50 nucleótidos, en el que el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia de polinucleótidos que puede incluir deleciones o adiciones con un total del 20 por ciento o menor de la secuencia de referencia sobre la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una

secuencia más grande como, por ejemplo, un segmento de las regiones del promotor del CsVMV desveladas en el presente documento.

#### B. Promotores del Virus del Mosaico de las Nervaduras de la Mandioca (CsVMV)

5 La presente divulgación se refiere a promotores del CsVMV y a construcciones de ADN que contienen un promotor del CsVMV unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico heterólogo. Un promotor del CsVMV es una secuencia de nucleótidos del promotor que puede iniciar la transcripción de la secuencia de ácido nucleico heterólogo cuando está presente en un medio de transcripción capaz de sustentar la transcripción, tal como en una célula de planta, o en una planta o en un entorno similar al descrito en el presente documento. El promotor inicia la transcripción de un ácido nucleico heterólogo unido operativamente al promotor.

10 Como se usa en el presente documento, "promotor del CsVMV" incluye el promotor del CsVMV de tipo silvestre identificado en el presente documento, fragmentos del mismo, tal como los fragmentos CVP1 y CVP2 descritos en el presente documento y derivados de los mismos, tales como las construcciones de delección descritas en el presente documento, compartiendo todos ellos la propiedad de incluir secuencias de nucleótidos derivadas de la secuencia de longitud completa del promotor del CsVMV descrita en el presente documento y mostrada en la SEC ID N°: 3.

15 Un promotor del CsVMV preferido es una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia al menos del 80% con 18 nucleótidos secuenciales del promotor del CsVMV mostrados en la SEC ID N°: 3. Preferentemente, la identidad es al menos del 90%, y más preferentemente al menos del 98%. Preferentemente la identidad está presente en 20 nucleótidos secuenciales y más preferentemente en 25 nucleótidos secuenciales. El porcentaje de identidad es una medida del número de nucleótidos idénticos en una secuencia lineal ininterrumpida de nucleótidos (es decir, secuencial) cuando se compara con una secuencia de nucleótidos diana de longitud específica.

20 Como se usa en el presente documento, "identidad" de una secuencia de nucleótidos significa que los restos de nucleótidos comparados en dos secuencias individuales son idénticos. Por tanto, un 100% de identidad significa, por ejemplo, que después de comparar 25 nucleótidos secuenciales en dos moléculas diferentes, sendos restos en los 25 pares de nucleótidos comparados son idénticos.

25 Un medio de transcripción puede ser cualquiera de una diversidad de entornos, como se sabe bien en el campo biotecnológico de plantas y por lo tanto su limitación no es necesaria. Sin embargo, los medios ejemplares y preferidos incluyen una célula de planta transformada por un ácido nucleico que comprende el promotor sujeto, tal como una célula de planta cultivada, protoplastos de plantas u otras configuraciones de cultivos de tejidos de plantas, células de plantas no diferenciadas, células de plantas diferenciadas tal en como plántulas cultivadas, plantas transgénicas, plantas maduras y medios similares. También se incluyen sistemas de expresión bioquímicos *in vitro* que comprenden un medio de expresión reconstituido compuesto por proteínas purificadas, sustratos y componentes necesarios para sustentar la transcripción, como se sabe en la técnica.

30 Un promotor de la presente divulgación adopta la forma de un ácido nucleico aislado, un gen quimérico, un casete de expresión y formas similares de ADN recombinante (ADNr), como se define en el presente documento.

35 Una molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos del promotor que contiene un promotor del CsVMV como se ha descrito anteriormente.

40 Un gen quimérico es una fusión que comprende dos secuencias de nucleótidos diferentes en la que una secuencia de nucleótidos del promotor sujeto está unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico heterólogo, de tal manera que, en un medio de transcripción apropiado, el ácido nucleico heterólogo se transcribe bajo control del promotor sujeto. Las secuencias de ácido nucleico heterólogo ejemplares para su uso en un gen quimérico pueden ser cualquier secuencia de ácido nucleico que codifique un producto génico útil. En el presente documento también se describen productos génicos y secuencias de ácido nucleico heterólogo útiles.

45 Son particularmente útiles los diversos promotores descritos en el presente documento que permiten controlar sobre el tipo de planta o tejido de planta en el que se promoverá la transcripción. Por ejemplo, en el presente documento se describen promotores que son constitutivos para la expresión en una gran diversidad de tipos de plantas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, incluyendo la mayoría de los tejidos de la planta y hay promotores descritos que limitan preferentemente la transcripción con respecto a determinados tejidos de la planta.

50 Una secuencia de nucleótidos del promotor preferida comprende una secuencia de nucleótidos que deriva del promotor del CsVMV mostrado en la SEC ID N°: 3. En este contexto, la expresión "que derivada de" significa que el promotor sujeto se fabricó, por manipulación mecánica del promotor del CsVMV, por delección, fragmentación o sustitución, o se diseñó a partir del análisis de la secuencia y diseño y síntesis de una secuencia, cuyo derivado conserva importantes características funcionales del promotor del CsVMV como se identifica en el presente documento.

55 Preferentemente, una secuencia de nucleótidos del promotor es una de las secuencias descritas en el presente documento, es decir, una cualquiera de las secuencias promotoras presentes en las construcciones denominadas CVP1, CVP2, pA, pB, pC, pD, pE, pΔB, pΔC, pΔD1, pΔD2, pΔD3, pΔDE1, pΔDE2, pΔDE3 y pΔE. Estas secuencias

de nucleótidos promotoras preferidas se muestran en el Listado de Secuencias del presente documento como SEC ID Nos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 y 17, respectivamente.

Los promotores del CsVMV son útiles en la producción de plantas transgénicas. En plantas transgénicas se producen fenotipos deseados como resultado de la transformación de células de plantas mediante una construcción de ADN que contiene una secuencia de ADN heterólogo unida operativamente a un promotor del CsVMV. Por lo tanto, una construcción de ADN puede comprender un casete de expresión en una cualquiera de una diversidad de vectores de expresión para su uso en una diversidad de células de plantas.

Existen diversos procedimientos conocidos por los expertos en la técnica que pueden usarse para la preparación o aislamiento de promotores del CsVMV. Por ejemplo, los promotores del CsVMV puede aislarse de fragmentos de ADN genómicos del CsVMV.

Las secuencias de los promotores del CsVMV también pueden aislarse explorando bibliotecas de ADNc de plantas con sondas oligonucleotídicas que tienen secuencias derivadas de la secuencia de ADN del promotor del CsVMV representadas en el presente documento. También pueden usarse las diversas metodologías de clonación descritas en el presente documento para el aislamiento de los promotores del CsVMV usando la secuencia promotora del CsVMV de la SEC ID N°: 3. Para aislar fragmentos de ADN de plantas que contengan los promotores del CsVMV también pueden usarse otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Véase Sambrook, y col, para una descripción de otras técnicas para el aislamiento de los ADN relacionados con moléculas de ADN de secuencia conocida.

Para preparar una biblioteca de ADNc, se aísla ARNm de un tejido que exprese un gen diana expresado que vaya a clonarse. Por ejemplo, puede usarse el tejido del pericarpio de la fruta de una planta. El ADNc se prepara a partir del ARNm y después se sintetiza una segunda cadena de ARN complementaria. Posteriormente, esta molécula de ADN dúplex se liga en un vector recombinante. El vector se transfiere en un huésped recombinante para la propagación, exploración y clonación. Se conocen bien procedimientos para fabricar y explorar bibliotecas de ADNc. Véase Gubler y col, Gene, 25: 263-269, 1983 y Sambrook, y col.

Para una genoteca, típicamente el ADN se extrae del tejido de la planta y se corta mecánicamente o se digiere enzimáticamente para producir fragmentos de aproximadamente 15-20 kb. Después, los fragmentos de tamaño no deseado, se separan por centrifugación en gradiente y se construyen en vectores del bacteriófago lambda. Estos vectores y fagos se compactan *in vitro*, como describen Sambrook, y col. El fago recombinante se analiza por hibridación en placas como describen Benton y col, Science, 196: 180-182, 1977. La hibridación de las colonias se realiza como describen, en líneas generales, Grunstein y col, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 72: 3961-3965, 1975. El ADN de interés puede identificarse en bibliotecas de ADNc o genotecas mediante su capacidad para hibridarse con sondas de ácido nucleico, por ejemplo, en transferencias de Southern y estas regiones de ADN se aíslan mediante procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Véase Sambrook, y col.

Para amplificar secuencias de ácido nucleico de ARNm, de ADNc y de genotecas o bibliotecas de ADNc, pueden usarse técnicas de amplificación de ácido nucleico, tales como la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En las técnicas de PCR, se amplifican cebadores oligonucleotídicos complementarios con los dos bordes 3' de la región ADN a amplificar, después, usando los dos cebadores, se realiza la reacción en cadena de la polimerasa. Véase PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis y col, eds.), Academic Press, San Diego (1990). Pueden seleccionarse cebadores para amplificar regiones enteras que contengan un promotor deseado. También puede usarse PCR para amplificar segmentos de ADN más pequeños de estas regiones, según se desee.

Para aislar moléculas de ADN que contengan promotores del CsVMV Pueden usarse técnicas de amplificación por PCR y técnicas relacionadas de diversas maneras. Por ejemplo, para aislar ácidos nucleicos que contengan los promotores del CsVMV, puede usarse PCR en una diversidad de protocolos. En estos protocolos, a partir del análisis de la lista de secuencias de ADN del presente documento, se generan cebadores y sondas apropiados para la amplificación de ADN que contenga promotores del CsVMV.

Los oligonucleótidos, para su uso en los procedimientos desvelados, pueden sintetizarse químicamente de acuerdo con el procedimiento en fase sólida de triéster de fosoramidita descrito por Beaucage y col, Tetrahedron Lett., 22(20): 1859-1862, 1981, usando un sintetizador automático, como describen Needham-VanDevanter y col, Nucl. Acids Res., 12: 6159-6168, 1984. La purificación de oligonucleótidos es por electroforesis natural en gel de acrilamida o por HPLC de intercambio de aniones como describen Pearson y col, J. Chrom., 255: 137-149, 1983. La secuencia del oligonucleótido sintético puede verificarse usando el procedimiento de degradación química de Maxam y col, Meth. Enzymol., 65: 499-560, 1980.

Como se muestra en el presente documento, pueden producirse diferentes formas de un promotor del CsVMV con diferentes propiedades. Puede construirse un promotor del CsVMV de diversas maneras conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden construirse promotores realizando mapas de sitios de enzimas de restricción en el promotor del CsVMV y después usando el mapa construido para determinar la escisión con enzimas de restricción apropiadas para escindir un subconjunto de la secuencia. El fragmento de restricción más corto puede después

insertarse en un vector adecuado. En el presente documento se muestra la construcción de un promotor específico que controla la expresión de secuencias de ADN heterólogo unidas operativamente. De manera similar, también pueden prepararse otras formas de promotores.

5 Pueden mostrarse formas derivadas de un promotor para expresar secuencias de ADN heterólogo unidas operativamente. Esto puede realizarse preparando en primer lugar un vector que tenga una forma alternativa del promotor unido operativamente a un gen indicador. Las células de plantas se transforman después con el vector y las plantas transgénicas se producen a partir de las células de plantas transformadas. Después, se determina la expresión del gen bajo el control del promotor. Para una demostración de la expresión de una secuencia de ADN heterólogo mediante una forma alternativa de un promotor del CsVMV, véanse los Ejemplos del presente documento

10 Como alternativa, mediante diversos procedimientos, en base a la secuencia de un promotor descrita en el presente documento, puede sintetizarse una molécula de ácido nucleico que comprenda un promotor de la presente divulgación. Como se describe en el presente documento, para la producción de oligonucleótidos, la síntesis puede conseguirse mediante procedimientos sintéticos químicos. Además, la molécula de ácido nucleico puede prepararse mediante la síntesis de una serie de oligonucleótidos que, en la secuencia, se corresponden con diferentes partes del promotor y que pueden combinarse por ligamiento para formar moléculas de ácido nucleico más grandes.

### C. Vectores para expresar proteínas heterólogas

Las diferentes formas de un promotor del CsVMV descritas en el presente documento pueden usarse en casetes de expresión, vectores y otras construcciones de ADN.

20 Un vector de la presente divulgación es una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos del promotor, de acuerdo con la presente divulgación, que está unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico heterólogo. Típicamente, el vector puede expresar, como un gen quimérico, el promotor unido operativamente y las secuencias de ácido nucleico heterólogo. Generalmente, se conocen bien vectores adecuados para su uso en la expresión de genes quiméricos y su limitación no es necesaria.

25 Un gen quimérico, para su uso en un vector en el presente documento, es una fusión entre una secuencia de nucleótidos del promotor de la presente divulgación unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico heterólogo. En un gen quimérico, capaz de modificar un fenotipo de planta, puede usarse cualquiera de una diversidad de secuencias de ácido nucleico heterólogo y puede incluir proteínas o ácidos nucleicos de una planta, de un animal o de otro organismo. Las proteínas ejemplares incluyen proteínas que, desde el punto de vista agrícola, son útiles para aumentar la producción de las plantas, la resistencia a enfermedades, la capacidad para utilizar nutrientes modificados y proteínas similares.

30 Por ejemplo, el promotor del CsVMV puede usarse unido operativamente, por ejemplo, a genes relacionados con la resistencia a herbicidas; genes relacionados con la resistencia a enfermedades fúngicas (por ejemplo, quitinasas y glucanasas); genes relacionados con la resistencia a enfermedades bacterianas (por ejemplo, cecropinas); y genes relacionados con la resistencia a insectos (por ejemplo, la toxina de *B. thuringiensis*). Otros ejemplos incluyen proteínas de cubierta viral tales como la proteína de cubierta del CsVMV o la replicasa del virus del mosaico de la mandioca africana.

El promotor del CsVMV también puede usarse unido operativamente, por ejemplo, a genes relacionados con la maduración o degradación (por ejemplo, Acc oxidasa, Acc sintasa, poligalacturonasa, fitoeno sintasa); genes relacionados con el color; genes relacionados con el sabor dulce, y genes similares.

40 Pueden construirse casetes de expresión que contengan un promotor del CsVMV de diversas maneras. Estas técnicas son conocidas por los expertos en la materia y se describen, en líneas generales, en Sambrook, y col., citado anteriormente. Por ejemplo, para introducir un sitio de restricción en el codón de inicio de un fragmento génico heterólogo, pueden usarse diversos procedimientos, tales como la mutagénesis dirigida. Las secuencias de ADN heterólogo se unen después al promotor del CsVMV, de tal manera que la expresión de las secuencias heterólogas las regule el promotor. Las construcciones de ADN compuestas de un promotor del CsVMV unido operativamente a secuencias de ADN heterólogo pueden después insertarse en diversos vectores. Dichos vectores incluyen vectores de expresión que son útiles en la transformación de células de plantas. Muchos otros vectores de este tipo, útiles en la transformación de células de plantas, pueden construirse mediante el uso de técnicas de ADN recombinante bien conocidas por los expertos en la materia.

50 Los vectores ejemplares para la expresión en protoplastos o en tejidos de plantas incluyen: pUC 18/19 o pUC 118/119 (GIBCO BRL, Inc., MD); pBluescript SK (+/-) y pBluescript KS (+/-) (Stratagene, La Jolla, CA); el vector T de pT7Blue (NOVAGEN, Inc., WI); pGEM-3Z/4Z (PROMEGA Inc., Madison, WI), y vectores similares, tales como los descritos en el presente documento.

55 Los vectores ejemplares para la expresión usando transformación de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens* incluyen pBin 19 (Clontech Inc.), Frisch y col, Plant Mol. Biol., 27: 405-409, 1995; pCAMBIA 1200 y pCAMBIA 1201 (Center for the Application of Molecular Biology to International Agriculture, Canberra, Australia); pGA482, An y col, EMBO J., 4: 277-284, 1985; pCGN1547, (Calgene Inc.) McBride y col, Plant Mol. Biol., 14: 269-

276, 1990, y vectores similares, tales como los descritos en el presente documento.

En Sambrook, y col., *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* (2ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989, se describen, en líneas generales, técnicas de manipulación de genes de ácido nucleico, tales como subclonación de un promotor sujeto o secuencias de ácido nucleico heterólogo en vectores de expresión, sondas marcadoras, hibridación de ADN y similares. En el presente documento se hace referencia a este manual como "Sambrook, y col."

#### D. Plantas transgénicas

La divulgación también contempla una planta transgénica que comprende un promotor de la presente invención en una construcción génica quimérica como se describe en el presente documento. La planta tiene un fenotipo modificado debido a la expresión de la secuencia de ácido nucleico heterólogo que se expresa bajo el control del promotor sujeto. Por lo tanto, la planta transgénica contiene, como parte de la planta, un casete de expresión, como se define en el presente documento, habiéndose introducido el casete por transformación de una planta con un vector de la presente divulgación.

Dado que los promotores de la presente divulgación pueden funcionar en una amplia diversidad de plantas, incluyendo plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, una planta transgénica puede ser cualquier tipo de planta que contenga un promotor sujeto y que pueda expresar la secuencia de ácido nucleico heterólogo en un gen quimérico que contenga el promotor. En el presente documento se describen, más adelante, las especies y los géneros de plantas ejemplares.

Las técnicas para transformar una amplia diversidad de especies de plantas son bien conocidas y se describen en la bibliografía científica y técnica. Véase, por ejemplo, Weising y col, *Ann. Rev. Genet.*, 22: 421-477, 1988. Como se describe en el presente documento, un promotor constitutivo o inducible del CsVMV está unido operativamente a la secuencia de ADN heterólogo deseada en un vector adecuado. El vector, que comprende un promotor del CsVMV fusionado al ADN heterólogo, contendrá típicamente un gen marcador que confiere un fenotipo de selección a las células de la planta. Por ejemplo, el marcador puede codificar resistencia a biocidas, particularmente resistencia a antibióticos, tal como resistencia a kanamicina, G418, bleomicina, higromicina o resistencia a herbicidas, tal como resistencia a clorosulfón o al herbicida Basta. Dichos genes marcadores selectivos son útiles en protocolos para la producción de plantas Transgénicas.

Las construcciones de ADN que contienen un promotor del CsVMV unido a ADN heterólogo pueden introducirse en el genoma del huésped de planta deseado mediante diversas técnicas convencionales. Por ejemplo, la construcción de ADN puede introducirse directamente en el ADN de la célula de la planta usando técnicas tales como electroporación y microinyección de protoplastos de células de plantas. Como alternativa, las construcciones de ADN pueden introducirse directamente en el tejido de la planta usando procedimientos biolísticos, tales como bombardeo con micropartículas de ADN. Además, las construcciones de ADN pueden combinarse con regiones flanqueantes de ADN T adecuadas e introducirse en un vector huésped convencional de *Agrobacterium tumefaciens*. Cuando la bacteria infecta la célula, las funciones de virulencia del hospedador *Agrobacterium tumefaciens* dirigirán la inserción de la construcción y de un marcador adyacente en el ADN de la célula de la planta.

Las técnicas de microinyección se conocen en la técnica y se describen bien en la bibliografía científica y de patentes. En Paszkowski y col, *EMBO J.*, 3: 2717-2722, 1984 se describe la introducción de construcciones de ADN usando precipitación con polietilenglicol. Las técnicas de electroporación se describen en Fromm y col, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 5824, 1985. Las técnicas de transformación biolística se describen en Klein y col, *Nature* 327: 70-73, 1987.

Una variación implica la penetración biolística a alta velocidad por pequeñas partículas con el ácido nucleico bien dentro de la matriz de perlas o partículas pequeñas, o bien en la superficie (Klein y col, *Nature*, 327: 70-73, 1987). Aunque típicamente solo se requiere una única introducción de un nuevo segmento de ácido nucleico, este procedimiento proporciona particularmente introducciones múltiples.

En la bibliografía científica se describen bien técnicas de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Véanse, por ejemplo Horsch y col, *Science*, 233: 496-498, 1984, y Fraley y col, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 4803, 1983. Para una demostración de la transformación de células de plantas, por *Agrobacterium tumefaciens*, con un vector que comprende un promotor del CsVMV, véanse los Ejemplos del presente documento.

Más específicamente, una célula de planta, un explante, un meristema o una semilla se infecta con *Agrobacterium tumefaciens* transformada con el segmento. En condiciones apropiadas conocidas en la técnica, las células de las plantas transformadas se cultivan para formar brotes, raíces y desarrollarse posteriormente en plantas. Los segmentos de ácido nucleico pueden introducirse en células de plantas apropiadas, por ejemplo, mediante el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. El plásmido Ti se transmite a las células de las plantas tras la infección por *Agrobacterium tumefaciens* y se integra establemente en el genoma de la planta (Horsch y col, *Science*. 233: 496-498, 1984; Fraley y col, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.*, 80: 4803, 1983.

El plásmido Ti contiene dos regiones esenciales para la producción de células transformadas. Una de estas,

- denominada ADN de transferencia (ADN T), induce la formación de tumores. La otra, denominada región virulenta, es esencial para la introducción del ADN T en plantas. La región ADN de transferencia, que se transfiere al genoma de la planta, pueden aumentar de tamaño mediante la inserción de la secuencia de ácido nucleico extraño sin que su capacidad de transferencia resulte afectada. Eliminando los genes que producen tumores, para que no interfieran más, el plásmido Ti modificado puede usarse después como un vector para la transferencia de las construcciones génicas de la invención en una célula de planta apropiada, siendo así un "vector Ti desactivado".
- 5
- Todas las células de plantas que pueden transformarse por *Agrobacterium* y plantas completas regeneradas a partir de las células transformadas también pueden transformarse de acuerdo con la invención para producir plantas completas transformadas que contengan la secuencia de ácido nucleico extraña transferida.
- 10 Existen diversas maneras de transformar las células de las plantas con *Agrobacterium*, incluyendo:
- (1) co-cultivo de *Agrobacterium* con protoplastos aislados cultivados,
  - (2) co-cultivo de células o tejidos con *Agrobacterium*, o
  - (3) transformación de semillas, ápices o meristemas con *Agrobacterium*.
- 15 El procedimiento (1) requiere un sistema de cultivo establecido que permita el cultivo de protoplastos y la regeneración de plantas a partir de protoplastos cultivados.
- El procedimiento (2) requiere (a) que las células o los tejidos de la planta puedan transformarse por *Agrobacterium* y (b) que las células o los tejidos transformados puedan inducirse para regenerarse en plantas completas.
- El procedimiento (3) requiere micropropagación.
- 20 En el sistema binario, para que exista infección, se requieren dos plásmidos: un plásmido que contenga ADN T y un plásmido vir.
- Puede usarse cualquiera de una diversidad de plásmidos que contengan ADN T, el único requisito es que uno sea capaz de seleccionar independientemente cada uno de los dos plásmidos.
- 25 Después de la transformación de la célula de la planta o de la planta, mediante un marcador fenotípico apropiado, pueden seleccionarse aquellas células de plantas o plantas transformadas por el plásmido Ti, de tal manera que se integre el segmento de ADN deseado. Estos marcadores fenotípicos incluyen, pero sin limitación, resistencia a antibióticos, resistencia a herbicidas u observación visual. En la presente invención pueden usarse otros marcadores fenotípicos conocidos en la técnica.
- 30 La presente descripción incluye el uso de los promotores desvelados en la transformación de cualquier planta, incluyendo tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas. La transformación de dicotiledóneas se describe en referencias indicadas anteriormente. La transformación de monocotiledóneas se conoce usando diversas técnicas que incluyen, electroporación (por ejemplo, Shimamoto y col, *Nature*, 338: 274-276, 1992; balística (por ejemplo, Solicitud de Patente Europea 270.356); y *Agrobacterium* (por ejemplo, Bytebier y col, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 84: 5345-5349, 1987).
- 35 Las células de plantas transformadas que derivan de cualquiera de las técnicas de transformación indicadas anteriormente pueden cultivarse para regenerar una planta completa que posea el fenotipo transformado deseado. Dichas técnicas de regeneración se basan en la manipulación de determinadas fitohormonas en un medio de crecimiento de cultivo tisular típicamente basado en un marcador biocida y/o herbicida que se ha introducido junto con las secuencias de nucleótidos. La regeneración de plantas a partir de protoplastos cultivados se describe en Evans y col, *Handbook of Plant Cell Culture*, páginas. 124-176, MacMillan Publishing Company, Nueva York, 1983; y Binding, *Regeneration of Plants, Plant Protoplasts*, páginas 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985. La regeneración también puede obtenerse a partir de callos, explantes, órganos de la planta o partes de los mismos. Klee y col, *Ann. Rev. Plant Pays.*, 38: 467-486, 1987 describen, en líneas generales, dichas técnicas de regeneración.
- 40 En las Patentes de Estados Unidos Nos 5.188.642; 5.202.422; 5.463.175 y 5.639.947, se describen procedimientos adicionales para producir una planta transgénica útil en la presente invención.
- 45 Un experto en la materia reconocerá que, en plantas transgénicas, después de incorporar, de manera estable, un casete de expresión que comprende el promotor del CsVMV y que se ha confirmado que es operativo, este puede introducirse en otras plantas por cruzamiento sexual. Dependiendo de la especie a cruzar, puede usarse cualquiera de una diversidad de técnicas de reproducción convencionales.
- 50 Los procedimientos y composiciones de la invención tienen uso sobre una amplia serie de tipos de plantas, incluyendo especies de los géneros *Fragaria*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Vigna*, *Citrus*, *Linum*, *Geranium*, *Manihot*, *Daucus*, *Arabidopsis*, *Brassica*, *Raphanus*, *Sinapis*, *Atropa*, *Capsicum*, *Hyoscyamus*, *Lycopersicon*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Petunia*, *Digitalis*, *Majorana*, *Cichorium*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Bromus*, *Asparagus*, *Antirrhinum*, *Herecocalis*, *Nemesia*, *Pelargonium*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Ranunculus*, *Senecio*, *Salpiglossis*, *Cucumis*, *Browaalia*, *Glycine*, *Lolium*, *Zea*, *Triticum*, *Sorghum*, *Datura*, *Chrysanthemum*, *Dianthus*, *Gerbera*,

Euphorbia, Ipomoea, Passiflora, Cyclamen, Malus, Prunus, Rosa, Rubus, Populus, Santalum, Allium, Liliun, Narcissus, Ananas, Arachis, Phaseolus y Pisum, e incluyendo, más particularmente, cultivos oleaginosos, tales como colza (*Brassica* sp.), algodón (*Gossypium* sp.), cacahuete (*Arachis* sp.), girasol (*Helianthus* sp.), palma (*Elaeis* sp.), lino (*Linum* sp.), cártamo (*Carthamus* sp.), coco (*Cocos* ap.) y soja (*Glycine* sp.); cultivos de grano tales como trigo (*Triticum* sp.), maíz (*Zea* sp.), sorgo (*Sorghum* sp.), cebada (*Hordeum* sp.), centeno (*Secale* sp.), avena (*Averia* sp.) y arroz (*Oryza* sp.); cultivos de frutas tales como banana (*Musa* sp.), cítricos (*Citrus* sp.), bayas (por ejemplo, fresa (*Fragaria* Sp.) o frambuesa (*Rubus* sp.), mango (*Mangifera* sp.), melón (*Cucumis* sp.), pera (*Pyrus* sp.), pepino (*Cucumis* sp.), y albaricoque, melocotón, cereza, ciruela y ciruela pasa (*Prunus* sp.); cultivos hortícolas, tales como guisante (*Pisum* sp.), judía (*Vicia* sp.), brócoli y crucíferas relacionadas (*Brassica* sp.), espinaca (*Spinacia* sp.), cebolla (*Allium* sp.), apio (*Apiurti* sp.), zanahoria (*Daucus sal.*), espárrago (*Asparagus* sp.), y alcachofa (*Helianthus* sp.); tomate (*Lycopersicon esculenium*), pimiento (*Capsicum annuum*); cultivos ornamentales adicionales tales como tulipán (*Tulipa* sp.), cabeza de dragón (*Antirrhinum* sp.), Iris (*Iris* sp.), Orquídea (*Cymbidium* y *Cattleya* sp.), geranio; cultivos para bebidas tales como café (*Coffea* sp.) y té (*Thea* sp.); cultivos de hierbas tales como menta (*Mentha* sp.), timo (*Thymus* sp.) mejorana (*Origanum* sp.), quimbombó, café, patata, tubérculos, taro.

#### 15 E. Procedimientos para expresar ácidos nucleicos heterólogos en plantas

Las construcciones de ADN, genes quiméricos y casetes de expresión que contienen promotores del CsVMV de la presente divulgación pueden usarse para transformar células de plantas y producir plantas transgénicas con características fenotípicas deseadas. Existe una diversidad de estrategias diferentes que pueden usarse para producir un fenotipo deseado en plantas transgénicas. Por ejemplo, usando procedimientos descritos en el presente documento, un nuevo gen puede unirse operativamente a un promotor del CsVMV y transformar células de plantas. Las plantas transgénicas pueden producirse a partir de las células de las plantas transformadas de manera que el nuevo producto génico se produzca en todos los tejidos o solamente en determinados tejidos de una planta transgénica. En este contexto, la expresión "nuevo gen" se refiere a un gen que, normalmente, no está presente en una planta o que si lo está, no se expresa normalmente en un tejido de célula de la planta. La expresión del nuevo gen puede dar como resultado la producción de una proteína que confiere un fenotipo modificado para una planta transgénica.

Por tanto, la divulgación contempla un procedimiento para expresar una secuencia de ácido nucleico heterólogo en una célula de planta que comprende:

- a) transformar la célula de planta con un vector que comprenda una secuencia de nucleótidos del promotor de acuerdo con la presente invención que esté unida operativamente a la secuencia de ácido nucleico heterólogo; y
- b) cultivar la célula de planta en condiciones en las que la secuencia de ácido nucleico heterólogo se exprese en la célula vegetal.

Los procedimientos para transformar una célula de planta pueden variar ampliamente y no es necesaria su limitación. En el presente documento se describen procedimientos de transformación ejemplares.

El procedimiento para la expresión puede incluir objetivos tales como proporcionar una proteína heteróloga que confiera un fenotipo deseable después de la expresión y transcripción de la secuencia de ácido nucleico heterólogo, para proporcionar un ácido nucleico expresado que pueda funcionar como una molécula anti-sentido, para proporcionar un ácido nucleico expresado que pueda regular la expresión génica o procesar ácidos nucleicos, y objetivos similares dentro de una planta transgénica.

Por lo tanto, pueden usarse construcciones de ADN que contengan un promotor del CsVMV unido operativamente a una secuencia de ADN heterólogo en diversas técnicas para suprimir la expresión de genes de plantas endógenos, por ejemplo supresión con sentido o antisentido. En la tecnología antisentido, un segmento de ácido nucleico del gen de la planta deseado se clona y se une operativamente a un promotor del CsVMV de tal manera que se sintetizará la cadena antisentido del ARN. Después, la construcción se transforma en plantas y se produce la cadena antisentido de ARN. En las células de plantas, se ha observado que, el ARN antisentido, inhibe la expresión génica; véase por ejemplo Sheehy y col, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85: 8805-8809, 1988, y Hiatt y col., Patente de Estados Unidos N° 4.801.340.

El segmento de ácido nucleico a introducir en supresión antisentido generalmente será sustancialmente idéntico a al menos una parte del gen o genes endógenos, funciona o funcionan para reprimir pero no son necesariamente idénticos. Los vectores de la presente invención pueden diseñarse de tal manera que el efecto inhibitorio se aplique a otras proteínas dentro de una familia de genes que presentan homología u homología sustancial con el gen diana. Pueden usarse segmentos de un gen (1) directamente para inhibir la expresión de genes homólogos en diferentes especies de plantas o (2) como un medio para obtener las secuencias correspondientes, que pueden usarse para suprimir el gen.

Tampoco es necesario que la secuencia introducida sea de longitud completa con respecto al producto de transcripción primario o ARNm completamente procesado. Generalmente, para compensar el uso de una secuencia más corta puede usarse mayor homología. Adicionalmente, no es necesario que la secuencia introducida tenga el

mismo modelo de intrón o exón y homología de segmentos no codificantes y la homología de segmentos no codificantes será igualmente eficaz. Normalmente, debe usarse una secuencia de entre aproximadamente 30 o 40 nucleótidos y aproximadamente de 2.000 nucleótidos, aunque se prefiere una secuencia de al menos aproximadamente 100 nucleótidos, siendo más preferida una secuencia de al menos aproximadamente 200 nucleótidos, y prefiriéndose especialmente una secuencia de al menos aproximadamente 500 nucleótidos.

También se ha descrito que las moléculas o ribozimas de ARN catalíticas se han usado como un medio para inhibir la expresión de genes de plantas endógenos. Es posible diseñar ribozimas que se emparejen específicamente con prácticamente cualquier ARN diana y escindan la estructura fosfodiéster en una localización específica, inactivando funcionalmente así el ARN diana. Realizando esta escisión, la ribozima no se modifica a sí misma, y por tanto es capaz de reciclar y escindir otras moléculas, haciendo que sea una enzima genuina. La inclusión de secuencias de ribozima dentro de los ARN antisentido confiere actividad de escisión de ARN después de esto, aumentando de esta manera la actividad de las construcciones.

Se han identificado diversos casos de ribozimas. Una clase de ribozimas deriva de una serie de ARN circulares de tamaño pequeño que pueden autoescindirse y replicarse en plantas. Los ARN se replican en solitario (ARN viroide) o con un virus auxiliar (ARN satélite). Los ejemplos incluyen los ARN del viroide de la mancha solar del aguacate y los ARN satélite del virus de la mancha anular del tabaco, virus del veteado transitorio de la alfalfa, virus del moteado aterciopelado del tabaco, virus del moteado de *Solanum nodiflorum* y virus del moteado del trébol subterráneo. En Haseloff y col, Nature, 334: 585-591, 1988, se describe el diseño y el uso de ribozimas específicas de ARN diana.

Un procedimiento preferido de supresión es la supresión en sentido. Se ha demostrado que la introducción de un ácido nucleico configurado en la orientación en sentido es un medio eficaz mediante el cual se bloquea la transcripción de genes diana. Para ejemplos del uso de este procedimiento para modular la expresión de genes endógenos, véase Napoli y col, The Plant Cell, 2: 279-289, 1990, y la Patente de Estados Unidos N° 5.034.323. La supresión en sentido es un procedimiento preferido para el control de la maduración (por ejemplo Acc oxidasa o Acc sintasa), control del sabor dulce (por ejemplo, ADPG pirofosforilasa) o modificación del color (por ejemplo chalcona sintasa); véase la Patente de Estados Unidos N° 5.034.323.

Generalmente, en la supresión en sentido, se produce la transcripción de la secuencia introducida. El efecto también puede producirse cuando la secuencia introducida no contiene, de por sí, secuencias codificantes, sino solo secuencias intrónicas o no traducidas, homólogas a las secuencias presentes en el transcrito primario de la secuencia endógena. Generalmente, la secuencia introducida será sustancialmente idéntica a la secuencia endógena que se pretende reprimir. Esta identidad mínima será típicamente mayor de aproximadamente el 65%, pero una mayor identidad es útil para ejercer una represión más eficaz de la expresión de las secuencias endógenas. Sustancialmente se prefiere una identidad mayor de más de aproximadamente 80%, aunque sería más preferido de aproximadamente el 95% con respecto a la identidad absoluta. El efecto puede aplicarse a otras proteínas dentro de una familia de genes similar que presentan homología u homología sustancial. Pueden usarse segmentos de un gen (1) para inhibir directamente la expresión de genes homólogos en diferentes especies de plantas o (2) como un medio para obtener las secuencias correspondientes, que pueden usarse para suprimir el gen.

En la supresión en sentido, la secuencia introducida, que requiere menos que una identidad absoluta, tampoco es necesario que sea de longitud completa con respecto al producto de transcripción primario o ARNm completamente procesado. Una mayor identidad en una secuencia de longitud completa más corta, compensa una secuencia menos idéntica más larga. Adicionalmente, la secuencia introducida no es necesario que tenga el mismo patrón de intrón o exón, y la identidad de segmentos no codificantes puede ser igualmente eficaz. Se prefiere una secuencia de un tamaño de al menos 50 pares de bases, siendo más preferidas secuencias de mayor longitud; véase la Patente de Estados Unidos N° 5.034.323.

La expresión de las secuencias de ADN heterólogo unidas a un promotor del CsVMV puede detectarse de diversas maneras, dependiendo de la naturaleza de las secuencias heterólogas. Por ejemplo, el fenotipo deseado puede someterse a ensayo. El fenotipo deseado que resulta del éxito de la expresión de las secuencias de ADN heterólogo bajo el control de un promotor del CsVMV puede determinarse de diversas maneras, dependiendo del rasgo fenotípico que se introduzca. Por ejemplo, la resistencia a un herbicida puede detectarse por tratamiento con el herbicida.

La expresión del ADN heterólogo también puede detectarse midiendo el producto específico de la transcripción del ARN. Esto puede realizarse, por ejemplo, mediante protección con RNAsa o procedimientos de transferencia de Northern. Si las secuencias de ADN heterólogo codifican una nueva proteína, el producto proteico puede someterse a ensayo, por ejemplo, mediante su función o mediante una diversidad de técnicas de inmunoensayo. Por ejemplo, en un ensayo enzimático puede medirse un nuevo producto proteico con actividad enzimática.

### Ejemplos

A modo ilustrativo y no limitativo se proporcionan los siguientes ejemplos.

#### 1. Aislamiento de un promotor del virus del mosaico de la nervadura de la mandioca (CsVMV)

Se realizaron técnicas moleculares como describen esencialmente Sambrook y col, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Los números de nucleótidos se refieren a la secuencia de nucleótidos del genoma del virus del mosaico de la nervadura de la mandioca descritos por Calvert y col, J Gen Virol, 76: 1271-1276, 1995, y publicados con los Nos de Acceso a GeneBank U59751 y U20341. El GeneBank es una base de datos de secuencias de nucleótidos proporcionada por la National Medical Library en el National Center for Biotechnology Information en el National Institutes of Health, Bethesda, MD. El clon genómico de longitud completa original del CsVMV lo proporcionó el Dr. R. Shepherd (Universidad de Kentucky). El clon se construyó ligando el ADN genómico viral de longitud completa del CsVMV cortado en un solo sitio con BglII en el sitio BglII del plásmido pCKIZ, Anza, O., Replication and mapping of caulimoviruses, PhD thesis, University of California, David, Estados Unidos de América, 1982. Se aislaron seis fragmentos solapantes usando sitios de restricción convenientes y cada fragmento se clonó en el plásmido pUC119. Se realizó secuenciación automática, usando un aparato de secuenciación modelo 373A de Applied Biosystems, por elongación mediada por Taq usando cebadores marcados con colorante. Cuando era necesario, se realizaban las reacciones de la PCR y se llevaba a cabo la secuenciación directa del producto de la PCR. Usando el programa informático SeqEd, proporcionado por el fabricante del secuenciador automatizado, se recopilaron los datos de secuencia.

Los fragmentos de restricción derivados directamente del clon genómico se clonaron en el plásmido pUC119. Usando estos subclones, se aislaron dos fragmentos de ADN virales que contenían un motivo de la caja TATA consenso (Figura 1). Por digestión enzimática con AluI se obtuvo un fragmento denominado CVP1 que incluía los nucleótidos 7235 a 7623 del CsVMV. Por amplificación con PCR se aisló un fragmento más largo que contenía los nucleótidos 7160 a 7675 del CsVMV y se denominó CVP2. Los dos oligonucleótidos usados en la reacción de la PCR fueron: cebador 1, 5'ACCGGTACCAGAAGGTAATTATCCAAGATGT3' (SEC ID N°: 18) (secuencia del CsVMV del nucleótido 7160 al 7183 con la adición de un sitio de restricción KpnI en el extremo 5') y el cebador 2, 5'CGGAATTCAAACTTACAAATTTCTCTGAAG3' (SEC ID N°: 19) (secuencia del CsVMV complementaria a los nucleótidos 7652 a 7675 con la adición de un sitio de restricción EcoRI en el extremo 5'). La reacción de amplificación contenía 25 pmol de cada cebador, 200 µM de cada dNTP, 100 ng de ADN plasmídico que contenía la secuencia a amplificar, 2,5 U de Pfu polimerasa y el tampón apropiado (Stratagene). Se realizó desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos y después la mezcla de reacción se desnaturalizó a 94 °C durante 1 minutos, se hibridó a 60 °C durante 1 minuto y se alargó a 72 °C durante 1 minuto para cada uno de los 15 ciclos. Se realizó ampliación final durante 5 minutos a 72 °C. La precisión de la secuencia del producto de amplificación se confirmó posteriormente por secuenciación de terminación de cadena con didesoxinucleótidos (Sequenasa-USB).

Para estudiar la actividad de los promotores se usaron los plásmidos quiméricos pLTAB:CVP1 y pLTAB:CVP2 (Figura 1) y se prepararon como se describe más adelante. Los fragmentos promotores CVP1 y CVP2 se ligaron respectivamente en los sitios SmaI y EcoRI/KpnI del pGN100, un plásmido derivado de pUC 119 que contenía la secuencia codificante de uidA unida a la señal de poliadenilación en 3' del gen neopalina sintasa (nos 3') como se ilustra en la Figura 1.

Los casetes que contenían los genes de fusión promotor del CsVMV:uidA se escindieron, mediante digestión con KpnI/HindIII, de pLTAB:CVP1 y pLTAB:CVP2 y se subclonaron en los sitios KpnI/HindIII en el vector binario pBIN19 (Clontech) usado para la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*. El plásmido pe35GN contiene el promotor 35S potenciado, Kay y col, Science, 236: 1299-1302, 1987, y la secuencia codificante de uidA unida al extremo nos 3'. El plásmido pDO432 contiene la secuencia codificante de luciferasa de *Photinus pyralis* bajo el control del promotor 35S, Ow y col, Science, 234: 856-859, 1986. Cada plásmido pLTAB:CVP1, pLTAB:CVP2 y pe35GN, usado en los experimentos de ensayo transitorios, tenía un tamaño aproximado de 5,5 kb.

## 2. Sitio de inicio de la transcripción para el promotor del CsVMV

El sitio de inicio de la transcripción del promotor del CsVMV se determinó mediante análisis de extensión con cebadores usando ARN total recogido de plantas transgénicas de tabaco que contenían el gen de fusión CVP1: uidA preparado como se describe en el Ejemplo 4.

El ARN total se extrajo de hojas jóvenes de plantas transgénicas de tabaco como describen Prescott y Martin, Plant Mol Biol Reporter, 4: 219-224, 1987, con escasas modificaciones. Se realizó extensión con cebadores con un oligonucleótido de 34 pb de longitud con la secuencia 5'-CGCGATCCAGACTGAATGCCACAGGCCGTCGAG-3' (SEC ID N°: 20) que es complementaria a una región de 34 nucleótidos cadena abajo del codón de inicio ATG en el gen uidA. El oligonucleótido (20 pmol) se marcó en el extremo 5' usando 6 U de polinucleótido quinasa de T4 (USB) y 7 µCi de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (3000 µCi/mmol, 10 µCi/µl). Después de la reacción de marcado el cebador se purificó usando columnas NuTrap Push (Stratagene). Una décima parte de pmol del cebador marcado se mezcló con 50 µg de ARN total de plantas transgénicas. El experimento se realizó de acuerdo con Sambrook y col, Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, salvo que la hibridación se realizó a 30 °C o a 40 °C durante 12 horas, y la reacción de extensión prosiguió durante 1 hora a 42 °C con 20 U de AMV transcriptasa inversa (Gibco-BRL). Los productos de extensión se separaron en un gel de poliacrilamida al 7,5% que contenía urea 7 M. Las reacciones de secuencia (Sequenasa-USB) realizadas con el mismo cebador marcado se sometieron a electroforesis en carriles adyacentes en el mismo gel.

Se detectó un solo producto de extensión principal y se realizó un mapa para un resto de adenina (nt. 7604) localizado 35 nucleótidos cadena abajo de la supuesta caja TATA (Figura 2). Por comparación con la localización del inicio de la transcripción descrito para otros promotores de pararetrovirus de plantas (Guilley y col, Cell, 30: 763-773, 1982; Hay y col, Nucl Acids Res, 19: 2615-2621, 1991; Medberry y col, Nucl Acids Res, 18: 5505-5513, 1990; y Sanfa on, H., Virology, 198 :39-49, 1994) el sitio de inicio de la transcripción descrito en el presente documento en el nucleótido 7604 representa el extremo 5' del transcrito del CsVMV. Comparando la secuencia del promotor del CsVMV de la caja TATA para el inicio de la transcripción con la de los promotores de caulimovirus 34S del FMV y 35S del CaMV (Gardner y col, Nucl Acids Res, 9: 2871-2887, 1981. 17; y Richins y col, Nucl Acids Res 15: 8451-8466, 1987) se llegó a la conclusión de que estos tres promotores estaban, en esta región, muy relacionados entre sí. En cambio hay menos homología con los promotores de badnavirus (ComYMV y RTBV).

En la Figura 3 se representa la secuencia de nucleótidos de la región promotora de un genoma del CsVMV y se confirmó mediante los resultados descritos por Calvert y col, J Gen Virol, 76: 1271-1276, 1995. El sistema de numeración mostrado en la Figura 3 se basa en el sitio de inicio de la transcripción en el que +1 se corresponde con el sitio de inicio de la transcripción indicado en el presente documento como nucleótido 7604 usando los números de la secuencia genómica. Por tanto, CVP1 comprende 387 nucleótidos desde la posición -368 a la +20 y CVP2 comprende un fragmento de 514 nucleótidos desde la posición -443 a la +72 (Figura 3).

Una comparación de la secuencia del promotor del CsVMV con secuencias de promotores de pararetrovirus, concretamente el promotor 35S del CaMV, Gardner y col, Nucl Acids Res, 9: 2871-2887, 1981, el promotor 34S del FMV, Richins y col, Nucl Acids Res 15: 8451-8466, 1987, del RTBV, Qu y col, Virology, 185: 354-364, 1991, y del ComYMV, Medberry y col, Nucl Acids Res, 18: 5505-5513, 1990, revelaron la presencia de una caja TATA conservada, como se ha mencionado anteriormente, y un motivo de 17 nucleótidos AGACGTAAGCACTGACG (posición -203 a -219) (SEC ID N°: 21) que tiene una fuerte homología con el potenciador transcripcional as1 encontrado en el promotor 35S del CaMV, FMV y ComYMV. También se identificó una secuencia de 22 nucleótidos CTTATCACAAAG-GAATCTTATC (posición -90 a -111) (SEC ID N°: 22) que estaba presente en el promotor del ComYMV pero no en los promotores del RTBV o de caulimovirus. Esta homología limitada indicó que los autores de la invención habían aislado un promotor de pararetrovirus de plantas distinto.

Además, recientes desarrollos en el campo de la taxonomía de virus han reconocido las diferencias entre el virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el virus del mosaico de la nervadura de la mandioca (CsVMV) hasta el punto en el que se ha adoptado un nuevo gen para el CsVMV. Específicamente, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) se congregó en mayo de 1997 y adoptó un cambio en la nomenclatura viral de tal manera que el CsVMV se incluyó en el género "cassemovirus" y el CaMV en el género caulimovirus.

La base del cambio se resume en la Figura 4 que ilustra una comparación de la organización genómica de diversos virus relacionados. En particular, se observa que el orden de dos de las proteínas principales (proteína de cubierta y proteína del movimiento) está invertido en el genoma relativo al CaMV, y que estas dos proteínas están codificadas por una sola ORF que se procesa como una poliproteína mientras que en el CaMV estas dos proteínas están codificadas por dos ORF distintas denominadas ORF1 y ORF4, y la secuencia de nucleótidos real de muchas de las ORF es sustancialmente diferente de la del CaMV.

Usando programas del paquete informático DNASTAR de Macintosh (DNASTAR Inc., Madison, WI) se analizaron las secuencias virales. Las secuencias publicadas se obtuvieron procedentes del GeneBank usando, para cada cepa viral, los siguientes números de publicación (entre paréntesis): cepa de Estrasburgo del CaMV (J02048), CERV (X04658), FMV (X06166), SVBV (X97304), PCSV (U1398B), SbCMV (X15828), RTBV (M65026), ComYMV (X52938), CSSV (L14546), ScBV (M89923).

Teniendo en cuenta los grados de homología entre el CaMV y el CsVMV, se observa que existe aproximadamente una homología del 23% entre las secuencia promotoras, mientras que los promotores del CaMV y del FMV muestran una homología de aproximadamente el 47%. De manera similar, por alineamiento de la región entre el inicio de la ORF1 con el extremo de la ORF5, existe una homología del 35% entre el CsVMV y el CaMV en comparación con una homología del 56% entre el CaMV y el FMV.

### 3. Aislamiento, transformación y cultivo de protoplastos

Se aislaron protoplastos de tabaco de cultivos en suspensión de células BY-2 (*Nicotiana tabacum* L, cv. Amarillo Brillante, *Bright Yellow*) y se transfectaron con ADN básicamente como describen Kikkawa y col, J. Gen. Virol., 63: 457-467, 1982.

Se prepararon protoplastos de mandioca de cultivos en suspensión de células embrionarias de *Manihot esculenta* L. cv TMS60444, Taylor y col, Proceedings of the Second International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network - CBN II, Bogor, Indonesia, páginas 229-240, 1995. Para el aislamiento de los protoplastos se recogieron 50 ml de un cultivo de 10 días (el medio se renovó cada 2 días). Antes de la digestión enzimática, las células se resuspendieron en 30 ml de medio que contenía manitol 0,55 M, sales de Schenk y Hilderbrandt 3,2 g/l (Sigma), vitaminas de Murashige y Skoog 1x(Sigma), CaCl<sub>2</sub> 20 mM, pH 5,8 [medio A]. Se permitió la sedimentación de las células y el medio A se sustituyó por una solución enzimática que consistía en medio A complementado con celulasa

Onozuka RS al 2% y Pectoliasa Y 23 al 0,1%. La digestión se realizó en la oscuridad durante 3,5 h a 27 °C. Las células se agitaron suavemente durante la primera hora de tratamiento. La mezcla de incubación se filtró secuencialmente a través de filtros de 100 µm y 70 µm. Los protoplastos se llevaron 3 x por centrifugación a 100 x g durante 10 min en medio A. El número de protoplastos se calculó usando un hemocitómetro.

- 5 Los protoplastos purificados se resuspendieron a una densidad final de  $10^6$  células/ml en tampón de electroporación que contenía Mes 5 mM, NaCl 130 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, manitol 0,45 M, pH 5,8. En una cubeta de longitud de trayectoria de 0,4 cm. se añadieron 200 µl de tampón de electroporación, que contenía 30 µg de cada plásmido, preparado en el presente documento, a 800 µl de suspensión de protoplastos. La captación de ADN se realizó usando un instrumento Gene Pulser (Biorad) que suministraba un impulso de 300 V a una capacitancia de 500 µF.
- 10 Después de la electroporación los protoplastos se incubaron en hielo durante 30 minutos, después de lo cual se resuspendieron a una densidad de  $10^5$  células/ml en medio de cultivo A complementado con sacarosa al 2% y Pichloran  $5 \times 10^{-5}$  M. Después de 24 horas de incubación en la oscuridad a 27 °C, los protoplastos se recogieron por centrifugación (10 min a 100 x g) y se resuspendieron en tampón de extracción con GUS, Jefferson y col, EMBO J, 6: 3901-3907, 1987, pH 7.7.

#### 15 4. Transformación de plantas con *Agrobacterium*

Las construcciones génicas presentes en los plásmidos pBIN19 y preparadas como se describe en los Ejemplos se introdujeron en la cepa LBA4404 de *Agropacterium tumefaciens* por electroporación, Singh y col, Focus, 15: 84-87, 1993. Para infectar discos foliares de *Nicotiana tabacum* cv Xanthi NN, se usó *Agrobacterium* modificada, de acuerdo con al procedimiento descrito por Horsch y col, Plant Molecular Biology Manual, páginas A5/1- A5/9. Kluwer

20 academic publishers, Dordrecht, 1988. Plantas regeneradas resistentes a kanamicina se transfirieron al suelo y se cultivaron en invernadero. Se produjeron siete líneas transgénicas independientes que contenían la construcción CVP1 y ocho que contenían la construcción CVP2. Las plantas cultivadas en el invernadero se dejaron autofertilizar y se recogieron semillas R1. Las semillas R1 germinaron en medio de Murashige y Skoog (MS), Murashige y col, Physiol Plant, 15: 473-497, 1962, que contenía kanamicina y las plantas de semillero se cultivaron en invernadero.

#### 25 5. Transformación de plantas usando bombardeo con partículas

Se cortaron hojas y tallos de plántulas de mandioca (variedad de cultivo Mcol 1505) cultivadas *in vitro* en medio que contenía sales y vitaminas MS, sacarosa 20 g/l, CuSO<sub>4</sub> 2 µM, Phytigel 3 g/l, pH 5,7. Los explantes se seccionaron y los fragmentos tisulares se colocaron posteriormente en el centro de placas de Petri de 9 cm que contenían medio de cultivo solidificado. Se realizó microbombardeo con un sistema de suministro de partículas accionado por helio

30 (PDS 1000/He-BioRad). La preparación de las partículas de oro (diámetro medio de 1,6 µm) y la partículas de revestimiento con ADN se realizó esencialmente como se describe en el manual de instrucciones (BioRad).

Las placas diana se colocaron en la cámara de disparo en el tercer nivel desde la parte inferior mientras que el ensamblaje macrotransportador/tamiz de detención se colocó en el quinto nivel. Se realizaron dos disparos por cada placa a una presión de 1100 PSI aproximadamente con 1 µg de ADN plasmídico preparado como se describe en los

35 Ejemplos. Tras el bombardeo, se añadió agua estéril a las placas para impedir la deshidratación del material. Los explantes se incubaron durante 2 días en la oscuridad a 25 °C antes de realizar los ensayos GUS histoquímicos.

Se obtuvieron siete líneas de arroz transgénicas (*Oryza sativa* L. Taipei 309) mediante bombardeo de partículas como describen Li y col, Plant Cell Reports, 12: 250-255, 1993, usando pLTAB:CVP2 en asociación con pMON410 (Monsanto Co.); este último contiene el gen de resistencia a higromicina.

#### 40 6. Ensayos con luciferasa y glucuronidasa para medir la actividad del promotor del CsVMV

Se realizó la lisis de los protoplastos transfectados sometiendo a agitación vorticial durante 2 minutos en tampón de extracción con GUS, pH 7,7. Los extractos se aclararon por centrifugación (5000 x g, 5 min) a 4 °C en una microcentrífuga. El sobrenadante se recuperó y se usó para los ensayos MUG y LUC. La actividad GUS se determinó usando 4-metil-umbeliferil-β-D-glucurónido (MUG-Sigma) mediante el procedimiento de Jefferson y col, EMBO J, 6: 3901-3907, 1987, y se cuantificó para 50 µl de extracto como pmoles de metilumbeliferona (MU) por

45 hora. La actividad LUC se determinó en 50 µl del mismo extracto de proteína con un luminómetro (Monolight 2010) usando un ensayo luciferasa (Analytical Luminescence Laboratory, San Diego, CA). La transfección conjunta de células con un gen uidA más un plásmido luciferasa permitió a los autores de la invención normalizar variaciones de la actividad GUS entre experimentos, Leckie y col, BioTechniques, 17: 54-57, 1994. Los datos GUS normalizados se expresaron con pmoles de metilumbeliferona (MU) por hora por unidad de luz emitida.

50

El tejido de las plantas transgénicas se cultivó en tampón GUS, pH 8, y la actividad GUS se evaluó como describen Jefferson y col, EMBO J, 6: 3901-3907, 1987. La actividad enzimática (pmol/min) se refirió a mg de proteína según se determina mediante el procedimiento de unión a colorante de Bradford, M., Anal. Biochem, 72: 248-254, 1976.

Se realizó análisis histoquímico de actividad GUS esencialmente como describen Jefferson y col, EMBO J, 6: 3901-3907, 1987. Durante 4 a 8 horas, se incubaron a 37 °C pequeños fragmentos de hoja y tallo procedentes de

55 transformantes primarios o de progenie R1 en tampón de reacción que contenía 5-bromo-4-cloro-3-indolil

glucurónido (X-gluc) 1 mM, tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7, ferrocianuro potásico y ferricianuro potásico 2 mM, y Tritón X-100 al 0,1%. Las raíces y los órganos florales se incubaron en el mismo medio sin las sales de cianuro e incluyendo mercaptoetanol al 0,1% para reducir la descomposición de los tejidos. Se tomaron secciones de tejido cortadas a mano y se aclararon en etanol al 70%. Las secciones teñidas se visualizaron con un microscopio Zeiss.

## 5 7. Expresión de genes exógenos usando el promotor del CsVMV

### a. Expresión en protoplastos de tabaco y de mandioca

Los fragmentos promotores CVP1 y CVP2 se ensayaron en experimentos de ensayo transitorios usando protoplastos de tabaco y de mandioca obtenidos a partir de cultivos de suspensión celular. En este experimento se usaron los plásmidos pLTAB:CVP1 y pLTAB: CVP2. El plásmido pe35GN, que contenía la secuencia uidA bajo el control de promotor 35S potenciado (e35S, *enhanced 35S*), Kay y col, Science, 236: 1299-1302, 1987, sirvió como control positivo. Cada plásmido se introdujo conjuntamente en protoplastos con un plásmido que contenía un gen luciferasa bajo el control del promotor 35S del CaMV, Ow y col, Science, 234: 856-859, 1986. Después de cada experimento de transfección se determinó la proporción GUS/LUC. Se realizaron cuatro experimentos de transfección independientes y proporcionaron resultados similares, en la Figura 5 se resumen. En los protoplastos de tabaco la proporción GUS/LUC para el promotor CVP1 fue de 0,58, o aproximadamente el 50% del nivel de expresión determinado por el promotor e35S (1,32). Sin embargo, cuando se usó el fragmento CVP2, la proporción fue de 1,3, o dos veces más activa que la de CVP1. La diferencia entre los dos fragmentos indica que CVP1 carece de uno o más elementos importantes para un alto nivel de expresión. Los promotores CVP2 y e35S produjeron actividad GUS similar indicando que el promotor del CsVMV es un fuerte promotor en protoplastos de tabaco. Estudios similares realizados en protoplastos de mandioca proporcionaron resultados comparables con los realizados en tabaco, mostrando que el promotor del CsVMV es también muy eficaz en estas células.

### b. Expresión en plantas de tabaco y de arroz

Se obtuvieron siete líneas de tabaco transformadas que contenían la fusión promotor CVP1-gen uidA y ocho que contenían el promotor CVP2 como se describe en el presente documento. La presencia del casete génico de longitud completa se confirmó por análisis PCR de transformantes primarios (plantas regeneradas a partir de callos transgénicos).

Se realizó un análisis histoquímico detallado de la acumulación GUS usando secciones tisulares recientes cortadas a mano de diversos órganos procedentes de transformantes primarios y su progenie R1. Todas las plantas de tabaco transformadas que contenían el fragmento CVP1 o el fragmento CVP2 tuvieron esencialmente el mismo patrón de expresión génica aunque que la intensidad de la tinción variaba entre los transformantes. En las hojas, se observó una fuerte actividad GUS en los tejidos del floema en la nervadura central y en las nervaduras secundarias laterales (Figuras 6A y 6B). Las células parenquimáticas adyacentes a elementos del xilema también desarrollaron un patrón de tinción azul mientras que las células parenquimáticas de la nervadura central no contenían actividad GUS detectable (Figuras 6A y 6B) a excepción de las células clorenquimáticas justo por debajo de la epidermis (Figura 6C). Las células de la capa del mesófilo en empalizada y mesófilo esponjoso en la lamina foliar mostraron una tinción muy intensa (Figuras 6A y 6C), mientras que en la epidermis, las células de reserva y tricomas, especialmente las células de la punta glandular, desarrollaron una tinción intensa. Las células epidérmicas no especializadas acumularon poca o ninguna tinción. Secciones transversales de tallos mostraron una fuerte tinción de las células del floema, incluyendo los haces del floema internos localizados en el tejido medular central y de las células del floema localizadas externas al xilema (Figura 6D). También fue visible una expresión más débil en las células parenquimáticas del xilema. La tinción GUS no pudo detectarse en células medulares o en células parenquimáticas corticales del tallo (Figura 6D). Los tejidos radiculares incubados con X-Gluc revelaron un cilindro vascular teñido de azul (Figura 6E); no se tomaron secciones transversales debido a la naturaleza frágil de los tejidos. Las puntas radiculares se tiñeron más intensamente que cualquier otra región en la raíz (Figura 6E). En las flores, la parte basal de los ovarios presentó una tinción azul intensa. Los elementos vasculares del tejido floral presentaron una fuerte tinción en el estambre, pistilo y la placenta dentro del ovario (Figura 6F), así como en los sépalos y pétalos. Los granos de polen presentaron también un color azul. Las plantas de semilla R1 desarrollaron el mismo patrón de tinción general que el de los transformantes parentales R0 salvo que la actividad GUS en el mesófilo de los cotiledones apareció más débil que en las hojas maduras.

Se realizó análisis histoquímico para detectar la actividad GUS de una manera similar en 7 líneas de arroz independientemente transformadas que contenían el gen CVP2:uidA. El patrón general del gen promotor del CVP2-uidA fue muy similar en el arroz y en el tabaco, a pesar de las diferencias anatómicas de estas plantas. Secciones transversales de hojas incubadas con sustrato X-Gluc dieron como resultado una fuerte tinción en los haces vasculares y en las células del mesófilo (Figura 6C). Las pequeñas células parenquimáticas del floema y las células parenquimáticas del xilema presentaron una intensa tinción mientras que los elementos traqueales del metaxilema y elementos filtradores más grandes no mostraron ningún precipitado azul. Las células del haz vascular, células bulbiformes y fibras del esclerénquima tampoco presentaron tinción. Las células de reserva y las células pilosas foliares se tiñeron en la epidermis foliar. El patrón de actividad GUS revelado en secciones transversales del tejido de la vaina foliar (Figura 6H) fue similar al observado en las hojas. Como se observa en las plantas de tabaco, la actividad GUS no fue detectable en las células parenquimáticas (Figura 6H). Las raíces se tiñeron solo en el cilindro

vascular y en la punta. El tejido floral del arroz tuvo esencialmente el mismo patrón de actividad GUS que el de las flores del tabaco (Figura 6I).

La actividad GUS en extractos preparados a partir de diferentes órganos se determinó cuantitativamente entre transformantes de tabaco y de arroz preparados como se describe en los Ejemplos y usando el ensayo de fluorescencia con 4-Metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucuronido (MUG) Jefferson y col, EMBO J, 6: 3901-3907, 1987. Los órganos ensayados incluyeron hojas jóvenes, hojas maduras, tallos y raíces. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Figura 7 y confirman que el promotor del CsVMV es activo en todos los órganos tanto del arroz como del tabaco. El promotor del CsVMV es más activo en las hojas que en otros órganos mientras que el nivel de expresión más bajo se detectó en las raíces. La actividad GUS en plantas de tabaco que contenían el promotor CVP2 no se mostró significativamente más fuerte que en plantas que contenían el promotor CVP1. La doble diferencia en la actividad del promotor entre CVP1 y CVP2 medida en protoplastos no puede detectarse en plantas transgénicas debido a la variación de la expresión de los transgenes, a la variabilidad relativa del ensayo con MUG y a la gran estabilidad de GUS que condujo a la acumulación de proteínas en los tejidos de las plantas.

#### c. Expresión transitoria en explantes de plantas de mandioca

La actividad del promotor del fragmento CVP2 mostrado en la Figura 1 se ensayó en plantas de mandioca mediante bombardeo con micropartículas en explantes de tallo y hoja a partir del material cultivado *in vitro*. En este estudio se usó (como control positivo) el plásmido pLTAB:CVP2 y el plásmido pe35GN y la transformación se realizó por bombardeo como se describe en el Ejemplo 5. Después de esto, las plántulas se analizaron para determinar la expresión tisular mediante el procedimiento histoquímico del Ejemplo 6. Se encontró aproximadamente el mismo número de focos teñidos intensamente de azul, mostrando expresión GUS (Figura 6J), usando plásmidos que contenían cualquier promotor. Se encontraron células teñidas de azul en las células epidérmicas, células de reserva, células del mesófilo y a lo largo de las nervaduras de las hojas. Estos experimentos proporcionan pruebas de la actividad promotora de los fragmentos CVP2 en diferentes tipos de células de mandioca.

#### 8. Análisis de los Ejemplos 1-7

Los Ejemplos describen el aislamiento de un promotor del genoma viral del virus del mosaico de la nervadura de la mandioca recientemente caracterizado, Calvert y col, J Gen Virol, 76: 1271-1276, 1995. Se determinó el sitio de inicio de la transcripción del promotor usando ARN aislado de plantas transgénicas que contenían el gen pCsVMV-uidA. Los resultados del presente documento indican que el promotor del CsVMV es relativamente fuerte en protoplastos de tabaco y mandioca y que su actividad es similar a la obtenida con el promotor e35S. De los dos fragmentos promotores ensayados en protoplastos, el fragmento CVP1 más corto es aproximadamente dos veces menos activo que el fragmento CVP2 más largo. Sin embargo, ambos fragmentos dan como resultado el mismo patrón de expresión en plantas de tabaco y de arroz transgénicas. Las diferencias en el nivel de expresión observadas en protoplastos podrían deberse a un potenciador transcripcional en la región 5' del fragmento más largo o a la secuencia líder no traducida más larga.

Como una comparación, se observó que los primeros 60 nucleótidos de la secuencia líder del CaMV (desde +1 al primer ATG) estimulaban, aproximadamente el doble, la expresión de un gen cadena abajo (Dowson y col, Plant Mol Biol, 23: 97-109, 1993; y Fytterer y col, EMBO J, 9: 1697-1707, 1990). Se había descrito un efecto similar para la secuencia líder no traducida del promotor del virus baciliforme del tungro del arroz (RTBV), Fytterer y col, EMBO J, 9: 1697-1707, 1990. Sin embargo hay homología de secuencia limitada entre la secuencia líder del CsVMV y las secuencias líder del CaMV o del RTBV. El análisis de plantas transgénicas indica que el promotor del CsVMV, como es el caso con los promotores de caulimovirus, es activo en todos los órganos y en diversos tipos de células. El promotor del CsVMV se expresa fuertemente en tejidos vasculares, en células del mesófilo de las hojas y en las puntas radiculares de plantas de arroz y de tabaco. Sin embargo, no había actividad GUS en células de la médula de tabaco sin clorofila y del parénquima cortical. Esto podría indicar que el promotor del CsVMV tiene dos dominios de actividad principales, es decir, los elementos vasculares y las células verdes que contienen cloroplastos. Sin embargo no puede excluirse la posibilidad de que estas observaciones se deban a las limitaciones del ensayo de tinción. Pueden aparecer células grandes con escaso citoplasma (tales como las células parenquimáticas) que contengan poca o ninguna tinción en comparación con células más pequeñas con un denso citoplasma. Del mismo modo, células con diferentes actividades metabólicas pueden teñirse con diferentes intensidades.

Los datos del presente documento muestran que la expresión del promotor del CsVMV en protoplastos y en plantas transgénicas es relativamente similar a la del promotor 35S. Sin embargo, la secuencia de nucleótidos del promotor del CsVMV tiene homologías limitadas con los promotores de caulimovirus y pueden implicar diferencias en los mecanismos de regulación del promotor. El análisis de secuencia del promotor del CsVMV muestra la presencia de diversos motivos que se asemejan a elementos cis previamente identificados que están implicados en la regulación transcripcional. La presencia de dichos motivos en el promotor del CsVMV podría explicar el patrón de expresión en plantas transgénicas. Se identificó un motivo de 16 pb con fuerte homología con el elemento as1 del promotor 35S del CaMV, Lam y col, Proc Natl Acad of Sci USA, 86: 7890-7894, 1989, en el promotor del CsVMV en el nt -203 al -219. El elemento as1, caracterizado por repeticiones directas de TGACG, se une al factor nuclear AS1, Fromm y col, Plant Cell, 1: 977-984, 1989, así como al factor de la transcripción TGA1 clonado, Katagiri, y col, Mol Cell. Biol, 12: 4809-4816, 1992, y dirige la expresión génica específica del tejido radicular, Benfey y col, EMBO J, 8: 2195-2202,

1989. La expresión del promotor del CsVMV en raíces es similar a la inducida por el promotor 35S del CaMV, Benfey y col, EMBO J, 8: 2195-2202, 1989, y por los promotores del ComYMV, Medberry y col, Plant Cell, 4: 185-192, 1992, ambos de los cuales contienen el elemento as1. En el promotor del CsVMV, el motivo as1 se localiza en la posición de -203 a -219 mientras que en los promotores de caulimovirus, este está generalmente más cerca de la caja TATA (n.t. -83 a -63 en el promotor 35S del CaMV; -57 a -73 en el promotor del FMV). Sin embargo, en el promotor del ComYMV, el motivo as1 se localiza entre el nucleótido -205 y -227 y no es esencial para la actividad radicular, Medberry y col, Plant J, 619-626, 1993: se sugiere que un elemento adicional está implicado en la regulación de la expresión en raíces del promotor del ComYMV. Se requieren estudios adicionales para determinar si la posición del elemento as1 con respecto a la secuencia de la caja TATA modula su función en la expresión génica radicular.
- En la posición -90 a -111, se identificó una secuencia de 22 nucleótidos CTTATCACAAAGGAATCTTATC (SEC ID N°: 23) que estaba presente en la misma posición relativa (n.t. -78 a n.t. -100) en el promotor del ComYMV pero no en otros promotores de pararetrovirus de plantas. Este motivo se localiza en el promotor del ComYMV en una región necesaria para la expresión en tejidos vasculares, Medberry y col, Plant J, 619-626, 1993. El promotor del CsVMV también incluye el motivo AAGATAAGG (n.t. -186 a -194) que contiene la secuencia GATAAG consenso cajal que está presente en promotores génicos Rbcs, Donald y col, EMBO J, 9: 1717-1726, 1990. Además, la secuencia GTAGAAA, identificada en la posición -257 -263, es idéntica a la secuencia del sitio de unión para el factor nuclear específico de hoja, MNF1, encontrado en el promotor del gen PEPc así como en el promotor 35S, Yanagisawa y col, Plant Mol Biol, 19: 545-553, 1992. Estos motivos podrían estar implicados en la fuerte expresión génica de los promotores del CsVMV en células del mesófilo. Los nucleótidos de -170 a -130 (Figura 3) contienen dos motivos que son similares a la secuencia núcleo potenciadora del SV 40, GTGGAAAG, Ondek y col, EMBO J, 6: 1017-1025, 1987.

#### 9. Preparación de construcciones de delección del promotor del CsVMV

El promotor del CsVMV se mutó mediante delecciones progresivas en el extremo 5' y mediante delecciones internas.

- El plásmido de partida para este estudio fue pILTAB:CVP2 que contenía un fragmento del promotor del CsVMV que se extendía desde la posición +72 a la -443, Verdaguer y col, Plant Mol Biol, 31: 1129-39, 1996. Debido a la ausencia de sitios de restricción convenientes en el fragmento del promotor del CsVMV, se usó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para generar un conjunto de delecciones en el extremo 5' e internas.

- Las delecciones del promotor en el extremo 5' se obtuvieron directamente por amplificación PCR. Se usó un cebador inverso común P1' (Tabla 1) que se hibridaba en el extremo 3' del promotor emparejado con cebadores específicos del CsVMV, P2, P3, P4, P5 y P6 (Tabla 1), para generar cinco fragmentos promotores denominados B, C, D, E y F que tenían diversas delecciones de la secuencia del promotor de CsVMV de tipo silvestre.

TABLA 1

Nombre	Secuencia (de 5' a 3')	Posición	Sentido	SID
P1	GCTCTAGACCAGAAGGTAATTATCCAAG	-443/-423	+	24
P2	TATGGATCCTATGTTCAAAAATGAAG	-330/-312	+	25
P3	AAAGGATCCTGAAGACGTAAGCACTG	-222/-206	+	26
P4	AGAGGATCCGGTCGGTGATTGTGAA	-178/-163	+	27
P5	AAAGGATCCTTATCACAAAGGAATC	-112/-95	+	28
P6	TATGGATCCGTGTCATTTTTGCCCTTG	-63/-43	+	29
P1'	CGGAATTCAAACCTTACAAATTTCTCTAAG	+72/+50	-	30
P2'	TAAGGATCCTTTCCGCCCTTACATT	-116/-132	-	31
P3'	CATGGATCCTCTATGTCTCTTTTAC	-149/-168	-	32
P4'	ACAGGATCCGACCTTATCTTCT	-173/-187	-	33
P5'	ACCGGATCCTCTTTTTCATTGTTT	-182/-199	-	34
P6'	TCAGGATCCTTTTCTTCGCCTGGT	-228/-243	-	35
P7'	ATAGGATCCATATGTGCCGCATA	-334/-348	-	36

- La Tabla 1 ilustra cebadores oligonucleotídicos usados para generar fragmentos del promotor del CsVMV por amplificación con PCR. "SID" indica la SECUENCIA ID N°. Los cebadores contienen secuencias del promotor del CsVMV en orientación en sentido (+) o inversa (-). Se indican las coordenadas de los cebadores con respecto al sitio de inicio de la transcripción mostrado en la Figura 3. Para crear delecciones en el extremo 5' del promotor del CsVMV, se usó el cebador P1' en asociación con P2 a P6. De manera similar, para las delecciones en el extremo 3', se usó el cebador P1 en asociación con P2' a P7'. Los cebadores P1 y P1' contienen un sitio XbaI y un sitio EcoRI, respectivamente, en sus extremos 5', mientras que los otros cebadores tienen un sitio BamHI. Los sitios de restricción se indican en negrita.

Los cebadores oligonucleotídicos indicados en la Tabla 1 se prepararon por síntesis química con fosforamidita en un sintetizador automático de un proveedor comercial (Gibco BRL Life Technology, Inc.).

5 Los fragmentos resultantes amplificados por PCR presentan un extremo 3' común en la posición +72 y sus puntos de extremo 5' en las posiciones -330, -222, -178, -112, -63 respectivamente (Figura 8). También se re-sintetizó un  
 10 fragmento promotor de longitud completa (fragmento A) usando el cebador P1 y P1' (Tabla 1). Las reacciones PCR se realizaron con 100 ng de pLTAB:CVP2, 2,5 U de Taq ADN polimerasa (Gibco-BRL) y concentraciones convencionales de cebadores, MgCl<sub>2</sub> y los dNTP. Se realizaron veinte ciclos (94 °C, 30 s; 56 °C, 30 s, 72 °C, 30 s) de amplificación y posteriormente se realizó una elongación final durante 5 min a 72 °C. Cada uno de los cinco fragmentos de ADN amplificados se digirieron con BamHI y EcoRI y se ligaron en los mismos sitios de un plásmido que contenía la secuencia codificante del gen uidA (que codifica la β-glucuronidasa-GUS) unido a la señal de poliadenilación 3' del gen nopalina sintasa (Figura 8). Los plásmidos resultantes se denominaron pA, pB, pC, pD, pE, pF de acuerdo con la delección del promotor que contenían (Figura 8).

15 Se construyeron delecciones internas de promotores en dos etapas. En primer lugar, se realizaron las condiciones PCR, como se ha descrito anteriormente, para generar un conjunto de delecciones en el extremo 3' del promotor del CsVMV. Un cebador en orientación sentido (P1, Tabla 1) que se hibrida en el extremo 5' del promotor se emparejó con cada uno de los 6 cebadores inversos específicos del CsVMV (P2' a P7', Tabla 1) para generar seis promotores truncados con un extremo 5' común en la posición -443 y puntos en el extremo 3' que abarcaban desde la posición -116 a la -334. Después, en los plásmidos previamente obtenidos (pB a pF), se modificaron delecciones internas por ingeniería genética clonando los diferentes fragmentos de promotores truncados en el extremo 3' cadena arriba de  
 20 los promotores deleccionados en el extremo 5'. Por consiguiente, un fragmento del promotor en el extremo 3' deleccionado que abarcaba los nucleótidos -443 a -334 se digirió con BamHI y XbaI y se ligó en los mismos sitios en el plásmido pC. El plásmido resultante, denominado pΔB, contenía una delección interna desde los nucleótidos -334 a -222 (Figura 8). De manera similar, para crear el plásmido pΔC (Figura 8), se fusionó un fragmento que abarcaba los nucleótidos -443 a -228 con el fragmento del promotor D. Para crear el plásmido pΔD1 y pΔD2 y pΔD3, respectivamente (Figura 8), en el plásmido pE se clonaron individualmente tres fragmentos con un extremo 5' común en la posición -443 y extremos 3' localizados en la posición -182, -173 y -149. Estos tres mismos fragmentos se clonaron en pF para crear los plásmidos pΔDE1 y pΔDE2 y pΔDE3 (Figura 8). Con el mismo procedimiento, en el plásmido pF, se clonó un fragmento que contenía los nucleótidos -443 a -116, para generar el plásmido pΔE (Figura 8). Todas las secuencias de los promotores se verificaron por secuenciación con di-desoxinucleótidos. Los diferentes genes de fusión promotor del CsVMV-uidA se escindieron por XbaI y HindIII y se ligaron en los mismos sitios del vector binario pBin 19 usado para la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*.

## 10. Análisis de expresión de las construcciones de delección del promotor del CsVMV

### a. Transformación de plantas con *Agrobacterium*

35 Los plásmidos derivados del vector pBin 19 que contenían las construcciones deleccionadas del promotor se transflectaron por electroporación en la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*.

Las transformaciones de *Nicotiana tabacum* cv Xanthi NN, mediadas por *Agrobacterium*, se realizaron como se ha descrito previamente, Horsch y col, Plant molecular biology manual, páginas A5/1- A5/9. Kluwer academic publishers, 1988. Se cultivaron plantas regeneradas resistentes a kanamicina hasta la madurez en un invernadero y se permitió la autofertilización. Las semillas R1 germinaron en medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS),  
 40 Murashige y Skoog, *Physiol Plant*, 15: 473-497, 1962, con kanamicina 100 mg/l y se transfirieron al suelo en un invernadero. Para cada construcción se produjeron entre 10 y 20 líneas transgénicas independientes. Para cada construcción con promotor se analizaron diez líneas R1 independientes.

### b. Análisis histoquímico de la expresión del CsVMV en plantas de semillas jóvenes

45 Para analizar el patrón de expresión del promotor deleccionado en las fases tempranas del desarrollo se realizó un análisis histoquímico GUS en plantas de semillas de 10 días transformadas con plásmidos.

Para el análisis GUS, se recogieron hojas jóvenes expandidas en la parte superior de las plantas. Se tomaron secciones de tejido reciente y se incubaron durante 6 a 12 horas a 37 °C en tampón de reacción que contenía 5-bromo-4-cloro-3-indol glucoronido (X-gluc) 1 mM, tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7, ferrocianuro potásico y ferricianuro potásico 2 mM y Tritón X-100 al 0,1%. Para el análisis histoquímico GUS de plantas de semillas R1  
 50 jóvenes, se recogieron plántulas completas aproximadamente una semana después de la germinación y se sumergieron en tampón GUS, Jefferson y col, *Embo J*, 6: 3901-7, 1987. Después de algunos minutos de infiltración al vacío, se realizó la incubación durante una noche a 37 °C. Las muestras se aclararon mediante diversos lavados en etanol al 70%. Se realizó análisis cuantitativo GUS usando el sustrato 4 metilumbeliferona-β-D glucuronido (MUG) como describen Jefferson y col, *Embo J*, 6: 3901-7, 1987.

55 Se analizaron los patrones de expresión de las diferentes construcciones de promotores en plantas de tabaco transgénicas transformadas usando tinción histoquímica de actividad GUS. Se confirmó la presencia de un casete génico intacto promotor:uidA por PCR y/o análisis de Southern. El patrón de expresión GUS entre plantas que

5 contenían la misma construcción del promotor fue similar, con algunas excepciones que se indican más adelante. Claramente pudieron visualizarse diferencias significativas y reproducibles en las intensidades de tinción entre algunas construcciones del promotor. Las plantas ensayadas en este estudio contenían entre 1 a 5 copias del gen de fusión uidA. El número de copias no afectó al patrón característico de expresión observado con cada construcción. Además, no se observó ninguna correlación clara entre el número de copias y la intensidad aparente de la tinción. Diferentes patrones de tinción, entre construcciones del promotor, indican un efecto de la delección en la regulación del promotor. El promotor del CsVMV se expresa en todos los órganos de las plantas transgénicas. Las regiones de mayor expresión del promotor se localizaron en los elementos vasculares, en las células del mesófilo de las hojas y en las puntas radiculares. Por consiguiente, se analizó la actividad GUS en estos tres tejidos diferentes y los resultados se resumen en la Tabla 2.

TABLA 2

Promotor	Mesófilo	Floema	Puntas radiculares
-443 pA	+	+	+
-330 pB	+	+	+
-222 pC	+	+	+
-178 pD	(+)	+	-
-112 pE	+	(+/-)	-
-63 pF	+	-	-
-334/-222 pΔB	+	+	+
-228/-178 pΔC	+	+	+
-182/-112 pΔD1	+	+	+
-173/-112 pΔD2	+	+	+
-149/-112 pΔD3	+	+	+
-182/-63 pΔDE1	-	(-)	+
-173/-63 pΔDE2	-	(+/-)	+
-149/-63 pΔDE3	-	(+/-)	+
-116/-63 pΔE	+	+	+

15 Para cada construcción mostrada en la Tabla 2 se indican los nombres de las construcciones del promotor y los criterios de valoración de las delecciones. Se realiza una escala de los niveles de expresión de la actividad GUS detectados y se indica en cuatro niveles en la Tabla 2: “+”: sin diferencias visibles con el promotor de longitud completa (es decir, pA); “(+/-)”: menor tinción que con los promotores de longitud completa; “(-)”: muy poca expresión; “-“: tinción no detectable.

a) delecciones en el extremo 5’:

20 La tinción con GUS en plantas transgénicas que llevan la construcción de promotor deleccionado en la posición -222 (construcción pC) se produjo siguiendo el mismo patrón (Tabla 2) y estuvo en el mismo intervalo de intensidad al observado con el promotor de longitud completa (construcción pA, Figura 9A). Otra delección del promotor en la posición -178 (construcción pD) produjo un cambio importante en el patrón de expresión de GUS (Tabla 2). En secciones transversales de hojas de la mayoría de las plantas que llevaban la construcción pD, se observó una fuerte tinción restringida a los elementos vasculares (Figura 9B). No se detectó actividad de GUS en las células del mesófilo en empalizada y mesófilo esponjoso. Sin embargo, tres líneas de plantas de diez, presentaron una tinción reducida en las células del mesófilo. En todas las plantas transformadas con la construcción pD, las puntas radiculares no presentaron tinción GUS (Figura 9I), mientras que este tejido se tiñe intensamente con el promotor de longitud completa. La expresión GUS del promotor de la construcción pE, deleccionada la posición -112, quedó restringida a los elementos vasculares (Tabla 2, Figura 9C). La intensidad de la expresión fue muy baja y para detectar un precipitado azul se necesitó un largo tiempo de incubación. La construcción pF no presentó ninguna expresión detectable. Este estudio demostró que las funciones específicas de órgano pueden atribuirse a distintas regiones promotoras. Aunque la región que abarca los nucleótidos -443 a -222 pareció ser no-esencial para la actividad del promotor, la región desde -222 a -178 es aparentemente responsable de la expresión del promotor en células del mesófilo así como en la punta radicular. Como consecuencia un promotor deleccionado en la posición -178 es casi inactivo en tejidos verdes aunque contenga todos los elementos necesarios para la expresión vascular. Se demostró que la construcción pE presentaba una expresión vascular muy débil. La fuerte expresión vascular visualizada con la construcción pD podría deberse a un fuerte elemento vascular en la región (-178/-112) o a un activador no específico presente en esta región que influye en el elemento vascular presente en el promotor E.

## b) Deleciones internas

La delección interna de la región del nucleótido -334 a -222 (promotor  $\Delta B$ ) no influyó en el patrón de expresión general del promotor del CsVMV (Tabla 2). Se visualizó una disminución significativa en la expresión GUS en el tejido mesófilo de las plantas transformadas con p $\Delta C$  (Tabla 2, Figura 9D). De acuerdo con los datos obtenidos a partir de la delección en el extremo 5', este resultado demostró que la región -222 a -178 contiene elementos importantes que controlan la expresión del promotor en tejidos verdes. Sin embargo, en todas las líneas ensayadas se observó una tinción reducida en las células del mesófilo, lo que sugería que un elemento adicional de menor importancia, presuntamente localizado en la región que abarca los nucleótidos -443 a -222, está también implicado en la expresión del promotor en este tipo de células. Adicionalmente, los elementos vasculares mostraron una fuerte tinción lo que sugería que, en este tejido, la actividad del promotor no resultaba afectada por esta delección (Figura 9D). La construcción p $\Delta C$  no suprimía la expresión en la punta radicular. Esto sugería que, además de la región (-222/-178), otro elemento localizado en la región (-443/-222) está probablemente implicado en la expresión del promotor en este tejido. La delección de la región -182 a -112 (construcción p $\Delta D1$ ) tuvo un efecto drástico sobre la expresión del promotor (Tabla 2). De hecho, la construcción p $\Delta D1$  presentó un perfil de expresión específico vascular solo con tinción débil en los elementos vasculares (Figura 9E). Adicionalmente, también se observó expresión GUS en la punta radicular. Esta construcción del promotor contiene la mayoría de los dominios implicados en la expresión del tejido mesófilo, como se ha definido anteriormente. Este dominio mesófilo, en el contexto de la delección  $\Delta D1$ , no activa el promotor en el tejido verde. Este resultado podría deberse a la delección de uno o más elementos cis localizados entre los nucleótidos -182 y -112 y necesaria para promover la activación del dominio mesófilo. La construcción p $\Delta E$  presentó un patrón de expresión constitutivo similar al del promotor no deleccionado (Tabla 2, Figura 9G). La fuerte expresión vascular observada con esta construcción sugiere que el elemento vascular mencionado anteriormente, que está presente en la región (-112/-63), no es necesario para una fuerte expresión del promotor en tejido vascular. Por lo tanto, a la región (-178/-112) puede atribuirse una importante función vascular. La delección interna que abarca los nucleótidos -182 a -63 (p $\Delta DE1$ ) tuvo un gran efecto sobre la actividad del promotor (Tabla 2). De las 10 plantas transgénicas independientes ensayadas, 8 no tuvieron ninguna actividad GUS detectable ni en las hojas ni en los tallos. En dos plantas, después de incubación prolongada, se observó una puntuación de color azul muy pálido localizada en los elementos del floema (Figura 9F). En cambio, se reveló una fuerte tinción en la punta radicular así como una tinción más débil en los elementos vasculares de la raíz. Estos resultados concuerdan algo con los datos mencionados anteriormente. De hecho, el promotor  $\Delta DE1$  no contiene la región (-178 a -63) para la expresión vascular, así como una región (-182 a -112) que es necesaria para la expresión en el tejido mesófilo. Presumiblemente, la actividad de GUS detectada en tejido radicular se debe a la presencia de la región (-443/-182) que se demostró que estaba implicada en la expresión de la punta radicular.

## c) El dominio promotor (-178 -112).

Los resultados de las delecciones en el extremo 5' destacan la importancia de la región (-182/-112) para la expresión constitutiva del promotor del CsVMV. De hecho, la delección p $\Delta D1$  suprimió la actividad del promotor en el tejido mesófilo y también disminuyó la expresión vascular (Figura 9E). Por consiguiente, se prepararon las construcciones p $\Delta D2$  y p $\Delta D3$  para investigar esta región con mayor detalle (Tabla). La construcción  $\Delta D2$ , deleccionada desde los nucleótidos -173 a -112, presentó un perfil de expresión similar al del promotor de longitud completa del CsVMV (Figura 9G). Este resultado sugiere que la adición de 9 nucleótidos en el punto del extremo 5' de la delección (-182/-112) puede restablecer el patrón de expresión completo modificado con la construcción  $\Delta D1$ . De manera interesante estos 9 nucleótidos contienen un motivo GATA. La diferencia más drástica se observó en células del mesófilo, que no presentaron ningún color azul cuando se transformaban con la construcción  $\Delta D1$ . La región desde -182 a -173 es por tanto necesaria para la expresión de mesófilo. No pudo detectarse ninguna diferencia significativa entre la construcción p $\Delta D2$  y p $\Delta D3$ .

Por otro lado, la adición de las secuencias -182/-173 y -182/-149 a p $\Delta DE1$  para preparar p $\Delta DE2$  y p $\Delta DE3$  respectivamente, no condujo a ningún restablecimiento de la actividad promotora (Tabla 2) excepto en las puntas radiculares. En las plantas transformadas con p $\Delta DE2$  y p $\Delta DE3$ , no se observó tinción con GUS en células del mesófilo mientras que la expresión en elementos vasculares fue muy baja (Figura 9E). La comparación de las construcciones p $\Delta D2$  y p $\Delta D3$  con las construcciones p $\Delta DE2$  y p $\Delta DE3$  implicó un importante papel de la región (-112/-63) para la actividad del promotor general. Sin embargo, el efecto drástico de la delección de esta región podría suprimirse mediante la adición de la región (-149/-116) como se sugiere cuando se compara p $\Delta DE3$  con p $\Delta E$  (Tabla 2, Figuras 9E y 9G). Estos resultados indican que la región cadena arriba desde -222 a -173 por si sola no puede conseguir un patrón de expresión constitutivo completo. La presencia de la región (-149 a -116) (mostrada por p $\Delta E$ ) o de la región desde -112 a -63 (mostrada por p $\Delta D2$  y p $\Delta D3$ ) que podría ser funcionalmente redundante, en asociación con la región cadena arriba (-222 a -173) es necesaria para la actividad óptima del promotor del CsVMV en todos los tejidos.

Estos resultados indican (como se muestra comparando p $\Delta E$  y p $\Delta DE3$ ) que la región (-149/-116) es probablemente responsable de la fuerte expresión vascular observada con el promotor D truncado.

Las construcciones del promotor deleccionado dirigen patrones de expresión específicos que fueron similares a los

observados en plantas adultas. En hojas cotiledonares, las construcciones pD, pE, p $\Delta$ D1, que confieren un patrón de expresión específico vascular en hojas expandidas de plantas adultas, presentaron un perfil de tinción GUS solamente en los elementos vasculares (Figura 9H). De manera similar, las construcciones pB y pC, que fueron activas tanto en tejido mesófilo como vascular, en plantas de tabaco, tuvieron el mismo patrón de expresión constitutivo en plantas de semillas (Figura 9H). Estos resultados sugieren que los patrones de expresión específicos, observados con las diferentes delecciones en plantas transgénicas, no están influenciados por la fase de desarrollo de la planta.

#### c. Expresión en plantas de semillas transgénicas

Usando un ensayo fluorométrico se cuantificó la actividad de GUS en extractos de proteína preparados a partir de tejidos foliares, Jefferson y col, Embo J, 6: 3901-7, 1987. Se recogieron muestras de tejido intervenal de hojas jóvenes expandidas de plantas de tabaco transgénicas de 5 semanas de vida, preparadas como se describe en el Ejemplo 10.a). Por consiguiente, los niveles de actividad enzimática detectados reflejan principalmente la expresión del promotor en el tejido mesófilo. Como se observa en la Figura 10, los valores de la actividad de GUS de diferentes líneas transgénicas que contienen la misma construcción del promotor varían en un factor máximo de 17. La variación en cuanto a la expresión transgénica puede atribuirse a una combinación de factores, incluyendo un supuesto efecto de posición que refleja la influencia de la cromatina circundante en la expresión génica, diferencias en cuanto al número de copias o silenciamiento génico. Estos datos confirman los datos de localización histoquímicos para la expresión de GUS en plantas transgénicas. En extractos de plantas que llevaban las construcciones de los promotores p $\Delta$ D1, p $\Delta$ DE1, p $\Delta$ DE2 y p $\Delta$ DE3 se detectó la actividad de GUS más baja. Este resultado fue coherente con el análisis histoquímico, dado que estas construcciones de delección no expresaron el gen indicador en células del mesófilo de plantas transgénicas aunque presentaron una débil tinción GUS en elementos vasculares. Por consiguiente, los niveles de actividad GUS de estas delecciones fueron aproximadamente 20 veces más bajos que los niveles detectados con las construcciones pB y pC, que mostraron fuertes patrones de expresión constitutivos en plantas transgénicas. Como muestra la construcción pD, si se delecionaba la secuencia desde -222 a -178, se encontraba una reducción significativa en el nivel de actividad. De manera similar, la delección interna de la secuencia desde -228 a -178 redujo a un factor de cinco el nivel de actividad GUS medido con las construcciones de alta expresión pB o pC. Estos resultados destacan la función de la región desde los nucleótidos -228 a -178 para promover la expresión en tejidos verdes.

El nivel medio de actividad medido con la construcción p $\Delta$ D2 y p $\Delta$ D3 fue mayor que con la construcción p $\Delta$ D1. Sin embargo los niveles de actividad p $\Delta$ D3 estuvieron en el intervalo más alto cuando la construcción p $\Delta$ D2 produjo niveles de expresión moderados. Esta diferencia no se detectó usando el ensayo histoquímico. La construcción p $\Delta$ D2 se expresó en células de mesófilo de plantas transgénicas, pero basándose en el ensayo fluorométrico, es posible que la observación de la tinción GUS sobrevalore el nivel de actividad de esta construcción promotora. Por consiguiente, las mediciones de GUS fluorométricas sugieren que la región que abarca los nucleótidos -173 a -149 es importante para el nivel de expresión en tejidos verdes. Como se observa con el ensayo histoquímico, el alto nivel de expresión, medido con la construcción p $\Delta$ D3, quedó anulado por delección de la región que abarcaba los nucleótidos -112 a -63 (construcción p $\Delta$ DE3). Sin embargo, se midieron altos niveles de actividad GUS a pesar de una delección de la región que contenía los nucleótidos -116 a -63 (construcción p $\Delta$ E) lo que indicaba que la región desde -149 a -116 es útil para altos niveles de actividad del promotor (como se muestra cuando se compara p $\Delta$ DE3 y p $\Delta$ E).

#### d. Aislamiento, transformación y cultivo de protoplastos

Se prepararon protoplastos de células de tabaco BY-2 en suspensión y se transflectaron con ADN esencialmente como describen Watanabe y col, FEBS Letters, 219: 65-69, 1987. Se aislaron protoplastos de mesófilo de tabaco de hojas de 5 semanas de vida completamente expandidas, cultivadas en una cámara de cultivo. La superficie de las hojas se esterilizó por inmersión en una solución de clorox al 5% durante 5 minutos seguido de 3 lavados con agua estéril. Las hojas se secaron en una cámara laminar y la epidermis inferior se eliminó por exfoliación. Los trozos de hoja exfoliados se lavaron en manitol 0,6 M y se transfirieron a una solución enzimática que contenía celulasa R10 al 1,5%, macerozima R10 al 0,3% y manitol 0,6 M, pH 5,8. La digestión se realizó a 28 °C durante 12 a 16 horas. La mezcla de digestión se filtró a través de una capa de Miracloth y posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 300 rpm en una centrifuga clínica. Se recogió el sobrenadante y se centrifugó una segunda vez con los mismos parámetros. Los sedimentos de protoplastos se resuspendieron en solución de sacarosa al 20% y se transfirieron a matraces volumétricos de 50 ml. Los matraces se centrifugaron en un rotor J6B Beckman a 100 g durante 7 min. Con una pipeta Pasteur se recogieron los protoplastos redondeados intactos que flotaban en la superficie de la solución de sacarosa y se contaron usando un hemocitómetro. Para cada electroporación se usó, aproximadamente, 1 millón de protoplastos.

Los protoplastos del mesófilo se resuspendieron en 600  $\mu$ l de tampón de electroporación que contenía manitol 0,55 M, MES 5 mM, KCl 70 mM, pH 5,8. A la solución de protoplastos se añadieron 30  $\mu$ g de ADN plasmídico con 30  $\mu$ g de construcción 35S-luciferasa, Ow y col, Science, 234: 856-859, 1986, usada como patrón interno, y la transferencia de ADN se realizó a 200 voltios y a 250  $\mu$ F usando un aparato de impulsos BioRad gene. Después del impulso, se dejó sedimentar los protoplastos durante 1 hora en hielo. Los protoplastos se cultivaron a una densidad

de  $10^5$  células/ml en un medio de cultivo que contenía manitol 0,4 M, sacarosa al 30%, sales MS 4,3 g/l, clorhidrato de tiamina 10 mg/l, ácido nicotínico 5 mg/l, clorhidrato de piridoxina 10 mg/l, mioinositol 100 mg/l, glicina 2 mg/l, NAA 2 mg/l, BAP 0,5 mg/l, pH 5,8. Después de 24 horas de cultivo a 25 °C, los protoplastos se recogieron para realizar la extracción de proteínas.

- 5 Se realizaron ensayos con MUG y LUC sobre los extractos de proteína de los protoplastos, como se ha descrito anteriormente. Los resultados se expresaron con una proporción entre la actividad GUS de la construcción del promotor del CsVMV y la actividad LUC del control interno.

e. Expresión de las construcciones del promotor de CsVMV en protoplastos

10 Protoplastos preparados a partir de células BY-2 en suspensión así como células de mesófilo de hojas de tabaco se transfectaron con las construcciones del promotor del CsVMV como se describe en el Ejemplo 10. La expresión transitoria de GUS se midió como se describe en el Ejemplo 6, 24 horas después de la electroporación en relación con un patrón interno expresado a partir de un plásmido cotransfectado con luciferasa. Para cada sistema de protoplasto se realizaron cuatro experimentos de transfección independientes. Los resultados obtenidos se resumen en la Figura 11.

15 En los protoplastos de células BY-2, la construcción pC que contenía un promotor del CsVMV delecionado en la posición -222, conservó el 88% de la actividad del fragmento del promotor de longitud completa. La actividad del promotor disminuyó considerablemente solo al 24% de actividad completa con una delección adicional en la posición -178. Las construcciones pD y pE tuvieron casi el mismo nivel de expresión mientras que se observó una segunda  
20 disminución de la actividad con una delección que se extendía a la posición -63. La construcción pF con 12% de la actividad del promotor completo estuvo justo por encima del nivel de fondo. Una delección interna del nucleótido -288 al -178 (construcción pΔC) disminuyó la expresión total en más del 50%. Sorprendentemente las construcciones pΔD1 y pΔDE1, que proporcionaron una expresión muy baja en plantas transgénicas, permitieron altos niveles de expresión. Estos niveles contrastan considerablemente con lo que se había observado en plantas y posiblemente podrían reflejar diferencias en el tipo de célula usado en los dos sistemas, es decir células diferenciadas de plantas  
25 intactas frente a células indiferenciadas de cultivo de células. Para abordar esta cuestión se realizaron experimentos de transfección usando protoplastos de mesófilo foliar. Las delecciones en el extremo 5' desde la posición -443 a la -222 (construcción pC) condujeron a una disminución del 35% en la expresión del promotor. La actividad GUS de la construcción pD fue solo del 15% en comparación con la del promotor de longitud completa, mientras que el nivel de actividad de la construcción pF no estuvo por encima del fondo. Al igual que para las células BY-2, el efecto de la delección interna (-228/-178) en protoplastos de mesófilo fue drástico. De hecho, cuando se usó la construcción pΔC, el nivel de expresión GUS disminuyó al 28%. La construcción pΔD1 mantuvo el 57% de la actividad del promotor de longitud completa que era aproximadamente la misma que la de la construcción pΔE (no ensayada en células BY-2). La actividad del promotor ΔDE1 se midió al 43% de los niveles del promotor del CsVMV no delecionado.

35 En ambos sistemas de protoplastos, se observó una disminución drástica en la expresión génica cuando se eliminó la secuencia desde la posición -222 a la 176 bien por delección en el extremo 5' o por delección interna. Pudo calcularse que, en protoplastos, esta región era responsable aproximadamente del 60% de la expresión del promotor. Las bajas actividades de pD y pE son, de alguna manera, coherentes con los otros histoquímicos de plantas transgénicas en las que estas construcciones presentan patrones de expresión específicos vasculares.

40 La construcción pΔD1 produjo sistemáticamente actividades GUS por encima del 50% con respecto al promotor de longitud completa. En protoplastos de mesófilo foliar, esta construcción estaba en el mismo intervalo de actividad que pΔE aunque en plantas presentó niveles de expresión muy diferentes. De manera similar, la construcción pΔDE1 produjo altos niveles de expresión que no eran coherentes con los resultados obtenidos en plantas transgénicas. Basándose en estos resultados, los autores de la presente invención llegaron a la conclusión de que en los protoplastos, los mecanismos reguladores que rigen la actividad del promotor de CsVMV, son diferentes de  
45 los que funcionan en plantas. La región (-222/-178) desempeña un papel crítico en los protoplastos mientras que la región desde la posición -178 a la -63 parece ser de menor importancia en los protoplastos en comparación con las plantas.

11. Análisis de los Ejemplos 9-10

50 Este estudio se realizó para determinar la estructura funcional del promotor del CsVMV. Se identificaron diferentes dominios responsables de la expresión del promotor en plantas transgénicas mediante un análisis de delección de la región reguladora del promotor. Los resultados de los autores de la presente invención demuestran que el patrón de expresión constitutivo del promotor del CsVMV se debe a distintos dominios específicos de tejido. Además, para una actividad óptima del promotor, se requieren interacciones sinérgicas entre elementos. Como se ilustra en la Figura 12, se combinaron todos los datos procedentes de plantas transgénicas para determinar el primer mapa funcional del promotor del CsVMV. La región que abarca desde el nucleótido -222 a -173 contiene elementos cis que controlan la expresión del promotor en tejidos verdes y en puntas radiculares. Como ya se ha descrito, Verdagner y col, Plant Mol Biol, 31: 1129-39, 1996, esta región contiene una secuencia consenso de la secuencia activadora 1 (as1) identificada en el promotor 35S del CaMV, Lam y col, Proc Natl Acad Sci U S A, 86: 7890-4, 1989. En este promotor, el elemento as1 está directamente implicado en la expresión de la punta radicular, Fromm y col, Plant Cell,

1: 977-84, 1989, al mismo tiempo que interacciona con elementos cadena arriba para permitir la actividad del promotor en otros tejidos (Benfey & Chua, Science, 250: 959-966, 1989; Fang y col, Plant Cell, 1: 141-50, 1989; Benfey y col, Embo Journal, 9: 1677-1684, 1990a; y Benfey y col, Embo Journal, 9: 1685-96, 1990b). Lam y col, Proc Natl Acad Sci U S A, 86: 7890-4, 1989a, indicaron que la mutación de este elemento en el promotor 35S conducía a una disminución del 80% de la actividad del promotor en raíces y tallos y a una disminución del 50% en hojas. El truncamiento del promotor del CsVMV en el nucleótido -178 también pone de manifiesto el papel de la región as1 para la expresión génica en puntas radiculares. La construcción pΔDE1 (delección de la región 182/-63), que dirige un patrón de tinción GUS, que se limitó a los tejidos radiculares, tuvo un elemento as1 intacto. Se observó que as1 interacciona con TGA1a, un factor de transcripción bzip del tabaco principalmente presente en tejidos radiculares Katagiri y col, Nature, 340: 727-730, 1989; y Neuhaus y col, Plant Cell, 6: 827-834, 1994. Por consiguiente, el patrón de expresión radicular observado con la construcción pΔDE1 podría ser el resultado de la interacción entre TGA1a y la secuencia as1. Sin embargo la construcción pΔDE1 así como la delección de pΔD1 (-182 a -112) mostraron que, en el promotor del CsVMV, el elemento as1, por sí solo, no puede activar la expresión del promotor en tejidos verdes. Por otro lado, se observó que la región desde -182 a -173 es esencial para dirigir la expresión del promotor en células de mesófilo. De manera interesante, esta pequeña región contiene un motivo GATA. El papel específico de esta región GATA, independientemente del elemento as1, no puede evaluarse. Por consiguiente, son concebibles dos hipótesis: que la región GATA, por sí sola, controla la expresión del promotor en tejidos verdes, o que la región GATA y el elemento as1 actúan conjuntamente por sinergia para controlar la actividad del promotor del CsVMV en el tejido mesófilo. Datos publicados indicaron que un motivo GATA en el promotor del CaMV, denominado secuencia de activación 2 (as2) Lam y Chua, Plant Cell, 1: 1147-56, 1989, también estaba implicado en la expresión en hojas. Además, la expresión en hojas controlada por esta región GATA era dependiente de secuencias localizadas dentro de la región -90 a -46 del promotor 35S (que contiene el elemento as1). El mismo tipo de interacción puede controlar la expresión del promotor del CsVMV en tejido verde. Sin embargo, el motivo GATA identificado en el promotor del CsVMV no es idéntico al elemento as2 del promotor del CaMV. Los autores de la invención encontraron una homología más fuerte con una caja GATA identificada en el promotor del badnavirus baciliforme del tungro del arroz, Yin y Beachy, Plant J, 7: 969-980, 1995) que también desempeña un papel importante en la activación de este promotor. Los autores de la invención observaron también que en el promotor del CsVMV, el motivo GATA se asemeja a una secuencia consenso de caja I (GTAAPu) encontrada en diversos promotores regulados por el ciclo circadiano y la luz, Donald y Cashmore, The Embo Journal, 9: 1717-1726, 1990; y Teakle y Key, Plant Molecular Biology, 29: 1253-1266, 1995.

Las construcciones pΔDE2 y pΔDE3 que contienen los elementos as1 y GATA presentaron un patrón de expresión GUS débil en plantas transgénicas. Estos datos implican que, para la activación del promotor en tejidos verdes, se requieren uno o más elementos adicionales. Los autores de la invención observaron que las regiones de los nucleótidos -149 a -112 o la región de -112/-63 podría restablecer la actividad del promotor en células de mesófilo que se había perdido con las construcciones pΔDE2 y pΔDE3. Estas dos regiones podrían contener elementos que actúan en cis con funciones redundantes que son necesarios para promover la activación en tejidos verdes. Como se demostró mediante la construcción pD o pE, estos supuestos elementos que actúan en cis se localizan en una región promotora que no puede dirigir la expresión génica en células del mesófilo. Para permitir la expresión en células del mesófilo, podrían imperar mecanismos sinérgicos o combinatorios entre la región GATA y la región -149 a 63. Sin embargo, puede proponerse una explicación alternativa. Se observó que el promotor es de hecho activo cuando al menos 46 nucleótidos están presentes entre el elemento GATA (-182 a -173) y la posición -63. La distancia entre la región GATA y la caja TATA puede ser responsable de los resultados observados. Una construcción que incluya un enlace neutro manteniendo una distancia correcta entre la región GATA y la caja TATA podría permitir abordar esta cuestión. No obstante, en el promotor 35S del CaMV, los motivos as1 y GATA se localizan entre las posiciones -64 y -105, por tanto mucho más cerca de la caja TATA que en el promotor del CsVMV. Por tanto, la distancia más pequeña entre la región GATA y la caja TATA, creada por las delecciones internas de pΔDE2 y pΔDE3, no debe impedir la actividad de los elementos as1 y GATA que actúan en cis. Adicionalmente, los resultados obtenidos con la construcción pD, que es capaz de dirigir altos niveles de expresión génica en los elementos vasculares, sugieren claramente que la región de -178 a -63 contiene elementos importantes que actúan en cis. Apoyando esta hipótesis, ensayos de unión *in vitro* realizados con la región -161 a -56 revelaron una interacción específica con proteínas nucleares. Solo se detectó una banda retrasada, cuya formación se desestabilizó eficazmente por competencia con un fragmento de 43 nucleótidos que se extendía desde el nucleótido -141 al -99. Esto habría sido más coherente con los datos *in vivo* de los autores de la presente descripción, si se hubiesen detectado dos complejos retrasados ya que ambas regiones desde -149 a -112 y desde -112 a -63 desempeñan un papel activo en el proceso de activación. Es posible que no pudiese detectarse una unión específica debido a una baja concentración de factores transcripcionales en el extracto nuclear de la invención o debido a una afinidad más baja para el sitio de unión o porque se necesite unión cooperativa con otros factores. El análisis de comparación de secuencias del fragmento -149/-99 con bases de datos de nucleótidos no reveló ninguna homología fuerte. El examen de la secuencia de nucleótidos de este fragmento reveló la presencia de una repetición GTAA localizada en las posiciones -129 a -113. Se han encontrado motivos GTAA en diversos elementos funcionales que actúan en cis, tales como la caja del endospermo de los promotores del gen zeína, Maier y col, The Embo Journal, 6: 17-22, 1987; y Muller y Knudsen, Plant J, 4: 343-55, 1993, el elemento as1 y el consenso OCS, Ellis y col, Plant J, 4: 433-43, 1993). La caja tef1 de los promotores de los genes EF-1a de *Arabidopsis thaliana*, Curie y col, Nucleic Acids Res, 19: 1305-1310, 1991; Curie y col, Plant Mol Biol, 18: 1083-1089, 1992, y de *Lycopersicon esculentum* también contiene una repetición GTAA y muestra similitudes con la caja GTAA del

promotor del CsVMV. Se ha descrito que la caja tef1, que se localiza en la región -100 de los promotores EF-1a, está implicada en la activación del promotor en células cíclicas, Regad y col, *Mol Gen Genet*, 248: 703-711, 1995. La función de la repetición GTAA en el promotor del CsVMV deberá determinarse más adelante.

5 La expresión del promotor del CsVMV en elementos vasculares está dirigida por la región que abarca los nucleótidos -178 a -63. Este dominio vascular contiene dos elementos independientes localizados respectivamente en la región -149/-112 y en la región -112/-63. Como se ha mencionado anteriormente, Verdaguer y col, *Plant Mol Biol*, 31: 1129-39, 1996, la última contiene una secuencia de 22 nucleótidos, caracterizada por una repetición CTTATC, que está presente en la misma posición relativa (de -78 a -100) en un dominio vascular del promotor del badnavirus del moteado amarillo de *Commelina* (ComYMV), Medberry y Olszewski, *Plant J*, 3: 619-26, 1993. Los resultados de los autores de la presente invención sugieren que los elementos, implicados en la expresión vascular del promotor del CsVMV, pueden ser los que interactúan con la región cadena arriba del mesófilo. Es interesante observar que los elementos vasculares en el promotor del CsVMV se localizan directamente cadena arriba de la caja TATA. Esta disposición es muy parecida a la descrita para los promotores del RTBV y del ComYMV, Medberry y Olszewski, *Plant J*, 3: 619-26, 1993; y Yin y Beachy, *Plant J*, 7: 969-980, 1995. En el promotor del CaMV, como describen Benfey y col, *Embo J*, 9: 1685-96, 1990b, el elemento vascular se localiza en el subdominio B4 que abarca los nucleótidos -310 a -209. Además, en este promotor, el elemento as1 también está implicado en la regulación de la expresión vascular. La delección de la región as1 en el CsVMV no afectó a la expresión vascular. Es probable que, en los promotores del CsVMV y del CaMV, los mecanismos que regulan la actividad promotora vascular sean diferentes.

20 En protoplastos, la actividad del promotor del CsVMV parece estar controlada esencialmente por la región que abarca los nucleótidos desde la posición -222 a la -178 que contiene la secuencia consenso as1. Es sorprendente observar que la expresión del promotor es independiente de la de la secuencia desde la posición -182 a la -63. Por ejemplo en protoplastos de células BY-2, los autores de la invención mostraron que la construcción del promotor p $\Delta$ DE conservaba más del 80% de la actividad del promotor de tipo silvestre. También se mencionaron discrepancias de resultados entre ensayos transitorios basados en protoplastos y plantas transgénicas para el promotor 35S del CaMV, Fang y col, *Plant Cell*, 1: 141-50, 1989; y Lam, *Results Probl Cell Differ*, 20: 181-196, 1994. Ow y col, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 84: 4870-4874, 1987, describieron mayor actividad de un promotor 35S de CaMV truncado en -90 en protoplastos de zanahoria que en plantas transgénicas. De manera similar, los autores de la invención observaron que el derivado -90 del promotor 35S proporcionaba una fuerte actividad CAT en protoplastos de células BY-2 (datos no mostrados) aunque se describió que, usando la misma construcción en plantas transgénicas, no era detectable ningún transcrito de CAT, Fang y col, *Plant Cell*, 1: 141-50, 1989. Los protoplastos están en un estado fisiológico altamente estresado, Roest y col, *Acta Botanica Neerlandica*, 42: 1-25, 1993. Las condiciones estresantes podrían ser responsables de la activación o inactivación de diversos factores, de actuación en trans, que interactúan con el promotor. En este sentido, son particularmente relevantes diversas descripciones sobre la sensibilidad del elemento as1 frente a señales relacionadas con estrés múltiple, tales como auxinas, ácido salicílico, jasmonato de metilo, Liu & Lam, *J Biol Chem*, 269: 668-675, 1994; Qin y col, *The Plant Cell*, 6: 863-874, 1994; Zhang y Singh, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 2507-11, 1994; y Xiang y col, *Plant Mol Biol*, 32: 415-26, 1996.

40 Previamente, los autores de la invención observaron que en protoplastos BY-2, una construcción del promotor del CsVMV, que abarcaba los nucleótidos -368 a +20, era dos veces menos activa que el promotor de longitud completa (-443 a +72), Verdaguer y col, *Plant Mol Biol*, 31: 1129-39, 1996. El estudio de la presente invención indica que el truncamiento en el extremo 5' del promotor en la posición -222 no influyó en el nivel de actividad. De hecho, en protoplastos BY2, la construcción pC conservó más del 80% de la actividad del promotor de longitud completa. Por consiguiente, la diferencia en la expresión del promotor detectada anteriormente se debe más probablemente a la mayor longitud del fragmento líder. Se sabe que, normalmente, los líderes virales no traducidos ejercen influencia en la estabilidad del mensajero o en el inicio de la traducción, Gallie y Walbot, *Nucleic Acids Res*, 20: 4631-4638, 1992; y Dowson y col, *Plant Mol Biol*, 23: 97-109, 1993. Recently, Chen y col, *J Virol*, 70: 8411-8421, 1996, describieron un efecto directo del líder del RTBV sobre la activación de la transcripción. Los autores de la invención no pueden descartar la posibilidad de la presencia de una secuencia de actuación en cis de este tipo en el fragmento líder del CsVMV.

55 El promotor del CsVMV tiene una estructura modular constituida por diferentes dominios que ejercen distintas influencias sobre patrones de expresión específicos de tejido. Además, la expresión del promotor requiere interacciones sinérgicas o combinatorias entre diferentes elementos que actúan en cis. Estas conclusiones recuerdan a las obtenidas con el promotor 35S del CaMV, Benfey y Chua, *Science*, 250: 959-966, 1990. Parece que los patrones de expresión constitutivos de los promotores del CaMV y del CsVMV se consiguen a través de las mismas estrategias reguladoras. La similitud de su organización funcional se pone de manifiesto por la importancia común de los elementos as1 y GATA que actúan en cis. Sin embargo estos dos promotores no son totalmente homólogos en sus estructuras funcionales. En el promotor del CsVMV, la región que se extiende desde la posición -63 a -149 contiene elementos esenciales para la expresión en plantas. Estos elementos no se identificaron en el promotor 35S del CaMV y pueden indicar alguna divergencia en los mecanismos reguladores usados por estos dos promotores de caulimovirus.

LISTADO DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(I) SOLICITANTE:

- 5 (A) NOMBRE: THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE
- (B) CALLE: 10550 North Torrey Pines Road
- (C) CIUDAD: La Jolla
- (D) ESTADO: California
- 10 (E) PAÍS: ESTADOS UNIDOS
- (F) CÓDIGO POSTAL: 92037
- (G) TELÉFONO: (619) 784-2937
- (H) TELEFAX: (619) 784-9399

15 (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: PROMOTORES DEL VIRUS DEL MOSAICO DE LA NERVADURA DE LA MANDIOCA Y SUS USOS

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 36

(iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

- 20 (A) TIPO DE MEDIO: disquete
- (B) ORDENADOR: Compatible con PC IBM
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) APLICACIÓN INFORMÁTICA: PatentIn Release Nº 1.0, Versión Nº 1.25

25 (v) DATOS ACTUALES DE LA SOLICITUD:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: PCT/US 97/
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 20-JUN-1997

30 (vi) FECHA DE SOLICITUD ANTERIOR:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 60/020.129
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 20-JUN-1996

35 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:1:

(I) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 40 (A) LONGITUD: 392 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

45 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 1:

```

AGCTCAGCAA GAAGCAGATC AATATGCGGC ACATATGCAA CCTATGTTCA AAAATGAAGA      60
ATGTACAGAT ACAAGATCCT ATACTGCCAG AATACGAAGA AGAATACGTA GAAATTGAAA      120
AAGAAGAACC AGGCGAAGAA AAGAATCTTG AAGACGTAAG CACTGACGAC AACAAATGAAA      180
AGAAGAAGAT AAGGTCGGTG ATTGTGAAAG AGACATAGAG GACACATGTA AGGTGGAAAA      240
TGTAAGGGCG GAAAGTAACC TTATCACAAA GGAATCTTAT CCCCCACTAC TTATCCTTTT      300
ATATTTTTCG GTGTCATTTT TGCCCTTGAG TTTTCCTATA TAAGGAACCA AGTTCGGCAT      360
TTGTGAAAAC AAGAAAAAAT TTGGTGTAAG CT                                     392
    
```

50 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 524 pares de bases

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN(genómico)  
 (iii) HIPOTÉTICO: NO  
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 2:

```

GGTACCAGAA GGTAAATTATC CAAGATGTAG CATCAAGAAT CCAATGTTTA CGGGAAAAAC      60
TATGGAAGTA TTATGTGAGC TCAGCAAGAA GCAGATCAAT ATGCGGCACA TATGCAACCT      120
ATGTTCAAAA ATGAAGAATG TACAGATACA AGATCCTATA CTGCCAGAAT ACGAAGAAGA      180
ATACGTAGAA ATTGAAAAAG AAGAACCAGG CGAAGAAAAG AATCTTGAAG ACGTAAGCAC      240
TGACGACAAC AATGAAAAGA AGAAGATAAG GTCGGTGATT GTGAAAGAGA CATAGAGGAC      300
ACATGTAAGG TGGAAAATGT AAGGGCGGAA AGTAACCTTA TCACAAAGGA ATCTTATCCC      360
CCACTACTTA TCCTTTTATA TTTTCCGTG TCATTTTTGC CCTTGAGTTT TCCTATATAA      420
GGAACCAAGT TCGGCATTG TGAAAACAAG AAAAAATTG GTGTAAGCTA TTTTCTTTGA      480
AGTACTGAGG ATACAAGTTC AGAGAAATTT GTAAGTTTGA ATTC                          524
  
```

10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

15

- (A) LONGITUD: 526 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

20

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)  
 (iii) HIPOTÉTICO: NO  
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 3:

25

```

TCTAGACCAG AAGGTAATTA TCCAAGATGT AGCATCAAGA ATCCAATGTT TACGGGAAAA      60
ACTATGGAAG TATTATGTGA GCTCAGCAAG AAGCAGATCA ATATGCGGCA CATATGCAAC      120
CTATGTTCAA AAATGAAGAA TGTACAGATA CAAGATCCTA TACTGCCAGA ATACGAAGAA      180
GAATACGTAG AAATTGAAAA AGAAGAACCA GGCGAAGAAA AGAATCTTGA AGACGTAAGC      240
ACTGACGACA ACAATGAAAA GAAGAAGATA AGGTCGGTGA TTGTGAAAGA GACATAGAGG      300
ACACATGTAA GGTGGAAAT GTAAGGGCGG AAGTAACCT TATCACAAAG GAATCTTATC      360
CCCCACTACT TATCCTTTTA TATTTTTCCG TGTCATTTTT GCCCTTGAGT TTTCTATAT      420
AAGGAACCAA GTTCGGCATT TGTGAAAACA AGAAAAAATT TGGTGTAAGC TATTTTCTTT      480
GAAGTACTGA GGATACAAGT TCAGAGAAAT TTGTAAGTTT GAATTC                          526
  
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

30

- (A) LONGITUD: 411 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

35

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)  
 (iii) HIPOTÉTICO: NO

- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 4:

GGATCCTATG TTCAAAAATG AAGAATGTAC AGATACAAGA TCCTATACTG CCAGAATACG	60
AAGAAGAATA CGTAGAAATT GAAAAGAAG AACAGGCCGA AGAAAAGAAT CTTGAAGACG	120
TAAGCACTGA CGACAACAAT GAAAAGAAGA AGATAAGGTC GGTGATTGTG AAAGAGACAT	180
AGAGGACACA TGTAAGGTGG AAAATGTAAG GCGGAAAGT AACCTTATCA CAAAGGAATC	240
TTATCCCCCA CTACTTATCC TTTTATATTT TTCCGTGTCA TTTTGGCCCT TGAGTTTTCC	300
TATATAAGGA ACCAAGTTCG GCATTTGTGA AAACAAGAAA AAATTTGGTG TAAGCTATTT	360
TCTTTGAAGT ACTGAGGATA CAAGTTCAGA GAAATTTGTA AGTTTGAATT C	411

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:5:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 305 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 5:

GGATCCTGAA GACGTAAGCA CTGACGACAA CAATGAAAAG AAGAAGATAA GGTCCGGTGAT	60
TGTGAAGAG ACATAGAGGA CACATGTAAG GTGGAAAATG TAAGGGCGGA AAGTAACCTT	120
ATCACAAAGG AATCTTATCC CCCACTACTT ATCCTTTTAT ATTTTCCCGT GTCATTTTTG	180
CCCTTGAGTT TTCCTATATA AGGAACCAAG TTCGGCATTG GTGAAAACAA GAAAAATTT	240
GGTGTAAAGCT ATTTTCTTTG AAGTACTGAG GATACAAGTT CAGAGAAATT TGTAAGTTTG	300
AATTC	305

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:6:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 261 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 6:

35

GGATCCGGTC GGTGATTGTG AAAGAGACAT AGAGGACACA TGTAAGGTGG AAAATGTAAG	60
GCGGAAAGT AACCTTATCA CAAAGGAATC TTATCCCCCA CTACTTATCC TTTTATATTT	120
TTCCGTGTCA TTTTGGCCCT TGAGTTTTCC TATATAAGGA ACCAAGTTCG GCATTTGTGA	180
AAACAAGAAA AAATTTGGTG TAAGCTATTT TCTTTGAAGT ACTGAGGATA CAAGTTCAGA	240
GAAATTTGTA AGTTTGAATT C	261

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:7:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 193 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN(genómico)  
 (iii) HIPOTÉTICO: NO  
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 7:

```
GGATCCTTAT CACAAAGGAA TCTTATCCCC CACTACTTAT CCTTTTATAT TTTCCGTGT      60
CATTTTTGCC CTTGAGTTTT CCTATATAAG GAACCAAGTT CGGCATTTGT GAAAACAAGA      120
AAAAATTTGG TGTAAGCTAT TTTCTTTGAA GTACTGAGGA TACAAGTTCA GAGAAATTTG      180
TAAGTTTGAA TTC                                                                193
```

- 15 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:8:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 (A) LONGITUD: 143 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 20  
 25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)  
 (iii) HIPOTÉTICO: NO  
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 8:

```
GGATCCGTGT CATTTTTGCC CTTGAGTTTT CCTATATAAG GAACCAAGTT CGGCATTTGT      60
GAAAACAAGA AAAAATTTGG TGTAAGCTAT TTTCTTTGAA GTACTGAGGA TACAAGTTCA      120
GAGAAATTTG TAAGTTTGAA TTC                                                  143
```

- 30 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:9:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 (A) LONGITUD: 420 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 35  
 40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)  
 (iii) HIPOTÉTICO: NO  
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 9:

```
TCTAGACCAG AAGGTAATTA TCCAAGATGT AGCATCAAGA ATCCAATGTT TACGGGAAAA      60
ACTATGGAAG TATTATGTGA GCTCAGCAAG AAGCAGATCA ATATGCGGCA CATATGGATC      120
CTGAAGACGT AAGCACTGAC GACAACAATG AAAAGAAGAA GATAAGGTCG GTGATTGTGA      180
AAGAGACATA GAGGACACAT GTAAGGTGGA AAATGTAAGG GCGGAAAGTA ACCTTATCAC      240
AAAGGAATCT TATCCCCCAC TACTTATCCT TTTATATTTT TCCGTGTCAT TTTTGCCCTT      300
GAGTTTTTCT ATATAAGGAA CCAAGTTCGG CATTGTGTA AACAAGAAA AATTTGGTGT      360
AAGCTATTTT CTTTGAAGTA CTGAGGATAC AAGTTCAGAG AAATTTGTAA GTTTGAATTC      420
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 482 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 10:

<b>TCTAGACCAG AAGGTAATTA TCCAAGATGT AGCATCAAGA ATCCAATGTT TACGGGAAAA</b>	<b>60</b>
<b>ACTATGGAAG TATTATGTGA GCTCAGCAAG AAGCAGATCA ATATGCGGCA CATATGCAAC</b>	<b>120</b>
<b>CTATGTTCAA AAATGAAGAA TGTACAGATA CAAGATCCTA TACTGCCAGA ATACGAAGAA</b>	<b>180</b>
<b>GAATACGTAG AAATTGAAAA AGAAGAACCA GGCGAAGAAA AGGATCCGGT CGGTGATTGT</b>	<b>240</b>
<b>GAAAGAGACA TAGAGGACAC ATGTAAGGTG GAAAATGTAA GGGCGGAAAG TAACCTTATC</b>	<b>300</b>
<b>ACAAAGGAAT CTTATCCCC ACTACTTATC CTTTTATATT TTTCCGTGTC ATTTTTGCCC</b>	<b>360</b>
<b>TTGAGTTTTC CTATATAAGG AACCAAGTTC GGCATTTGTG AAAACAAGAA AAAATTTGGT</b>	<b>420</b>
<b>GTAAGCTATT TTCTTTGAAG TACTGAGGAT ACAAGTTCAG AGAAATTTGT AAGTTTGAAT</b>	<b>480</b>
<b>TC</b>	<b>482</b>

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 458 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 11:

<b>TCTAGACCAG AAGGTAATTA TCCAAGATGT AGCATCAAGA ATCCAATGTT TACGGGAAAA</b>	<b>60</b>
<b>ACTATGGAAG TATTATGTGA GCTCAGCAAG AAGCAGATCA ATATGCGGCA CATATGCAAC</b>	<b>120</b>
<b>CTATGTTCAA AAATGAAGAA TGTACAGATA CAAGATCCTA TACTGCCAGA ATACGAAGAA</b>	<b>180</b>
<b>GAATACGTAG AAATTGAAAA AGAAGAACCA GGCGAAGAAA AGAATCTTGA AGACGTAAGC</b>	<b>240</b>
<b>ACTGACGACA ACAATGAAAA GAAGAGGATC CTTATCACAA AGGAATCTTA TCCCCACTA</b>	<b>300</b>
<b>CTTATCCTTT TATATTTTTTTC CGTGTCATTT TTGCCCTTGA GTTTTCTTAT ATAAGGAACC</b>	<b>360</b>
<b>AAGTTCGGCA TTTGTGAAAA CAAGAAAAAA TTTGGTGTA GCTATTTTCT TTGAAGTACT</b>	<b>420</b>
<b>GAGGATACAA GTTCAGAGAA ATTTGTAAGT TTGAATTC</b>	<b>458</b>

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 468 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 12:

5	<p>TCTAGACCAG AAGGTAATTA TCCAAGATGT AGCATCAAGA ATCCAATGTT TACGGGAAAA 60</p> <p>ACTATGGAAG TATTATGTGA GCTCAGCAAG AAGCAGATCA ATATGCGGCA CATATGCAAC 120</p> <p>CTATGTTCAA AAATGAAGAA TGTACAGATA CAAGATCCTA TACTGCCAGA ATACGAAGAA 180</p> <p>GAATACGTAG AAATTGAAAA AGAAGAACCA GCGGAAGAAA AGAATCTTGA AGACGTAAGC 240</p> <p>ACTGACGACA ACAATGAAAA GAAGAAGATA AGGTCGGATC CTTATCACAA AGGAATCTTA 300</p> <p>TCCCCACTA CTTATCCTTT TATATTTTTT CGTGTCAATF TTGCCCTTGA GTTTTCCTAT 360</p> <p>ATAAGGAACC AAGTTCGGCA TTTGTGAAAA CAAGAAAAAA TTTGGTGTA GCTATTTTCT 420</p> <p>TTGAAGTACT GAGGATACAA GTTCAGAGAA ATTTGTAAGT TTGAATTC 468</p>
---	---

10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 491 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 13:

15	<p>TCTAGACCAG AAGGTAATTA TCCAAGATGT AGCATCAAGA ATCCAATGTT TACGGGAAAA 60</p> <p>ACTATGGAAG TATTATGTGA GCTCAGCAAG AAGCAGATCA ATATGCGGCA CATATGCAAC 120</p> <p>CTATGTTCAA AAATGAAGAA TGTACAGATA CAAGATCCTA TACTGCCAGA ATACGAAGAA 180</p> <p>GAATACGTAG AAATTGAAAA AGAAGAACCA GCGGAAGAAA AGAATCTTGA AGACGTAAGC 240</p> <p>ACTGACGACA ACAATGAAAA GAAGAAGATA AGGTCGGTGA TTGTGAAAGA GACATAGAGG 300</p> <p>ATCCTTATCA CAAAGGAATC TTATCCCCCA CTACTTATCC TTTTATATTT TTCCGTGTCA 360</p> <p>TTTTTGCCCT TGAGTTTTTC TATATAAGGA ACCAAGTTTC GCATTTGTGA AAACAAGAAA 420</p> <p>AAATTTGGTG TAAGCTATTT TCTTTGAAGT ACTGAGGATA CAAGTTCAGA GAAATTTGTA 480</p> <p>AGTTTGAATT C 491</p>
----	--

25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 408 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 14:

TCTAGACCAG	AAGGTAATTA	TCCAAGATGT	AGCATCAAGA	ATCCAATGTT	TACGGGAAAA	60
ACTATGGAAG	TATTATGTGA	GCTCAGCAAG	AAGCAGATCA	ATATGCGGCA	CATATGCAAC	120
CTATGTTCAA	AAATGAAGAA	TGTACAGATA	CAAGATCCTA	TACTGCCAGA	ATACGAAGAA	180
GAATACGTAG	AAATTGAAAA	AGAAGAACCA	GGCGAAGAAA	AGAATCTTGA	AGACGTAAGC	240
ACTGACGACA	ACAATGAAAA	GAAGAGGATC	CGTGTCATTT	TTGCCCTTGA	GTTTTCTAT	300
ATAAGGAACC	AAGTTCGGCA	TTTGTGAAAA	CAAGAAAAAA	TTGGTGTAA	GCTATTTTCT	360
TTGAAGTACT	GAGGATACAA	GTTTCAGAGAA	ATTTGTAAGT	TTGAATTC		408

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:15:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 418 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 15:

TCTAGACCAG	AAGGTAATTA	TCCAAGATGT	AGCATCAAGA	ATCCAATGTT	TACGGGAAAA	60
ACTATGGAAG	TATTATGTGA	GCTCAGCAAG	AAGCAGATCA	ATATGCGGCA	CATATGCAAC	120
CTATGTTCAA	AAATGAAGAA	TGTACAGATA	CAAGATCCTA	TACTGCCAGA	ATACGAAGAA	180
GAATACGTAG	AAATTGAAAA	AGAAGAACCA	GGCGAAGAAA	AGAATCTTGA	AGACGTAAGC	240
ACTGACGACA	ACAATGAAAA	GAAGAAGATA	AGGTCGGATC	CGTGTCATTT	TTGCCCTTGA	300
GTTTTCTAT	ATAAGGAACC	AAGTTCGGCA	TTTGTGAAAA	CAAGAAAAAA	TTGGTGTAA	360
GCTATTTTCT	TTGAAGTACT	GAGGATACAA	GTTTCAGAGAA	ATTTGTAAGT	TTGAATTC	418

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:16:

20

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 441 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

30

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 16:

TCTAGACCAG	AAGGTAATTA	TCCAAGATGT	AGCATCAAGA	ATCCAATGTT	TACGGGAAAA	60
ACTATGGAAG	TATTATGTGA	GCTCAGCAAG	AAGCAGATCA	ATATGCGGCA	CATATGCAAC	120
CTATGTTCAA	AAATGAAGAA	TGTACAGATA	CAAGATCCTA	TACTGCCAGA	ATACGAAGAA	180
GAATACGTAG	AAATTGAAAA	AGAAGAACCA	GGCGAAGAAA	AGAATCTTGA	AGACGTAAGC	240
ACTGACGACA	ACAATGAAAA	GAAGAAGATA	AGGTCGGTGA	TTGTGAAAGA	GACATAGAGG	300
ATCCGTGTCA	TTTTTGCCCT	TGAGTTTCC	TATATAAGGA	ACCAAGTTCG	GCATTTGTGA	360
AAACAAGAAA	AAATTTGGTG	TAAGCTATTT	TCTTTGAAGT	ACTGAGGATA	CAAGTTCAGA	420
GAAATTTGTA	AGTTTGAATT	C				441

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 476 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)  
 (iii) HIPOTÉTICO: NO  
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 17:

	<b>TCTAGACCAG AAGGTAATTA TCCAAGATGT AGCATCAAGA ATCCAATGTT TACGGGAAAA</b>	<b>60</b>
	<b>ACTATGGAAG TATTATGTGA GCTCAGCAAG AAGCAGATCA ATATGCGGCA CATATGCAAC</b>	<b>120</b>
	<b>CTATGTTCAA AAATGAAGAA TGTACAGATA CAAGATCCTA TACTGCCAGA ATACGAAGAA</b>	<b>180</b>
	<b>GAATACGTAG AAATTGAAAA AGAAGAACCA GGCGAAGAAA AGAATCTTGA AGACGTAAGC</b>	<b>240</b>
	<b>ACTGACGACA ACAATGAAAA GAAGAAGATA AGGTCGGTGA TTGTGAAAGA GACATAGAGG</b>	<b>300</b>
	<b>ACACATGTAA GGTGGAAAAAT GTAAGGGCGG AAAGGATCCG TGTCATTTTT GCCCTGAGT</b>	<b>360</b>
	<b>TTTCCTATAT AAGGAACCAA GTTCGGCATT TGTGAAAACA AGAAAAAATT TGGTGTAAAGC</b>	<b>420</b>
15	<b>TATTTTCTTT GAAGTACTGA GGATACAAGT TCAGAGAAAT TTGTAAGTTT GAATTC</b>	<b>476</b>

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 31 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)  
 (iii) HIPOTÉTICO: NO  
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 18:  
 30 ACCGGTACCA GAAGGTAATT ATCCAAGATG T 31

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 30 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)  
 (iii) HIPOTÉTICO: NO  
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 19:  
 45 CGGAATTCAA ACTTACAAAT TTCTCTGAAG 30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 50 (A) LONGITUD: 34 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CADENA: sencilla

- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)  
(iii) HIPOTÉTICO: NO  
(iv) ANTI-SENTIDO: NO  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 20:  
CGCGATCCAG ACTGAATGCC CACAGGCCGT CGAG 34
- 5
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:21:
- 10 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 17 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 15
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)  
(iii) HIPOTÉTICO: NO  
(iv) ANTI-SENTIDO: NO  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 21:  
AGACGTAAGC ACTGACG 17
- 20
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:22:
- 25 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 22 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 30
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)  
(iii) HIPOTÉTICO: NO  
(iv) ANTI-SENTIDO: NO  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 22:  
CTTATCACAA AGGAATCTTA TC 22
- 35
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:23:
- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 22 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 45
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)  
(iii) HIPOTÉTICO: NO  
(iv) ANTI-SENTIDO: NO  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 23:  
CTTATCACAA AGGAATCTTA TC 22
- 50
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:24:
- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 28 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 60
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)  
(iii) HIPOTÉTICO: NO  
(iv) ANTI-SENTIDO: NO
- 65

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 24:  
GCTCTAGACC AGAAGGTAAT TATCCAAG 28

5 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:25:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 26 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 25:  
TATGGATCCT ATGTTCAAAA ATGAAG 26

20 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 26 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN(genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 26:  
AAAGGATCCT GAAGACGTAA GCACTG 26

35 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:27:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 40 (A) LONGITUD: 25 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 27:  
AGAGGATCCG GTCGGTGATT GTGAA 25

50 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 25 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN(genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 28:  
AAAGGATCCT TATCACAAG GAATC 25

65 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:29:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 27 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN(genómico)  
(iii) HIPOTÉTICO: NO  
(iv) ANTI-SENTIDO: NO  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 29:  
TATGGATCCG TGTCATTTTT GCCCTTG 27

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:30:

- 15 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
  
20 (A) LONGITUD: 29 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

- 25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)  
(iii) HIPOTÉTICO: NO  
(iv) ANTI-SENTIDO: SÍ  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 30:  
CGGAATCAA ACTTACAAAT TTCTCTAAG 29

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:31:

- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
  
35 (A) LONGITUD: 25 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal  
  
40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)  
(iii) HIPOTÉTICO: NO  
(iv) ANTI-SENTIDO: SÍ  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 31:  
TAAGGATCCT TTCCGCCCTT ACATT 25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:32:

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
  
50 (A) LONGITUD: 25 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal  
  
55 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)  
(iii) HIPOTÉTICO: NO  
(iv) ANTI-SENTIDO: SÍ  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 32:  
CATGGATCCT CTATGTCTCT TTCAC 25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:33:

- 60 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
  
65 (A) LONGITUD: 22 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)  
(iii) HIPOTÉTICO: NO  
(iv) ANTI-SENTIDO: SÍ  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 33:  
ACAGGATCCG ACCTTATCTT CT 22

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:34:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 26 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)  
(iii) HIPOTÉTICO: NO  
(iv) ANTI-SENTIDO: SÍ  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 34:  
ACCGGATCCT CTTCTTTTCA TTGTTC 26

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:35:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

25

(A) LONGITUD: 24 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)  
(iii) HIPOTÉTICO: NO  
(iv) ANTI-SENTIDO: SÍ  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 35:  
TCAGGATCCT TTTCTTCGCC TGGT 24

35

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:36:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

40

(A) LONGITUD: 23 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

45

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)  
(iii) HIPOTÉTICO: NO  
(iv) ANTI-SENTIDO: SÍ  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 36:  
ATAGGATCCA TATGTGCCGC ATA 23

50

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos del promotor que, en una célula de planta, puede iniciar la transcripción de una secuencia de ácido nucleico que no es del CsVMV unida operativamente, en la que dicha secuencia de nucleótidos del promotor se selecciona entre la SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15 y SEC ID N°: 16, no conteniendo la molécula de ácido nucleico aislada otras partes del genoma del CsVMV.
2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que dicha célula de planta es una monocotiledónea o dicotiledónea.
- 10 3. Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos del promotor que, en una célula de planta, puede iniciar la transcripción de una secuencia de ácido nucleico que no es del CsVMV unida operativamente, en la que dicha secuencia de nucleótidos del promotor se selecciona entre la SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15 y SEC ID N°: 16, estando unida operativamente dicha secuencia de nucleótidos del promotor a una secuencia de ácido nucleico que no es del CsVMV.
- 15 4. Una planta transgénica que comprende una secuencia de nucleótidos del promotor que, en una planta, puede iniciar la transcripción de una secuencia de ácido nucleico que no es del CsVMV unida operativamente, en la que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona entre la SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15 y SEC ID N°: 16, estando unida operativamente dicha secuencia de nucleótidos del promotor a una secuencia de ácido nucleico que no es del CsVMV.
- 20 5. Un procedimiento de expresión, en una célula de planta, de una secuencia de ácido nucleico que no es del CsVMV que comprende:
- a) la transformación de dicha célula de planta con un vector de acuerdo con la reivindicación 3; y
  - b) el cultivo de dicha célula de planta en condiciones en las que la secuencia de ácido que no es del CsVMV se exprese en dicha célula de planta.
- 25 6. Un gen quimérico que, en células de plantas, expresa una secuencia de ácido nucleico que no es del CsVMV que comprende, unidas operativamente en secuencia, en dirección 5' a 3':
- a) una secuencia de nucleótidos del promotor que, en una célula de planta, puede iniciar la transcripción de una secuencia de ácido nucleico que no es del CsVMV unida operativamente, en la que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona entre la SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15 y SEC ID N°: 16, y
  - b) una secuencia de ácido nucleico estructural que es secuencia.

30

GENOMA DEL CsVMV (8158)

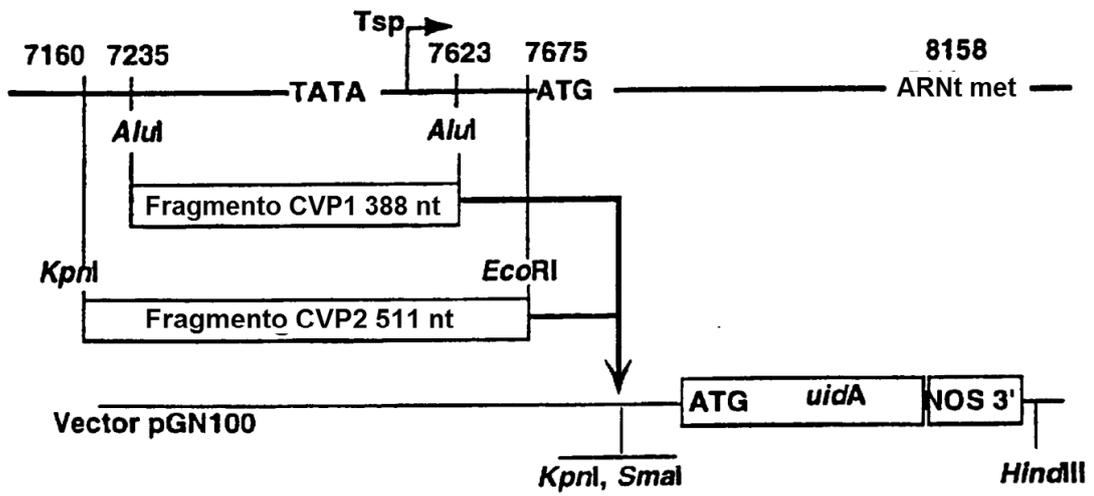


FIG. 1

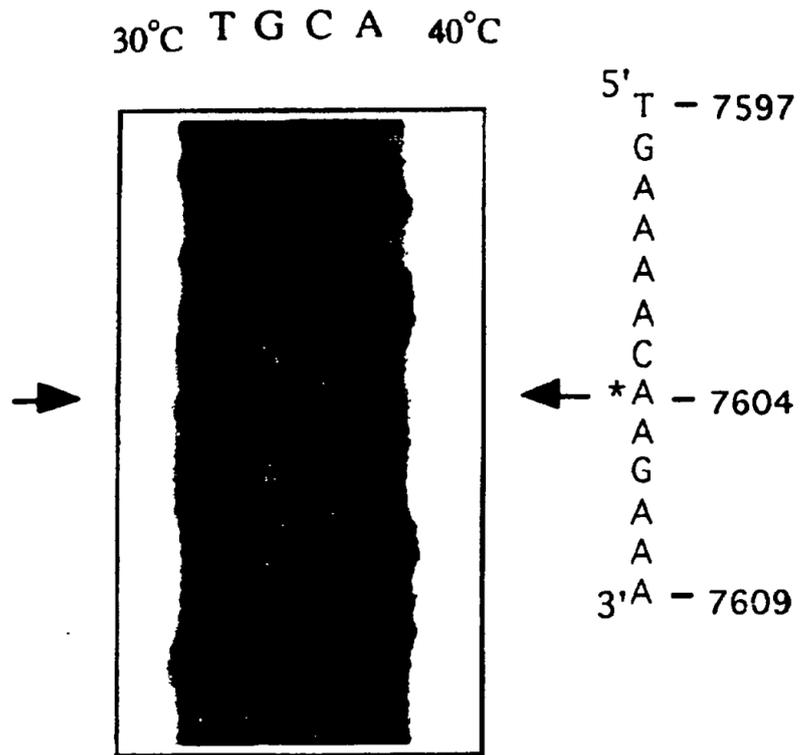


FIG. 2

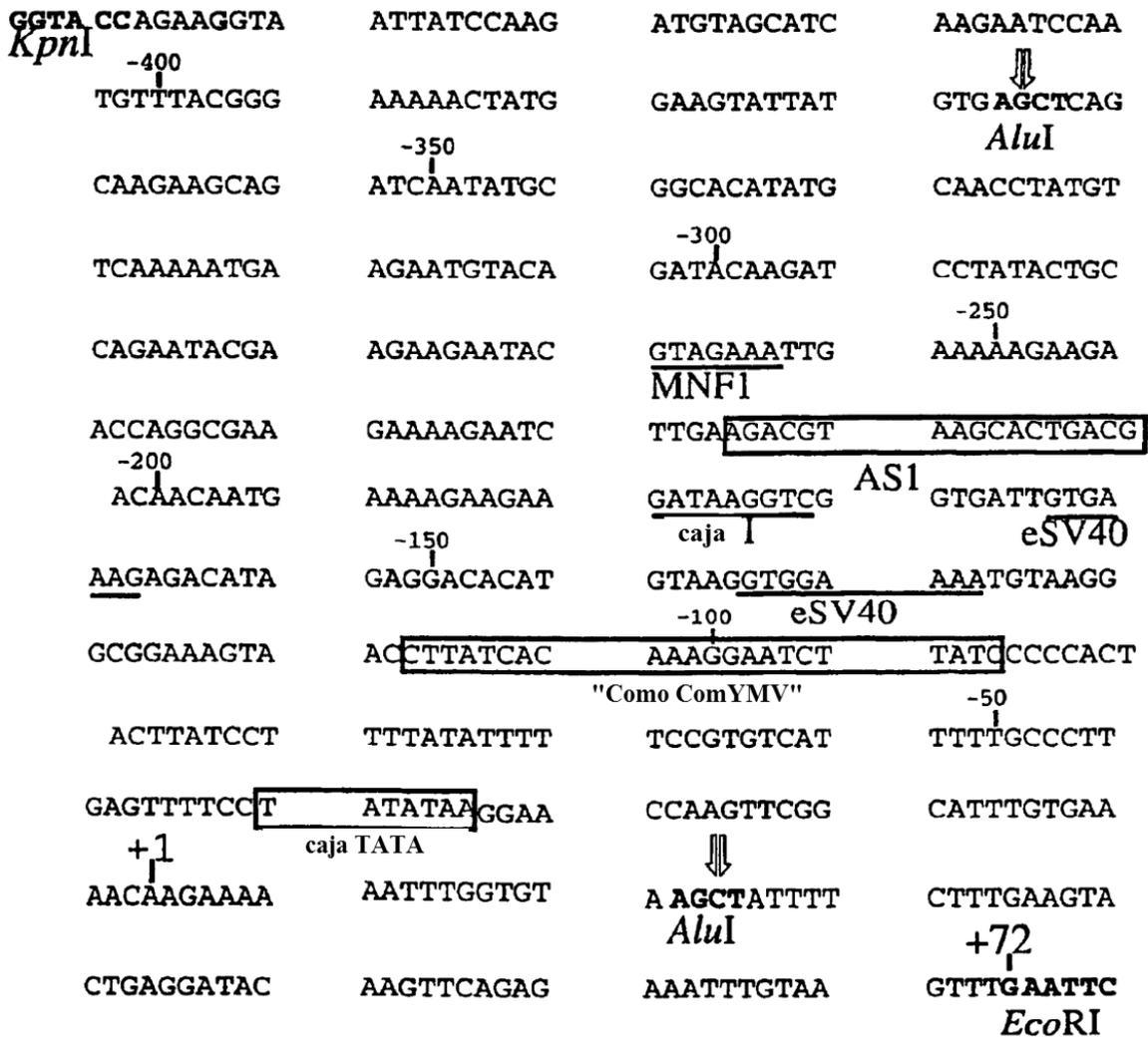
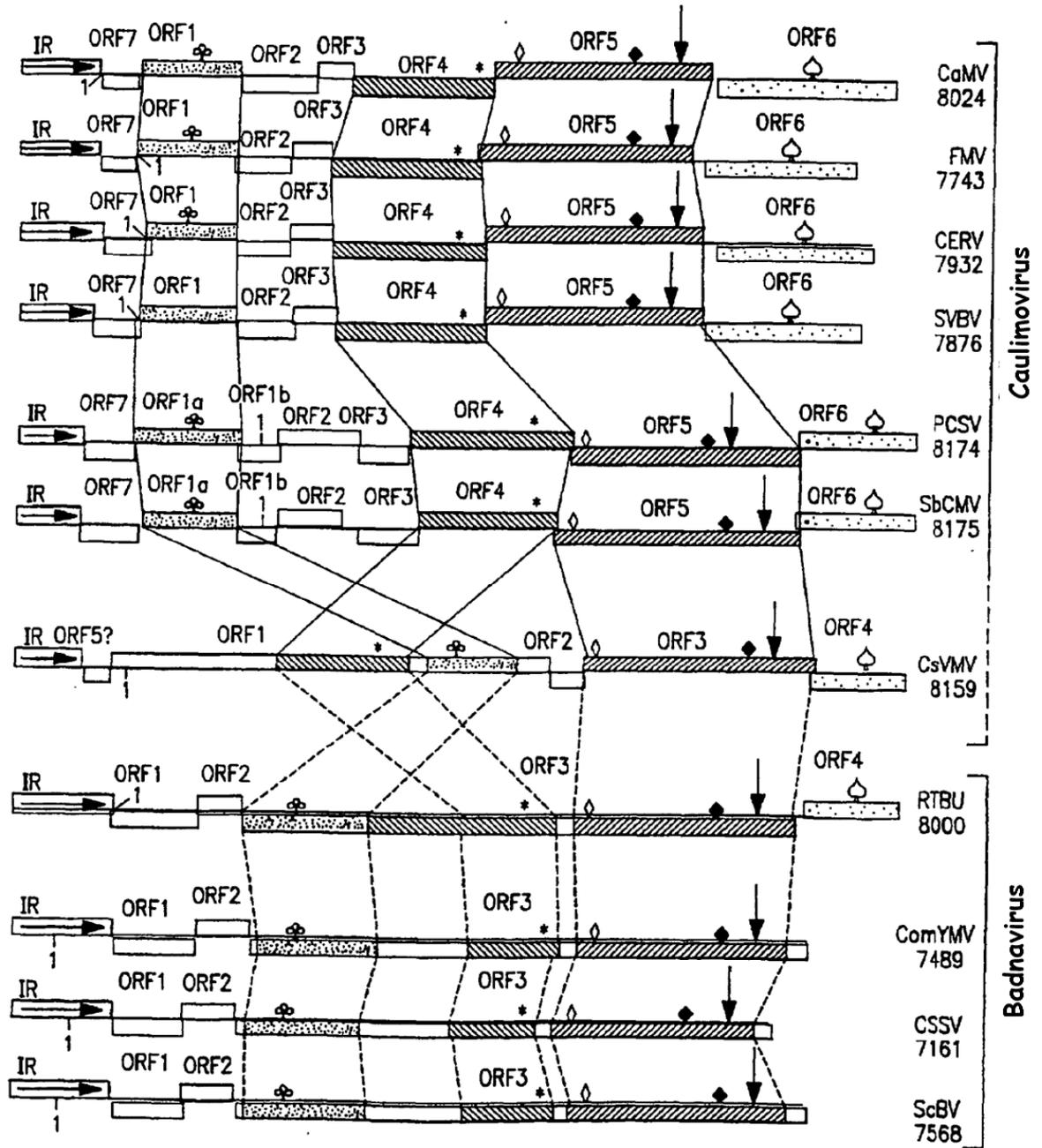


FIG. 3

FIG. 4



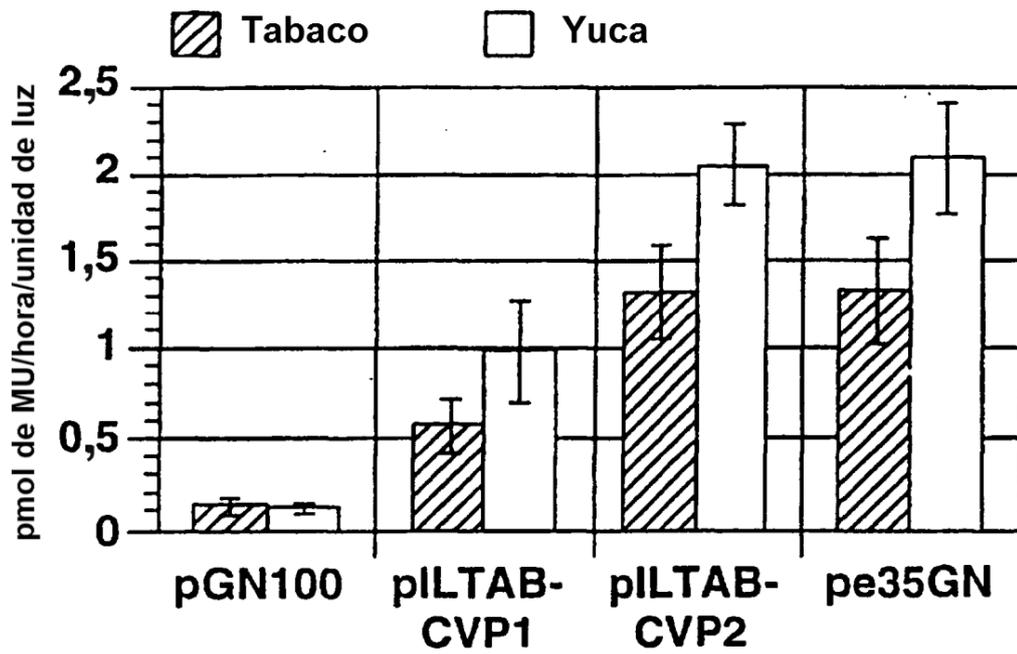


FIG. 5



FIG. 6A



FIG. 6B

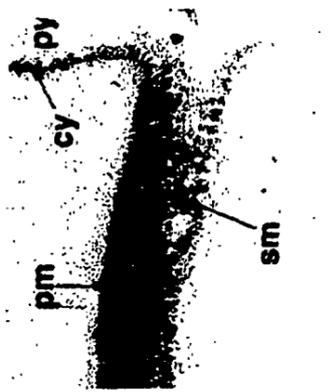


FIG. 6C



FIG. 6D



FIG. 6E



FIG. 6F

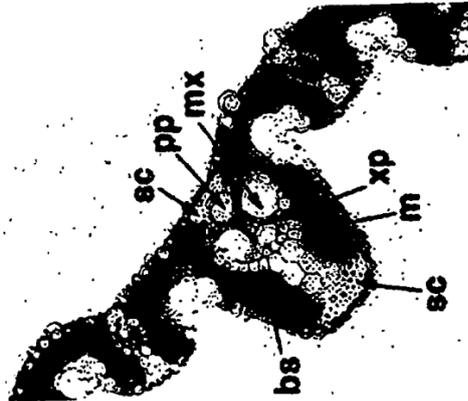
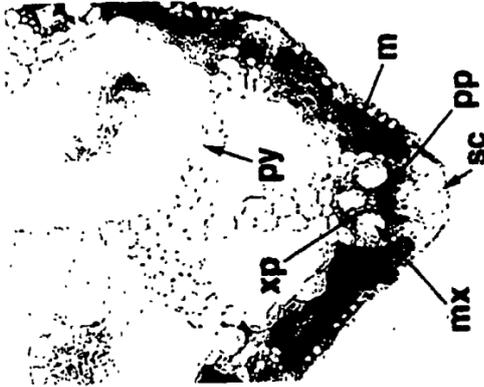
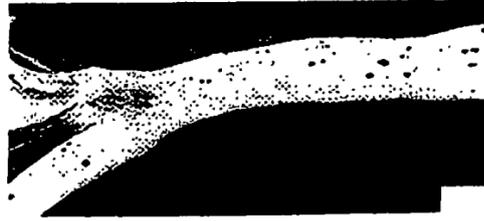


FIG. 6G FIG. 6H FIG. 6I FIG. 6J

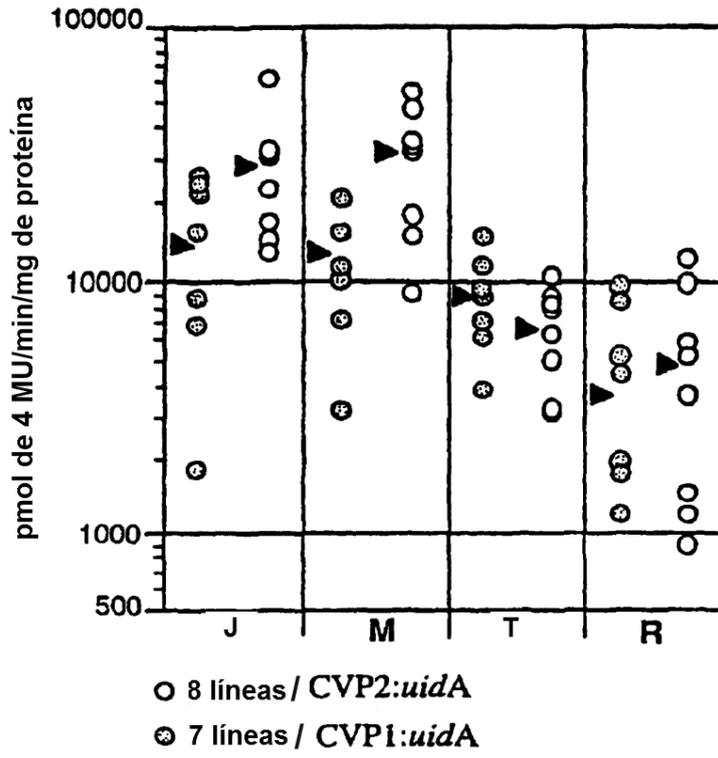


FIG. 7A

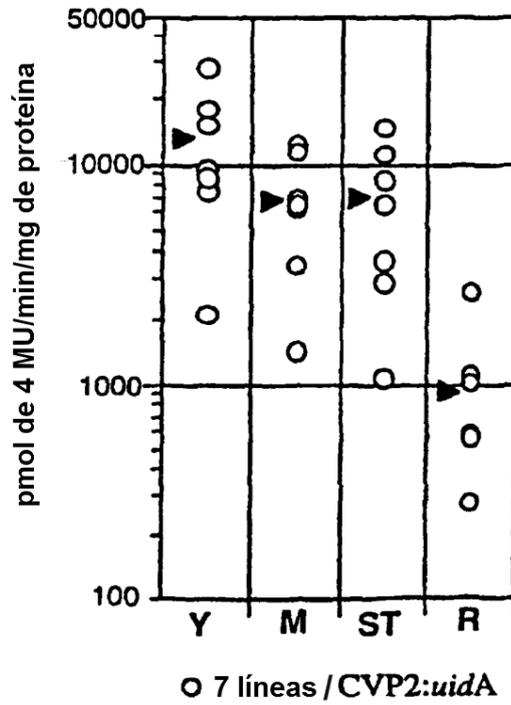


FIG. 7B

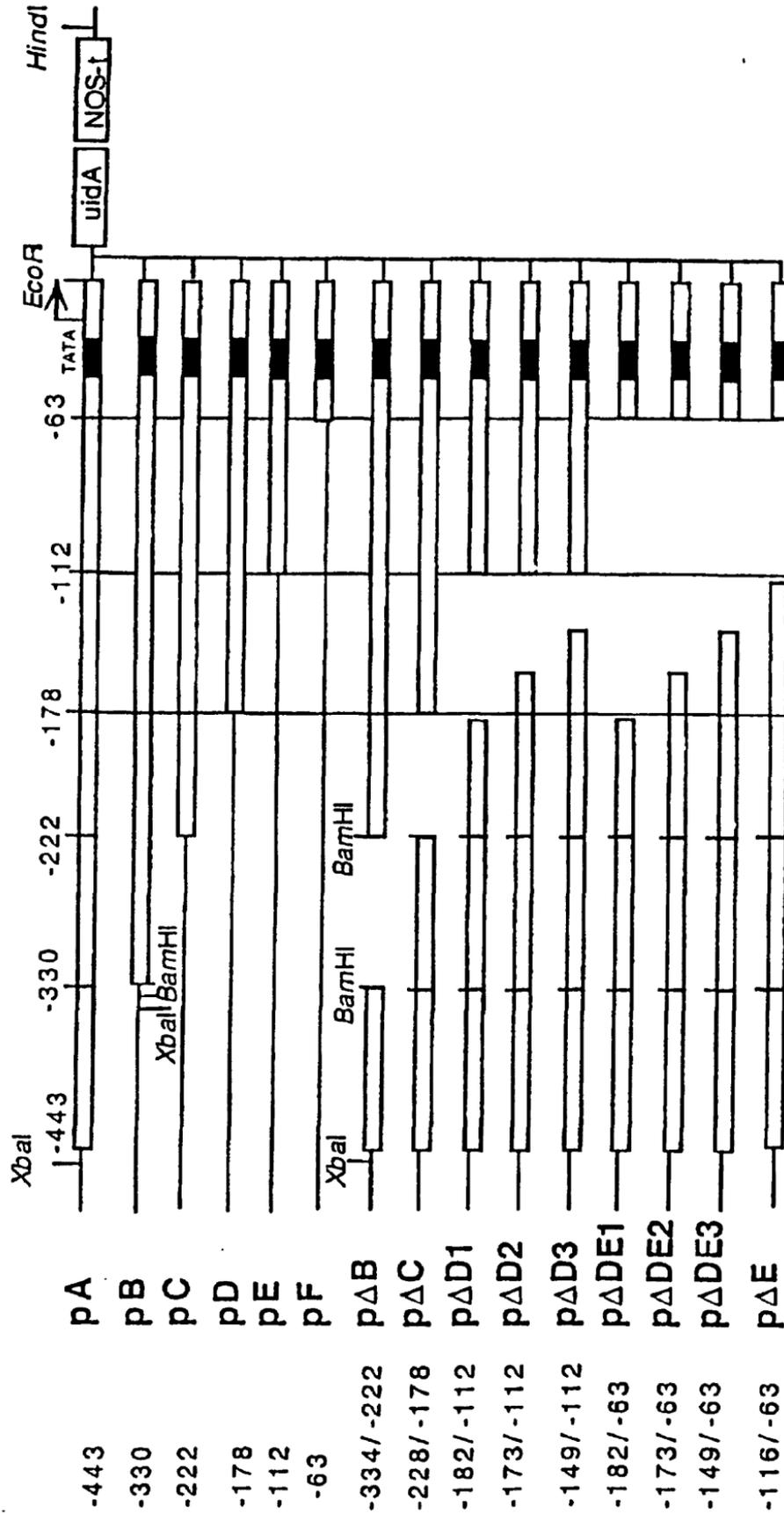
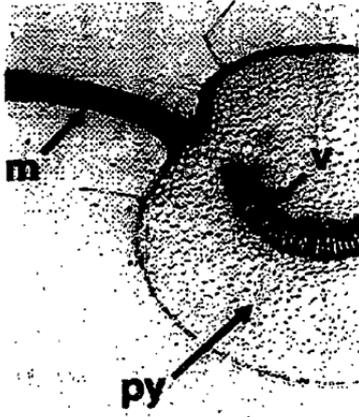


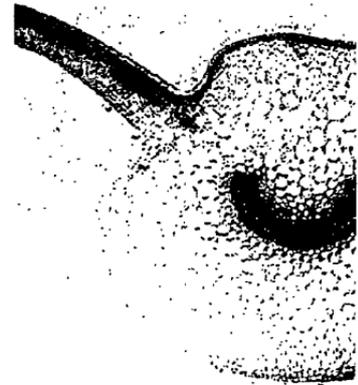
FIG. 8



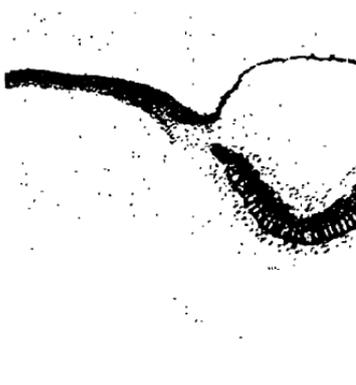
**FIG. 9A**



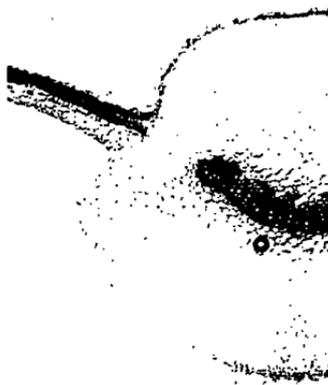
**FIG. 9B**



**FIG. 9C**



**FIG. 9D**



**FIG. 9E**



**FIG. 9F**



**FIG. 9G**



**FIG. 9H**



**FIG. 9I**

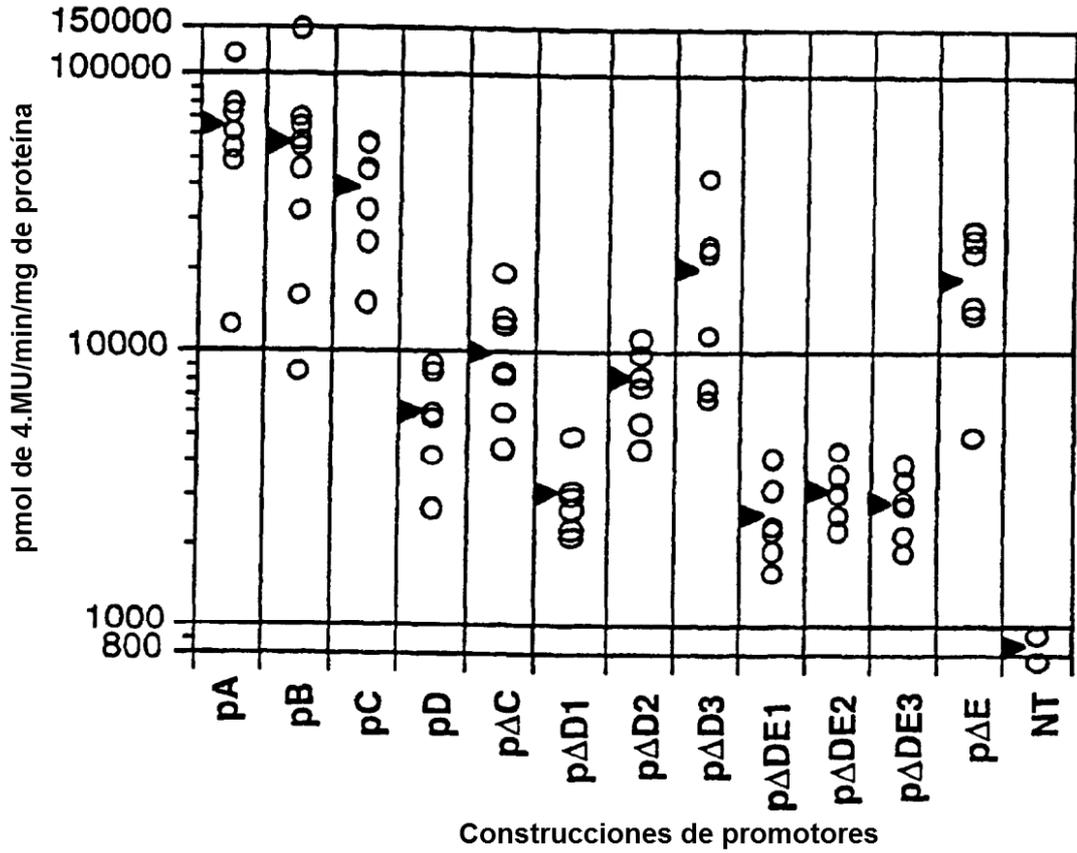


FIG. 10

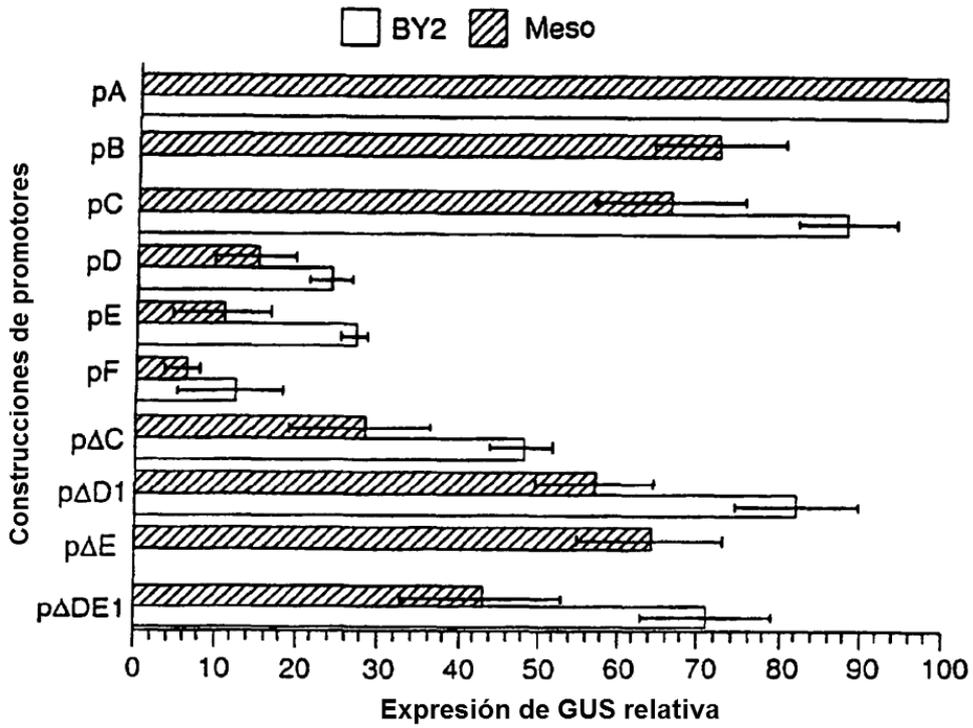


FIG. 11

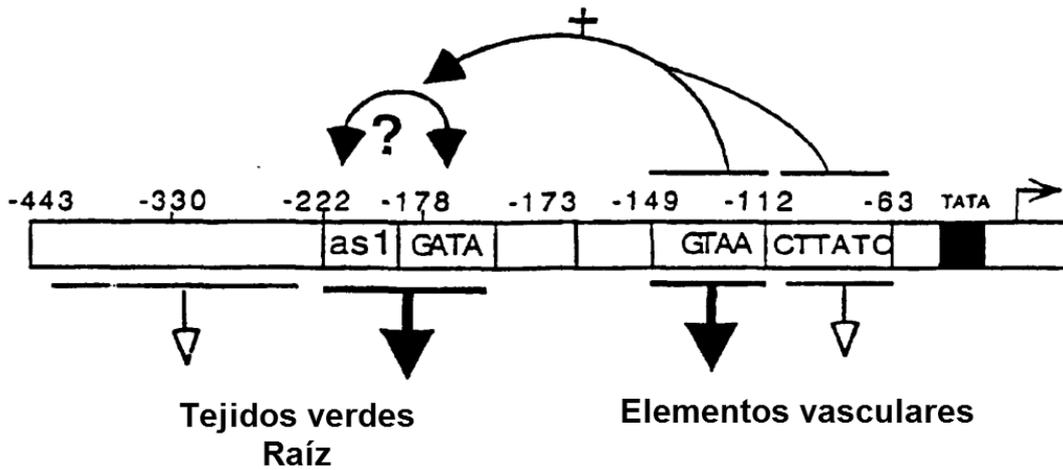


FIG. 12