

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 603**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.1998 E 08155814 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 1967589**

54 Título: **Región reguladora 5' de oleosina para la modificación de la composición de lípidos de una semilla de una planta**

30 Prioridad:

09.04.1997 US 831575

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

20.03.2013

73 Titular/es:

**BAYER S.A.S. (100.0%)
16 rue Jean-Marie Leclair
69009 Lyon , FR**

72 Inventor/es:

**LI, ZHONGSEN y
THOMAS, TERRY**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 398 603 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

Región reguladora 5' de oleosina para la modificación de la composición de lípidos de una semilla de una planta

Antecedentes de la invención

5 El contenido en aceite de semillas se ha modificado tradicionalmente mediante el cultivo de la planta. El uso de tecnología de ADN recombinante para modificar la composición de aceite en semillas puede acelerar este proceso y en algunos casos modificar los aceites de las semillas de un modo que no puede realizarse mediante solo el cultivo. La composición en aceite de *Brassica* se ha alterado significativamente modificando la expresión de un número de genes del metabolismo de lípidos. Dichas manipulaciones de la composición del aceite de semillas se han enfocado en alterar la proporción del componente endógeno de ácidos grasos. Por ejemplo, la represión antisentido del gen $\Delta 12$ -desaturasa en semillas transgénicas de colza ha dado como resultado un aumento de ácido oleico de hasta el 83 %. Topfer y col. 1995 Science 268:681-686.

15 Ha habido algunos intentos exitosos de modificación de la composición de aceite en semillas de plantas transgénicas mediante la introducción de genes nuevos que permiten la producción de un ácido graso que las plantas huéspedes no eran capaces de sintetizar previamente. Van de Loo y col. (1995 Proc. Natl. Acad. Sci USA 92:6743-6747) han sido capaces de introducir un gen $\Delta 12$ -hidroxilasa en tabaco transgénico, dando como resultando la introducción de un ácido graso novedoso, ácido ricinoleico, en el aceite de sus semillas. La acumulación de la que se ha informado era modesta en plantas que portan constructos en los que la transcripción del gen hidroxilasa esta bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). De forma similar, las plantas de tabaco se han manipulado para que produzcan niveles bajos de ácido petroselinico mediante expresión de una acil-ACP desaturasa de cilantro (Cahoon y col. 1992 Proc. Natl. Acad. Sci USA 89:11184-11188),

20 Los ácidos grasos de cadena larga (C18 y más grandes) tienen un valor económico significativo como alimentos de importancia nutricional y médica y como materias primas industriales (Ohlrogge.J.B. 1994 Plant Physiol. 104:821-826). El ácido linoleico (18:2 $\Delta 9$, 12) y α -linoleico (18:3 $\Delta 9$, 12, 15) son ácidos grasos esenciales que se encuentran en muchos aceites de semillas. Los niveles de estos ácidos grasos se han manipulado en cultivos de semillas para aceite mediante reproducción y biotecnología (Ohlrogge y col. 1991 Biochim. Biophys. Acta 1082:1-26; Topfer y col. 1995 Science 268:681-686. Adicionalmente, la producción de ácidos grasos novedosos en aceites de semillas puede tener un uso considerable en la salud de seres humanos y en aplicaciones industriales.

30 Se cree que el consumo de aceites vegetales ricos en ácido γ -linolénico (GLA) (18:3 $\Delta 6$, 9, 12) alivia la hipercolesterolemia y otros trastornos clínicos relacionados que se correlacionan con la susceptibilidad a una enfermedad cardíaca coronaria (Brenner R.R. 1976 Adv. Exp. Med. Biol. 83:85-101). Los beneficios terapéuticos de GLA dietético pueden ser resultado de su papel como precursor en la síntesis de prostaglandinas (Weete, J.D. 1980, en Lipid Biochemistry of Fungi and Other Organisms, eds. Plenum Press, Nueva York, páginas 59-62). El ácido linoleico (18:2) (LA) se transforma en ácido gamma-linolénico (18.3) (GLA) por medio de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa.

35 Pocos aceites de semillas contienen GLA aunque tengan altos contenidos del precursor ácido linoleico. Esto es debido a la ausencia de actividad de $\Delta 6$ -desaturasa en la mayor parte de las plantas. Por ejemplo, solo borraja (*Borago officinalis*), onagra (*Oenothera biennis*) y las grosellas (*Ribes nigrum*) producen cantidades apreciables de ácido linolénico. De estas tres especies solo *Oenothera* y borraja se cultivan como fuente comercial de GLA. Sería beneficioso si los aceites de semillas agronómicas pudieran manipularse para producir GLA en cantidades significativas introduciendo un gen heterólogo de $\Delta 6$ -desaturasa. También sería beneficioso si otros productos de expresión asociados con la síntesis de ácidos grasos y el metabolismo de lípidos pudieran producirse en plantas a niveles suficientemente altos para que sea factible la producción comercial de un producto de expresión particular.

45 Tal como se divulga en el documento de patente de Estados Unidos N° 5.552.306, recientemente se ha aislado un gen de $\Delta 6$ -desaturasa cianobacteriano. La expresión de este gen cianobacteriano en tabaco transgénico dio como resultado una acumulación significativa pero a un nivel bajo de GLA. (Reddy y col. 1996 Nature Biotech. 14:639-642). La solicitud de patente de Estados Unidos 2004/0078845 en trámite del solicitante divulga un gen de $\Delta 6$ -desaturasa aislado a partir de una planta de *Borago officinalis* y su expresión en tabaco bajo el control del promotor 35S del CaMV. Dicha expresión dio como resultado un nivel significativo pero bajo de GLA y la acumulación de ácido octadecatetraenoico (ODTA o OTA) en semillas. Por lo tanto, existe la necesidad de un promotor que funcione en plantas y que dirija de forma consecuyente la expresión de alto nivel de genes del metabolismo de lípidos en semillas de plantas transgénicas.

55 Las oleosinas son proteínas de semillas abundantes asociadas con la membrana monocapa de fosfolípidos de cuerpos oleosos. El primer gen de oleosina, L3, se clonó a partir de maíz seleccionando clones cuyos productos traducidos *in vitro* se reconocieron usando un anticuerpo anti-L3 (Vance y col. 1987 J. Biol. Chem. 262:11275-11279). Subsiguientemente, se clonaron isoformas diferentes de genes de oleosina a partir de especies diferentes de *Brassica*, soja, zanahoria, pino y *Arabidopsis* (Huang, A.H.C., 1992, Ann. Reviews Plant Phys. and Plant Mol. Biol. 43:177-200; Kirik y col., 1996 Plant Mol. Biol. 31:413-417; Van Rooijen y col., 1992 Plant Mol. Biol. 18:1177-1179; Zou y col., Plant Mol. Biol. 31:429-433, Plant y col., Plant Mol. Biol. 25:193-205. Las secuencias de proteína de oleosina previstas a partir de estos genes están muy conservadas, especialmente por el dominio hidrófobo central.

Todas estas oleosinas tienen el rasgo caracterizador de tres dominios diferentes. Un dominio anfipático de 40-60 aminoácidos está presente en el extremo N-terminal; un dominio totalmente hidrófobo de 68-74 aminoácidos está ubicado en el centro; y un dominio anfipático de hélice α de 33-40 aminoácidos está situado en el extremo C-terminal (Huang A.H.C. 1992).

- 5 La presente invención proporciona secuencias reguladoras 5' a partir de genes de oleosina que dirigen la expresión a alto nivel de genes del metabolismo de lípidos en plantas transgénicas. Según la invención, se proporcionan constructos quiméricos que comprenden una región reguladora 5' de oleosina unida operativamente a una secuencia codificante de un gen del metabolismo de lípidos tal como un gen de $\Delta 12$ -desaturasa o de $\Delta 15$ -desaturasa. Las plantas transgénicas que comprenden los constructos quiméricos objeto producen niveles de GLA que se acercan al nivel encontrado en las pocas especies de plantas que producen de forma natural GLA tal como la onagra (*Oenothera biennis*).

Sumario de la invención

- 15 La presente invención se refiere a una región reguladora 5' de un gen de oleosina de *Arabidopsis*. La región reguladora 5', cuando está unida operativamente a bien la secuencia codificante de un gen heterólogo o bien la secuencia complementaria de un gen vegetal nativo, dirige la expresión del gen heterólogo o secuencia complementaria en una semilla vegetal.

La presente invención proporciona, por lo tanto, casetes de expresión y vectores de expresión que comprenden una región reguladora 5' de oleosina unida operativamente a un gen heterólogo o una secuencia complementaria a un gen vegetal nativo.

- 20 Se proporcionan también vectores de transformación vegetales que comprenden los casetes de expresión y vectores de expresión, así como células vegetales transformadas por estos vectores, y plantas y su progenie que contienen los vectores.

En una realización de la invención, el gen heterólogo o la secuencia génica complementaria es un gen de la síntesis de ácidos grasos o un gen del metabolismo de lípidos.

- 25 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para producir una planta con niveles aumentados de un producto de un gen de la síntesis de ácidos grasos o del metabolismo de lípidos.

- 30 En particular, se proporciona un procedimiento para producir una planta con niveles aumentados de un gen de la síntesis de ácidos grasos o del metabolismo de lípidos transformando una planta con los casetes de expresión y los vectores de expresión objeto que comprenden una región reguladora 5' de oleosina y una secuencia codificante de un gen de la síntesis de ácidos grasos o del metabolismo de lípidos.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para cosuprimir un gen de la síntesis de ácidos grasos o del metabolismo de lípidos transformando una planta con los casetes de expresión y los vectores de expresión objeto que comprenden una región reguladora 5' de oleosina y una secuencia codificante de un gen de la síntesis de ácidos grasos o del metabolismo de lípidos.

- 35 Otro aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento de producción reducida de un gen vegetal nativo tal como un gen de la síntesis de ácidos grasos o un gen del metabolismo de lípidos transformando una planta con un vector de expresión que comprende una región reguladora 5' de oleosina unida operativamente a una secuencia de ácidos nucleicos complementaria de un gen vegetal nativo.

- 40 También se proporcionan procedimientos de modulación de los niveles de un gen heterólogo tal como un gen de la síntesis de ácidos grasos o del metabolismo de lípidos transformando una planta con los casetes de expresión y vectores de expresión objeto.

Breve descripción de las figuras

- 45 Fig. 1: representa la secuencia de nucleótidos y aminoácidos correspondiente del gen de $\Delta 6$ -desaturasa de borraja (SEC ID N°:1). El motivo unido a hemo b5 de citocromo está en un recuadro y los motivos ricos en histidina, de unión a metal, putativos (HRM) están subrayados. Los motivos reconocidos por los cebadores (análisis PCR) están subrayados con líneas discontinuas, es decir. tgg aaa tgg aac cat aa; y gag cat cat ttg ttt cc.

- 50 Fig. 2: es un dendrograma que muestra la similitud de la $\Delta 6$ -desaturasa de borraja con otras desaturasas unidas a membrana. La secuencia de aminoácidos de la $\Delta 6$ -desaturasa de borraja se comparó con otras desaturasas conocidas usando Gene Works (IntelliGenetics). Los valores numéricos se correlacionan con distancias filogenéticas relativas entre subgrupos comparados.

Fig. 3A: proporciona un perfil cromatográfico gas-líquido de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) derivados de tejido de hoja de un tipo silvestre de tabaco 'Xanthi'.

Fig. 3B: proporciona un perfil cromatográfico gas-líquido de las FAME derivadas de tejido de hoja de una planta de

tabaco transformada con el ADNc de $\Delta 6$ -desaturasa de borraja con el control transcripcional del promotor 35S del CaMV (pAN2). Se indican los picos correspondientes a linoleato de metilo (18:2), γ -linolenato de metilo (18:3 γ), α -linolenato de metilo (18:3 α) y octadecatetraenoato de metilo (18:4).

5 Fig. 4: es la secuencia de nucleótidos y corresponde a la secuencia de aminoácidos del ADNc de oleosina de AtS21 (SEC ID N°: 3).

Fig. 5: es un mapa ácido-base de la proteína AtS21 predicha generada por DNA Strider 1.2.

Fig. 6: es una representación Kyte-Doolittle de la proteína AtS21 predicha generada por DNA Strider 1.2.

10 Fig. 7: es una secuencia de alineamiento de oleosinas aisladas a partir de *Arabidopsis*. Las secuencias de oleosinas publicadas o depositadas en las bases de datos EMBL, BCM, NCBI se alinearon a cada una de las otras usando GeneWorks® 2.3. Los resultados idénticos están encuadrados con rectángulos. Las siete secuencias se dividen en tres grupos. El primer grupo incluye AtS21 (SEC ID N°:5), X91918 (SEC ID N°:6) y Z29859 (SEC ID N°:7). El segundo grupo incluye X62352 (SEC ID N°:8) y Ato13 (SEC ID N°:9). El tercer grupo incluye X91956 (SEC ID N°:10) y L40954 (SEC ID N°:11). Las diferencias en residuos de aminoácidos dentro del mismo grupo están indicadas con sombreado. Ato2/Z54164 es idéntica a AtS21. La secuencia de Ato13 (N° de acceso Z541654 en la base de datos EMBL) no se divulga realmente en la base de datos EMBL. El número de acceso Z54165 designa la misma secuencia que Z54164 que es Ato12.

Fig. 8A: es un análisis Northern del gen AtS21. Una mancha en gel de ARN que contiene diez microgramos de ARN total extraído de flores (F), hojas (L) raíces (R), semillas en desarrollo (Se) y recubrimientos de silicua en desarrollo (Si) se hibridó con una sonda fabricada a partir de ADNc de AtS21 de longitud completa.

20 Fig. 8B: es un análisis Southern del gen AtS21. Una mancha en gel de ADN que contenía diez microgramos de ADN genómico digerida con BamHI (B), EcoRI (E), HindIII (H), SacI (S) y XbaI (X) se hibridó con una sonda fabricada a partir de ADNc de AtS21 de longitud completa.

25 Fig. 9: es la secuencia de nucleótidos del fragmento SacI de ADN genómico de AtS21. (SEC ID N°: 12) Las secuencias del promotor y del intrón están en mayúsculas. Los fragmentos correspondientes a la secuencia de ADNc de AtS21 están en minúscula. El primer codón ATG y una caja TATA putativa están sombreados. La secuencia complementaria al cebador 21P para la amplificación PCR está en un recuadro. Un elemento de respuesta a ácido abscísico (ABRE) putativo y dos repeticiones de 14 pb están subrayados.

Fig. 10: es un mapa del constructo promotor AtS21/GUS (pAN5).

Fig. 11A: representa la expresión del gen AtS21/GUS en flores prematuras y hojas de *Arabidopsis*.

30 Fig. 11B: representa la expresión del gen AtS21/GUS en silicuas de *Arabidopsis*.

Fig. 11C: representa la expresión del gen AtS21/GUS en semillas de *Arabidopsis* en desarrollo.

Las figuras 11D a 11J representan la expresión del gen AtS21/GUS en embriones en desarrollo de *Arabidopsis*.

Fig. 11K: representma la expresión del gen AtS21/GUS en raíz y pelos de la raíz de un plantón joven de *Arabidopsis*.

35 Fig. 11L: representa la expresión del gen AtS21/GUS en cotiledones de *Arabidopsis* y en el ápice del brote de un plantón de cinco días.

Las figuras 11M y 11N representan la expresión del gen AtS21/GUS en cotiledones y ápice del brote de plantones de 5-15 días de *Arabidopsis*.

Fig. 12A: representa la expresión del gen de AtS21/GUS en embriones y endosperma de tabaco.

Fig. 12B: representa la expresión del gen de AtS21/GUS en semilla de tabaco en germinación.

40 Fig. 12C representa la expresión del gen de AtS21/GUS en un plantón de tabaco de 5 días de edad.

Fig. 12D representa la expresión del gen de AtS21/GUS en plantones de tabaco de 5-15 días de edad.

45 Fig. 13A: es un análisis Northern que muestra niveles de ARN de AtS21 en plantones de *Arabidopsis* de tipo silvestre en desarrollo, el carril 1 se cargó con ARN de semillas en desarrollo, el carril 2 se cargó con ARN de semillas embebidas durante 24-48 horas, el carril 3: plantones de 3 días; el carril 4: plantones de 4 días; el carril 5: plantones de 5 días; el carril 6: plantones de 6 días; el carril 7: plantones de 9 días; el carril 8: plantones de 12 días. La muestra se etiquetó como ADNc de AtS21. La exposición fue durante una hora a -80 °C.

Fig. 13B: es la misma transparencia que en la Fig. 13A con una exposición de solo 24 horas a -80 °C.

Fig. 13C: es la misma transparencia representada en las Figs. 13A y 13B después de la separación y la hibridación

con una sonda de gen de tubulina de *Arabidopsis*. La banda pequeña en cada uno de los carriles 1 y 2 es el remanente de la sonda AtS21 anterior. La exposición fue durante 48 horas a -80 °C.

Fig. 14: es un gráfico que compara actividades de GUS expresadas por los promotores AtS21 y 35S. Las actividades de GUS expresadas por el promotor AtS21 en semillas de *Arabidopsis* en desarrollo y hojas se representaron por pares con las expresadas por el promotor 35S. Las actividades de GUS expresadas por el promotor AtS21 en semillas secas y hojas de tabaco se representan en el lado derecho de la figura. La actividad de GUS en hoja de tabaco es tan baja que no aparece en la columna. «G-H» denota estadio globular a corazón; «H-T» denota estadio de corazón a torpedo; «T-C» denota estadio de torpedo a cotiledón; «C temprano» denota cotiledón temprano; «C tardío» denota cotiledón tardío. Las desviaciones típicas se enumeran en la tabla 2.

Fig. 15A: es un análisis de inmunotransferencia en gel de ARN llevado a cabo en muestras de 5 µg de ARN aislado a partir de tejido de hoja, raíz y embrión de 12 dpp de borraja, usando ADNc de Δ6-desaturasa de borraja etiquetado como sonda de hibridación.

Fig. 15B: representa un gráfico correspondiente a resultados del análisis Northern del experimento mostrado en la fig. 15A.

Fig. 16A: es un gráfico que muestra la acumulación de ARN de legumina relativa en embriones de borraja en desarrollo basado en resultados de inmunotransferencia Northern.

Fig. 16B: es un gráfico que muestra la acumulación de ARN de oleosina relativa en embriones de borraja en desarrollo basado en resultados de inmunotransferencia Northern.

Fig. 16C: es un gráfico que muestra la acumulación de ARN de Δ6-desaturasa relativa en embriones de borraja en desarrollo basado en resultados de inmunotransferencia Northern.

Fig. 17: es un análisis PCR que muestra la presencia del gen de delta 6-desaturasa de borraja en plantas transformadas de colza para aceite. Los carriles 1, 3 y 4 se cargaron con reacciones PCR realizadas con ADN de plantas transformadas con el gen de delta 6-desaturasa unido a la región reguladora 5' de oleosina; carril 2: ADN de planta transformada con el gen de delta 6-desaturasa de borraja unido a la región reguladora 5' de albúmina; los carriles 5 y 6: ADN de plantas no transformadas; el carril 7: marcador de peso molecular (1 kb de escalera, Gibco BRL); el carril 8: PCR sin plantilla de ADN añadida; el carril 9: control con ADN de *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 que contiene el plásmido pAN3 (es decir, el gen de delta 6-desaturasa de borraja unido a la región reguladora 5' de oleosina).

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una región reguladora 5' a partir de un gen de oleosina de *Arabidopsis*. Según la presente invención, la región reguladora 5' objeto, cuando está unida operativamente a bien la secuencia codificante de un gen heterólogo o una secuencia complementaria a un gen vegetal nativo, dirige la expresión de la secuencia codificante o la secuencia complementaria en una semilla vegetal. La región reguladora 5' de oleosina de la presente invención es útil en la construcción de un casete de expresión que comprende, en la dirección 5' a 3', una región reguladora 5' de oleosina objeto, un gen heterólogo o secuencia complementaria a un gen vegetal nativo bajo el control de la región reguladora y una secuencia de terminación 3'. Dicho casete de expresión puede incorporarse a una diversidad de vectores de replicación autónoma con el fin de construir un vector de expresión.

Se ha encontrado, sorprendentemente, que las plantas transformadas con los vectores de expresión de la presente invención producen niveles de GLA que se acercan al nivel encontrado en las pocas especies de plantas que producen de forma natural GLA, tales como la onagra (*Oenothera biennis*).

Tal como se usa en el presente documento, el término "casete" se refiere a una secuencia de nucleótidos capaces de expresar un gen particular si dicho gen se inserta de modo que se una operativamente a una o varias regiones reguladoras presentes en la secuencia de nucleótidos. De este modo, por ejemplo, el casete de expresión puede comprender una secuencia de codificación heteróloga que se desea que se exprese en una semilla de una planta. Los casetes de expresión y vectores de expresión de la presente invención, por lo tanto, son útiles para dirigir la expresión específica de semillas de cualquier cantidad de genes heterólogos. La expresión "expresiones específicas de semillas" tal como se usa en el presente documento, se refiere a la expresión en varias porciones de una semilla de una planta tal como el endosperma y el embrión.

Un ácido nucleico aislado que codifica una región reguladora 5' de un gen de oleosina puede proporcionarse tal como sigue. Se aíslan clones genómicos recombinantes de oleosina cribando una biblioteca de ADN genómico vegetal con un ADNc (o una porción del mismo) que representa el ARNm de oleosina. Se ha aislado una serie de ADNc de oleosina diferentes. Los procedimientos usados para aislar dichos ADN, así como las secuencias de nucleótidos y aminoácidos correspondientes se han publicado por Kirik y col. 1986 Plant Mol. Biol. 31:413-417; Zou y col. Plant Mol. Biol. 31:429-433; Van Rooijen y col. 1992 Plant Mol. Biol. 18: 1177-1179.

El cribado de sustracción virtual de una biblioteca específica de tejido usando una sonda de ADNc de cadena de polimerasa cebada (RP-PCR) aleatoria es otro procedimiento de obtención de un ADNc de oleosina útil para cribado de una biblioteca de ADN genómico vegetal. El cribado de sustracción virtual se refiere a un procedimiento en el que se construye una biblioteca de ADNc a partir de tejido diana y se representa en una densidad baja de modo que los clones individuales de ADNc se puedan separar fácilmente. Estos clones de ADNc se criban de forma sustractiva con cantidades de conductor (es decir, concentraciones de ADN para conducir cinéticamente la reacción de hibridación) de sondas de ADNc fabricadas a partir de tejidos o tejidos diferentes al tejido diana (es decir, tejido conductor). Las placas hibridadas representan genes que se expresan en la diana y en los tejidos conductores; las placas no hibridadas representan genes que pueden ser específicos de tejido diana o genes poco abundantes que no pueden detectarse mediante la sonda de ADNc conductora. Los ADNc no hibridados se seleccionan como genes específicos de tejido diana y se analizan posteriormente mediante secuenciación de una pasada e hibridación Northern.

La PCR cebada aleatoriamente (RP-PCR) está implicada en la síntesis de cantidades grandes de sondas de ADNc a partir de una cantidad traza de plantilla de ADNc. El procedimiento combina el poder de amplificación de la PCR con la representación de cebado aleatorio para amplificar y etiquetar simultáneamente ADNc bicatenario en una reacción en un único tubo.

Se proporcionan procedimientos considerados útiles en la obtención de ADN recombinante genómico de oleosina por Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY, por ejemplo, o cualquiera de la miríada de manuales de laboratorio de tecnología de ADN recombinante que están ampliamente disponibles. Para determinar secuencias de nucleótidos, están disponibles multitud de técnicas que son conocidas por el experto. Por ejemplo, pueden subclonarse fragmentos de restricción que contienen una región reguladora de oleosina en un sitio de unión múltiple de un vector de secuenciación tal como pBluescript (Stratagene). Estos subclones de pBluescript pueden secuenciarse después mediante un procedimiento didesoxi de doble cadena (Chen y Seeburg, 1985, DNA 4:165).

En una realización preferente, la región reguladora de oleosina comprende los nucleótidos 1-1267 de la Fig. 9 (SEC ID N°: 12). Se proporcionan modificaciones a la región reguladora de oleosina tal como se representa en SEC ID N°:12 que mantienen la propiedad característica de dirigir la expresión específica de semillas. Dichas modificaciones incluyen inserciones, deleciones y sustituciones de uno o varios nucleótidos.

La región reguladora 5' de la presente invención puede derivarse a partir de la digestión de endonucleasas o exonucleasas de restricción de un clon genómico de oleosina. De este modo, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos o aminoácidos conocida de la región codificante de un gen de oleosina aislado (por ejemplo, la Fig. 7) está alineada a la secuencia de ácidos nucleico o aminoácidos deducidos de un clon genómico de oleosina aislado y la secuencia flanqueante 5' (es decir, la secuencia cadena arriba del codón inicial traduccional de la región codificante) del clon genómico de oleosina aislado localizado.

La región reguladora 5', tal como se representa en la SEC ID N°:12 (nucleótidos 1-1267 de la Fig. 9), puede generarse a partir de un clon genómico que tenga una secuencia flanqueante 5' o secuencia codificante, o ambas, en exceso mediante la deleción mediada por exonucleasa III. Esto se realiza mediante la digestión de ADN preparado apropiadamente con exonucleasa III (exoIII) y eliminando partes alícuotas a intervalos de tiempo crecientes durante la digestión. Los fragmentos sucesivamente más pequeños resultantes de ADN pueden secuenciarse para determinar el punto final exacto de las deleciones. Existen varios sistemas disponibles comercialmente que usan exonucleasa III (exoIII) para crear dicha serie de deleciones, por ejemplo Promega Biotech, sistema "Erase-A-Base". Alternativamente, los cebadores PCR pueden definirse para permitir la amplificación directa de las regiones reguladoras 5' objeto.

Usando las mismas metodologías, el experto puede generar uno o varios fragmentos de deleción de nucleótidos 1-1267 tal como se expone en la SEC ID N°:12.

La identificación de secuencias reguladoras 5' que dirigen la expresión específica de semillax que comprenden los nucleótidos 1-1267 de la SEC ID N°:12 y modificaciones o fragmentos de deleción de las mismas, puede realizarse mediante fusiones transcripcionales de secuencias específicas con las secuencias codificantes de un gen heterólogo, transferencia del gen quimérico en un huésped apropiado y detección de la expresión del gen heterólogo. El ensayo usado para detectar la expresión depende de la naturaleza de la secuencia heteróloga. Por ejemplo, genes comunicadores, ejemplificados por cloranfenicol acetil transferasa y β -glucuronidasa (GUS), se usan comúnmente para evaluar la competencia transcripcional y traduccional de construcciones quiméricas. Hay disponibles ensayos estándar para detectar sensiblemente la enzima comunicadora en un organismo transgénico. El gen de β -glucuronidasa (GUS) es útil como comunicador de la actividad promotora en plantas transgénicas debido a la alta estabilidad de la enzima en células vegetales, la falta de actividad de β -glucuronidasa intrínseca en plantas superiores y disponibilidad de un ensayo fluorométrico cuantitativo y una técnica de localización histoquímica. Jefferson y col. (1987 EMBO J 6:3901) han establecido procedimientos estándar para la detección bioquímica e histoquímica de la actividad de GUS en tejidos vegetales. Se realizan ensayos bioquímicos mezclando lisados de tejidos vegetales con 4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido, un sustrato fluorométrico de GUS, incubando una hora a 37 °C y midiendo después la fluorescencia de la 4-metil-umbeliferona resultante. La localización histoquímica para la

actividad de GUS se determina incubando muestras de tejidos vegetales en 5-bromo-4-cloro-3-indolil-glucuronido (X-Gluc) durante aproximadamente 18 horas a 37 °C y observando el patrón de tinción de X-Gluc. La construcción de dichos genes quiméricos permite la definición de secuencias reguladoras específicas y demuestra que estas secuencias pueden dirigir la expresión de genes heterólogos de un modo específico de semillas.

5 Otro aspecto de la invención se refiere a casetes de expresión y vectores de expresión (también denominados en el presente documento «genes quiméricos») que comprenden una región reguladora 5' de un gen de oleosina que dirige la expresión específica de semillas unida operativamente a la secuencia codificante de un gen heterólogo de modo que el elemento regulador sea capaz de controlar la expresión del producto codificado por el gen heterólogo. El gen heterólogo puede ser cualquier gen diferente a la oleosina. Si es necesario, en los constructos quiméricos se incluyen elementos reguladores adicionales o partes de estos elementos suficientes para causar la expresión que da como resultado la producción de una cantidad eficaz del polipéptido codificado por el gen heterólogo.

10 En consecuencia, la presente invención proporciona genes quiméricos que comprenden una secuencia de la región reguladora 5' de oleosina, que confiere la expresión específica de semillas que está unida operativamente a una secuencia que codifica un gen heterólogo tal como una enzima del metabolismo de lípidos. Los ejemplos de genes del metabolismo de lípidos útiles para poner en práctica la presente invención incluyen lípido desaturasas tales como $\Delta 6$ -desaturasas, $\Delta 12$ -desaturasas, $\Delta 15$ -desaturasas y otras desaturasas relacionadas tales como esteroil-ACP desaturasas, proteínas transportadoras de acilos (ACP), tioesterasas, acetil transacilasas, acetil-coA carboxilasas, cetoacil-sintasas, malonil transacilasas y elongasas. Dichos genes del metabolismo de lípidos se han aislado y caracterizado a partir de una serie de bacterias y especies de plantas diferentes. Sus secuencias codificantes de nucleótidos así como procedimientos de aislamiento de dichas secuencias codificantes se divulgan en la literatura publicada y están ampliamente disponibles para los expertos en la técnica.

En particular, los genes de $\Delta 6$ -desaturasa divulgados en el documento de patente de Estados Unidos N° 5.552.306 y la solicitud de Estados Unidos 2004/0078845 en trámite de los solicitantes se contemplan como genes del metabolismo de lípidos particularmente útiles en la puesta en práctica de la presente invención.

25 Los genes quiméricos de la presente invención se construyen ligando una región reguladora 5' de un ADN genómico de oleosina a la secuencia codificante de un gen heterólogo. La yuxtaposición de estas secuencias puede realizarse de varios modos. En una realización preferente el orden de las secuencias, de 5' e 3', es una región reguladora 5' de oleosina (incluido un promotor), una secuencia codificante y una secuencia de terminación que incluye un sitio de poliadenilación.

30 Las técnicas estándar para la construcción de dichos genes quiméricos son bien conocidos por los expertos en la técnica y pueden encontrarse en referencias tales como por Sambrook y col. (1989). Están disponibles una variedad de estrategias para ligar fragmentos de ADN, la elección de los cuales depende de la naturaleza de los extremos de los fragmentos de ADN. Un experto en la técnica reconoce que con el fin de expresar el gen heterólogo, la construcción requiere elementos promotores y señales para la poliadenilación eficaz del transcrito. En consecuencia, la región reguladora 5' de oleosina que contiene la secuencia promotora consenso conocida como la caja TATA puede ligarse directamente a una secuencia codificante heteróloga sin promotor.

35 Los fragmentos de restricción o delección que contiene la caja TATA de oleosina se ligan en una orientación en sentido correcto a un gen heterólogo sin promotor tal como la secuencia codificante de β -glucuronidasa (GUS). El experto reconocerá que las regiones reguladoras 5' de oleosina objeto puede proporcionarse mediante otros medios, por ejemplo síntesis química o enzimática. El extremo 3' de una secuencia codificadora heteróloga se liga óptimamente a una secuencia de terminación que comprende un sitio de poliadenilación, ejemplificado por, pero no limitado a, el sitio de poliadenilación de nopalina sintasa o el sitio de poliadenilación del gen 7 de ADN-T de octopina. Alternativamente, puede proporcionarse el sitio de poliadenilación mediante un gen heterólogo.

45 La presente invención también proporciona procedimientos de aumento de niveles de genes heterólogos en semillas vegetales. Según dichos procedimientos, los casetes de expresión y vectores de expresión objeto se introducen en una planta con el fin de efectuar la expresión de un gen heterólogo. Por ejemplo, se proporciona un procedimiento de producción de una planta con niveles aumentados de un producto de un gen de la síntesis de aminoácidos o del metabolismo de lípidos transformando una célula vegetal con un vector de expresión que comprende una región reguladora 5' de oleosina unida operativamente a un gen de la síntesis de ácidos grasos o del metabolismo de lípidos y regenerando una planta con niveles aumentados del producto de dicho gen de la síntesis de ácidos grasos o del metabolismo de lípidos.

Otro aspecto de la presente invención proporciona procedimientos para reducir niveles de un producto de un gen que es nativo con respecto a una planta que comprende transformar una célula vegetal con un vector de expresión que comprende una región reguladora de oleosina objeto unida operativamente a una secuencia de ácidos nucleicos que es complementaria a un gen vegetal nativo. De este modo, se reducen niveles de producto endógeno del gen vegetal nativo mediante el mecanismo conocido como regulación antisentido. De este modo, por ejemplo, se reducen niveles de un producto de un gen de la síntesis de ácidos grasos o un gen del metabolismo de lípidos transformando una planta con un vector de expresión que comprende una región reguladora 5' de oleosina objeto unida operativamente a una secuencia de ácidos nucleicos que es complementaria a una secuencia de ácidos

nucleicos que codifica un gen de la síntesis de ácidos grasos o del metabolismo de lípidos nativo.

La presente invención también proporciona procedimientos de cosupresión de un gen que es nativo con respecto a una planta que comprende transformar una célula vegetal con un vector de expresión que comprende una región reguladora 5' de oleosina objeto unida operativamente a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un gen vegetal nativo. De este modo, se reducen niveles de producto endógeno del gen vegetal nativo mediante el mecanismo conocido como cosupresión. De este modo, por ejemplo, se reducen niveles de un producto de un gen de la síntesis de ácidos grasos o un gen del metabolismo de lípidos transformando una planta con un vector de expresión que comprende una región reguladora 5' de oleosina objeto unida operativamente a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un gen de la síntesis de ácidos grasos o del metabolismo de lípidos nativo con respecto a la planta. Aunque el mecanismo exacto de cosupresión no se entiende en su totalidad, un experto en la técnica está familiarizado con trabajos publicados que informan de las condiciones experimentales y resultados asociados con la cosupresión (Napoli y col. 1990 *The Plant Cell* 2:270-289); Van der Krol 1990 *The Plant Cell* 2:291-299).

Para proporcionar la expresión regulada de genes heterólogos o nativos, las plantas se transforman con las construcciones de genes quiméricos de la invención. Los procedimientos de transferencia de genes son bien conocidos en la técnica. Los genes quiméricos se introducen en plantas mediante el procedimiento de transformación-regeneración de discos de hojas tal como se describe por Horsch y col. 1985 *Science* 227:1229. Otros procedimientos de transformación tales como cultivos de protoplastos (Horsch y col. 1984 *Science* 223:496, DeBlock y col. 1984 *EMBO J.* 2:2143, Barton y col. 1983, *Cell* 32:1033) también pueden usarse y están dentro del alcance de la presente invención. En una realización preferente, se transforman plantas con vectores derivados de *Agrobacteria* tales como los descritos por Klett y col. (1987) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38:467. Están disponibles otros procedimientos bien conocidos para insertar los genes quiméricos de la presente invención en células vegetales. Dichos procedimientos alternativos incluyen enfoques biolísticos (Klein y col. 1987 *Nature* 327:70), electroporación, captación de ADN inducida químicamente y el uso de virus o polen como vectores.

Cuando es necesario para el procedimiento de transformación, los genes quiméricos de la presente invención pueden insertarse en un vector de transformación vegetal, por ejemplo, el vector binario descrito por Bevan, M. 1984 *Nucleic Acids Res.* 12:8711-8721. Pueden derivarse vectores de transformación vegetal modificando el sistema de transferencia de genes natural de *Agrobacterium tumefaciens*. El sistema natural comprende plásmidos Ti (inductores de tumores) grandes que contienen un segmento grande conocido como ADN-T que se transfiere a plantas transformadas. Otro segmento del plásmido Ti, la región vir, es responsable de la transferencia de ADN-T. La región de DNA-T está bordeada por repeticiones terminales. En vectores binarios modificados, los genes que inducen tumores se han eliminado y las funciones de la región vir se usan para la transferencia de ADN extraño bordeado por secuencias de borde de ADN-T. La región T también contiene un marcador seleccionable para la resistencia de antibióticos y un sitio de clonación múltiple para insertar secuencias para la transferencia. Dichas cepas manipuladas se conocen como cepas de *A. tumefaciens* "desarmadas", y permiten la transferencia eficaz de secuencias bordeadas por la región T en el genoma nuclear de plantas.

Se inoculan discos de hoja esterilizadas en superficie y otros tejidos susceptibles con *A. tumefaciens* que contiene ADN extraño "desarmado", se cultivan durante un número de días y después se transfieren a medio que contiene antibiótico. Se seleccionan después brotes transformados después de hechar raíces en medio que contenía el antibiótico apropiado y se transfieren al suelo. Las plantas transgénicas se polinizan y las semillas de estas plantas se recogen y se cultivan en medio antibiótico.

Puede realizarse un seguimiento de la expresión de un gen heterólogo en semillas en desarrollo, plantones jóvenes y plantas maduras mediante ensayos inmunológicos, histoquímicos o de actividad. Tal como se ha tratado en el presente documento, la elección del ensayo de expresión del gen quimérico depende de la naturaleza de la región codificante heteróloga. Por ejemplo, puede usarse un análisis de Northern para evaluar la transcripción si están disponibles sondas de nucleótidos apropiadas. Si los anticuerpos del polipéptido codificado por el gen heterólogo están disponibles, puede usarse un análisis de Western y localización inmunohistoquímica para evaluar la producción y localización del polipéptido. Dependiendo del gen heterólogo apropiado pueden usarse ensayos bioquímicos. Por ejemplo, se detectan acetiltransferasas midiendo la acetilación de un sustrato estándar. La expresión de un gen de una lípido desaturasa puede evaluarse por análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES).

Otro aspecto de la presente invención proporciona plantas transgénicas o progenie de estas plantas que contienen los genes quiméricos de la invención. Se consideran plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. Las células vegetales se transforman con los genes quiméricos mediante cualquiera de los procedimientos de transformación de plantas descritos anteriormente. La célula vegetal transformada, generalmente en forma de un cultivo de callos, disco de hoja, explante o planta completa (mediante el procedimiento de infiltración al vacío de Bechtold y col. 1993 *C.R. Acad. Sci. Paris*, 316:1194-1199) se regenera dando una planta transgénica completa mediante procedimientos bien conocidos por un experto en la técnica (por ejemplo, Horsch y col. 1985 *Science* 227:1129). En una realización preferente, la planta transgénica es girasol, algodón, colza para aceite, maíz, tabaco, *Arabidopsis*, cacahuete o soja. Debido a que la progenie de plantas transformadas hereda los genes quiméricos, se usan semillas o esquejes de plantas transformadas para mantener la línea transgénica.

Los ejemplos siguientes ilustran adicionalmente la invención.

Ejemplo 1: Aislamiento de ARN polisómico unido a membrana y construcción de una biblioteca de ADNc de borraja

5 Se aislaron polisomas unidos a membrana de semillas de borraja 12 días después de la polinización (12 DPP) usando el protocolo establecido para guisantes por Larkins y Davies (1975 Plant Phys. 55: 749-756). Se extrajo ARN de los polisomas tal como se describe por Mechler (1987 Methods in Enzymology 152: 241-248, Academic Press) Se aisló ARN de poly-A+ a partir del ARN polisómico unido a membrana usando perlas de Oligotex-dT™ (Qiagen

10 El ADNc correspondiente se fabricó usando el kit de síntesis de ADNc ZAP de Stratagene. La biblioteca de ADNc se construyó en el vector lambda ZAP II (Stratagene) usando el kit de lambda ZAP II. La biblioteca primaria se enpaquetó con extracto de empaquetamiento Gigapack II Gold (Stratagene).

Ejemplo 2: Aislamiento de un ADNc de Δ -6 desaturasa de borraja

Protocolo de hibridación

15 La biblioteca de ADNc de borraja amplificada se plaqueó a densidad baja (500 ufp en placas de Petri de 150 mm). Los ADN de proteína de almacenamiento de semillas muy prevalentes se redujeron (sustrajeron de los ADN totales) mediante cribado con los ADN correspondientes.

20 Las muestras de hibridación para el cribado de la biblioteca de ADNc de borraja se generaron usando la síntesis de ADN cebado aleatoriamente tal como se describe por Ausubel y col. (1994 Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, N.Y.) y correspondieron a ADNc de proteína de almacenamiento de semillas expresados abundantemente identificados previamente. Los nucleótidos no incorporados se eliminaron usando una columna de giro G-50 (Boehringer Mannheim). La sonda se desnaturalizó por hibridación hirviendo en un baño de agua durante 5 minutos, después se enfrió rápidamente sobre hielo. Los filtros de nitrocelulosa que portaban bacteriofagos recombinantes fijados se prehibridaron a 60 °C durante 2-4 horas en solución de hibridación [4X SET (NaCl 600 mM, Tris-HCl 80 mM, Na₂EDTA 4 mM; pH 7,8), 5X reactivo de Denhardt (albúmina de suero bovino al 0,1 %, Ficoll al 0,1 % y polivinilpirrolidona al 0,1 %), 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, 50 µg/ml de poliadenina y 10 µg/ml de policitidina]. Este se reemplazó por solución de hibridación nueva a la que se añadió la sonda radioactiva desnaturalizada (2 ng/ml de solución de hibridación). Los filtros se incubaron a 60 °C con agitación durante la noche. Los filtros se lavaron secuencialmente en 4X, 2X y 1X SET (NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, Na₂EDTA 1 mM; pH 7,8) durante 15 minutos cada vez a 60 °C. Los filtros se secaron al aire y después se expusieron a una película de rayos X durante 24 horas con pantallas intensificadoras a -80 °C.

30 Las placas no hibridadas se escindieron usando el protocolo de escisión y rectivos de Stratagene. Las colonias bacterianas resultantes se usaron para inocular cultivos líquidos y se secuenciaron bien manualmente o bien mediante un secuenciador automático ABI.

Secuenciación aleatoria de ADNc de bibliotecas polisómicas unidas a membrana de semillas (12 DPP) de borraja

35 Cada ADNc que corresponde a una placa no hibridada se secuenció una vez y se generó una etiqueta de secuencia de 200-300 pares de bases. Toda la secuenciación se realizó mediante secuenciación en ciclos (Epicentre). Se generaron más de 300 etiquetas de secuencia expresadas (EST). Cada etiqueta de secuencia se comparó con la base de datos GenBank usando el algoritmo BLAST (Altschul y col. 1990 J. Mol. Biol. 215:403-410). Se identificó un número de genes del metabolismo de lípidos que incluían la Δ 6-desaturasa.

40 Las búsquedas en bases de datos con el clon de ADNc denominado mbp-65 usando BLASTX con la base de datos GenBank dio como resultado una coincidencia significativa con la Δ 6-desaturasa de *Synechocystis* aislada previamente. No obstante, se determinó que el mbp-65 no era un ADNc de longitud completa. Se aisló un ADNc de longitud completa usando mbp-65 para cribar la biblioteca polisómica unida a membrana de borraja. El clon resultante se denominó pAN1 y el inserto de ADNc de pAN1 se secuenció mediante el procedimiento de secuenciación en ciclos. La secuencia de aminoácidos deducida del marco de lectura abierto (fig. 1, SEC ID N°:1) se comparó con otras desaturasas conocidas usando el programa de alineamiento de proteínas Geneworks (IntelligGenetics). Este alineamiento indicó que el inserto de ADNc de pAN1 era el gen de Δ 6-desaturasa de borraja.

45 El dendrograma resultante (figura 2) muestra que las Δ 15-desaturasas y Δ 12-desaturasas comprenden dos grupos. La secuencia de borraja aislada y la Δ 6-desaturasa de *Synechocystis* aislada previamente (documento de patente de Estados Unidos N° 5.552.306) formaron un tercer grupo distinto. Una comparación de motivos de aminoácidos comunes a las desaturasas y se pensaba que estaban implicados catalíticamente en la unión a metales ilustra la similitud general de la proteína codificada por el gen de borraja con desaturasas en general y la Δ 6-desaturasa de *Synechocystis* en particular (tabla 1). Al mismo tiempo, la comparación de los motivos en la tabla 1 indica diferencias definidas entre esta proteína y otras desaturasas vegetales. Además, la secuencia de borraja también se distingue de desaturasas de ácidos grasos asociadas a membrana de planta conocidas por la presencia de un motivo de unión a hemo conservado en proteínas b₅ de citocromo (Schmidt y col. 1994 Plant Mol. Biol. 26:631-642) (figura 1).

5 Por lo tanto, aunque estos resultados sugieren claramente que el ADNc aislado era un gen de $\Delta 6$ -desaturasa de borraja, era necesaria una confirmación adicional. Para confirmar la identidad del ADNc de $\Delta 6$ -desaturasa de borraja, el inserto de ADNc de pAN1 se clonó en un casete de expresión para la expresión estable. El vector pB1121 (Jefferson y col. 1987 EM BO J. 6:3901-3907) se preparó por ligadura mediante digestión con BamHI y EcoICR I (un isosquízómero de SacI que deja extremos romos; disponible de Promega) que escinde la región codificante de GUS que deja el promotor 35S y el terminador NOS intactos.

10 El ADNc de $\Delta 6$ -desaturasa de borraja se escindió del plásmido recombinante (pAN1) mediante digestión con BamHI y XhoI. El extremo XhoI se fabricó como realizando una reacción de llenado catalizada por el fragmento de Klenow de ADN polimerasa I. Este fragmento se clonó después en los sitios BamHI/EcoICR I de pB1121.1, dando como resultado el plásmido pAN2.

TABLA 1

COMPARACIÓN DE MOTIVOS DE AMINOÁCIDOS COMUNES EN DESATURASAS UNIDAS A MEMBRANA

Desaturasa	Caja lipídica	Caja metálica 1	Caja metálica 2
Δ^6 de borraja	WIGHDAGH (SEC ID N°: 15)	KNAHH (SEC ID N°:21)	FQIEHH (SEC ID N°:29)
Δ^6 de <i>Synechocystis</i>	NVGH DANH (SEC ID N°: 16)	HNYLHH (SEC ID N°:22)	HQVTHH (SEC ID N°:30)
Δ^{15} de cloroplasto de Arab.	VLCHDCGH (SEC ID N°: 17)	HRTTH (SEC ID N°:23)	KVIHH (SEC ID N°:31)
Δ^{15} de arroz	VLGHDCGH (SEC ID N°: 17)	HRTTH (SEC ID N°:23)	HVIHH (SEC ID N°:31)
Δ^{15} de cloroplasto de glicina	VLGHDCGH (SEC ID N°: 17)	HRTTH (SEC ID N°:23)	HVIHH (SEC ID N°:31)
fad3 (Δ^{15}) de Arab.	VLGHDCGH (SEC ID N°: 17)	HRTTH (SEC ID N°:23)	HVIHH (SEC ID N°:31)
fad 3 (Δ^{15}) de Brassica	VIAHECCH (SEC ID N°: 18)	HRRHH (SEC ID N°:24)	HVAHH (SEC ID N°:32)
Δ^{12} (P1-81)* de borraja	V:ASBC5H (SEC ID N°: 18)	HRRHH (SEC ID N°:24)	HVAHH (SEC ID N°:32)
fad2 (Δ^{12}) de ARB.	VICH DCAH (SEC ID N°: 19)	HDRHH (SEC ID N°:25)	HIPHH (SEC ID N°:33)
Δ^{12} de cloroplasto de Arab.	VIGH DCAH (SEC ID N°: 19)	HDRHH (SEC ID N°:25)	KIPHH (SEC ID N°:33)
Δ^{12} de plástido de glicina	VIGH DCAH (SEC ID N°: 19)	HDQHH (SEC ID N°:26)	HIPHH (SEC ID N°:33)
n-6 plastidial de espinaca	VVGHDCGH (SEC ID N°: 20)	HDHHH (SEC ID N°:27)	HIPHH (SEC ID N°:33)
Δ^{12} de <i>Synechocystis</i>	VLCHDCCH (SEC ID N°: 17)	HNNHH (SEC ID N°:28)	HVPHH (SEC ID N°:34)
Δ^{12} de Anabaena			

*P1-81 es un ADNc de longitud completa que se identificó mediante análisis EST y muestra una similitud alta con la $\Delta 12$ -desaturasa de *Arbidopsis* (fad2)

15 Ejemplo 3: Producción de plantas transgénicas y preparación y análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME)

El plásmido de expresión pAN2 se usó para transformar tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. xanthi) a través de *Agrobacterium tumefaciens* según procedimientos estándar (Horsch y col. 1985 Science 227:1229-1231; Bogue y col. 1990 Mol. Gen. Genet. 221:49-57) exceptuando que los transformantes iniciales se seleccionaron en 100 $\mu\text{g/ml}$ de canamicina.

20 Se congeló tejido de plantas transgénicas en nitrógeno líquido y se liofilizó durante la noche. Se prepararon FAME tal como se describe por Dahmer y col. (1989) J. Amer. Oil. Chem. Soc. 66: 543-548. En algunos casos, el disolvente se evaporó de nuevo y las FAME se resuspendieron en acetato de etilo y se extrajeron una vez con agua desionizada para eliminar cualesquiera contaminantes solubles en agua, las FAME se analizaron usando un cromatógrafo gas-líquido Tracor-560 tal como se ha descrito previamente (Reddy y col. 1996 Nature Biotech. 14:639-642).

25 Tal como se muestra en la figura 3, hojas de tabaco transgénico que contenían el ADNc de borraja produjeron tanto GLA como ácido octa-decatetraenoico (OTA) (18:4 $\Delta 6, 9, 12, 15$). Por lo tanto, estos resultados demuestran que el ADNc aislado codifica una $\Delta 6$ -desaturasa de borraja.

Ejemplo 4: Expresión de $\Delta 6$ -desaturasa en borraja

La expresión nativa de $\Delta 6$ -desaturasa se examinó mediante análisis de Northern de ARN derivado de tejidos de borraja. El ARN se aisló a partir del desarrollo de embriones de borraja siguiendo el procedimiento de Chang y col. 1993 Plant Mol. Biol. Rep. 11:113-116. El ARN se separó por electroforesis en geles de formaldehído-agasosa, se transfirió a membranas de nailon mediante transferencia capilar y se inmovilizó cocinando a 80 °C durante 30 minutos siguiendo protocolos estándar (Brown T., 1996, en Current Protocols in Molecular Biology, eds. Auselbel y col. [Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York] páginas 4.9.1-4.9.14.). Los filtros se preincubaron a 42 °C en una solución que contenía formamida desionizada al 50 %, 5X reactivo de Denhardt, 5X SSPE (NaCl 900 mM, fosfato de sodio 50 mM, pH 7,7, y EDTA 5 mM), SDS al 0,1 % y 200 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Después de dos horas, los filtros se añadieron a una solución nueva de la misma composición con la adición de sonda de hibridación radioactiva desnaturalizada. En este caso, las sondas usadas fueron ADNc de legumina de borraja (Fig. 16A), ADNc de oleosina de borraja (Fig. 16B) y ADNc de $\Delta 6$ -desaturasa de borraja (pANI, ejemplo 2) (Fig. 16C). Los ADN de legumina y oleosina de borraja se aislaron mediante clonación EST y se identificaron por comparación con la base de datos del GenBank usando el algoritmo BLAST tal como se describe en el ejemplo 2. La variación de carga se corrigió mediante normalización a niveles de ARNm de EF1 α de borraja. El ARNm de EF1 α se identificó correlacionando con el ADNc correspondiente obtenido mediante el análisis EST descrito en el ejemplo 2. Los filtros se hibridaron a 42 °C durante 12-20 horas, después se lavaron tal como se ha descrito anteriormente (excepto en que la temperatura fue de 65 °C), se secaron con aire y se expusieron a una película de rayos X.

Tal como se muestra en las figuras 15A y 15B, la $\Delta 6$ -desaturasa se expresa principalmente en semillas de borraja. Las semillas de borraja alcanzan la maduración entre 18-20 días después de la polinización (dpp). La expresión de ARNm de $\Delta 6$ -desaturasa tiene lugar a través de puntos temporales recogidos (8-20 dpp), pero parece máxima de 10-16 días después de la polinización. Este perfil de expresión es similar al observado para ARN de proteína de almacenamiento de oleosina y semillas 12S de borraja (fig. 16A, 16B y 16C).

Ejemplo 5: Aislamiento y caracterización de un ADNc de oleosina novedoso.

El ADNc de oleosina (AtS21) se aisló mediante cribado de sustracción virtual de una biblioteca de ADNc de semillas en desarrollo de *Arabidopsis* usando una sonda de ADN de reacción en cadena de la polimerasa cebada aleatoriamente (RP-PCR) derivada de tejido de raíz.

PREPARACIÓN DE ARN

Se cultivaron plantas *Arabidopsis thaliana* Landsberg erecta con iluminación continua en una mezcla de vermiculita/suelo a temperatura ambiente (22 °C). Se diseccionaron silicuas 2-5 días después de la floración para recoger por separado semillas en desarrollo y recubrimientos de silicua. También se recogieron inflorescencias que contienen brotes de flores iniciales y flores totalmente abiertas, hojas y silicuas completas uno o tres días después de la floración. Se obtuvieron raíces a partir de plantones que se habían cultivado en medio líquido Gamborg B₅ (GIBCO BRL) durante dos semanas. Las semillas para cultivo de raíces se esterilizaron previamente con lejía al 50 % durante cinco minutos y se lavaron con agua cuidadosamente. Todos los tejidos se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Los ARN totales se aislaron siguiendo un protocolo de extracción con fenol/SDS en caliente y de precipitación con LiCl (Harris y col. 1978 Biochem. 17:3251-3256; Galau y col. 1981 J. Biol. Chem. 256:2551-2560). Se aisló ARn de Poly A+ usando cromatografía en columna oligo dT según los protocolos de los fabricantes (PHARMACIA o STRATAGENE) o usando partículas de látex de oligotex-dT (QIAGEN).

Construcción de bibliotecas de ADNc específicas del tejido

Se construyeron bibliotecas de ADNc de flor, silicua de un día, silicua de tres días, hoja, raíz y semilla en desarrollo cada uno a partir de 5 µg de ARN de poly A+ usando el kit de síntesis de ADNc ZAP (Stratagene). Se clonaron direccionalmente ADNc en sitios de EcoRI y XhoI de pBluescript SK(-) en el vector λ -ZAPII (Short y col. 1988 Nucleic Acids Res. 16:7583-7600). No se identificó ninguna placa con fagos recombinantes mediante el desarrollo de color azul en placas NZY que contenían X-gal (5 bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactopiranosido) e IPTG (isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido).

Los fondos no recombinantes para las bibliotecas de ADNc de flor, silicua de un día, silicua de tres días, hoja, raíz y semilla en desarrollo fueron del 2,8 %, 2 %, 3,3 %, 6,5 %, 2,5 % y 1,9 % respectivamente.

Etiquetado de ADN de cebado aleatorio

Los insertos de ADNc de clones aislados (ADNc no hibridado) se escindieron mediante doble digestión de EcoRI/XhoI y se purificaron en gel para el etiquetado de cebado aleatorio. La mezcla de reacción de Klenow contenía plantillas de 50 ng de ADN, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, MgCl₂ 5 mM, DTT 7,5 mM, dCTP, Dgtp y dTTP, cada uno 50 µM, cebadores aleatorios hexámeros 10 µM (Boehringer Mannheim), α -32 P-dATP 50 µCi, 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml (DuPont) y 5 unidades de fragmento de Klenow de ADN polimerasa I (New England Biolabs). Las reacciones se llevaron a cabo a 37 °C durante una hora. Se usaron partes alícuotas de mezclas de reacción diluidas para la precipitación TCA y análisis en gel desnaturalizado alcalino. Las sondas de hibridación se etiquetaron solo con ADN

polimerasa de Klenow y los dNTP no incorporados se eliminaron usando columnas de giro Sephadex R G-50 (Boehringer Mannheim).

PCR cebada aleatoriamente

5 Se sintetizó ADN bicatenario a partir de ARN de poly A+ aislado de tejido de raíz de *Arabidopsis* usando el sistema de síntesis de ADNc (GIBCO BRL) con oligo dT12-18 como cebadores. Los ADNc más largos de 300 pb se enriquecieron en cromatografía en columna Sephacryl S-400 (Stratagene). Se usaron ADNc fraccionados como plantillas para el etiquetado RP-PCR. La reacción contenía Tris-HCl 10 mM, pH 9,0, KCl 50 mM, Tririon X-100 al 0,1 %, MgCl₂ 2 mM, 5 unidades de Taq ADN polimerasa (PROMEGA), 200 dCTP, cGTP y dTTP, y diferentes concentraciones de cebadores aleatorios hexámeros α-32P dATP, 800 mCi/mmol, 10 mCi/ml (DuPont) y ATPd frío
 10 en un volumen final de 25 ml. Después de 5 minutos iniciales a 95 °C, se llevaron a cabo diferentes reacciones usando programas diferentes para optimizar las condiciones de ADNc en RP-PCR. A menos que se indique lo contrario, se usó el programa siguiente para la mayor parte del etiquetado de la sonda de ADNc por RP-PCR: 95 °C/5 minutos, después: 40 ciclos a 95 °C de 30 segundos, 18 °C/1 segundo, rampa a 30 °C a una velocidad de 0,1 °C/segundo. 72 °C/1 minuto. Los productos de RP-PCR se extrajeron con fenol/cloroformo y se precipito en etanol o se purificó pasando a través de columnas de giro de Sephadex G-50 (Boehringer Mannheim).
 15

Sustracción virtual de manchas de clones

La escisión másica de bibliotecas de ADNc de λ-ZAP se llevó a cabo coinfectando células huésped XLI-Blue MRF' con fagos recombinantes a partir de las bibliotecas y fago auxiliar ExAssist (STRATAGENE). Los fagémidos escindidos se rescataron usando células SOLR. Los ADN de plásmidos se prepararon mediante un procedimiento de ebullición mini-prep (Holmes y col. 1981 Anal. Biochem. 114:193-197) a partir de clones aislados aleatoriamente. Se escindieron insertos de ADNc mediante doble digestión con EcoRI y XhoI y se resolvieron en geles de agarosa al 1 %. Los ADN se desnaturalizaron en NaOH 0,5 N y NaCl 1,5 M durante 45 minutos, se neutralizaron en Tris-HCl 0,5 M, pH 8,0, y NaCl 1,5 M durante 45 minutos, y después se transfirieron mediante inmunotransferencia a membranas de nailon (Micron Separations, Inc.) en 10X SSC durante la noche. Después de una prehibridación de una hora a 65 °C, la sonda de RP-ADNc de raíz se añadió al mismo tampón de hibridación que contenía fracción de albúmina bovina V al 1 % (Sigma), EDTA 1 mM, NaHPO₄ 0,5 M, pH 7,2, SDS al 7 %. La hibridación continuó durante 24 horas a 65 °C. Los filtros se lavaron en albúmina bovina al 0,5 %, EDTA 1 mM, NaHPO₄ 40 mM, pH 7,2, SDS al 5 % durante diez minutos a temperatura ambiente y 3 x 10 minutos en EDTA 1 mM, NaHPO₄ 40 mM, pH 7,2, SDS al 1 % a 65 °C. Se expusieron autorradiografías a películas de rayos X (Kodak) durante dos a cinco días a -80 °C.
 20
 25
 30 La hibridación de las manchas resultantes con sondas de RP-PCR de raíz “sustraídas virtualmente” de ADNc de semilla compartidas con la población de ARN de raíz. Los ADNc de semilla restantes que representan ADNc específicos de la semilla putativos, que incluyen los que codifican oleosinas, se secuenciaron usando el procedimiento de secuenciación en ciclos, identificando, de este modo, AtS21 como un clon de ADNc de oleosina.

Análisis de secuencia de AtS21

35 El ADNc de oleosina tiene una longitud de 834 pb incluida una cola de 18 pb de longitud de poly A (Fig. 4, SEC ID N°: 3). Tiene una homología alta con otros genes de oleosina de *Arabidopsis*, así como de otras especies. Recientemente, se ha informado de un gen de oleosina idéntico (Zou y col., 1996, Plant Mol.Biol. 31:429-433). La proteína predicha tiene una longitud de 191 aminoácidos con un dominio medio muy hidrófobo flanqueado por un dominio hidrófilo a cada lado. La existencia de dos corrientes de codones de detección en el marco y la similaridad
 40 con otros genes de oleosina indican que este ADNc es de longitud completa. Ya que existen dos codones de detección en el marco justo cadena arriba del primer ATG, este ADNc se considera que es de longitud completa (figura 4, SEC ID N°:3). La proteína predicha tiene tres dominios distintos basados en la distribución de sus residuos de aminoácidos. Los dominios N-terminal y C-terminal son ricos en residuos cargados, mientras que el dominio central es absolutamente hidrófobo (figura 5). En el dominio central se localizan hasta 20 residuos de leucina y se
 45 disponen como repeticiones con un leucina presente cada 7-10 residuos. Otros restos de aminoácidos no polares también están incluidos en el dominio central, haciendo este dominio absolutamente hidrófobo (figura 6).

Búsquedas amplias en diferentes bases de datos usando tanto ADNc de AtS21 y su secuencia de proteína predicha indentificaron oleosinas de zanahoria, maíz, algodón, semillas de colza, *Arabidopsis* y otras especies de plantas. La homología está restringida principalmente al dominio hidrófobo central. Se encontraron siete secuencias de oleosina de *Arabidopsis*. AtS21 representa el mismo gen que Z54164, que tiene unas pocas bases más en la región no traducida 5'. Las siete secuencias de oleosina de *Arabidopsis* disponibles hasta la fecha se alinearon una a cada otra (figura 7). Los resultados sugirieron que las siete secuencias entran dentro de tres grupos. El primer grupo incluye AtS21 (SEC ID N°:5), X91918 (SEC ID N°:6) y la secuencia parcial Z29859 (SEC ID N°:7). Ya que X91918 (SEC ID N°: 6) tiene solo su último residuo distinto de AtS21 (SEC ID N°:5) y ya que Z29859 (SEC ID N°:7) tiene solo tres residuos de aminoácidos que son diferentes de AtS21 (SEC ID N°:5), las tres secuencias representan probablemente el mismo gen. Las dos secuencias del segundo grupo, X62352 (SEC ID N°:8) y Ato13 (SEC ID N°:9) son diferentes tanto en secuencia como en longitud. Por lo tanto, no existe duda de que representan dos genes independientes. Igual que el primer grupo, las dos secuencias del tercer grupo, X91956 (SEC ID N°:10) y L40954 (SEC ID N°:11), también tienen solo tres residuos divergentes que pueden deberse a errores de secuencia. Por lo
 50
 55

tanto, X91956 (SEC ID N°:10) y L40954 (SEC ID N°:11) representan probablemente el mismo gen. A diferencia de todas las demás secuencias de oleosa que se predijeron a partir de secuencia de ADNc, X62352 (SEC ID N°:8) se dedujo de una secuencia genómica (Van Rooijen y col. 1992 Plant Mol. Biol. 18: 1177-1179). En conclusión, se han identificado cuatro genes diferentes de oleosina de *Arabidopsis* hasta la fecha, y están conservados solo en el medio del dominio hidrófobo.

Análisis de Northern

Con el fin de caracterizar el patrón de expresión del gen AtS21 nativo, se realizó un análisis de Northern tal como se ha descrito en el ejemplo 4 con la excepción de que la sonda fue ADNc de AtS21 (inserto pAN1) etiquetado con ³²P-dATP a una actividad específica de 5×10^8 cpm/ug.

Los resultados indicaron que el gen AtS21 se expresa fuertemente en semillas en desarrollo y se expresan débilmente en recubrimientos de silicua (figura 8A). También se detectó un transcrito mucho más grande, que puede representar pre-ARNm de AtS21 no procesado, en ARN de semillas en desarrollo. No se detectó AtS21 en ARN de flor, hoja, raíz (figura 8A) o silicua de un día. Un análisis de Northern reveló que AtS21 también se expresa fuertemente en semillas en germinación impregnadas (figuras 13A y 13B).

Ejemplo 6: Caracterización de clones genómicos de oleosina y aislamiento de promotor de oleosina

Se aislaron clones genómicos cribando una biblioteca de ADN genómico de *Arabidopsis* usando el ADNc de longitud completa (AtS21) como sonda. Se cartografiaron dos clones genómicos mediante digestión con enzimas de restricción seguida por hibridación Southern usando la mitad 5' del ADNc escindido por SacI como sonda. Se subclonó un fragmento de SacI de 2 kb y se secuenció (Fig. 9, SEC ID N°:35). Dos regiones del clon genómico eran idénticas a la secuencia de ADNc. Un intrón de 395 pb separa las dos regiones.

El número de copia de gen AtS21 en el genoma de *Arabidopsis* se determinó mediante hibridación Southern de ADN genómico seguido de digestion con las enzimas BamHI, EcoRI, HindIII, SacI y XbaI, usando el ADNc de longitud completa como sonda (figura 8B). Se detectó una única banda en todos los carriles excepto la digestión de SacI, en la que se detectaron dos bandas. Ya que la sonda de ADNc tiene un sitio de SacI interno, estos resultados indicaron que AtS21 es un gen de copia única en el genoma de *Arabidopsis*. Ya que se ha sabido que el genoma de *Arabidopsis* contiene diferentes isoformas de genes de oleosina, este análisis de Southern también demuestra que las diferentes isoformas de oleosina son divergentes al nivel de secuencia de ADN.

Dos regiones, separadas por un intrón de 395 pb, del fragmento de ADN genómico son idénticas a la secuencia de ADNc de AtS21. Las búsquedas en bases de datos usando la secuencia promotora 5' cadena arriba de la secuencia de ADNc de AtS21 no identificaron ninguna secuencia con homología significativa. Además, la comparación de la secuencia promotora de AtS21 con otros promotores de oleosina de *Arabidopsis* aisladas previamente (Van Rooijen y col., 1992) revelaron similitud. La secuencia promotora de AtS21 es rica en bases A/T y contiene hasta 44 repeticiones directas que varían de 10 pb a 14 pb con solo un desapareamiento permitido. Dos repeticiones directas de 14 pb y un elemento de respuesta ABA están subrayados en el figura 9.

Ejemplo 7: Construcción del casete de expresión y de patrones de expresión del gen promotor AtS21/GUS en *Arabidopsis* transgénica y tabaco

Construcción del casete de expresión del gen promotor AtS21/GUS

El fragmento promotor de 1267 pb que comienza por la primera G cadena arriba del codón ATG del fragmento de ADN genómico se amplificó usando PCR y se condensó con el gen comunicador GUS para analizar su actividad. El fragmento promotor del clon genómico A1S21 se amplificó por PCR usando el cebador T7 GTAATACGACTCACTATAGGGC (SEC ID N°: 13) y el cebador 21P GGGGATCCTATACTAAAAGTATAGAGTAAAGG (SEC ID N°:14) complementario a la región 5' no traducida cadena arriba del primer codón ATG (figura 9). Un sitio de clonación BamHI se introdujo mediante el cebador de 21P. El fragmento amplificado se clonó en los sitios BamHI y SacI de pBluescript KS (Stratagene). Se secuenciaron clones individuales para evaluar mutaciones de PCR posibles, así como la orientación de sus insertos. El clon correcto se digirió con BamHI y HindIII, y el fragmento promotor escindido (1,3 kb) se clonó en los sitios correspondientes de pBI101.1 (Jefferson, R.A. 1987a, Plant Mol. Biol. Rep. 5:387-405; Jefferson y col., 1987b, EMBO J. 6:3901-3907) cadena arriba del gen GUS. Los plásmidos resultantes se designaron pAN5 (fig. 10). El constructo promotor AtS21/GUS (pAN5) se introdujo en tabaco (mediante el procedimiento de discos de hojas, Horsch y col., 1985; Bogue y col. 1990 Mol. Gen. Gen. 221:49-57) y ecotipo de *Arabidopsis* Colombia mediante infiltración al vacío tal como se describe por Bechtold y col. (1993) C.R. Acad. Sci. Paris, 316:1194-1199. Las semillas se esterizaron y se seleccionaron en medios que contenían 50 µg/ml de kanamicina, 500 µg/ml de carbenicilina.

Ensayo de actividad de GUS: Los patrones de expresión del gen GUS comunicador se revelaron mediante tinción histoquímica (Jefferson y col., 1987a, Plant Mol. Biol. Rep. 5:387-405). Se tiñieron diferentes tejidos en solución de sustrato que contenía 2 mg/ml de ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónico (X-Gluc) (Research Organics, Inc.), ferrocianuro de potasio 0,5 mM y ferrocianuro de potasio 0,5 mM en 50 tampón de fosfato de sodio, pH 7,0 a 37 °C durante la noche y después se deshidrataron sucesivamente en etanol al 20 %, 40 % y 80 % (Jefferson y col.,

1987). Se tomaron fotografías usando un microscopio de compuesto Axiophot (Zeiss) o microscopio de disección Olympus SZH10. Las diapositivas se convirtieron en imágenes digitales usando un escáner de diapositivas Spring/Scan 35LE (Polaroid) y se compilaron usando Adobe Photoshop™ 3.0.5 y Canvas™ 3.5.

5 Las actividades de GUS se midieron cuantitativamente mediante fluorometría usando 4-MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glucuronida) 2 mM como sustrato (Jefferson y col., 1987). Las semillas de *Arabidopsis* en desarrollo se clasificaron según sus colores y se recogieron otros tejidos vegetales y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Los tejidos vegetales se molieron en tampón de extracción que contenía fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0, EDTA 10 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, Triton X-100 al 0,1 % y laurilsarcosina sódica al 0,1 %. Los desechos del tejido se eliminaron mediante 5 minutos de centrifugación en un microtubo de centrifugación. Se prepararon partes alícuotas del sobrenadante y se mezclaron con sustrato y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Se analizaron tres réplicas para cada muestra. Las reacciones se detuvieron añadiendo 4 volúmenes de carbonato de sodio 0,2 M. Se leyó la fluorescencia usando un fluorómetro de ADN TKO-100 (Hofer Scientific Instruments). Las concentraciones de proteínas de los extractos se determinaron usando el procedimiento de Bradford (Bio Rad).

Patrones de expresión de promotor AtS21/GUS en *Arabidopsis* transgénica y tabaco

15 La actividad de GUS en *Arabidopsis* se detectó en semillas verdes y regiones nodulares en las que silicuas, hojas basales y ramas se unen al tronco de inflorescencia (figuras 11A y 11B). No se detectó actividad de GUS en ninguna hoja, raíz, flor, recubrimiento de silicua o regiones internodales del tronco de inflorescencia. Estudios detallados de la expresión de GUS en semillas en desarrollo revelaron que el promotor de AtS21 era activo solo en semillas verdes en las que los embriones tienen ya un estadio desarrollado posterior a corazón (figuras 11C y 11G). Los embriones jóvenes que muestran actividad de GUS que pudieron detectarse por tinción histoquímica fueron en estadio temprano de torpedo. Interesantemente, la tinción se restringió solo a la parte inferior del embrión, incluido hipocotilo y radical embrionario. No se detectó tinción en cotiledones jóvenes (figuras 11D y 11E). Los cotiledones comienzan a teñirse cuando los embriones están en los estadios de torpedo tardío o incluso de cotiledón temprano (figura 11F y 11H). Más tarde, se tiñe la totalidad de los embriones y la tinción se vuelve más intensa que en los embriones madurados (figuras 11I y 11J). También se ha observado que la expresión génica de GUS se restringió a los embriones. El recubrimiento de semillas y los endospermas jóvenes no se tiñeron (figura 11C).

La actividad de GUS también se detectó en plántones en desarrollo. Los plántones jóvenes de 3-5 días de edad se tiñeron por todas partes. Aunque se tiñeron algunos pelos de la raíz cercanos al hipocotilo (figura 11K), la mayor parte de las estructuras de nueva formación tales como pelos de raíz, primordia de raíz lateral y ápice del brote no se tiñeron (figuras 11L y 11N). Más tarde, la tinción se restringió a cotiledones e hipocotilos cuando crecieron raíces laterales a partir del alargamiento de la raíz embrionaria. La tinción en raíces embrionarias desapareció. No se observó tinción en raíces laterales de nueva formación, hojas verdaderas ni tricomas de hojas verdaderas (figuras 11M y 11N).

35 Los patrones de expresión promotor AtS21/GUS en tabaco son básicamente los mismos que en *Arabidopsis*. La actividad de GUS se detectó solo en semillas en estadios tardíos y regiones nodulares diferentes de plantas maduras. En semillas en germinación, se detectó una tinción fuerte a lo largo de la totalidad de los embriones en tan solo una hora después de que se diseccionaran a partir de semillas embebidas. También se tiñó el endosperma maduro, que las semillas de *Arabidopsis* no tienen, pero no recubrimientos de semillas (figura 12A). Las puntas de la raíz de algunos plántones jóvenes de una línea transgénica no se tiñeron (figura 12B). Por otra parte, los patrones de expresión de GUS en plántones de tabaco en desarrollo fueron los mismos que en plántones de *Arabidopsis* (figuras 12B, 12C y 12D). Las estructuras de nueva formación tales como raíces laterales y hojas verdaderas no se tiñeron.

Niveles de ARNm de AtS21 en plántones en desarrollo

45 Ya que las actividades fuertes de promotor AtS21/GUS observadas tanto en plántones de *Arabidopsis* como de tabaco no son consecuentes con la expresión específica de semillas de genes de oleosina, se llevó a cabo un análisis de Northern para determinar si estaba presente el ARNm de AtS21 en plántones en desarrollo en los que la actividad de GUS era tan fuerte. Se analizaron ARN preparados a partir de plántones en estadios diferentes de 24 horas a 12 días mediante hibridación Northern usando ADNc de AtS21 como sonda. Sorprendentemente, se detectó ARNm de AtS21 a un nivel alto comparable al de semillas en desarrollo en semillas embebidas 24-48 horas. El nivel de ARNm cayó drásticamente cuando emergieron primeramente plántones jóvenes a las 74 horas (figuras 13A y 13B). En 96 horas y en plántones viejos no se detectó ninguna señal incluso con una exposición más larga (figura 13B). Las cargas de muestras de ARN se analizaron mediante hibridación de la misma mancha con una sonda de gen de tubulina (figura 13C) que se aisló e identificó mediante análisis EST tal como se describe en el ejemplo 2. Ya que el ARNm de AtS21 era tan abundante en semillas, las sondas de AtS21 residuales permanecieron en la mancha incluso después de una separación intensa. Estos resultados indicaron que el ARNm de AtS21 detectado en plántones impregnados y plántones muy jóvenes son los vehículos de ARNm de AtS21 a partir de semillas secas. Se ha informado recientemente que un ARNm de Ato12 de oleosina (idéntico a AtS21) es más abundante en semillas secas (Kirik y col., 1996 Plant Mol. Biol. 31 (2): 413-417.) De forma similar, las actividades fuertes de GUS en plántones son más probables debido a la transferencia de la proteína β -glucuronidasa y la β -glucuronidasa de nueva síntesis a partir de su ARNm transferido desde el estadio de semilla seca.

Ejemplo 8: Comparación de la actividad entre el promotor AtS21 y el promotor 35s

Las actividades de GUS en semillas en desarrollo de *Arabidopsis* transgénica expresadas por el promotor AtS21 se compararon con las expresadas por el promotor 35S en el constructo pBI221 (Jefferson y col. EMBO J. 6,3901-3907. Las semillas se clasificaron según sus colores (tabla 2). El estadio más temprano era de globular a estadio de corazón tardío cuando las semillas eran todavía blancas pero lo suficientemente grandes para diseccionarlas a partir de la silicua. La actividad del promotor AtS21 se detectó a un nivel aproximadamente tres veces inferior al del promotor 35S en este estadio. La actividad del promotor 35S permaneció al mismo nivel bajo a lo largo de la totalidad del desarrollo del embrión. Por el contrario, la actividad del promotor AtS21 aumentó rápidamente cuando los embriones pasaron de estadio de torpedo y alcanzaron el nivel más elevado de 25,25 pmol 4-MU/min µg de proteína en el estadio maduro (figura 5-8). La actividad máxima del promotor AtS21 es hasta 210 veces superior que su actividad más baja en el estadio de globular a corazón y es cerca de 100 veces superior a la actividad del promotor 35S en el mismo estadio (tabla 2). Los niveles de actividad del promotor AtS21 son similares a los de otros promotores de oleosina de *Arabidopsis* expresados en *Brassica napus* (Plant y col. 1994, Plant mol. Biol. 25:193-205. La actividad del promotor AtS21 también se detectó a nivel de fondo en la hoja. La alta desviación típica, superior al promedio mismo, indica que la actividad de GUS solo se detectó en las hojas de algunas líneas (tabla 2). Por otra parte, la actividad del promotor 35S en hojas fue más de 20 veces superior que en semillas. Las comparaciones por pares de actividades entre el promotor AtS21 y el promotor 35S se muestran en la figura 14.

Aunque la actividad del promotor AtS21 fue aproximadamente 3 tres veces inferior en semillas secas de tabaco que en semillas secas de *Arabidopsis*, la actividad de GUS absoluta fue aún más alta que la expresada por el promotor 35S en hojas de *Arabidopsis* (tabla 2). La actividad del promotor AtS21 no detectable se observó en hoja de tabaco (figura 14).

La comparación del promotor AtS21 frente al promotor 35S reveló que este último no es un buen promotor para expresar genes a niveles altos en semillas en desarrollo. Debido a sus actividades bajas consecuentes a lo largo de la totalidad del periodo de desarrollo del embrión, el promotor 35S es útil para la expresión de niveles bajos consecuentes de genes objetivo. Por otra parte, el promotor AtS21 es un promotor muy fuerte que puede usarse para expresar genes partiendo de embriones en el estadio de corazón y acumulándolos hasta el estadio de semilla seca. El promotor 35S, aunque no es eficaz, es mejor que el promotor AtS21 expresando genes en embriones antes del estadio de corazón.

TABLA 2

ACTIVIDADES DE GUS DE AtS21 y CONSTRUCTOS PROMOTOR 35S/GUS									
COLOR DEL ESTADIO	BLANCOG-H	BLANCO/AMARILLO H-T	AMARILLO T-C	VERDE CLARO C TEMPRANO	VERDE OSCURO C TARDÍO	VERDE/AMARILLO MARRÓN NATURALEZA	MARRÓN SEMILLA SECA	HOJA	
AtS21	0,12±0,17	1,35± 1,57	6,77± 1,25	18,99±3,75	21,85±4,45	25,25±4,64	24,38±10,85	0,08±0,12	
35S	0,30±0,06	0,25±0,08	0,29±0,04	0,28±0,03	0,33±10,06	0,26±0,04	0,31 ±0,02	6,56±0,74	
AtS21	(In tobacco)						8,81 ±0,21	0,01±0,00	

Abreviaturas: G, estadio globalar; H, estadio corazón; T, estadio torpedo; C, estadio cotiledón. Las actividades de GUS son en pmol 4-MU/µg de proteína.min. Para el promotor AtS21 los números son el promedio de cinco líneas independientes con desviaciones típicas. Se ensayaron tres repeticiones para cada línea. Para el promotor 35S, los números son tres repeticiones de la misma línea con desviaciones típicas.

Ejemplo 9: Expresión del gen Δ^6 -desaturasa de borraja con el control del promotor AtS21 y comparación con la expresión con el control del promotor 35S de CaMV

5 Con el fin de crear un constructo de expresión con el promotor AtS21 que dirige la expresión del gen de Δ^6 -desaturasa de borraja, se eliminó el fragmento codificante de GUS del pAN₅ mediante digestión con SmaI y EcoICR I. El inserto de ADNc de pAN1 (ejemplo 2) se escindió después mediante una primera digestión con XhoI (y se llenó en el saliente residual como anteriormente), y después de digirió con SmaI. El fragmento resultante se usó para reemplazar la porción escindida de pAN5, obteniéndose pAN3.

10 Después de la transformación de tabaco y *Arabidopsis* siguiendo los procedimientos del ejemplo 7, se hizo un seguimiento de los niveles de actividad de Δ^6 -desaturasa analizando los ésteres metílicos de ácidos grasos correspondientes de sus productos de reacción, ácido γ -linolénico (GLA) y ácido octadecatetraenoico (OTA) usando los procedimientos indicados en el ejemplo 3. Los niveles de GLA y OTA (tabla 3) de semillas transgénicas se elevan hasta el 6,7 % de ácidos grasos C18 (media = 3,1 %) y 2,8 % (media = 1,1 %), respectivamente. No se detectó GLA u OTA en las hojas de estas plantas. En cambio, las plantas transgénicas con promotor/ Δ^6 -desaturasa de CaMV 35 S produjeron niveles de GLA en semillas que se elevaron hasta el 3,1 % de ácidos grasos C18 (media = 1,3 %) y OTA no medible en semillas.

TABLA 3

EXPRESIÓN DE Δ^6 -DESATURASA DE BORRAJA EN PLANTAS TRANSGÉNICAS							
PROMOTOR	PLANTA	SEMILLA			HOJA		
		GLA*	INTERVALO	OTA*	INTERVALO	GLA	INTERVALO
		INTERVALO		INTERVALO		INTERVALO	
virus del mosaico de la coliflor 35S	de tabaco	1,3	0,7-3,1	n.d		20	19-22
oleosina de <i>Arabidopsis</i>	de <i>Arabidopsis</i>	3,1	0-6,7	1,1	0-2,8	n.d.	n.d

*el valor medio se expresa como porcentaje de ácidos grasos C18; n.d. no detectado

Ejemplo 10: Transformación de colza para aceite con un casete de expresión que comprende la región reguladora 5' de oleosina unida al gen delta 6-desaturasa de borraja

20 Colza para aceite, Cv. Westar, se transformó con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 que contenía el plásmido pAN3 (es decir, el gen Δ^6 -desaturasa de borraja bajo el control del promotor oleosina de *Arabidopsis* (ejemplo 9))

25 Se cultivaron conjuntamente internódulos terminales de Westar durante 2-3 días con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 inducida (Alt-Moerbe y col. 1988 Mol. Gen. Genet. 213:1-8; James y col. 1993 Plant Cell Reports 12:559-563), después se transfirieron a medio de regeneración (Boulter y col. 1990 Plant Science 70: 91- 99; Fry y col. 1987 Plant Cell Reports 6:321-325). Los plantones regenerados se transfirieron a medio de crecimiento (Pelletier y col. 1983 Mol. Gen. Menet. 191: 244-250), y una cadena de polimerasa; el ensayo de reacción (PCR) se realizó en fragmentos de hojas para evaluar la presencia del gen.

30 Se aisló ADN de las hojas según el protocolo de KM Haymes y col. (1996) Plant Molecular Biology Reporter 14 (3) : 280-284, y se resuspendieron en 100 μ l de agua, sin tratamiento de RNasa. Se usaron 5 μ l de extracto para la reacción PCR, en un volumen final de 50 μ l. La reacción se realizó en un termociclador Perkin-Elmer 9600, con los ciclos siguientes:

1 ciclo: 95 °C, 5 minutos

30 ciclos: 95 °C, 45 s; 52 °C, 45 s; 72 °C, 1 minuto;

35 1 ciclo: 72 °C, 5 minutos

y los cebadores siguientes (derivados de la cercanía de las regiones de caja metálica tal como se indica en la fig. 1, SEC. N°.:1): 5' TGG AAA TGG AAC CAT AA 3' 5' GGA AAC AAA TGA TGC TC 3'

La amplificación de ADN reveló el fragmento de PCR de 549 pares de bases (figura 17).

40 Los brotes positivos se transfirieron a medio de alargamiento, después a medio para hechar raíces (DeBlock y col. 1989 Plant Physiol. 91: 694-701). Los brotes con un sistema radicular bien desarrollado se transfirieron al

invernadero. Cuando las plantas estaban bien desarrolladas, las hojas se recogieron para el análisis Southern con el fin de evaluar el número de copias génicas.

5 Se extrajo ADN genómico según el procedimiento de Bouchez y col. (1996) Plant Molecular Biology Reporter 14:115-123, se digirió con las enzimas de restricción Bgl I y/o Cla I, se separó electroforéticamente en gel de agarosa (Maniatis y col. 1982, in Molecular Cloning; a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor/NY), y se preparó para la transferencia a membranas de nailon (membrana Nytran, Schleicher y Schuell) según las instrucciones del fabricante. Después, el ADN se transfirió a membranas durante la noche por acción capilar usando 20XSSC (Maniatis y col. 1982).

10 Siguiendo a la transferencia, las membranas se reticularon mediante UV (Stratagene) durante 30 segundos y se prehibridaron durante 1 hora a 65 °C en 15 ml de una solución que contenía 6X.SSC, SDS al 0,5 % y leche descremada deshidratada al 2,25 % p/p en viales de vidrio en horno de hibridación (Appligene). Las membranas se hibridaron durante la noche en la misma solución que contenía una sonda de hibridación desnaturalizada radioetiquetada con ³²P a una actividad específica de 108 cpm/μg mediante el procedimiento de cebador aleatorio (con el kit Ready-ToGo obtenido de Pharmacia). La sonda representa un fragmento de PCR del gen de delta 6-
15 desaturasa de borraja (obtenido en las condiciones y con los cebadores detallados anteriormente). Después de la hibridación, los filtros se lavaron a 65 °C en 2XSSC, SDS al 0,1 % durante 15 minutos y 0,2XSSC, SDS al 0,1 % durante 15 minutos. Las membranas se envolvieron después en Saran-Wrap y se expusieron a película de Kodak XAR usando una pantalla de intensificación a -70 °C en un casete impermeable a la luz. El tiempo de exposición fue generalmente de 3 días.

20 Los resultados obtenidos confirman la presencia del gen. Según el constructo del gen, el número de bandas de cada carril de ADN digerido por Bgl I o Cla I representa el número de genes de delta 6-desaturasa presentes en el ADN genómico de la planta. La digestión con Bgl 1 y Cla 1 juntos genera un fragmento de 3435 bp.

LISTADO DE SECUENCIAS

25

<110> BAYER CROPS SCIENCE S.A.

<120> UNA REGIÓN REGULADORA 5' DE ALEOSINA PARA LA MODIFICACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LÍPIDOS DE SEMILLAS DE PLANTAS

<130> PH97019Div1

30

<160> 35

<170> Patentin version 3.4

<210> 1

<211> 1684

<212> ADN

35

<213> Borago officinalis

<220>

<221> CDS

<222> (43)..(1386)

<400>

ES 2 398 603 T3

atattctgcct accctcccaa agagagtagt catttttcat ca atg gct gct caa	54
Met Ala Ala Gln	
1	
atc aag aaa tac att acc tca gat gaa ctc aag aac cac gat aaa ccc	102
Ile Lys Lys Tyr Ile Thr Ser Asp Glu Leu Lys Asn His Asp Lys Pro	
5 10 15 20	
gga gat cta tgg atc tcg att caa ggg aaa gcc tat gat gtt tcg gat	150
Gly Asp Leu Trp Ile Ser Ile Gln Gly Lys Ala Tyr Asp Val Ser Asp	
25 30 35	
tgg gtg aaa gac cat cca ggt ggc agc ttt ccc ttg aag agt ctt gct	198
Trp Val Lys Asp His Pro Gly Gly Ser Phe Pro Leu Lys Ser Leu Ala	
40 45 50	
ggt caa gag gta act gat gca ttt gtt gca ttc cat cct gcc tct aca	246
Gly Gln Glu Val Thr Asp Ala Phe Val Ala Phe His Pro Ala Ser Thr	
55 60 65	
tgg aag aat ctt gat aag ttt ttc act ggg tat tat ctt aaa gat tac	294
Trp Lys Asn Leu Asp Lys Phe Phe Thr Gly Tyr Tyr Leu Lys Asp Tyr	
70 75 80	
tct gtt tct gag gtt tct aaa gat tat agg aag ctt gtg ttt gag ttt	342
Ser Val Ser Glu Val Ser Lys Asp Tyr Arg Lys Leu Val Phe Glu Phe	
85 90 95 100	
tct aaa atg ggt ttg tat gac aaa aaa ggt cat att atg ttt gca act	390
Ser Lys Met Gly Leu Tyr Asp Lys Lys Gly His Ile Met Phe Ala Thr	
105 110 115	
ttg tgc ttt ata gca atg ctg ttt gct atg agt gtt tat ggg gtt ttg	438
Leu Cys Phe Ile Ala Met Leu Phe Ala Met Ser Val Tyr Gly Val Leu	
120 125 130	
ttt tgt gag ggt gtt ttg gta cat ttg ttt tct ggg tgt ttg atg ggg	486
Phe Cys Glu Gly Val Leu Val His Leu Phe Ser Gly Cys Leu Met Gly	
135 140 145	
ttt ctt tgg att cag agt ggt tgg att gga cat gat gct ggg cat tat	534
Phe Leu Trp Ile Gln Ser Gly Trp Ile Gly His Asp Ala Gly His Tyr	
150 155 160	
atg gta gtg tct gat tca agg ctt aat aag ttt atg ggt att ttt gct	582

ES 2 398 603 T3

Met 165	Val	Val	Ser	Asp	Ser 170	Arg	Leu	Asn	Lys	Phe 175	Met	Gly	Ile	Phe	Ala 180	
gca Ala	aat Asn	tgt Cys	ctt Leu	tca Ser 185	gga Gly	ata Ile	agt Ser	att Ile	ggg Gly 190	tgg Trp	tgg Trp	aaa Lys	tgg Trp	aac Asn 195	cat His	630
aat Asn	gca Ala	cat His	cac His 200	att Ile	gcc Ala	tgt Cys	aat Asn 205	agc Ser	ctt Leu	gaa Glu	tat Tyr	gac Asp 210	cct Pro 210	gat Asp	tta Leu	678
caa Gln	tat Tyr	ata Ile 215	cca Pro	ttc Phe	ctt Leu	ggt Val	gtg Val 220	tct Ser	tcc Ser	aag Lys	ttt Phe	ttt Phe 225	ggg Gly	tca Ser	ctc Leu	726
acc Thr	tct Ser 230	cat His	ttc Phe	tat Tyr	gag Gln 235	aaa Lys	agg Arg	ttg Leu	act Thr	ttt Phe	gac Asp 240	tct Ser	tta Leu	tca Ser	aga Arg	774
ttc Phe 245	ttt Phe	gta Val	agt Ser	tat Tyr	caa Gln 250	cat His	tgg Trp	aca Thr	ttt Phe	tac Tyr 255	cct Pro	att Ile	atg Met	tgt Cys	gct Ala 260	822
gct Ala	agg Arg	ctc Leu	aat Asn 265	atg Met	tat Tyr	gta Val	caa Gln	tct Ser	ctc Leu 270	ata Ile	atg Met	ttg Leu	ttg Leu	acc Thr 275	aag Lys	870
aga Arg	aat Asn	gtg Val	tcc Ser 280	tat Tyr	cga Arg	gct Ala	cag Gln	gaa Glu 285	ctc Leu	ttg Leu	gga Gly	tgc Cys	cta Leu 290	gtg Val	ttc Phe	918
tcg Ser	att Ile	tgg Trp 295	tac Tyr	ccg Pro	ttg Leu	ctt Leu	ggt Val 300	tct Ser	tgt Cys	ttg Leu	cct Pro	aat Asn 305	tgg Trp	ggg Gly	gaa Glu	966
aga Arg	att Ile 310	atg Met	ttt Phe	ggt Val	att Ile	gca Ala 315	agt Ser	tta Leu	tca Ser	gtg Val	act Thr 320	gga Gly	atg Met	caa Gln	caa Gln	1014
ggt Val 325	cag Gln	ttc Phe	tcc Ser	ttg Leu	aac Asn 330	cac His	ttc Phe	tct Ser	tca Ser	agt Ser 335	ggt Val	tat Tyr	ggt Val	gga Gly 340	aag Lys	1062
cct Pro	aaa Lys	ggg Gly	aat Asn 345	aat Asn	tgg Trp	ttt Phe	gag Glu	aaa Lys	caa Gln 350	acg Thr	gat Asp	ggg Gly	aca Thr	ctt Leu 355	gac Asp	1110
att Ile	tct Ser	tgt Cys	cct Pro 360	cct Pro	tgg Trp	atg Met	gat Asp	tgg Trp 365	ttt Phe	cat His	ggg Gly	gga Gly	ttg Leu 370	caa Gln	ttc Phe	1158
caa Gln	att Ile	gag Glu 375	cat His	cat His	ttg Leu	ttt Phe	ccc Pro 380	aag Lys	atg Met	cct Pro	aga Arg	tgc Cys 385	aac Asn	ctt Leu	agg Arg	1206
aaa Lys	atc Ile 390	tcg Ser	ccc Pro	tac Tyr	gtg Val	atc Ile 395	gag Glu	tta Leu	tgc Cys	aag Lys	aaa Lys 400	cat His	aat Asn	ttg Leu	cct Pro	1254
tac Tyr 405	aat Asn	tat Tyr	gca Ala	tct Ser	ttc Phe 410	tcc Ser	aag Lys	gcc Ala	aat Asn	gaa Glu 415	atg Met	aca Thr	ctc Leu	aga Arg	aca Thr 420	1302
ttg Leu	agg Arg	aac Asn	aca Thr	gca Ala 425	ttg Leu	cag Gln	gct Ala	agg Arg	gat Asp 430	ata Ile	acc Thr	aag Lys	ccg Pro	ctc Leu 435	ccg Pro	1350
aag Lys	aat Asn	ttg Leu	gta Val	tgg Trp	gaa Glu	gct Ala	ctt Leu	cac His	act Thr	cat His	ggg Gly	taaaattacc			1396	

ES 2 398 603 T3

440 445
cttagttcat gtaataattt gagattatgt atctcctatg tttgtgtcctt gtcttggttc 1456
tacttggttg agtcattgca acttgccttt tatggtttat tagatgtttt ttaatatt 1516
ttagaggttt tgctttcatc tccattattg atgaataagg agttgcatat tgtcaattgt 1576
tgtgctcaat atctgatatt ttggaatgta cttgtacca cgtggttttc agttgaagct 1636
catgtgtact tctatagact ttgtttaaat ggttatgtca tgttattt 1684

<210> 2

<211> 448

5 <212> PRT

<213> Borago officinalis

<400> 2

ES 2 398 603 T3

Met Ala Ala Gln Ile Lys Lys Tyr Ile Thr Ser Asp Glu Leu Lys Asn
 1 5 10 15
 His Asp Lys Pro Gly Asp Leu Trp Ile Ser Ile Gln Gly Lys Ala Tyr
 20 25 30
 Asp Val Ser Asp Trp Val Lys Asp His Pro Gly Gly Ser Phe Pro Leu
 35 40 45
 Lys Ser Leu Ala Gly Gln Glu Val Thr Asp Ala Phe Val Ala Phe His
 50 55 60
 Pro Ala Ser Thr Trp Lys Asn Leu Asp Lys Phe Phe Thr Gly Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Leu Lys Asp Tyr Ser Val Ser Glu Val Ser Lys Asp Tyr Arg Lys Leu
 85 90 95
 Val Phe Glu Phe Ser Lys Met Gly Leu Tyr Asp Lys Lys Gly His Ile
 100 105 110
 Met Phe Ala Thr Leu Cys Phe Ile Ala Met Leu Phe Ala Met Ser Val
 115 120 125
 Tyr Gly Val Leu Phe Cys Glu Gly Val Leu Val His Leu Phe Ser Gly
 130 135 140
 Cys Leu Met Gly Phe Leu Trp Ile Gln Ser Gly Trp Ile Gly His Asp
 145 150 155 160
 Ala Gly His Tyr Met Val Val Ser Asp Ser Arg Leu Asn Lys Phe Met
 165 170 175
 Gly Ile Phe Ala Ala Asn Cys Leu Ser Gly Ile Ser Ile Gly Trp Trp
 180 185 190
 Lys Trp Asn His Asn Ala His His Ile Ala Cys Asn Ser Leu Glu Tyr

ES 2 398 603 T3

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

5 <222> (31..603

<400> 3

```

ttagccttta ctctatagtt ttagatagac atg gcg aat gtg gat cgt gat cgg      54
                               Met Ala Asn Val Asp Arg Asp Arg
                               1                               5

cgt gtc cat gta gac cgt act gac aaa cgt gtt cat cag cca aac tac      102
Arg Val His Val Asp Arg Thr Asp Lys Arg Val His Gln Pro Asn Tyr
 10                               15                               20

gaa gat gat gtc ggt ttt ggt ggc tat ggc ggt tat ggt gct ggt tct      150
Glu Asp Asp Val Gly Phe Gly Gly Tyr Gly Gly Tyr Gly Ala Gly Ser
25                               30                               35                               40

gat tat aag agt cgc ggc ccc tcc act aac caa atc ttg gca ctt ata      198
Asp Tyr Lys Ser Arg Gly Pro Ser Thr Asn Gln Ile Leu Ala Leu Ile
 45                               50                               55

gca gga gtt ccc att ggt ggc aca ctg cta acc cta gct gga ctc act      246
Ala Gly Val Pro Ile Gly Gly Thr Leu Leu Thr Leu Ala Gly Leu Thr
 60                               65                               70

cta gcc ggt tcg gtg atc ggc ttg cta gtc tcc ata ccc ctc ttc ctc      294
Leu Ala Gly Ser Val Ile Gly Leu Leu Val Ser Ile Pro Leu Phe Leu
 75                               80                               85

ctc ttc agt ccg gtg ata gtc ccg gcg gct ctc act att ggg ctt gct      342
Leu Phe Ser Pro Val Ile Val Pro Ala Ala Leu Thr Ile Gly Leu Ala
 90                               95                               100

gtg acg gga atc ttg gct tct ggt ttg ttt ggg ttg acg ggt ctg agc      390
Val Thr Gly Ile Leu Ala Ser Gly Leu Phe Gly Leu Thr Gly Leu Ser
105                               110                               115                               120

tcg gtc tcg tgg gtc ctc aac tac ctc cgt ggg acg agt gat aca gtg      438
Ser Val Ser Trp Val Leu Asn Tyr Leu Arg Gly Thr Ser Asp Thr Val
125                               130                               135

cca gag caa ttg gac tac gct aaa cgg cgt atg gct gat gcg gta ggc      486
Pro Glu Gln Leu Asp Tyr Ala Lys Arg Arg Met Ala Asp Ala Val Gly
140                               145                               150

tat gct ggt atg aag gga aaa gag atg ggt cag tat gtg caa gat aag      534
Tyr Ala Gly Met Lys Gly Lys Glu Met Gly Gln Tyr Val Gln Asp Lys
155                               160                               165

gct cat gag gct cgt gag act gag ttc atg act gag acc cat gag ccg      582
Ala His Glu Ala Arg Glu Thr Glu Phe Met Thr Glu Thr His Glu Pro
170                               175                               180

ggt aag gcc agg aga ggc tca taagctaata taaattgcgg gagtcagttg      633
Gly Lys Ala Arg Arg Gly Ser
185                               190

gaaacgcgat aaatgtagtt ttacttttat gtcccagttt ctttcctctt ttaagaatat      693

ctttgtctat atatgtgttc gttcgttttg tcttgtccaa ataaaaatcc ttgttagtga      753

aataagaat gaaataaata tgttttcttt tttgagataa ccagaaatct catactattt      813

tctaaaaaaa aaaaaaaaaa a                                             834

```

ES 2 398 603 T3

<210> 4

<211> 191

<212> PRT

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 4

```

Met Ala Asn Val Asp Arg Asp Arg Arg Val His Val Asp Arg Thr Asp
 1          5          10
Lys Arg Val His Gln Pro Asn Tyr Glu Asp Asp Val Gly Phe Gly Gly
          20          25          30
Tyr Gly Gly Tyr Gly Ala Gly Ser Asp Tyr Lys Ser Arg Gly Pro Ser
          35          40          45
Thr Asn Gln Ile Leu Ala Leu Ile Ala Gly Val Pro Ile Gly Gly Thr
          50          55          60
Leu Leu Thr Leu Ala Gly Leu Thr Leu Ala Gly Ser Val Ile Gly Leu
65          70          75          80
Leu Val Ser Ile Pro Leu Phe Leu Leu Phe Ser Pro Val Ile Val Pro
          85          90          95
Ala Ala Leu Thr Ile Gly Leu Ala Val Thr Gly Ile Leu Ala Ser Gly
          100          105          110
Leu Phe Gly Leu Thr Gly Leu Ser Ser Val Ser Trp Val Leu Asn Tyr
          115          120          125
Leu Arg Gly Thr Ser Asp Thr Val Pro Glu Gln Leu Asp Tyr Ala Lys
          130          135          140
Arg Arg Met Ala Asp Ala Val Gly Tyr Ala Gly Met Lys Gly Lys Glu
145          150          155          160
Met Gly Gln Tyr Val Gln Asp Lys Ala His Glu Ala Arg Glu Thr Glu
          165          170          175
Phe Met Thr Glu Thr His Glu Pro Gly Lys Ala Arg Arg Gly Ser
          180          185          190

```

10

<210> 5

<211> 191

<212> PRT

ES 2 398 603 T3

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 5

Met Ala Asn Val Asp Arg Asp Arg Arg Val His Val Asp Arg Thr Asp
 1 5 10 15
 Lys Arg Val His Gln Pro Asn Tyr Glu Asp Asp Val Gly Phe Gly Gly
 20 25 30
 Thr Gly Gly Thr Gly Ala Gly Ser Asp Tyr Lys Ser Arg Gly Pro Ser
 35 40 45
 Thr Asn Gln Ile Leu Ala Leu Ile Ala Gly Val Pro Ile Gly Gly Thr
 50 55 60
 Leu Ile Thr Leu Ala Gly Leu Thr Leu Ala Gly Ser Val Ile Gly Leu
 65 70 75 80
 Leu Val Ser Ile Pro Leu Phe Leu Ile Phe Ser Pro Val Ile Val Pro
 85 90 95
 Ala Ala Leu Thr Ile Gly Leu Ala Val Thr Gly Ile Leu Ala Ser Gly
 100 105 110
 Leu Phe Gly Leu Thr Gly Leu Ser Ser Val Ser Trp Val Leu Asn Tyr
 115 120 125
 Leu Arg Gly Thr Ser Asp Thr Val Pro Glu Gln Leu Asp Tyr Ala Lys
 130 135 140
 Arg Arg Met Ala Asp Ala Val Gly Tyr Ala Gly Met Lys Gly Lys Glu
 145 150 155 160
 Met Gly Gln Tyr Val Gln Asp Lys Ala His Glu Ala Arg Glu Thr Glu
 165 170 175
 Phe Met Thr Glu Thr His Glu Pro Gly Lys Ala Arg Arg Gly Pro
 180 185 190

5

<210> 6

<211> 191

<212> PRT

10 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 6

ES 2 398 603 T3

Met Ala Asn Val Asp Arg Asp Arg Arg Val His Val Asp Arg Thr Asp
 1 5 10 15

Lys Arg Val His Gln Pro Asn Tyr Glu Asp Asp Val Gly Phe Gly Gly
 20 25 30

Thr Gly Gly Thr Gly Ala Gly Ser Asp Tyr Lys Ser Arg Gly Pro Ser
 35 40 45

Thr Asn Gln Ile Leu Ala Leu Ile Ala Gly Val Pro Ile Gly Gly Thr
 50 55 60

Leu Ile Thr Leu Ala Gly Leu Thr Leu Ala Gly Ser Val Ile Gly Leu
 65 70 75 80

Leu Val Ser Ile Pro Leu Phe Leu Ile Phe Ser Pro Val Ile Val Pro
 85 90 95

Ala Ala Leu Thr Ile Gly Leu Ala Val Thr Gly Ile Leu Ala Ser Gly
 100 105 110

Leu Phe Gly Leu Thr Gly Leu Ser Ser Val Ser Trp Val Leu Asn Tyr
 115 120 125

Leu Arg Gly Thr Ser Asp Thr Val Pro Glu Gln Leu Asp Tyr Ala Lys
 130 135 140

Arg Arg Met Ala Asp Ala Val Gly Tyr Ala Gly Met Lys Gly Lys Glu
 145 150 155 160

Met Gly Gln Tyr Val Gln Asp Lys Ala His Glu Ala Arg Glu Thr Glu
 165 170 175

Phe Met Thr Glu Thr His Glu Pro Gly Lys Ala Arg Arg Gly Pro
 180 185 190

- 5 <210> 7
- <211> 78
- <212> PRT
- <213> Arabidopsis thaliana

- 10 <400> 7

ES 2 398 603 T3

Phe Gly Leu Thr Gly Leu Ser Ser Val Ser Trp Val Leu Gln Leu Pro
1 5 10 15

Pro Trp Ala Ser Asp Thr Val Pro Glu Gln Val Asp Tyr Ala Lys Arg
20 25 30

Arg Met Ala Asp Ala Val Gly Tyr Ala Gly Met Lys Gly Lys Glu Met
35 40 45

Gly Gln Tyr Val Gln Asp Lys Ala His Glu Ala Arg Glu Thr Glu Phe
50 55 60

Met Thr Glu Thr His Glu Pro Gly Lys Ala Arg Arg Gly Ser
65 70 75

<210> 8

5 <211> 173

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 8

10

ES 2 398 603 T3

Met Ala Asp Thr Ala Arg Gly Thr His His Asp Ile Ile Gly Arg Asp
 1 5 10 15

Gln Tyr Pro Met Met Gly Arg Asp Arg Asp Gln Tyr Gln Met Ser Gly
 20 25 30

Arg Gly Ser Asp Tyr Ser Lys Ser Arg Gln Ile Ala Lys Ala Ala Thr
 35 40 45

Ala Val Thr Ala Gly Gly Ser Leu Leu Val Leu Ser Ser Leu Thr Leu
 50 55 60

Val Gly Thr Val Ile Ala Leu Thr Val Ala Thr Pro Leu Leu Val Ile
 65 70 75 80

Phe Ser Pro Ile Leu Val Pro Ala Leu Ile Thr Val Ala Leu Leu Ile
 85 90 95

Thr Gly Phe Leu Ser Ser Gly Gly Phe Gly Ile Ala Ala Ile Thr Val
 100 105 110

Phe Ser Trp Ile Tyr Lys Tyr Ala Thr Gly Glu His Pro Gln Gly Ser
 115 120 125

Asp Lys Leu Asp Ser Ala Arg Met Lys Leu Gly Ser Lys Ala Gln Asp
 130 135 140

Leu Lys Asp Arg Ala Gln Tyr Tyr Gly Gln Gln His Thr Gly Gly Glu
 145 150 155 160

His Asp Arg Asp Arg Thr Arg Gly Gly Gln His Thr Thr
 165 170

- 5 <210> 9
- <211> 141
- <212> PRT
- <213> Arabidopsis thaliana

- 10 <400> 9

ES 2 398 603 T3

Met Ala Asp Gln Thr Arg Thr His His Glu Met Ile Ser Arg Asp Ser
 1 5 10 15
 Thr Gln Glu Ala His Pro Lys Ala Arg Gln Met Val Lys Ala Ala Thr
 20 25 30
 Ala Val Thr Ala Gly Gly Ser Leu Leu Val Leu Ser Gly Leu Thr Leu
 35 40 45
 Ala Gly Thr Val Ile Ala Leu Thr Val Ala Thr Pro Leu Leu Val Ile
 50 55 60
 Phe Ser Pro Val Leu Val Pro Ala Val Val Thr Val Ala Leu Ile Ile
 65 70 75 80
 Thr Gly Phe Leu Ala Ser Gly Gly Phe Gly Ile Ala Ala Ile Thr Ala
 85 90 95
 Phe Ser Trp Leu Tyr Arg His Met Thr Gly Ser Gly Ser Asp Lys Ile
 100 105 110
 Glu Asn Ala Arg Met Lys Val Gly Ser Arg Val Gln Asp Thr Lys Tyr

115

120

125

Gly Gln His Asn Ile Gly Val Gln His Gln Gln Val Ser
 130 135 140

<210> 10

5 <211> 199

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 10

10

ES 2 398 603 T3

Met Ala Asp Thr His Arg Val Asp Arg Thr Asp Arg His Phe Gln Phe
 1 5 10 15

Gln Ser Pro Tyr Glu Gly Gly Arg Gly Gln Gly Gln Tyr Glu Gly Asp
 20 25 30

Arg Gly Tyr Gly Gly Gly Gly Tyr Lys Ser Met Met Pro Glu Ser Gly
 35 40 45

Pro Ser Ser Thr Gln Val Leu Ser Leu Leu Ile Gly Val Pro Val Val
 50 55 60

Gly Ser Leu Leu Ala Ile Ala Gly Leu Leu Leu Ala Gly Ser Val Ile
 65 70 75 80

Gly Ile Met Val Ala Leu Pro Leu Phe Leu Ile Phe Ser Pro Val Ile
 85 90 95

Val Pro Ala Gly Ile Thr Ile Gly Leu Ala Met Thr Gly Phe Ile Ala
 100 105 110

Ser Gly Met Phe Gly Leu Thr Gly Leu Ser Ser Ile Ser Trp Val Met
 115 120 125

Asn Tyr Leu Arg Gly Thr Lys Arg Thr Val Pro Glu Gln Leu Glu Tyr
 130 135 140

Ala Lys Arg Arg Met Ala Asp Ala Val Gly Tyr Ala Gly Gln Lys Gly
 145 150 155 160

Lys Glu Met Gly Gln His Val Gln Asn Lys Ala Gln Asp Val Lys Gln
 165 170 175

Tyr Asp Ile Ser Lys Pro His Asp Thr Thr Thr Lys Gly His Glu Thr
 180 185 190

Gln Gly Gly Thr Thr Ala Ala
 195

<210> 11

5 <211> 199

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 11

ES 2 398 603 T3

Met Ala Asp Thr His Arg Val Asp Arg Thr Asp Arg His Phe Gln Phe
 1 5 10 15

Gln Ser Pro Tyr Glu Gly Gly Arg Gly Gln Gly Gln Tyr Glu Gly Asp
 20 25 30

Arg Gly Tyr Gly Gly Gly Gly Tyr Lys Ser Met Met Pro Glu Ser Gly
 35 40 45

Pro Ser Ser Thr Gln Val Leu Ser Leu Leu Ile Gly Val Pro Val Val
 50 55 60

Gly Ser Leu Ile Ala Ile Ala Gly Leu Leu Leu Ala Gly Ser Val Ile
 65 70 75 80

Gly Leu Met Val Ala Leu Pro Ile Phe Leu Ile Phe Ser Pro Val Ile
 85 90 95

Val Pro Ala Ala Leu Thr Ile Gly Leu Ala Met Thr Gly Phe Leu Ala
 100 105 110

Ser Gly Met Phe Gly Leu Thr Gly Leu Ser Ser Ile Ser Trp Val Met
 115 120 125

Asn Tyr Leu Arg Gly Thr Arg Arg Thr Val Pro Glu Gln Leu Glu Tyr
 130 135 140

Ala Lys Arg Arg Met Ala Asp Ala Val Gly Tyr Ala Gly Gln Lys Gly
 145 150 155 160

Lys Glu Met Gly Gln His Val Gln Asn Lys Ala Gln Asp Val Lys Gln
 165 170 175

Tyr Asp Ile Ser Lys Pro His Asp Thr Thr Thr Lys Gly His Glu Thr
 180 185 190

Gln Gly Arg Thr Thr Ala Ala
 195

<210> 12

5 <211> 1267

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 12

ES 2 398 603 T3

gagctcgatc acacaaagaa aacgtcaaat ggatcatact gggcccattt tgcagaccaa 60
gagaaagtga gagagagttg tcctctcggt atcaagtaac agtagaccac cactaaaccg 120
ccaatagctt ataatcaaaa tagaaagggtc taataacaga aacaaatgaa aaagccttgt 180
tccatggact gcctacccga attgattgat tcgactagtt tttcttctc tttgattaag 240

acctccgtaa gaaaaatggt actactaaag ccaactcgcta ccaaaactaa accattccag 300
actgtaactg gaccaatatt tctaaactgt aaccagatct caaacatata aactaattaa 360
gaactataac cattaaccgt aaaaataaat ttactacagt aaaaaattat actaatttca 420
gctatgatgg aatttcagct cttagagtt gtggaaatca agtaaaccta aaatccta 480
aatattcttc atccttattt ttgtttcaca tgcattgctgt ccaatctggt attagcattt 540
gaaagcctaa aattctatat acagtacaat aaatctaatt aattttcatt actaataaaa 600
tgcttcatat atactcttgt atttataaat catccgttat cgttactata cttttataca 660
tcacctaca ttcataccta agctagcaaa gcaaactact aaaagggtcg tcaacgcaag 720
ttatttgcta gttgggtgcat actacacacg gctacggcaa cattaagtaa cacattaaga 780
gggtgttttct taatgtagta tggtaattat atttatttca aaacttggat tagatataaa 840
ggtacaggta gatgaaaaat atttggttag cgggttgaga ttaagcggat ataggaggca 900
tatatacagc tgtgagaaga agagggataa atacaaaaag ggaaggatgt ttttgccgac 960
agagaaagggt agattaagta ggcattcgaga ggagagcaat tgtaaaatgg atgatttggt 1020
tggttttgta cgggtggagag aagaacgaaa agatgatcag gtaaaaaatg aaacttggaa 1080
atcatgcaaa gccacacctc tcccttcaac acagtcttac gtgtcgtctt ctcttcactc 1140
catatctcct ttttattacc aagaaatata tgtcaatccc atttatatgt acgttctctt 1200
agacttatct ctatataccc ccttttaatt tgtgtgctct tagcctttac tctatagttt 1260
tagatag 1267

<210> 13

5 <211> 2

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> cebador

<400> 13

gtaatacgac tcactatagg gc 22

15 <210> 14

<211> 32

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> cebador

<400> 14

ggggatccta tactaaaact atagagtaaa gg 32

10 <210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220>

15 <223> péptido

<400> 15

Trp Ile Gly His Asp Ala Gly His
1 5

<210> 16

20 <211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> péptido

<400> 16

Asn Val Gly His Asp Ala Asn His
1 5

<210> 17

30 <211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 17

Val Leu Gly His Asp Cys Gly His
1 5

5

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> péptido

<400> 18

Val Ile Ala His Glu Cys Gly His
1 5

15

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>.

<223> péptido

25 <400> 19

Val Ile Gly His Asp Cys Ala His
1 5

<210> 20

30 <211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

5

<400> 23

His Arg Thr His His
1 5

<210> 24

10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15

<223> péptido

<400> 24

His Arg Arg His His
1 5

20

<210> 25

<211>5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25

<223> péptido

<400> 25

His Asp Arg His His
1 5

30

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

5

<400> 26

His Asp Gln His His
1 5

10 <210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> péptido

<400> 27

His Asp His His His
1 5

20

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> péptido

<400> 28

His Asn His His His
1 5

30

<210> 29

<211>6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> péptido

<400> 29

Phe Gln Ile Glu His His
1 5

10

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> péptido

<400> 30

20

His Gln Val Thr His His
1 5

<210> 31

<211> 5

25 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

30

<400> 31

His Val Ile His His
1 5

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

10 <400> 32

His Val Ala His His
1 5

<210> 33

<211>5

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

20

<400> 33

His Ile Pro His His
1 5

<210> 34

25 <211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> péptido

<400> 34

His Val Pro His His
1 . 5

<210> 35

<211> 1943

5 <212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 35

ES 2 398 603 T3

gagctcgatc acacaaagaa aacgtcaaat ggatcatact gggcccattt tgcagaccaa 60
 gagaaagtga gagagagttg tcctctcggt atcaagtaac agtagaccac cactaaaccg 120
 ccaatagctt ataatacaaaa tagaaaggct taataacaga aacaaatgaa aaagccttgt 180
 tccatggact gcctaccgga attgattgat tgcactagtt tttcttcttc tttgattaag 240
 acctccgtaa gaaaaatggg actactaaag ccactcgcta ccaaaactaa accattccag 300
 actgtaactg gaccaatatt tctaaactgt aaccagatct caaacatata aactaattaa 360
 gaactataac cattaaccgt aaaaataaat ttactacagt aaaaaattat actaatttca 420
 gctatgatgg aatttcagct cttaagagtt gtggaaatca agtaaacctt aaatcctaata 480
 aatattcttc atccttattt ttgtttcaca tgcattgctgt ccaatctgtt attagcattt 540
 gaaagcctaa aattctatat acagtacaat aatctaat aattttcatt actaataaaa 600
 tgcttcatat atactcttgt atttataaat catccgttat cgttactata cctttataca 660
 tcacctaca ttcataccta agctagcaaa gcaaactact aaaagggctc tcaacgcaag 720
 ttatttgcta gttggtgcat actacacacg gctacggcaa cattaagtaa cacattaaga 780
 ggtgttttct taatgtagta tggttaattat atttatttca aaacttggat tagatataaaa 840
 ggtacaggta gatgaaaaat atttggttag cgggttgaga ttaagcggat ataggaggca 900
 tatatacagc tgtgagaaga agagggataa atacaaaaag ggaaggatgt ttttgccgac 960
 agagaaagggt agattaagta ggcacgcaga ggagagcaat tgtaaatgg atgatttgtt 1020
 tggttttgta cgggtggagag aagaacgaaa agatgatcag gtaaaaaatg aaacttggaa 1080
 atcatgcaaa gccacacctc tcccttcaac acagtcttac gtgtcgtctt ctcttcactc 1140
 catatctcct ttttattacc aagaaatata tgtcaatccc atttatatgt acgttctctt 1200
 agacttatct ctatataccc ccttttaatt tgtgtgctct tagcctttac tctatagttt 1260
 tagatagaca tggcgaatgt ggatcgtgat cggcgtgtgc atgtagaccg tactgacaaa 1320
 cgtgttcac agccaaacta cgaagatgat gtcggttttg gtggctatgg cggttatggt 1380
 gctggttctg attataagag tcgcgccccc tccactaacc aagtattttt gtggtctctt 1440
 tagtttttct tgtgttttcc tatgatcacg ctctccaaac tatttgaaga ttttctgtaa 1500
 attcatttta aacagaaaga taaataaaat agtgaagaac cataggaatc gtacgttacg 1560
 ttaattattt ccttttagtt ctttaagtcct aattaggatt cctttaaaag ttgcaacaat 1620
 ctaattgttc acaaaatgag taaagtttga aacagatttt tatacaccac ttgcatatgt 1680
 ttatcatggt gatgcatgct tgtagataa actcgatata atcaatacat gcagatcttg 1740
 gcacttatag caggagtcc cattggtggc aactgctaa ccctagctgg actcactcta 1800
 gccggttcgg tgatcggctt gctagtctcc ataccctct tctctctctt cagtccggtg 1860
 atagtcccgg cggctctcac tattgggctt gctgtgacgg gaatcttggc ttctggtttg 1920
 tttgggttga cgggtctgag ctc 1943

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico aislado que codifica una región reguladora 5' de oleosina que dirige la expresión específica de semillas que consiste en la secuencia de nucleótidos representada en la SEC ID N°:12.
- 5 2. Un casete de expresión que comprende la región reguladora 5' de oleosina de la reivindicación 1 unido operativamente a al menos uno entre un ácido nucleico que codifica un gen heterólogo o un ácido nucleico que codifica una secuencia complementaria a un gen vegetal nativo.
3. El casete de expresión de la reivindicación 2 en el que el gen heterólogo es al menos uno de un gen de la síntesis de ácidos grasos o un gen del metabolismo de lípidos.
- 10 4. El casete de expresión de la reivindicación 3 en el que el gen heterólogo se selecciona del grupo que consiste en un gen de acetil-coA carboxilasa, un gen de cetoacil sintasa, un gen de malonil transacilasa, un gen de lípido desaturasa, un gen de proteína transportadora de acilos (ACP), un gen de tioesterasa, un gen de acetil transacilasa o un gen de elongasa.
5. El casete de expresión de la reivindicación 4 en el que el gen de lípido desaturasa se selecciona del grupo que consiste en un gen de $\Delta 12$ -desaturasa y un gen de $\Delta 15$ -desaturasa.
- 15 6. Un vector de expresión que comprende el casete de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5.
7. Una célula que comprende el casete de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5.
8. Una célula que comprende el vector de expresión de la reivindicación 6.
9. La célula de la reivindicación 7 u 8 en la que dicha célula es una célula bacteriana o una célula vegetal.
10. Una planta transgénica que comprende el casete de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5.
- 20 11. Una planta transgénica que comprende el vector de expresión de la reivindicación 6.
12. La planta de la reivindicación 10 u 11 en la que dicha planta es al menos una de entre una planta de girasol, soja, maíz, algodón, tabaco, cacahuete, colza o Arabidopsis.
13. Progenie de la planta de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 **caracterizada porque** comprende el casete de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 o el vector de la reivindicación 6.
- 25 14. Semilla de la planta de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 **caracterizada porque** comprende el casete de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 o el vector de la reivindicación 6.
15. Un procedimiento de producción de una planta con niveles aumentados de un producto de un gen de la síntesis de ácidos grasos o un gen del metabolismo de lípidos que comprende:
 - 30 (a) transformar una célula vegetal con un vector de expresión que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 1 unido operativamente a al menos uno de entre un ácido nucleico aislado que codifica un gen de la síntesis de ácidos grasos o un gen del metabolismo de lípidos; y
 - (b) regenerar una planta con niveles aumentados del producto de dicho gen de la síntesis de ácidos grasos o dicho gen del metabolismo de lípidos a partir de dicha célula vegetal.
- 35 16. El procedimiento de la reivindicación 15 en el que dicho gen de la síntesis de ácidos grasos o dicho gen del metabolismo de lípidos es al menos uno de entre un gen de lípido desaturase, un gen de proteína transportadora de acilos (ACP), un gen de tioesterasa, un gen de elongasa, un gen de acetil transacilasa, un gen de acetil-coA-carboxilasa, un gen de cetoacil sintasa o un gen de malonil transacilasa.
17. Un procedimiento de producción reducida de un gen de la síntesis de ácido graso o del metabolismo de lípidos en una planta que comprende:
 - 40 (a) transformar una célula vegetal con un vector de expresión que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 1 unido operativamente a una secuencia de ácidos nucleicos complementaria a un gen de la síntesis de ácidos grasos o del metabolismo de lípidos; y
 - (b) regenerar una planta con producción reducida de dicho gen de la síntesis de ácidos grasos o de dicho gen del metabolismo de lípidos.
- 45 18. Un procedimiento de cosupresión de un gen nativo de la síntesis de ácidos grasos o del metabolismo de lípidos en una planta que comprende:
 - (a) transformar una célula de la planta con un vector de expresión que comprende el ácido nucleico aislado

de la reivindicación 1 unido operativamente a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un gen de la síntesis de ácidos grasos o del metabolismo de lípidos nativo de la planta; y

(b) regenerar una planta con producción reducida de dicho gen de la síntesis de ácidos grasos o de dicho gen del metabolismo de lípidos.

FIG.1A

2 ata tct gcc tac cct ccc aaa gag agt agt cat ttt tca tca atg gct gct caa atc aag
M A A Q I K

62 aaa tac att acc tca gat gaa ctc aag aac cac gat aaa ccc gga gat cta tgg atc tcg
K Y I T S D E L K N H D K P G D L W I S

122 att caa ggg aaa gcc tat gat gtt tcg gat tgg gtg aak gac cat cca ggt ggc agc ttt
I Q G K A Y D V S D W V K D H P C G S F

182 ccc ttg aag agt ctt gct ggt caa gag gta act gat gca ttt gtt gca ttc cat cct gcc
P K S L A G Q E Y T D A F V A F H P A

242 tct aca tgg aag aat ctt gat aag ttt ttc act ggg tat tat ctt aaa gat tac tct gtt
S T W K N L D K F F T I G Y L K D Y S V

302 tct gag gtt tct aaa gat tat agg aag ctt gtg ttt gag ttt tct aaa atg ggt ttg tat
S E V S K D Y R K L V F E F S K M G L Y

362 gac aaa aaa ggt cat att atg ttt gca act ttg tgc ttt ata gca atg ctg ttt gct atg
D K K G H I M F A T L C F I A M L F A M

FIG.1B

422 agt gtt tat ggg gtt ttg ttt tgt gag ggt gtt ttg gta cat ttg ttt tct ggg tgt ttg
 S V Y G V L F C E G V L V H L F S G C L

482 atg ggg ttt ctt tgg att cag agt ggt tgg att gga cat gat gct ggg cat tat atg gta
 M G F L W I Q S G W I G H D A G H Y M V

542 tct gat tca agg ctt aat aag ttt atg ggt att ttt gct gca aat tgt ctt tca gga
 V S D S R L N K F M G I F A A N C L S G

602 ata agt att ggt tgg tgg aaa tgg aac cat aat gca cat cac att gcc tgt aat agc ctt
 I S I G W W R K W N H N A H H I A C N S L

662 gaa tat gac cct gat tta caa tat ata cca ttc ctt gtt gtg tct tcc aag ttt ttt ggt
 E Y D P D L Q Y I P F L V V S S K F F G

722 tca ctc acc tct cat ttc tat gag aaa agg ttg act ttt gac tct tta tca aga ttc ttt
 S L T S H F Y E K R L T F D S L S R F F

FIG.1C

782
gta agt tat caa cat tgg aca ttt tac cct att atg tgt gct agg ctc aat atg tat
v s y q h w t f y p i m c a a r l n m y

842
gta caa tct ctc ata atg ttg acc aag aga aat gtg tcc tat cga gct cag gaa ctc
v q s l i m l l t k r n v s y r a q e l

902
ttg gga tgc cta gtg ttc tgc att tgg tac cgg ttg ctt gtt tct tgt ttg cct aat tgg
l g c l v f s i w y p l l v s c l p n w

962
ggt gaa aga att atg ttt gtt att gea agt tta tca gtg act gga atg caa caa gtt cag
g e r i m f v i a s l s v t g m q q v q

1022
ttc tcc ttg aac cac ttc tct tca agt gtt tat gtt gga aag cct aaa ggg aat aat tgg
f s l n h f s s tca agt gtt tat gtt gga aag cct aaa ggg aat aat tgg

1082
ttt gag aaa caa acg gat ggg aca ctt gac att tct tgt cct cct tgg atg gat tgg ttt
f e k q t d g t l d i s c p p w m d w f

FIG.1D

1142 cat ggt gga ttg caa ttc caa att gag cat cat ttg ttt ccc aag atg cct aga tgc aac
H G G L Q F Q I E H H L F P R M P R C N

1202 ctt agg aaa atc tcc ccc tac gtg atc gag tta tgc aag aaa cat aat ttg cct tac aat
L R K I S P Y V I E L C K H N L P Y N

1262 tat gca tct ttc tcc aag gcc aat gaa atg aca ctc aga aca ttg agg aac aca gca ttg
Y A S F S K A N E M T L R T L R N T A L

1322 cag gct agg gat ata acc aag ccg ctc ccg aag aat ttg gta tgg gaa gct ctt cac act
Q A R D I T K P L P K N L V W E A L H T

1382 cat ggt taa aat tac cct tag ttc atg taa taa ttt gag att atg tat ctc cta tgt ttg
H G *

1442 tgt ctt gtc ttg gtt cta ctt gtt gga gtc att gca act tgt ctt tta tgg ttt att aga

1502 tgt ttt tta ata tat ttt aga ggt ttt gct ttc atc tcc att att gat gaa taa gga gtt

FIG.1E

1562
gca tat tgt caa ttg tgc tca ata tot gat att ttg gaa tgt act ttg tac cac tgt
1622
gtt ttc agt tga agc tca tgt gta ctt cta tag act ttg ttt aaa tga tta tgt cat gtt
1682
att t

FIG. 2

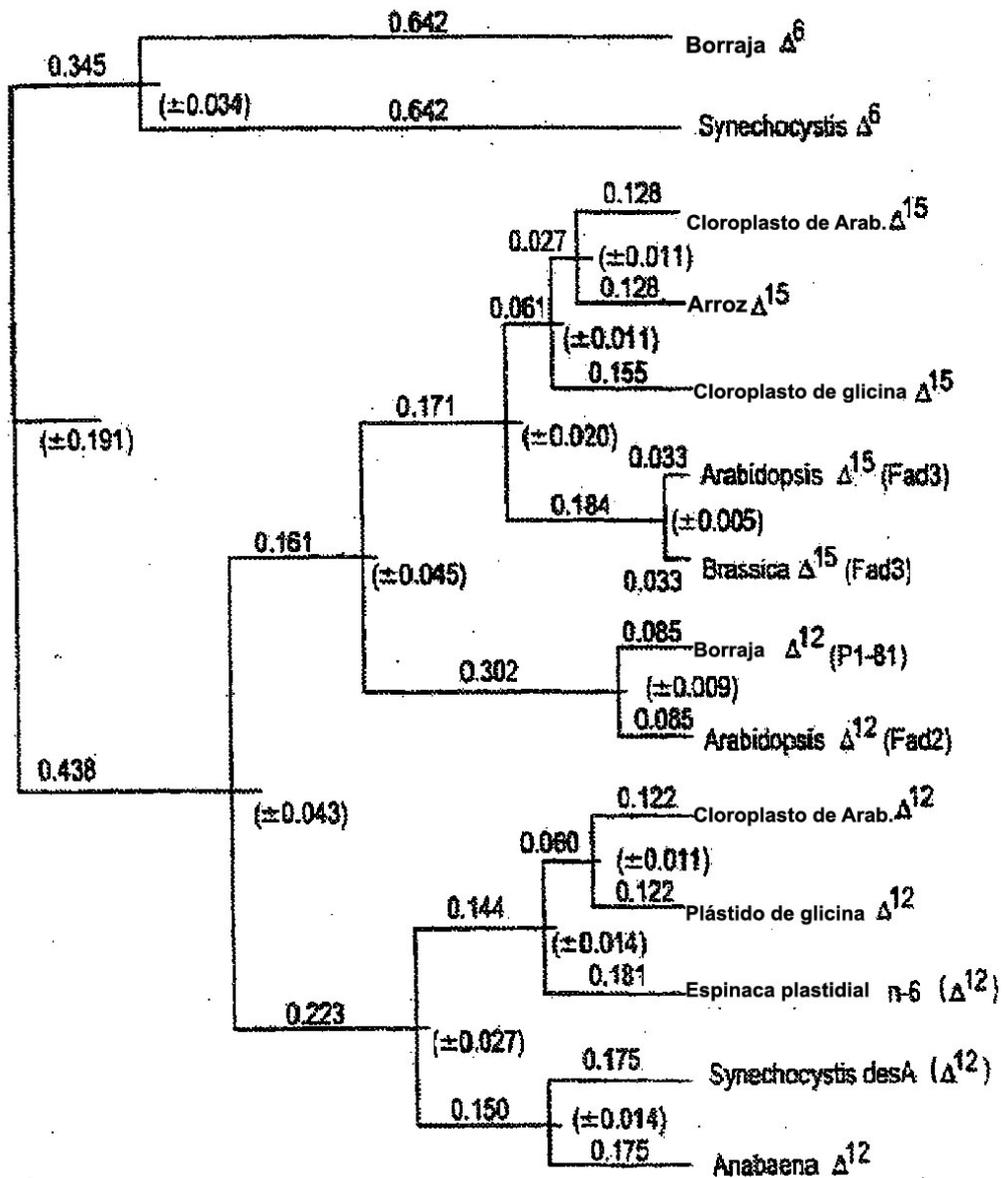


FIG. 3A

FIG. 3B

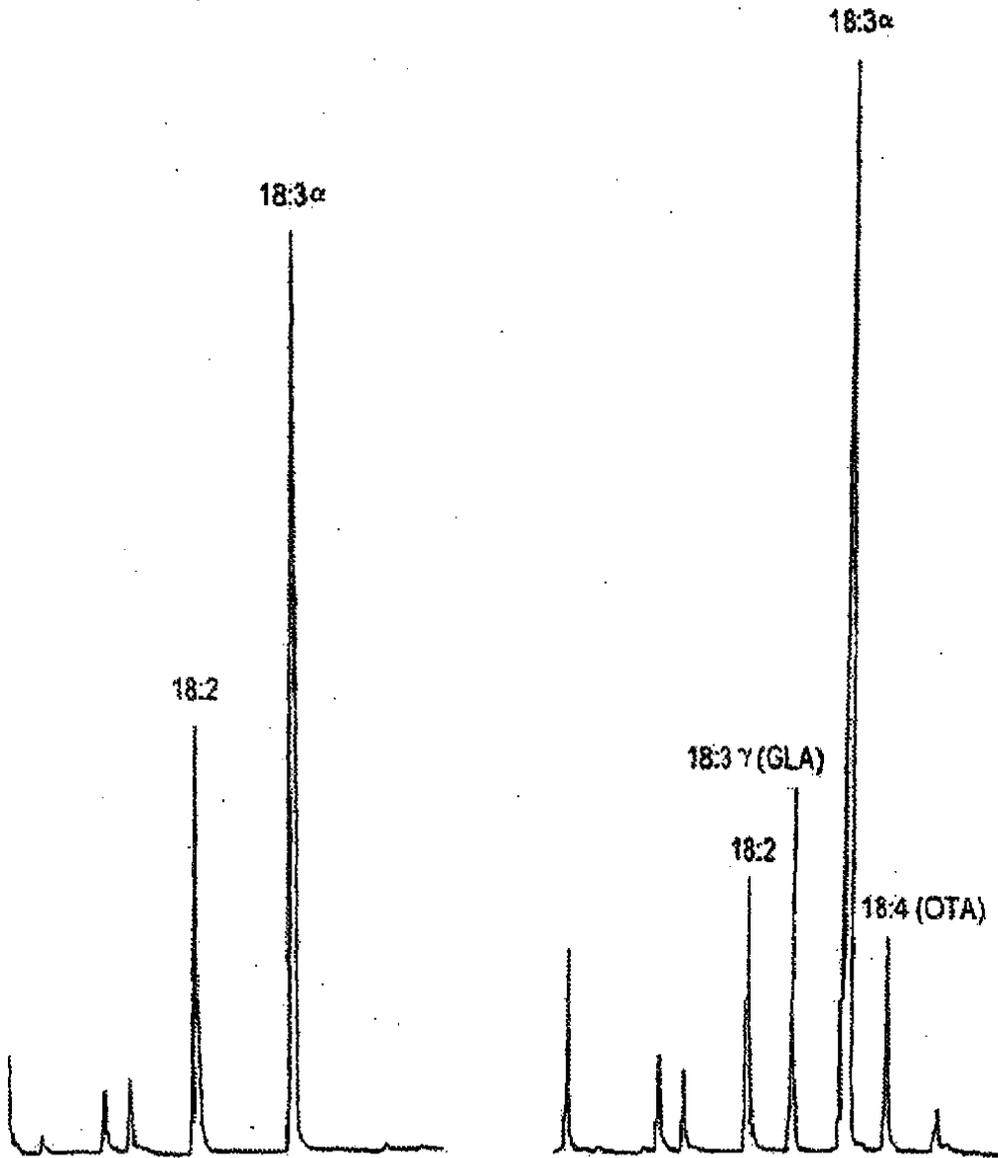


FIG.4

```

1   tta gcc ttt act cta tag ttt tag ata gac atg gcg aat gtg gat cgt gat cgg cgt gtg
1   M A N V D R R D R R V
61  cat gta gac cgt act gac aaa cgt gtt cat cag cca aac tac gaa gat gat gtc ggt ttt
11  H V D R T D K R V H Q P N Y E D D V G F
121 ggt ggc tat ggc ggt tat ggt gct ggt tct gat tat aag agt cgc ggc ccc tcc act aac
31  G G Y G G A G S D Y K S R G P S T N
181 caa atc ttg gca ctt ata gca gga gtt ccc att ggt ggc aca ctg cta acc cta gct gga
51  Q I L A L I A G V P I G G T L L T L A G
241 ctc act cta gcc ggt tgc gtg atc ggc ttg cta gtc tcc ata ccc ctc ttc ctc ctc ttc
71  L T L A G S V I G L V S I P L F L L F
301 agt ccg gtg ata gtc ccg gcg gct ctc act att ggg ctt gct gtg acg gga atc ttg gct
91  S P V I V P A A L T I G L A V T G I L A
361 tct ggt ttg ttt ggg ttg acg ggt ctg agc tgg gtc tgc tgg gtc ctc aac tac ctc cgt
111 S G L F G L T G L S S V S W V L N Y L R
421 ggg acg agt gat aca gtg cca gag caa ttg gac tac gct aaa cgg cgt atg gct gat gcg
131 G T S D T V P E Q L D Y A K R R M A D A
481 gta ggc tat gct ggt atg aag gga aaa gag atg ggt cag tat gtg caa gat aag gct cat
151 V G Y A G M K G K E M G Q Y V Q D K A H
541 gag gct cgt gag act gag ttc atg act gag acc cat gag ccg ggt aag gcc agg aga ggc
171 E A R E T E F M T E T H E P G K A R R G
601 tca taa gct aat ata aat tgc ggg agt cag ttg gaa acg cga taa atg tag ttt tac ttt
191 S *
661 tat gtc cca gtt tct ttc ctc ttt taa gaa tat ctt tgt cta tat atg tgt tgc ttc gtt
721 ttg tct tgt cca aat aaa aat cct tgt tag tga aat aag aaa tga aat aaa tat gtt ttc
781 ttt ttt gag ata acc aga aat ctc ata ttt tct aaa aaa aat aaa aat aaa aat

```

FIG.5

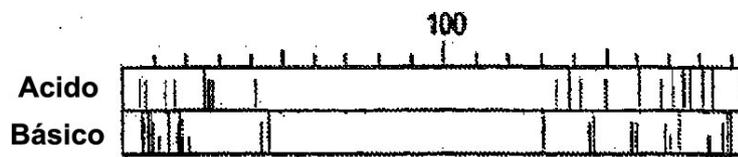


FIG.6

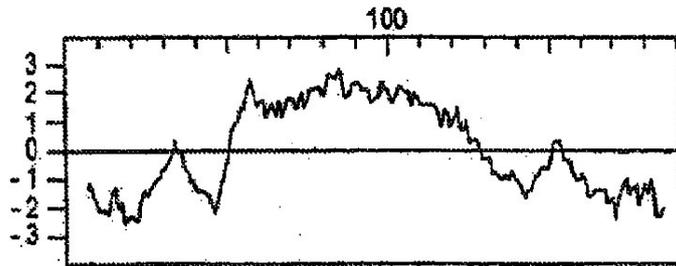


FIG.7A

AtS21	MANVDRDRRV	HVDRTDKRVH	-QPNYEDDVG	---F-G--GY	GGYGAGSDYK	43
X91918	MANVDRDRRV	HVDRTDKRVH	-QPNYEDDVG	---F-G--GY	GGYGAGSDYK	43
Z29859						
X62352	MADTARG---	-THHDIIGRD	QYPMGRDRD	QYQKSGRG--	-----SDY-	37
At013	MADQTR----	-THHE-----	--MISRDS	Q-----	-----EAH-	21
X91956	MADTHR-----	-VDRTRHFQ	FQSPYEGGRG	QOQYEGDRGY	GGGYKSMMP	45
L40954	MADTHR-----	-VDRTRHFQ	FQSPYEGGRG	QOQYEGDRGY	GGGYKSMMP	45
AtS21	SRGPSTNOILL	ALIAGVPIGG	TLTIAQLTL	AGSVICLIIMS	IPILIFSPV	93
X91918	SRGPSTNOILL	ALIAGVPIGG	TLTIAQLTL	AGSVICLIIMS	IPILIFSPV	93
Z29859						
X62352	----SKSRCIA	KAATAVTAGG	SLIMSSLTTL	VGVVIALIIMA	TPILVIFSPV	84
At013	----PKARQMV	KAATAVTAGG	SLIMISQLTL	AGVIVIALIIMA	TPILVIFSPV	68
X91956	ESGPSSTQVVL	SLLIQVPPVVG	SLIPIAQLLLI	AGSVIGIPIAIVA	LPILIFSPV	95
L40954	ESGPSSTQVVL	SLLIQVPPVVG	SLIPIAQLLLI	AGSVIGIPIAIVA	LPILIFSPV	95
AtS21	IVPAALITIGL	AVTGFIIASGL	FGLTGLSSVS	WVNLNLRGTS	DTVPEQLDIA	143
X91918	IVPAALITIGL	AVTGFIIASGL	FGLTGLSSVS	WVNLNLRGTS	DTVPEQLDIA	143
Z29859			FGLTGLSSVS	WVNLNLRGTS	DTVPEQLDIA	30
X62352	IVPALITIVAL	LITGFIISSCG	FGIARITVFS	WLYKYATGEH	PQGSCKLDSA	134
At013	IVPAVITIVAL	LITGFIIASCG	FGIARITVFS	WLYRHHFGS	--GSDKIENA	115
X91956	IVPAGITIGL	AMTGFIIASGM	FGLTGLSSIS	WVNLNLRGTS	RTVPEOLEIA	145
L40954	IVPAGITIGL	AMTGFIIASGM	FGLTGLSSIS	WVNLNLRGTS	RTVPEOLEIA	145

FIG.7B

ALS21	KRRMADAVGY AGMKGKEMGQ YVQDKAHEAR ETEF-----	MTETHEPGKA	187
X91918	KRRMADAVGY AGMKGKEMGQ YVQDKAHEAR ETEF-----	MTETHEPGKA	187
Z29859	KRRMADAVGY AGMKGKEMGQ YVQDKAHEAR ETEF-----	MTETHEPGKA	74
X62352	RMKLGSKA-- QDILKDR--QY YCQHTGCEH DRDRTRGGQH TT-----		173
Atol3	RMKVGSRV-- QDTK----- YGCHNIGVQH QQ-----	VS-----	141
X91956	KRRMADAVGY AGQKKGEMGQ HVMONKAQDVK QYDISKPHDT	TTKGHETGG	195
L40954	KRRMADAVGY AGQKKGEMGQ HVMONKAQDVK QYDISKPHDT	TTKGHETQGR	195

ALS21	RRGS = Z54164/Atol2	191
X91918	RRGP	191
Z29859	RRGS	78
X62352	----	173
Atol3	----	141
X91956	TTAA	199
L40954	TTAA	199



FIG.8A

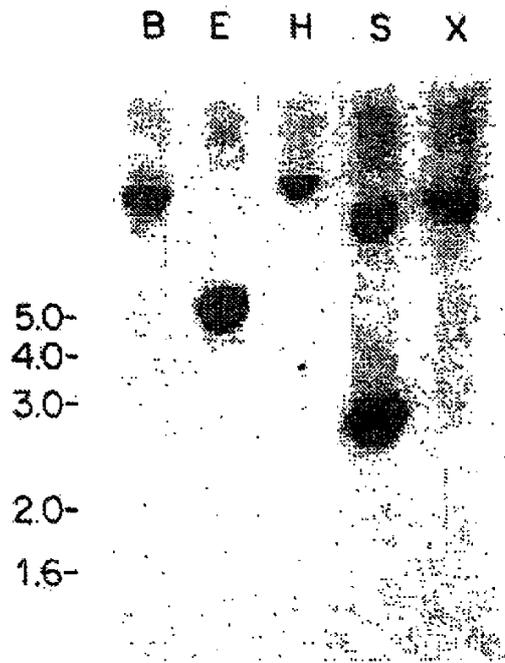


FIG.8B

FIG.9

1 GAGCTCGATCACACAAAGAAAGGTCAAATGGATCACTACTGGGCCCAATTTGACACCAAGAGAAAGTGAGAGAGAGTTG
 81 TCCCTCTGTTATCAAGTAAACAGTAGACCACCACTAACCCGCAATAGCTTATAATCAAAATAGAAAGGTCCTAATAACAGA
 161 AACAAATGAAAAGCCTTGTTCCATGGACTGGACTGCCACCGAATTGATTCGACTAGTTTTCCTTCTTTGATTAAG
 241 ACCTCGGTAAGAAAATGGTACTACTAAAGCCACTCGCTACCAAAACCTAAACCATTCCAGACTGTAACTGGACCAATATT
 321 TCTAAACTGTAAACCAGACTCAACACATATAAATAAATAAAGAACTATAACCTTAACCGTAAAAAATAAATTTACTACAGT
 401 AAAAAATPATACATAATTCAGCTATGATGGAATTTCCAGCTCTTAAGAGTTGTGGAAATCAAGTAAACCTAAAAATCCATAAT
 481 AATATCTTCATCTCTAATTTTGTTCACATGCAATGCTGCTCCAAATCTGTTAATAGCAATTTGAAAGCCATAAAATCTATAT
 561 ACAGTACAATAATCTAATTAATTTTCATTTACTAATAAATGCTTCCATATAATACICTTTGTAATTTATAAATCATCCGGTTAT
 641 CGTTACTATACCTTTATACATCTCTTACATTTCACTACCTAAGCTAGCAAAAGCAAACTACTAAAGGGTTCGTCAACGCCAAG
 721 TTATTTGCTAGTTGGTGCACTACACACCGCTACGGCAACATTAAGTNACACATTAAGAGGTTGTTTCTTAATGTAGTA
 801 TGGTAATATATATTTTCAAAACTTGGATTAGATATAAARGGTACAGGTAGATGAAATAATATTTGGTTAGCCGGTTGAGA
 881 TTAAGCGGATATAGGAGGCATATAACAGCTGTGAGAGAGAGAGGATATAATACAAAAGGGAGGATGTTTTTGCCGAC
 961 AGAGAAAGGTAGATTAAGTAGGATCGAGAGGAGAGCAATTTAATAATGGATGATTTGTTGGTTTTGACGGTGGAGAG
 1041 AAGAACGAAAAGATGATCAGGTAAAATAATGNAACTTGGAAATCATGCAAAAGCCACACCCTCCCCITCAACACAGTCTTAC
 1121 GTGTCGCTTCTCTTCACTCCATATCTCCTTTTATTTACCAGAAATATGTCAATCCCAATTTATAATGACGTTCTCTT
 1201 AGACTTATCTCTATAATACCCCTTTTAATTTGTGTCCTctagcccttactctatagtttagatagacatggcgeatgt
 1281 ggatcgtgatcggcgtgtgcatgtagccgtactgacaaaagtggttccatcagcccaactacgaagatgatgtcggttttg
 1361 gtggctatggcgttatagtgctggttctgattataagagtccggcccctccactaaaccaagTATTTTGTGGTCTCTCTT
 1441 TAGTTTTCTTTGTTTCCCTATGATCACGCTCCCAAACATATTTGAAGATTTCTGTAAATTCATTATAAACAGAAAGA
 1521 TAAATAAAATAGTGAAGAACCATAGGAATCGTACGTTACGTTAATTAATTTCCCTTTTAGTTCCTAATTAGGATTT
 1601 CCTTTAAAAGTTGCAACAATCTAATTTGTTCAAAAATAGTAAAGTTTGAACAGATTTTATATACACCACCTTGCCATATGT
 1681 TTATCATGGTGATGCATGCTTGTAGATAAATCGATATAAATCAATACATGCAGatcttggcacttaagcaggagtcc
 1761 catlgtgtggcacaatgctaaccctagctggactcactctagccgggtcggtgatcggcttgcctagctccatacccctct
 1821 tccctctctcagtcgggtgatagtcgggctcactatgggcttgcctgtgacgggaatcttggcttcttgggtttg
 1901 tttgggttgacgggtctgagctc

FIG.10

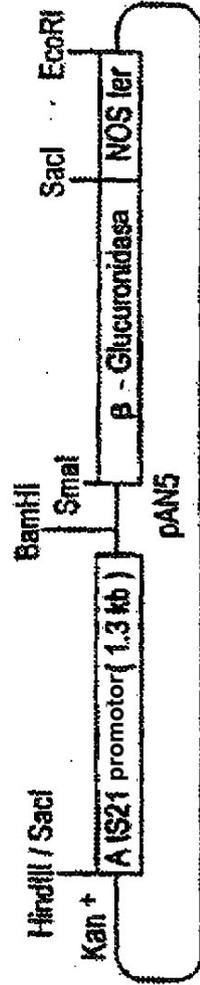


FIG.11A FIG.11B FIG.11C

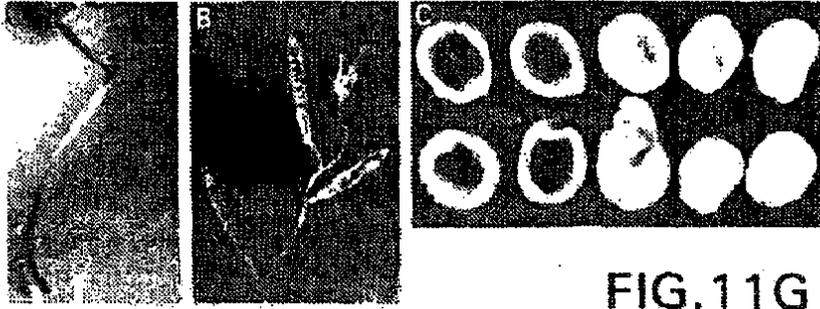


FIG.11G

FIG.11D FIG.11E FIG.11F



FIG.11H

FIG.11I

FIG.11J



FIG.11K FIG.11L FIG.11M FIG.11N



FIG.12A



FIG.12B



FIG.12C

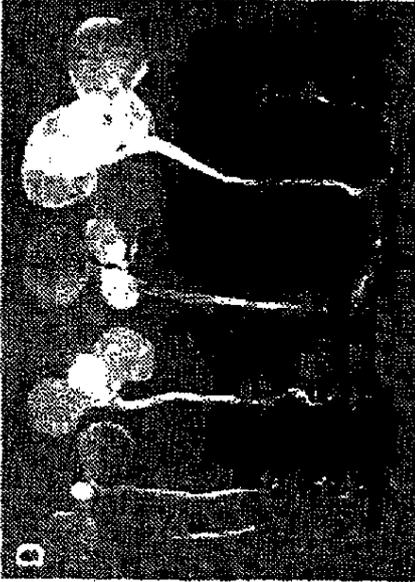


FIG.12D

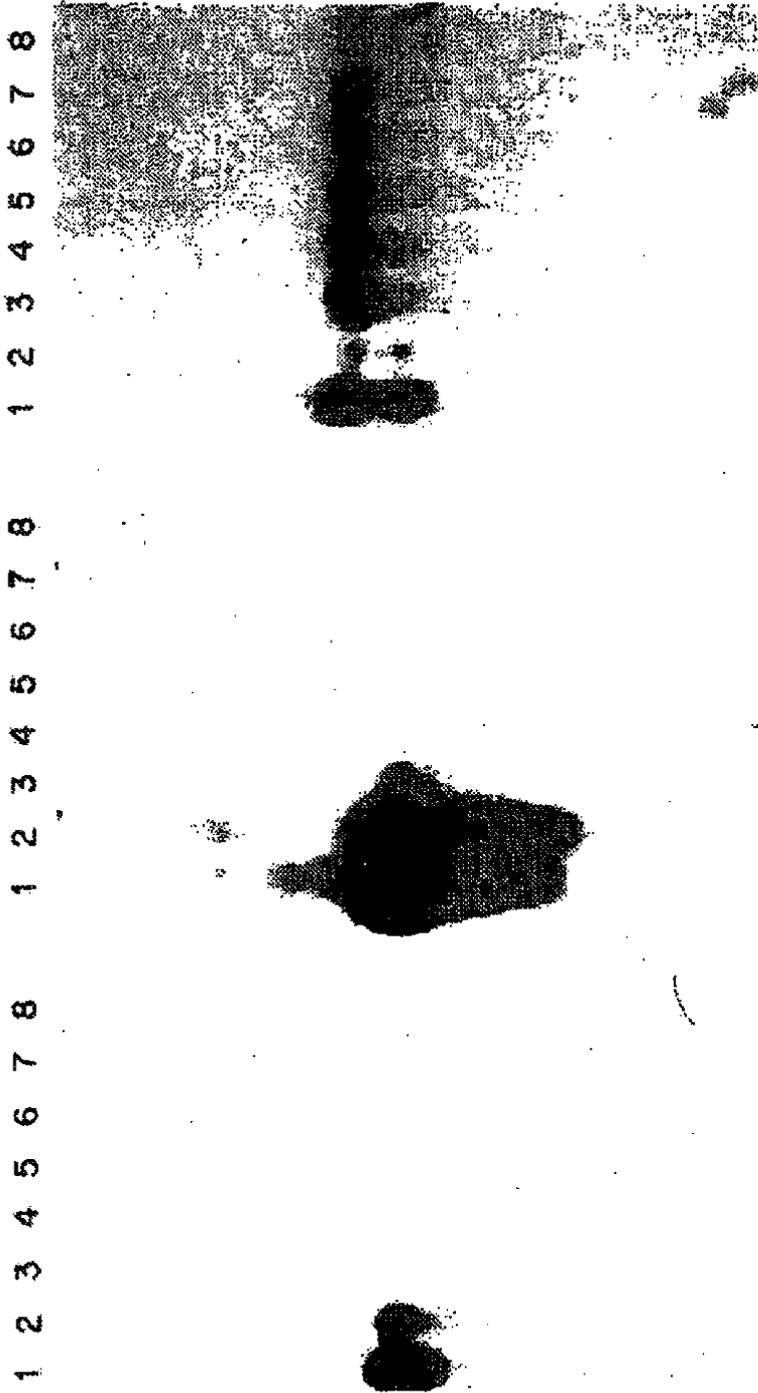


FIG.13C

FIG.13B

FIG.13A

FIG.14

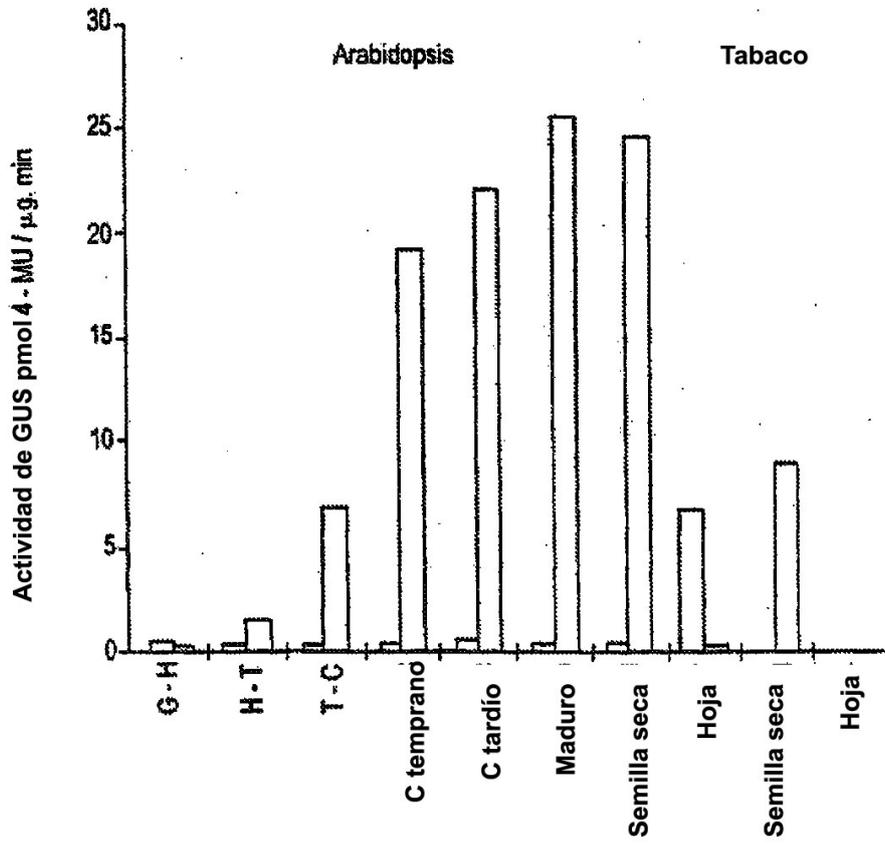
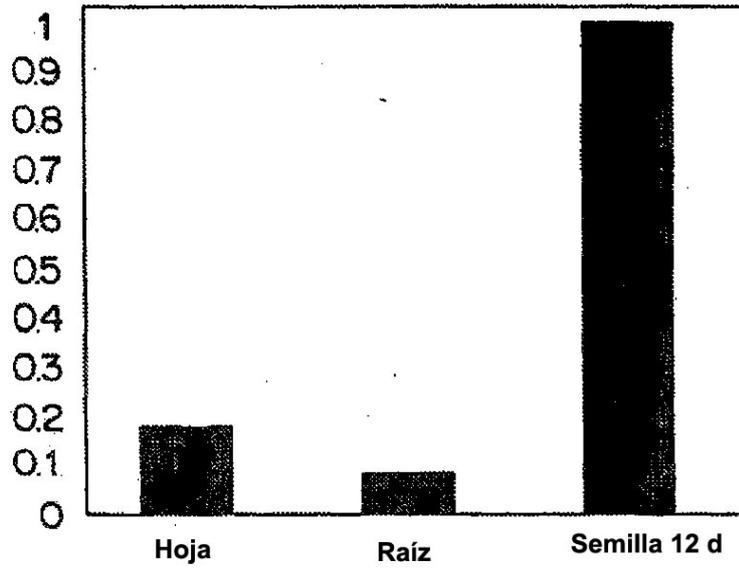


FIG. 15B



Tejido de borraja

L R S



FIG. 15A

FIG.16C

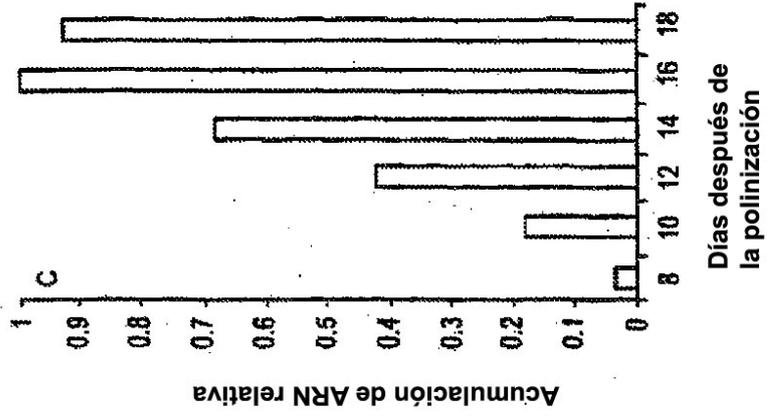


FIG.16B

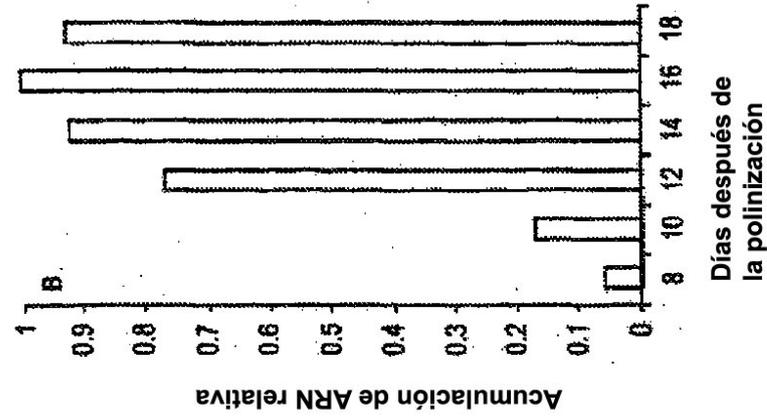


FIG.16A

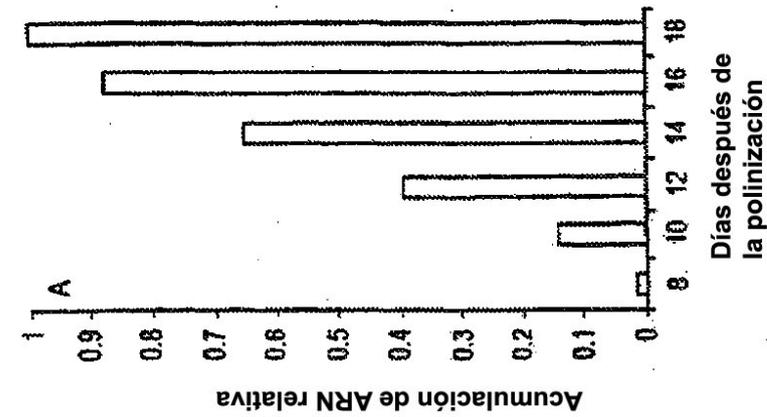


FIGURA 17

