

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 522**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/67 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.1996 E 96939224 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 0870043**

54 Título: **Expresión de genes aumentada por intensificadores, en plantas**

30 Prioridad:

29.11.1995 GB 9524350

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

08.11.2013

73 Titular/es:

**BRITISH AMERICAN TOBACCO (INVESTMENTS)
LIMITED (100.0%)**

**Globe House 1 Water Street
London WC2R 3LA, GB**

72 Inventor/es:

**GRAY, JOHN CLINTON;
SANDHU, JAGDEEP SINGH y
WEBSTER, CARL INNES**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 428 522 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

Expresión de genes aumentada por intensificadores, en plantas

Esta invención se refiere al aumento de la expresión de un gen, y, en particular, a la alteración de la actividad del promotor del gen.

5 La manipulación genética depende de la introducción de genes quiméricos en plantas y la expresión del gen introducido depende del promotor. Hay muchas razones por las que sería ventajoso tener un método para mejorar la eficacia del promotor de estos genes. Los diferentes promotores funcionan con diferentes eficiencias en diferentes tejidos. Los diferentes promotores funcionan con diferentes eficiencias en el mismo tejido, algunos, tales como el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (35S CaMV), son considerados comúnmente como un promotor más fuerte que el promotor del gen *nos*. Los promotores comúnmente consisten en más de 1.000 bp y cuando se acortan funcionan con menos eficacia. Sin embargo, las secciones largas de ADN producen dificultades técnicas en los mecanismos de ADN recombinante. Por lo tanto, hay muchos casos en los que puede requerirse una expresión mejorada. En experimentos que implican antisentido, podría ser necesaria la expresión más alta posible para lograr un resultado comercial. Es, por lo tanto, una ventaja tener constructos de ADN disponibles que mejoren, en las condiciones apropiadas, la expresión de un gen dado.

10 Las secuencias que activan la transcripción se han denominado intensificadores (Simpson *et al.* Nature (1986) 323, 551-554) y se ha obtenido una secuencia que es activa como intensificador a partir del promotor 35S de CaMV (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.164.316). El promotor 35S que contiene esta región intensificadora está activo en muchas plantas y el promotor ha sido descrito como constitutivo, actuando en muchos tejidos. Sin embargo, si bien se han sugerido regiones intensificadoras para los genes de plantas, no se había reconocido previamente que parte de un promotor de una planta pudiera tener una actividad intensificadora en varios órganos diferentes y en especies diferentes. Por ejemplo, la región -352 a -2 del gen *RbcS* del guisante se unió al promotor *nos* bacteriano y esto produjo una fuerte expresión inducida por la luz en los tejidos fotosintéticos. Experimentos similares en los que se colocaba el elemento aguas abajo de la secuencia codificante no causaron expresión en el tabaco (Fluhr *et al.*, Science (1986) **232**, 1106-1111).

15 El gen *PeE* de guisante fue aislado por Last, D.I. y Gray, J.C. (Plant Molecular Biology (1989) **12**, 655-666). Este gen codifica la plastocianina que es una proteína de cobre de 10 kDa implicada en la transferencia fotosintética de electrones. Por lo tanto, se requiere la expresión de este gen en órganos, tales como hojas y tallos en las células que contienen cloroplastos. Estudios de delección con la región promotora de este gen sugirieron que el promotor era activo en las hojas, tallos y flores, pero no en las raíces, y que un elemento aguas arriba de -784 a -992 reprimía la expresión en las hojas (véase, por ejemplo, Pwee, K-H. *et al.*, The Plant Journal (1993) **3**(3) 437-449 y Dupree, P. *et al.*, The Plant Journal (1991) **1** 115-120). La eliminación de esta región produjo un promotor muy "fuerte" (Pwee, KH. y Gray, J.C. The Plant Journal (1993) **3** 437-449).

20 También se han llevado a cabo estudios de delección en el gen *PeE* de Arabidopsis (Vorst, O. *et al.*, The Plant Journal (1993) **4**(6) 933-945), revelando la presencia de un elemento regulador positivo fuerte en la región aguas arriba del promotor *PeE* de Arabidopsis. La delección de esta parte del promotor dio como resultado una marcada reducción de la actividad del promotor y una pérdida de la dependencia del cloroplasto de la expresión del gen informador. También se han descrito dos supuestos sitios de unión a proteínas en este elemento regulador positivo bastante aguas arriba, que pueden tener implicaciones reguladoras en la expresión del promotor *PeE* de Arabidopsis (Fischer, U. *et al.*, Plant Molecular Biology (1994) **26** 873-886).

25 La invención se basa en el sorprendente hallazgo de que un gen expresado en el tejido fotosintético verde de guisante tiene una región intensificadora que es activa en otras especies y en otros tejidos, incluidos los tejidos no fotosintéticos.

30 La presente invención se refiere, por lo tanto, a una secuencia de ADN que es activa como un intensificador y provoca un aumento en la expresión de un promotor expresado en los tejidos verdes.

35 La presente invención también se refiere a una secuencia de ADN que es activa como un intensificador y provoca un aumento en la expresión de cualquier promotor que se expresa en uno o más de las raíces, tubérculos, tallos, hojas, flores o semillas de las plantas.

40 Otro objeto de la invención es proporcionar un método de intensificación de la expresión de genes en plantas distintas de la planta de la que se obtuvo la secuencia.

45 La presente invención proporciona un método para facilitar un aumento de la expresión de uno o más genes en uno o más órganos de una planta intensificando la actividad de un promotor de los uno o más genes utilizando una secuencia intensificadora aislada y/o purificada, consistiendo el intensificador en una secuencia aislada seleccionada del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 1 de la Figura 6; una secuencia que es una subsecuencia encontrada en el SEQ ID NO: 1, cuya subsecuencia es rica en bases A y T, comprendiendo la cantidad total de bases A y T más de 50% de la secuencia de nucleótidos, y activa como intensificador; el SEQ ID NO: 2 de la Figura 7; las siguientes secuencias del SEQ ID NO: 1: las secuencias de pares de bases de los nucleótidos -44 a -389, -388 a -284, -283 a -

- 5 179, -444 a -284 y -388 a -179; y el SEQ ID NO: 3 de la Figura 8; en donde dicho método comprende (i) obtener la secuencia intensificadora de un gen de una planta o producir sintéticamente la secuencia intensificadora; y (ii) formar un gen quimérico que comprende la secuencia intensificadora aislada y/o purificada, el promotor, una secuencia codificante o no codificante y una secuencia terminadora; incrementándose la actividad incrementada del promotor en comparación con la actividad del promotor sin que dicha secuencia intensificadora esté presente.
- Según se utiliza en la presente memoria un aumento de la expresión significa que la expresión del gen cuando se utiliza con el intensificador como el descrito en la presente invención es mayor que la que se observaría sin utilizar el intensificador de la expresión de ese gen.
- 10 Ventajosamente, el intensificador se obtiene a partir de un gen vegetal o se produce sintéticamente. El intensificador puede ser un homólogo del gen vegetal o de la secuencia producida sintéticamente.
- Ventajosamente, el intensificador se obtiene a partir de un gen expresado en el guisante. Más ventajosamente, el gen se expresa en los tejidos fotosintéticos verdes del guisante, en particular, en las hojas de la planta de guisante.
- 15 Preferiblemente, el aumento de la expresión del gen que se va a incorporar a uno o más órganos de la planta es una planta que es diferente de la planta de la cual se obtuvo el intensificador. La diferencia puede ser una diferencia en el tipo de planta, es decir, la familia, u otra planta de la misma familia de plantas.
- 20 La presente invención hace referencia a un intensificador, siendo el intensificador una secuencia seleccionada del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 1 de la Figura 6; una secuencia que es una subsecuencia encontrada en el SEQ ID NO: 1, cuya subsecuencia es rica en bases A y T, comprendiendo la cantidad total de bases A y T más de 50% de la secuencia de nucleótidos, y activa como intensificador; el SEQ ID NO: 2 de la Figura 7; las siguientes secuencias del SEQ ID NO: 1: secuencias de pares de bases de los nucleótidos -444 a -389, -388 a -284, -283 a -179, -444 a -284 y -388 a -179; y el SEQ ID NO: 3 de la Figura 8.
- La secuencia intensificadora puede ser adecuadamente una secuencia aislada y/o purificada.
- 25 Preferiblemente, la subsecuencia comprende al menos 35% de bases A y al menos 35% de bases T. Una de las bases A o T, puede incluso estar presente en 40, 45% o 50%, o más, de la subsecuencia. La subsecuencia puede comprender sólo bases A y T.
- El SEQ ID NO: 2 es una región de 31 pb del SEQ ID NO: 1.
- 30 Una secuencia similar también puede ser conocida como un homólogo. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término homólogo representa un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que es idéntica, o similar, a otra secuencia de nucleótidos. La similitud debe ser suficiente para permitir que la secuencia de nucleótidos actúe como un intensificador de acuerdo con la invención.
- Preferiblemente, el promotor del gen es un promotor de un gen en plantas. Preferiblemente, la secuencia o subsecuencia del intensificador causa un incremento de la expresión del gen en los tejidos verdes o no verdes de las plantas, y, en particular, en las raíces, tubérculos, semillas, tallos, flores o las hojas de tales plantas.
- 35 Ventajosamente, el intensificador aumenta la expresión de un gen en plantas distintas de la planta de la que se obtiene el intensificador.
- El intensificador puede funcionar adecuadamente en una orientación normal o inversa. Adecuadamente, el intensificador también puede ser operable unido al promotor o al terminador del gen que se vaya a expresar.
- 40 La presente invención también proporciona un gen quimérico que comprende un intensificador, consistiendo el intensificador en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 1 de la Figura 6; una secuencia que es una subsecuencia encontrada en el SEQ ID NO: 1, cuya subsecuencia es rica en bases A y T, comprendiendo la cantidad total de bases A y T más de 50% de la secuencia de nucleótidos, y activa como intensificador; el SEQ ID NO: 2 de la Figura 7; las siguientes secuencias del SEQ ID NO: 1: secuencias de pares de bases de los nucleótidos -444 a -389, -388 a -284, -283 a -179, -444 a -284 y -388 a -179; y el SEQ ID NO: 3 de la Figura 8, un promotor del gen, una secuencia codificante o no codificante y una secuencia terminadora, en donde la
- 45 secuencia intensificadora se obtiene de un gen vegetal, o se produce sintéticamente, en una forma aislada y/o purificada, y conectada operablemente a dicho promotor para formar un gen quimérico.
- Según se utiliza en la presente memoria, el término gen quimérico representa una molécula de ADN recombinante que contiene secuencias de más de un organismo.
- El gen quimérico puede comprender más de uno del intensificador y más de un promotor.
- 50 El intensificador puede estar en orientación normal o inversa cuando está contenido en el gen quimérico.
- El gen quimérico puede contener una secuencia informadora o cualquier otra secuencia que confiera un carácter identificable a una planta transformada.

La presente invención, por otra parte, proporciona una planta transformada, que puede haber sido transformada por el método de la invención o con un gen quimérico de la invención, que tiene un aumento de la expresión de uno o más genes en la planta transformada en virtud de la utilización de uno o más intensificadores descritos en la presente memoria.

5 La planta transformada puede ser una especie de dicotiledónea, tal como patata, tabaco, algodón, lechuga, melón, calabaza, pepino, guisante, colza, soja, remolacha azucarera o girasol, o de una especie monocotiledónea, tal como trigo, cebada, centeno, arroz o maíz. Los sistemas de transformación alternativos adecuados para tales cultivos serán conocidos por el lector experto y no necesitan ser elucidados aquí.

10 La presente invención también proporciona propágulos de una planta transformada utilizando un gen quimérico de acuerdo con la presente invención.

La presente invención también proporciona una célula que alberga un gen que tiene un aumento de la expresión como resultado del método o el gen quimérico del presente documento.

Con el fin de que la invención pueda ser fácilmente entendida y fácilmente llevada a efecto, se hará referencia a continuación, a modo de ejemplo, a los dibujos esquemáticos del presente documento, en los que:

15 La Figura 1 muestra la actividad específica de GUS en forma de diagrama de barras del SEQ ID NO: 1 que se comporta como un intensificador en las hojas de plantas de tabaco transgénicas cuando se fusiona en orientación normal e inversa a un promotor mínimo *PefE*, un informador GUS y un terminador *nos*,

20 La Figura 2 muestra la actividad específica de GUS en forma de diagrama de barras del SEQ ID NO: 2 que se comporta como un intensificador en las hojas de plantas de tabaco transgénicas en copias únicas y múltiples cuando se fusiona a un promotor mínimo *PefE*, un informador GUS y un terminador *nos*,

La Figura 3 muestra la actividad específica de GUS en forma de diagrama de barras del SEQ ID NO: 1 que se comporta como un intensificador en las raíces de plantas de tabaco transgénicas cuando se fusiona en la orientación normal e inversa aguas arriba o aguas abajo de un promotor 35S de CaMV mínimo (-90), un informador GUS y un terminador *nos*,

25 La Figura 4 muestra la actividad específica de GUS en forma de diagrama de barras de subsecuencias del SEQ ID NO: 1 en orientación normal que se comportan como intensificadores en las hojas de plantas de tabaco transgénicas cuando se fusionan a un promotor mínimo *PefE*, un informador GUS y un terminador *nos*,

30 La Figura 5 muestra la actividad específica de GUS en forma de diagrama de barras del SEQ ID NO: 1 que se comporta como un intensificador en los micro-tubérculos de plantas de patata transgénicas cuando se fusiona en la orientación normal e inversa a un promotor de patatina completo o mínimo, un informador GUS y un terminador *nos*, y

La Figura 6 muestra la secuencia codificante de la secuencia del promotor de plastocianina de guisante (-444 a -179), conocida también en la presente memoria como SEQ ID NO: 1,

35 La Figura 7 muestra la secuencia codificante para la subsecuencia del promotor de plastocianina de guisante de la Figura 6, siendo esta subsecuencia conocida como SEQ ID NO: 2,

La Figura 8 muestra la secuencia de nucleótidos activa como intensificador y conocida en la presente memoria como SEQ ID NO: 3,

40 La Figura 9 muestra la actividad específica de GUS en forma de diagrama de barras del SEQ ID NO: 3 que se comporta como un intensificador en las hojas de plantas de tabaco transgénicas cuando se fusiona a un promotor mínimo *PefE*, un informador GUS y un terminador *nos*,

La Figura 10 muestra el constructo pATC, y

La Figura 11 muestra los constructos pATC 21040, pATC 25040, pATC 26040, pATC 27040, pATC 28040 y pATC 29040.

Ejemplo 1

45 La secuencia conocida en la presente memoria como SEQ ID NO: 1 (véase la Figura 6) se aisló de las hojas del guisante en la forma descrita por Last, D.I. y Gray, J.C. [Plant Molecular Biology (1989) **12**, 655-666]. Esta secuencia se unió ya sea en la orientación normal o en la inversa a la sección -175 a +4 del promotor *PefE* fusionada a una secuencia codificante del informador GUS y al terminador *nos*, como se muestra en la Figura 1. El gen quimérico resultante del vector de *Agrobacterium tumefaciens* pBIN19 (Jefferson, R.A. *et al.*, EMBO J, **6**, 3901-3907) se utilizó para transformar plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. *Samsun*). La Figura 1 muestra en forma gráfica los resultados para cuatro constructos diferentes. Para cada constructo se analizaron diferentes líneas transformadas independientes. La Tabla 1 muestra los valores reales de la actividad específica de GUS obtenidos para cada línea.

Como era de esperar, el promotor *PeE* sólo se expresa en las hojas pero no en las raíces. Sin embargo, las cifras de actividad indican el sorprendente resultado de que la región -179 a -444 aguas arriba de este promotor intensificará la expresión en cualquier orientación, es decir, la orientación normal o inversa.

5 Los métodos para la producción de las plantas se detallan a continuación, pero, como sería reconocido por un experto en la técnica, otros métodos para la producción y el análisis de éstas u otras plantas serían igualmente adecuados.

Plantas transgénicas

10 Los constructos de fusión recombinantes que contenían el intensificador y el promotor *PeE* unido a un informador GUS y un terminador *nos* se movilaron en *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Ooms, G; Hooykaas, P.J.J; Van Veen R.J.M; Van Beelen, P; Retensburg, T.J.G; Schilpoort R.A. (1982a) Octopine Ti plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T region. Plasmid 7, 15-29) utilizando la electroporación de acuerdo con Shen, W.J. y Forde, B.J. [Nucleic Acid Research (1989) 17, 8385] y las células de *Agrobacterium* transformadas se utilizaron para infectar discos de hoja de tabaco de acuerdo con Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G. y Fraley, R.T. 1985 [A simple method for transferring genes into plants. Science, 22, 1229-1231]. Los brotes regenerados individuales resistentes a kanamicina se diseccionaron de los discos foliares con callo y se enraizaron en medio sin reguladores del crecimiento. Las plantas transgénicas enraizadas se mantuvieron en cultivo de tejidos en medio con 100 µg ml⁻¹ de kanamicina y 200 µg ml⁻¹ de carbenicilina, y se subcultivaron cada 7-8 semanas. El material utilizado en los análisis con GUS se recogió de las hojas expandidas, sanas, jóvenes (25-35 mm de longitud), bastante cerca del ápice del brote. Las raíces se lavaron a fondo en agua destilada antes de su uso.

Análisis fluorométrico con GUS

25 Se llevaron a cabo análisis de la enzima GUS esencialmente de acuerdo con Jefferson *et al.* 1987, EMBO J, 6, 3901 a 3907. Se elaboraron extractos a partir de 10-40 mg de tejido de la planta en 500 µl de tampón de lisis GUS (NaP_i 50 mM, pH 7,0, EDTA 10 mM, Triton X-100 al 0,1%, laurilsarcosinato de sodio al 0,1%, 2-mercaptoetanol 10 mM) y se utilizaron 5-50 µl de extracto en cada análisis que contenía 4-metilumbeliferil-glucurónido 1 mM. Se midió la fluorescencia utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia LS50 (Perkin Elmer, Connecticut, USA). La proteína se determinó utilizando el procedimiento de microanálisis de Bradford (1976).

Tabla 1

5 Actividad específica de GUS a partir de extractos de hoja y raíz de plantas de tabaco en cultivo de tejido transformadas con el constructo que contiene el SEQ ID NO: 1 en ambas orientaciones aguas arriba del promotor *PetE* mínimo -175/+4, el informador GUS, el terminador *nos*.

		Actividad específica de GUS (pmol MU/min/ μ g de proteína)	
Constructo 40 Promotor <i>PetE</i> -175/+4, informador GUS, terminador <i>nos</i> como control			
Núm. de Planta	Hojas	Raíces	
14	4,6	-	
18	3,3	-	
6	5,3	-	
11	4,6	-	
15	6,1	-	
21	2,4	-	
Media \pm ETM	4,30 \pm 0,54		
Constructo 38 SEQ ID NO: 1 en orientación normal aguas arriba del promotor <i>PetE</i> -175/+4, informador GUS, terminador <i>nos</i>			
Núm. de Planta	Hojas	Raíces	
3	147,5	-	
4	21,3	-	
6	57,4	-	
7	56,9	-	
8	41,7	-	
11	37,1	-	
14	79,7	-	
19	26,9	-	
25	34,5	-	
31	97,2	-	
Media \pm ETM	60,0 \pm 12,26		
Constructo 38 SEQ ID NO: 1 en orientación inversa aguas arriba del promotor <i>PetE</i> -175/+4, informador GUS, terminador <i>nos</i>			
Núm. de Planta	Hojas	Raíces	
2	60,6	-	
5	43,8	-	
8	55,4	-	
14	160,5	-	
16	24,2	-	
18	85,2	-	
23	78,7	-	
24	16,7	-	
Media \pm ETM	65,6 \pm 15,96		

MU = 4-metilumbeliferona

Ejemplo 2

10 En un experimento adicional, en lugar de utilizar la totalidad del SEQ ID NO: 1, se utilizó una región de 31 pb desde -289 a -259 del SEQ ID NO: 1. La secuencia se modificó para dar el SEQ ID NO: 2 descrito en la Figura 7.

15 En el constructo 110, una copia de la secuencia del SEQ ID NO: 2 se unió al promotor -175/+4 *PetE* aguas arriba, cuyo promotor está unido a una secuencia codificante del informador GUS y el terminador *nos*, como se muestra en la Figura 2. En el constructo 108, 3 copias del SEQ ID NO: 2 estaban unidas al promotor *PetE* -175 a +4. Se muestran los resultados obtenidos después de la transformación y regeneración de las plantas de tabaco para la población en la Figura 2 e indican que más de una copia de la región del SEQ ID NO: 2 aumentan la expresión del

promotor. La Tabla 2 muestra los valores reales de la actividad específica de GUS obtenidos para cada línea. Se utilizó el mismo control que en el Ejemplo 1 y se mostró en la Figura 2.

TABLA 2

5 Actividad específica de GUS de extractos de hojas de plantas de tabaco transgénicas transformadas con constructos que contienen una sola copia del fragmento de 31 pb o 3 copias del fragmento de 31 pb del promotor de plastocianina de guisante que muestra una alta afinidad por la unión a proteínas.

	Actividad Específica de GUS (pmol MU/min/ μ g de proteína)
Constructo 110 Oligonucleótido de 31 pb en orientación normal aguas arriba del promotor <i>PetE</i> -175/+4, informador GUS y terminador <i>nos</i>	
Núm. de Planta	Hojas
1	5,61
2	13,99
3	4,41
4	3,20
5	3,35
6	25,30
7	10,85
8	7,35
9	4,76
10	4,58
Media \pm ETM	8,34 \pm 6,54
Constructo 108 3 copias de oligonucleótido de 31 pb en orientación normal aguas arriba del promotor <i>PetE</i> -175/+4, informador GUS y terminador <i>nos</i>	
Núm. de Planta	Hojas
1	18,29
2	40,24
3	14,80
4	23,67
5	14,73
6	12,12
7	28,46
8	12,77
9	21,83
10	10,88
11	19,42
12	54,13
Media \pm ETM	22,61 \pm 12,37

Ejemplo 3

10 Para determinar si la región intensificadora del SEQ ID NO: 1 tenía un efecto similar en otros promotores, se unió el SEQ ID NO: 1 al promotor 35S "mínimo" de CaMV (-90) en la orientación normal e inversa, y también se unió en la orientación normal e inversa a la región del terminador del gen quimérico preparado con el promotor de CaMV mínimo. Se transformó tabaco y se analizó como se describe en el Ejemplo 1. La Figura 3 muestra los valores medios para las poblaciones obtenidas con estos constructos. La Tabla 3 presenta los valores para cada línea tanto para las hojas (mostrados en la Figura 3) como para las raíces. La región identificada como intensificador para el gen *PetE* actúa como un intensificador para el promotor de CaMV heterólogo y es activo en ambas orientaciones, ya esté presente aguas arriba o aguas abajo del promotor. El intensificador está activo con un promotor que se expresa en raíces y hojas y, por lo tanto, no es específico de tejido.

TABLA 3

20 Actividades específicas de GUS de extractos de raíz y hoja de plantas de tabaco transgénicas transformadas con constructos que contienen el promotor de 35S de CaMV mínimo (-90), el informador GUS, el terminador *nos* y la secuencia intensificadora.

ES 2 428 522 T3

		Actividad específica de GUS (pmol MU/min/ μ g de proteína)	
Constructo 33 Promotor 35S de CaMV (-90), informador GUS, y terminador <i>nos</i> como control			
Núm. de Planta	Hojas	Raíces	
4	0,07	0,30	
39	0,89	0,42	
48	3,21	0,35	
50	0,95	0,27	
51	0,98	0,39	
52	1,99	0,37	
53	3,44	0,33	
67	5,90	0,21	
77	1,25	0,47	
86	2,30	0,34	
Media \pm ETM	2,09 \pm 0,54	0,34 \pm 0,02	
Constructo 34 SEQ ID NO: 1 en orientación normal aguas arriba del promotor 35S de CaMV (-90), informador GUS, terminador <i>nos</i>			
Núm. de Planta	Hojas	Raíces	
8	2,08	0,61	
11	11,34	0,51	
17	13,45	0,45	
19	12,67	0,32	
21	14,69	0,43	
22	23,11	0,60	
55	13,45	0,43	
72	13,75	0,47	
86	4,91	0,54	
Media \pm ETM	12,16 \pm 1,99	0,48 \pm 0,03	
Constructo 35 SEQ ID NO: 1 en orientación inversa aguas arriba del promotor 35S de CaMV (-90), informador GUS, terminador <i>nos</i>			
Núm. de Planta	Hojas	Raíces	
7	17,11	1,40	
14	16,70	1,11	
22	14,24	0,91	
36	13,25	0,59	
41	18,20	1,00	
68	16,90	1,11	
77	7,23	1,24	
78	37,61	0,75	
83	34,62	0,96	
85	14,87	1,05	
94	7,93	1,12	
Media \pm ETM	18,06 \pm 2,90	1,01 \pm 0,06	

Tabla 3 (continuación)

		Actividad específica de GUS (pmol MU/min/ μ g de proteína)	
Constructo 36 SEQ ID NO: 1 en orientación normal aguas abajo del promotor 35S de CaMV (-90), informador GUS y terminador <i>nos</i>			
Núm. de Planta	Hojas	Raíces	
5	3,34	0,36	
11	2,46	0,63	
14	1,49	0,51	
16	1,73	0,31	
21	3,28	0,26	
34	7,61	0,29	
36	4,29	0,38	
43	2,61	0,37	
49	7,67	0,36	
Media \pm ETM	3,83 \pm 0,77	0,38 \pm 0,03	
Constructo 37 SEQ ID NO: 1 en orientación inversa aguas abajo del promotor 35S de CaMV (-90), informador GUS y terminador <i>nos</i>			
Núm. de Planta	Hojas	Raíces	
4	4,67	0,37	
9	3,67	0,29	
13	4,32	0,32	
17	2,19	0,61	
20	2,98	0,18	
21	9,34	0,27	
46	2,25	0,42	
48	3,45	0,35	
49	3,55	0,33	
73	3,98	0,37	
Media \pm ETM	4,04 \pm 0,64	0,35 \pm 0,03	

Ejemplo 4

- 5 Para identificar si las regiones del SEQ ID NO: 1 distintas del SEQ ID NO: 2, tenían actividad de tipo intensificador, se construyeron cinco nuevos genes quiméricos como se muestra en la Figura 4. Estos constructos utilizaban regiones del SEQ ID NO: 1 tanto aguas arriba como aguas abajo del SEQ ID NO: 2. Se obtuvieron plantas de tabaco transgénicas como se describe en el Ejemplo 1. El análisis de las plantas transgénicas que contienen estos constructos demuestra que todas las sub-regiones del SEQ ID NO: 1 seleccionadas contienen actividad de tipo
- 10 intensificador y la Tabla 4 indica que la actividad demostrada por el SEQ ID NO: 1 no está totalmente causada por el SEQ ID NO: 2.

Tabla 4

Actividades específicas de GUS en extractos de hojas de plantas de tabaco transgénicas transformadas con constructos que contienen fragmentos del SEQ ID NO: 1.

	Actividad Específica de GUS (pmol MU/min/ μ g de proteína)
Constructo 74 Fragmento -444 a -389 del promotor de plastocianina de guisante en orientación normal aguas arriba del promotor <i>PetE</i> -175/+4, informador GUS y terminador <i>nos</i>	
Núm. de Planta	Hojas
1	56,89
2	9,91
3	87,11
4	11,38
5	13,96
6	20,79
7	17,24
8	12,76
9	38,98
10	43,00
Media \pm ETM	31,40 \pm 8,00
Constructo 83 fragmento -388 a -284 del promotor de plastocianina de guisante en orientación normal aguas arriba del promotor <i>PetE</i> -175/+4, informador GUS y terminador <i>nos</i>	
Núm. de Planta	Hojas
1	45,55
2	16,71
3	22,32
4	21,66
5	22,49
6	17,72
7	16,86
8	11,33
9	10,81
Media \pm ETM	20,60 \pm 3,43
Constructo 90 fragmento -283 a -179 del promotor de plastocianina de guisante en orientación normal aguas arriba del promotor <i>PetE</i> -175/+4, informador GUS y terminador <i>nos</i>	
Núm. de Planta	Hojas
1	2,19
2	16,70
3	11,65
4	15,61
5	8,95
6	17,77
7	32,41
Media \pm ETM	15,04 \pm 3,53

Tabla 4 (continuación)

	Actividad Específica de GUS (pmol MU/min/ μ g de proteína)
Constructo 105 fragmento -444 a -284 del promotor de plastocianina de guisante en orientación normal aguas arriba del promotor <i>PetE</i> -175/+4, informador GUS y terminador <i>nos</i>	
Núm. de Planta	Hojas
1	42,81
2	30,29
3	28,63
4	31,82
5	24,68
6	34,67
7	33,54
8	22,95
9	25,61
10	44,81
11	37,89
Media \pm ETM	32,51 \pm 2,15
Constructo 111 fragmento -388 a -179 del promotor de plastocianina de guisante en orientación normal aguas arriba del promotor <i>PetE</i> -175/+4, informador GUS y terminador <i>nos</i>	
Núm. de Planta	Hojas
1	11,43
2	36,72
3	51,10
4	21,45
5	32,22
6	17,61
7	8,75
Media \pm ETM	25,61 \pm 5,73

Ejemplo 5

- 5 Para determinar si la región intensificadora era activa en otras especies, se unió la región -179 a -444 a la región -330 a +1 del promotor de la patatina PS20 descrito por Mignery, G.A.; Pikaard, C.S. y Park, W.D. 1988 [Molecular characterisation of the patatin multigene family of potato. *Gene*, **62**, 27-44]. El gen quimérico producido se transfirió a la patata mediante transformación.

Material Vegetal

- 10 Se mantuvieron cultivos de brotes de patata *in vitro* en medio de Murashige y Skoog (MS) en recipientes Magenta GA-7 a 22°C (16 horas/8 horas luz/oscuridad). Estos se subcultivaron nodalmente cada 3 semanas.

Los brotes de 5-7,5 cm (2-3 pulgadas) de altura *in vitro* fueron cultivados en macetas de 6,4 cm (2,5 pulgadas) de compost F1 de Levington. Estos se apartaron a un propagador durante una semana en una cámara de crecimiento a 18°C (16 horas/8 horas de luz/oscuridad). El propagador se retiró y las plantas se volvieron a plantar a las tres semanas en macetas de 12,7 cm (5 pulgadas). A las 5-7 semanas se utilizaron las plantas para la transformación.

- 15 *Agrobacterium tumefaciens*

Se hicieron crecer cultivos de las cepas adecuadas de una noche en líquido, por ejemplo, LBA4404, C58 núm. 3, a 28°C a una DO₆₀₀ (Pharmacia LKB ULTRASPEC II) de 0,8 en caldo L (véase más abajo).

Cultivo simultáneo

- 20 Se tomaron las cuatro hojas más jóvenes más expandidas y se esterilizó su superficie en lejía comercial al 10% (Domestos RTM) durante 15 minutos. Las hojas se enjuagaron cuidadosamente con agua estéril y a continuación se cortaron en discos con un perforador de corcho de 7 mm. Los discos se mezclaron con el *Agrobacterium* durante 1-5 minutos, se secaron sobre papel de filtro (Whatman Núm. 1) y a continuación se colocaron en medio para la formación de callos (véase más abajo) en placas de *Petri* de 90 mm con triple ventilación, la epidermis inferior hacia

abajo. Las placas de *Petri* de 90 mm con triple ventilación se sellaron con cinta, se cortaron para permitir el intercambio de gases y a continuación se incubaron a 22°C (16 horas/8 horas luz/oscuridad). Los discos se transfirieron a medio para la formación de callos más 500 µg ml⁻¹ de claforano y 30 µg ml⁻¹ de kanamicina después de 48 horas. Esto elimina las bacterias y selecciona las células transformadas.

5 Regeneración de brotes transformados

Después de 1 semana, los discos se transfirieron a medio de brotación que contenía los mismos antibióticos.

Caldo L	10 g l ⁻¹ de bactotripton
	5 g l ⁻¹ de extracto de levadura
	5 g l ⁻¹ de cloruro de sodio
	1 g l ⁻¹ de glucosa
Medio para la formación de callo	MS con sacarosa al 3%
	0,5 mg l ⁻¹ de 2,4-D
	2,5 mg l ⁻¹ de BAP
Medio de brotación	MS con sacarosa al 3%
	2,5 mg l ⁻¹ de BAP
	1,0 mg l ⁻¹ de GA ₃

10 Se realizaron transferencias adicionales en el mismo medio hasta que los brotes pudieron ser escindidos (por lo general alrededor de 4 semanas). Los brotes con callos se transfirieron a medio MS con claforano (500 µg/ml) en recipientes bien ventilados, por ejemplo, Magenta. Los transformantes se mantuvieron, después de varios pases con cefotaxima para eliminar las bacterias, en medio MS. Estos se retiraron de las condiciones *in vitro*, se apartaron y se hicieron crecer hasta la madurez como se ha descrito anteriormente para el material vegetal. El proceso produce plantas de patata transformadas a una frecuencia de hasta el 30% de los discos cultivados simultáneamente.

15 Los microtubérculos producidos en presencia de Ancimidol (180 µg/ml) a partir de estas plantas se analizaron para determinar la actividad de GUS como se describe en el Ejemplo 1. La Figura 5 muestra los resultados e indica que la secuencia intensificadora en cualquier orientación puede aumentar la actividad del promotor de patatina y la Tabla 5 demuestra que el gen se expresaba en micro-tubérculos, pero no en las hojas.

TABLA 5

20 Actividad específica de GUS de microtubérculos inducida en plantas de patata transgénicas que contienen el SEQ ID NO: 1 aguas arriba del promotor de clase I de patatina de -330 a -1 en comparación con un promotor de patatina mínimo y un promotor de patatina PS20 completo.

		Actividad específica de GUS (pmol MU/min/µg de proteína)	
Constructo p250 Promotor de patatina de 2562 pb, informador GUS, y terminador <i>nos</i>			
Núm. de Planta		Micro-tubérculos	Hojas
1		51,38	
2		6,17	
3		32,50	
4		49,28	
5		15,96	
6		10,36	
Media ± ETM		27,55 ± 8,06	

TABLA 5 (continuación)

		Actividad específica de GUS (pmol MU/min/ μ g de proteína)	
Constructo 116 Promotor de patatina de 330/+1 pb, informador GUS, y terminador <i>nos</i>			
Núm. de Planta	Micro-tubérculos	Hojas	
1	3,85		
2	14,01		
3	10,15		
4	8,45		
5	9,03		
6	8,79		
7	8,81		
Media \pm ETM	9,0 \pm 1,12		
Constructo 112 Fragmento -444 a -179 del promotor de plastocianina de guisante en orientación normal aguas arriba del promotor -330/+1 de patatina mínimo, informador GUS, y terminador <i>nos</i>			
Núm. de Planta	Micro-tubérculos	Hojas	
1	18,76		
2	15,28		
3	8,79		
4	14,66		
5	11,29		
6	84,08		
7	16,28		
8	61,15		
9	12,77		
10	10,14		
11	9,49		
Media \pm ETM	23,88 \pm 7,48		
Constructo 114 Fragmento -444 a -179 del promotor de plastocianina de guisante en orientación inversa aguas arriba del promotor -330/+1 de patatina mínimo, informador GUS, y terminador <i>nos</i>			
Núm. de Planta	Micro-tubérculos	Hojas	
1	18,36		
2	40,82		
3	40,49		
4	11,81		
5	98,54		
6	59,89		
7	11,48		
8	15,26		
9	7,50		
Media \pm ETM	33,69 \pm 10,01		

Ejemplo 6

5 La secuencia conocida en la presente memoria como SEQ ID NO: 3 (véase la Figura 8) fue diseñada por medio de lanzamiento de una moneda y construida a partir de dos oligonucleótidos complementarios (5' AAT TAT AAT ATA ATT TTA ATT TAA AA 3') y (5' AAT TTT TTA AAT TAT ATT AT 3') que contiene salientes EcoRI en los extremos 5' para permitir la multimerización sin ningún pb G/C intermedio. Los oligonucleótidos se recocióron, se fosforilaron y los concatámeros se insertaron en el sitio EcoRI de pC19H (Marsh et al, 1984). La secuenciación identificó tres plásmidos que contenían insertos de 4, 2 y 1 copias del oligonucleótido, respectivamente. Los insertos se escindieron en forma de fragmentos *HindIII-SalI* y se insertaron en pKHd7 (Pwee, K-H y Gray, J.C. (1993) The Plant Journal), conocido en la presente memoria como pJSS22, para dar pJSS139, pJSS140 y pJSS141 que contienen 2, 1 y 4 copias, respectivamente.

5 El gen quimérico resultante del vector de *Agrobacterium tumefaciens* pBIN19 se utilizó para transformar plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. *Samsun*) de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. La Figura 9 muestra de forma gráfica los resultados para cinco constructos diferentes. Para cada constructo se analizaron diversas líneas transformadas independientes. La Tabla 6 muestra los valores reales de la actividad específica de GUS obtenidos para cada línea. Como era de esperar, el promotor *PetE* se expresa en las hojas, pero también se indica el sorprendente resultado de que los múltiplos del SEQ ID NO: 3 intensificarán la expresión de una manera relacionada con la dosis.

Tabla 6

10 Actividad GUS específica de extractos de hojas de plantas de tabaco transgénicas transformadas con un constructo que contiene una única copia del oligonucleótido de 26 unidades en el sitio EcoRI aguas arriba del promotor mínimo *PetE* -175/+4, informador GUS y terminador *nos*.

Actividad GUS específica (pmol MU/min/ μ g de proteína)

Núm. de Planta	Núm. de 26 unidades	1-26 unidades	2-26 unidades	3-26 unidades
1	4,6	6,14	20,73	18,87
2	3,3	4,01	12,60	52,40
3	5,3	5,83	6,39	27,38
4	4,6	2,68	2,56	7,59
6	2,4	2,21	42,95	
7			7,57	
8			5,57	
9			10,08	
10			4,82	
Media \pm ETM	4,30 \pm 0,54	3,91 \pm 0,69	16,46 \pm 5,39	35,68 \pm 11,70

Ejemplo 7

15 A fin de establecer adicionalmente que el SEQ ID NO: 1 era activo con otros promotores, se obtuvo el promotor de la metalotioneína de guisante, conocida en la presente memoria como PsMT_A, (Marta Evans, I., *et al.*, FEBS **262** (1) 29-32). La región -806 a -1 de ese promotor se ligó a la región codificante de GUS, que contenía un intrón (Vancanneyt, G. *et al.*, (1990) Mol. Gen. Genet **220** 245-250) y un terminador *nos*, lo que dio como resultado el constructo pKS 21040 (véase la Figura 10). El SEQ ID NO: 1 se unió en el extremo 5' a este gen quimérico ya sea en la orientación normal o inversa. Las fusiones de intensificador-promotor-GUS-terminador *nos* se trasladaron al vector binario pATC (un derivado de pBIN19 con sitios de restricción modificados), mostrado en la Figura 10. Esto dio lugar a los constructos pATC 25040 y pATC 26040, respectivamente (véase la Figura 11) que se utilizaron para transformar *Nicotiana tabacum* cv tabaco Heavy Western con *Agrobacterium tumefaciens* R1000 para producir raíces pilosas.

25 Transformación de raíces pilosas:

30 Se transformó *Agrobacterium tumefaciens* R1000 (McAfee, B *et al.*, Plant Cell Tissue and Organ Culture (1993) **34**, 53-62) mediante electroporación (Shen, W.J. y Forde B.J., Nucleic acid research (1989) 17, 8385) y las bacterias resultantes se utilizaron para transformar *Nicotiana tabacum* mediante el método del disco foliar (Horsch, R.B.; Fry, E.J.; Hoffman, N.L.; Eichholtz, D, Rogers, S.G.; Fraley, R.T. Science (1985) **22**, 1229-1231). Las raíces que eran resistentes a la kanamicina se separaron de los discos y se transfirieron a medios de cultivo de tejidos que contenían 100 μ g/ml de kanamicina y 500 μ g/ml de claforano. Las raíces se mantuvieron en este medio y se subcultivaron cada tres semanas. A continuación las raíces se transfirieron a medios con 100 μ g/ml de kanamicina y 200 μ g/ml de claforano. Después de otros 7 días las raíces se transfirieron a medios sin claforano y se subcultivaron cada semana.

Ejemplo 8

Se sintetizaron monómeros, dímeros y tetrámeros del oligómero sintético (SEQ ID NO: 3) para que contuvieran

5 salientes de EcoRI de modo que pudieran ser ligados en el sitio EcoRI de pIC19H (Marsh et al (1984) Gene 32, 481-485). El fragmento XhoI-Sall se separó de los plásmidos resultantes y se ligó en el sitio correspondiente en pKS 21040. Las fusiones de oligómero sintético promotor-GUS-terminador *nos* se trasladaron al vector binario pATC. Los constructos resultantes pATC27040, pATC28040 y pATC29040 (véase la Figura 11) se utilizaron para transformar *Nicotiana tabacum* cv Heavy Western para producir raíces pilosas.

REFERENCIAS

- Bradford, M.M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein di-binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248.
- 5 Fluhr, R., Kuhlmeier, C., Nagy, F. y Chua, N.H. (1986) Organ specific and light-induced expression of plant genes. *Science* **232**, 1106-1111.
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G. y Fraley, R.T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, **22**, 1229-1231.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., y Bevan, M.W. (1987) [GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *European Molecular Biology Organisation J.* **6**, 3901-3907]
- 10 Last, D.I. y Gray, J.C. (1989) Plastocyanin is encoded by a single-copy gene in the pea haploid. *Plant Molecular Biology* **12**, 655-666.
- Marsh, J.L., Erfle, M., Wykes, E.J. (1984) The PIC plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation. *Gene* **32**, 481-485.
- 15 Marta Evans, I., Gatehouse, L.N., Gatehouse, J.A., Robinson, N.J. y Croy, R.R.D. (1990) A gene from pea (*Pisum sativum* L) with homology to metallothionein genes. *Federation of European Biochemical Sciences*, **262** (1) 29-32
- McAfee, B., White, E., Pelcher, L. y Lapp, M. (1993) Root induction in pine (*Pinus*) and larch (*Larix*) spp. using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **34**, 53-62.
- Mignery, G.A.; Pikaard, C.S. y Park, W.D. (1988) Molecular characterisation of the patatin multigene family of potato. *Gene*, **62**, 27-44.
- 20 Ooms, G; Hooykaas, P.J.J., Van Veen R.J.M, Van Beelen, P; Regensburg, T.J.G.; Schilpoort R.A. (1982a) Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T region. *Plasmid* **7**, 15-29.
- Pwee, K.H. y Gray, J.C. (1993) The pea plastocyanin promoter directs cell specific but not full light regulated expression in transgenic tobacco plants. *The Plant Journal* **3**, 437-449
- 25 Shen, W.J. y Forde, B.J. (1989) Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by high voltage. *Nucleic acid research* **17**, 8385.
- Simpson, J., Schell, J., Van Montagu, M. y Herrera-Estrella, L. (1986) Light-inducible and tissue-specific pea *1hcp* gene expression involves an upstream element combining enhancer- and silencer-like properties. *Nature* **323**, 551-554.
- 30 Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sánchez, A., Willmitzer, L. y Rochsa-Sosa, M. (1990) Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.* **220**, 245-250.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para proporcionar un aumento de la expresión de uno o más genes en uno o más órganos de una planta intensificando la actividad de un promotor de uno o más genes utilizando una secuencia intensificadora aislada y/o purificada, consistiendo el intensificador en una secuencia aislada seleccionada del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 1 de la Figura 6; una secuencia que es una subsecuencia encontrada en el SEQ ID NO: 1, cuya subsecuencia es rica en bases A y T, comprendiendo la cantidad total de bases A y T más de 50% de la secuencia de nucleótidos, y activa como intensificador; el SEQ ID NO: 2 de la Figura 7; las siguientes secuencias del SEQ ID NO: 1: secuencias de pares de bases de los nucleótidos -444 a -389, -388 a -284, -283 a -179, -444 a -284 y -388 a -179; y el SEQ ID NO: 3 de la Figura 8; en donde dicho método comprende
- 10 (i) obtener la secuencia intensificadora de un gen de una planta o producir sintéticamente la secuencia intensificadora; y
- (ii) formar un gen quimérico que comprende la secuencia intensificadora aislada y/o purificada, el promotor, una secuencia codificante o no codificante y una secuencia terminadora;
- 15 incrementándose la actividad incrementada del promotor en comparación con la actividad del promotor sin que dicha secuencia intensificadora esté presente.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la subsecuencia comprende al menos 35% de bases A y T, respectivamente.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde una de las bases A o T está presente al menos en 40%, 45% o 50% del intensificador.
- 20 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha subsecuencia comprende solamente bases A y T.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el promotor es un promotor de una planta.
6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el intensificador ocasiona un incremento de la expresión del gen en tejidos verdes o no verdes de plantas.
- 25 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el incremento de la expresión se produce en las raíces, tubérculos, semillas, tallos, flores u hojas de tales plantas.
8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el intensificador funciona tanto en orientación normal como inversa.
- 30 9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el intensificador está unido al promotor o al terminador del gen que se va a expresar.
10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el método comprende transformar una planta.
11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la planta transformada es una especie dicotiledónea o una especie monocotiledónea.
- 35 12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicha planta es patata, tabaco, algodón, lechuga, melón, calabaza, pepino, guisante, colza, soja, remolacha azucarera, girasol, trigo, cebada, centeno, arroz o maíz.
13. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el gen quimérico comprende más de uno de dicho intensificador y más de un promotor.
- 40 14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicho intensificador está conectado operablemente a dicho promotor, y dicho intensificador está en orientación normal o inversa.
- 45 15. Un gen quimérico que comprende un intensificador, consistiendo el intensificador en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 1 de la Figura 6; una secuencia que es una subsecuencia encontrada en el SEQ ID NO: 1, cuya subsecuencia es rica en bases A y T, comprendiendo la cantidad total de bases A y T más de 50% de la secuencia de nucleótidos, y activa como intensificador; el SEQ ID NO: 2 de la Figura 7; las siguientes secuencias del SEQ ID NO: 1: las secuencias de pares de bases de los nucleótidos -444 a -389, -388 a -284, -283 a -179, -444 a -284 y -388 a -179; y el SEQ ID NO: 3 de la Figura 8, un promotor del gen, una secuencia codificante o no codificante y una secuencia terminadora, en donde la secuencia intensificadora se obtiene de un gen de una planta, o se produce sintéticamente, en una forma aislada y/o purificada, y conectada operablemente a dicho promotor para formar un gen quimérico.
- 50 16. Un gen quimérico de acuerdo con la reivindicación 15, que comprende más de uno de dicho intensificador y más

de un promotor.

17. Un gen quimérico de acuerdo con a reivindicación 15 o 16, en donde dicho intensificador está en una orientación normal o inversa.
- 5 18. Un gen quimérico de acuerdo con la reivindicación 15, que consiste en el intensificador del SEQ ID NO: 1 en una orientación normal o inversa, un promotor de un gen, una secuencia capaz de conferir un carácter identificable a una planta transformada y el terminador *nos*, en donde dicho promotor se selecciona entre el promotor *PefE* -175/+4 mínimo, el promotor de la patatina -330/+1 mínimo y el promotor de la metalotioneína de guisante -806/-1 *PsMT_A*.
- 10 19. Un gen quimérico de acuerdo con la reivindicación 15, que consiste en el intensificador del SEQ ID NO: 1 en orientación normal o inversa, el promotor de CaMV de 35S (-90) mínimo, una secuencia capaz de conferir un carácter identificable a una planta transformada y el terminador *nos*.
- 15 20. Un gen quimérico de acuerdo con la reivindicación 15, que consiste en un intensificador en orientación normal, el promotor *PefE* -175/+4 mínimo, una secuencia capaz de conferir un carácter identificable a una planta transformada y el terminador *nos*, en donde el intensificador se selecciona del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 2, las siguientes secuencias del SEQ ID NO: 1: las secuencias de pares de bases de los nucleótidos -444 a -389, -388 a -284, -283 a -179, -444 a -284 y -388 a -179 y el SEQ ID NO: 3.
- 20 21. Un gen quimérico de acuerdo con la reivindicación 15, que consiste en tres copias adyacentes del intensificador del SEQ ID NO: 2 en una orientación normal, el promotor *PefE* -175/+4 mínimo, una secuencia capaz de conferir un carácter identificable a una planta transformada y el terminador *nos*, en donde dichas tres copias adyacentes de dicho intensificador está conectadas operablemente a dicho promotor.
22. Un gen quimérico de acuerdo con la reivindicación 15, que consiste en dos a cuatro copias adyacentes del intensificador del SEQ ID NO: 3 en una orientación normal, el promotor *PefE* -175/+4 mínimo, una secuencia capaz de conferir un carácter identificable a una planta transformada y el terminador *nos*, en donde dichas dos o cuatro copias adyacentes de dicho intensificador está conectadas operablemente a dicho promotor.
- 25 23. Un gen quimérico de acuerdo con la reivindicación 15, que consiste en una, dos o cuatro copias adyacentes del intensificador del SEQ ID NO: 3 en una orientación normal, el promotor *PsMT_A* de la metalotioneína de guisante -806/-1, una secuencia capaz de conferir un carácter identificable a una planta transformada y el terminador *nos*, en donde dichas una, dos o cuatro copias adyacentes de dicho intensificador está conectadas operablemente a dicho promotor.
- 30 24. Una planta transformada que tiene el gen quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 15-17.
25. Una planta de tabaco transformada que tiene el gen quimérico de la reivindicación 18, en donde el promotor es el promotor *PefE* -175/+4 mínimo o el promotor *PsMT_A* de la metalotioneína de guisante -806/-1.
26. Una planta de patata transformada que tiene el gen quimérico de la reivindicación 18, en donde el promotor es el promotor de patatina -330/+1 mínimo.
- 35 27. Una planta de tabaco transformada que tiene el quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 19-23.
28. Propágulos de una planta transformada con un gen quimérico como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 15-17, teniendo dichos propágulos dicho gen quimérico.
29. Una célula que tiene el gen quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 15-17.

Fig.1.

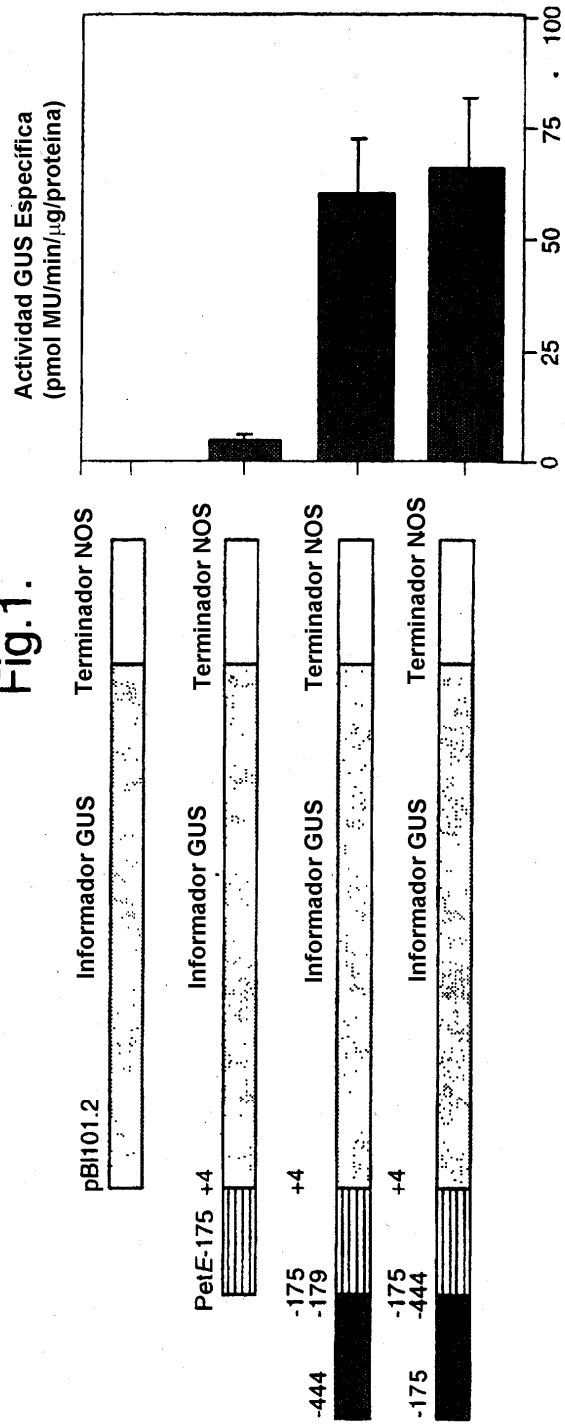


Fig.2.

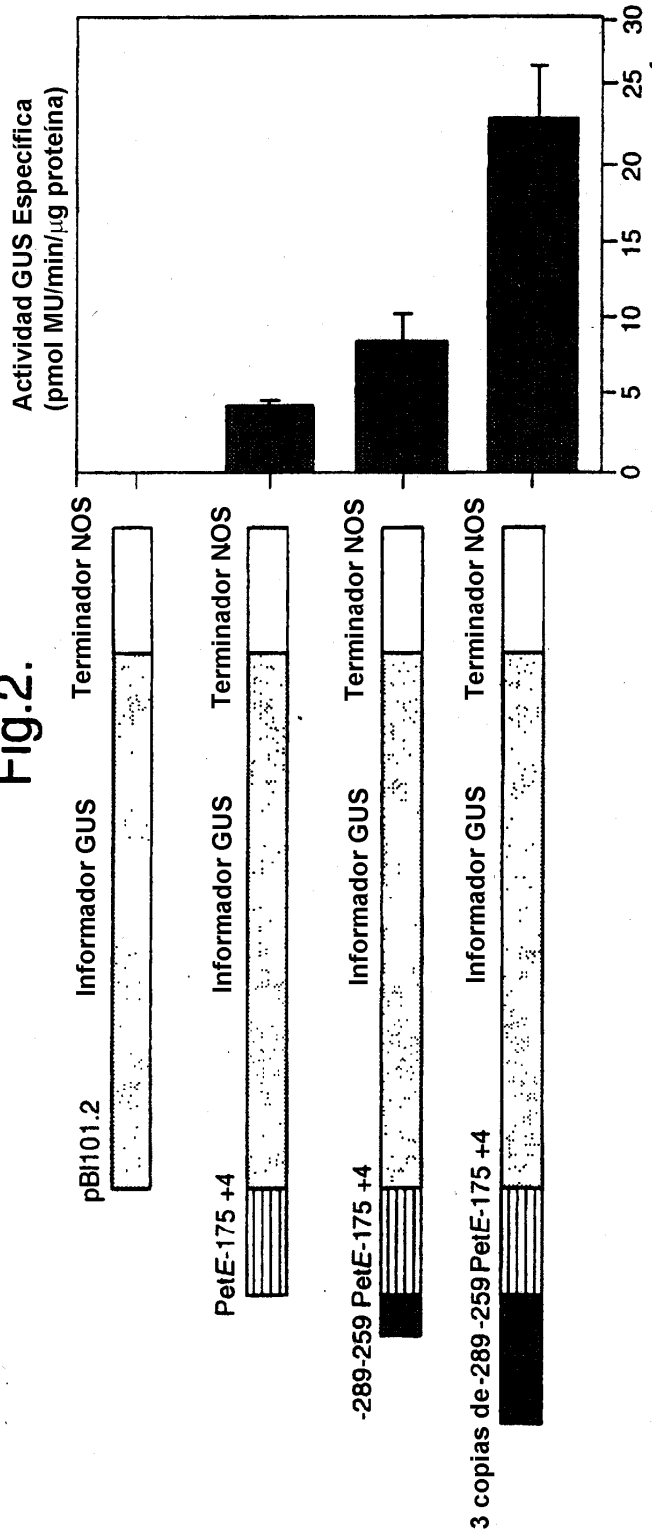


Fig.3.

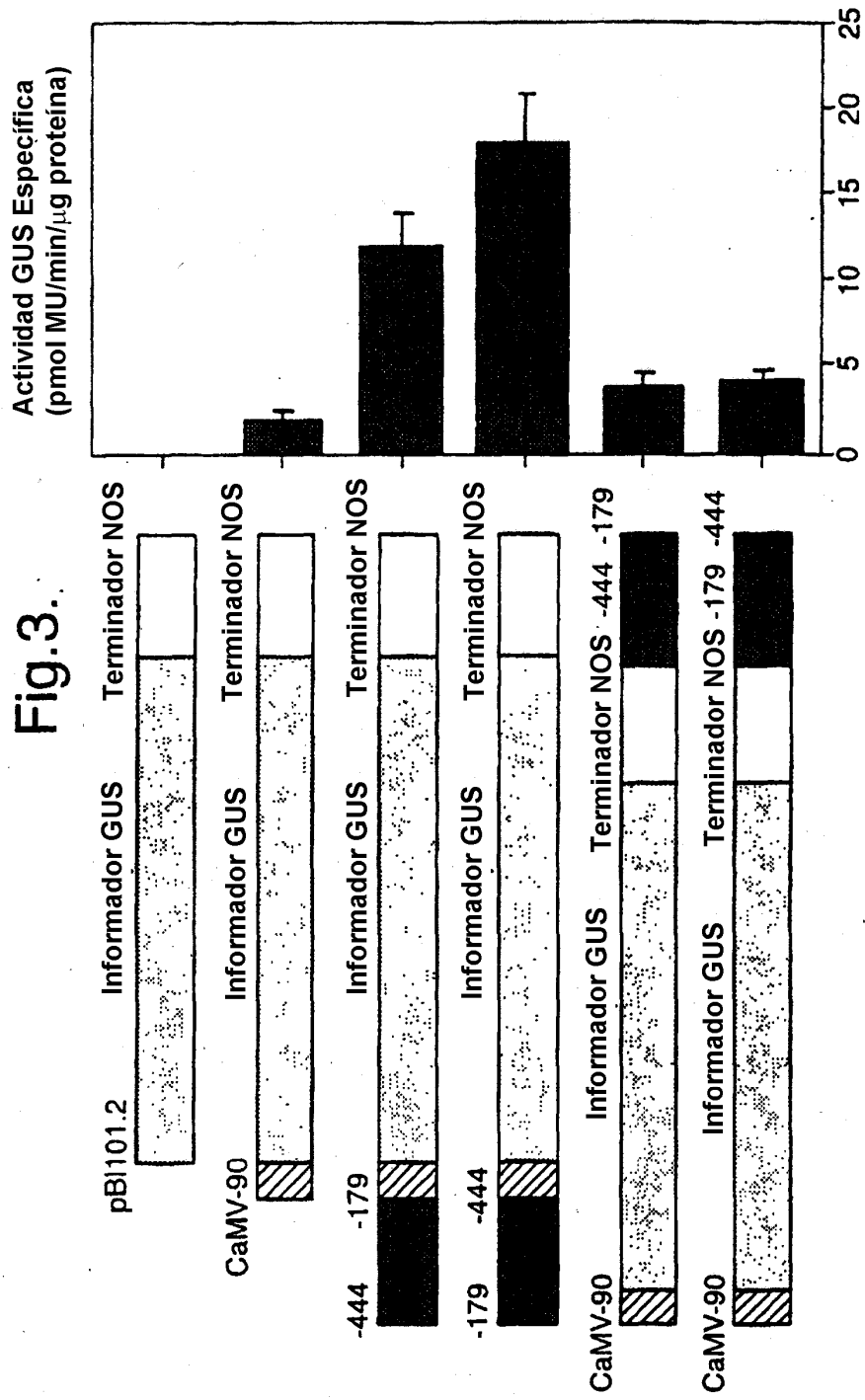


Fig.4.

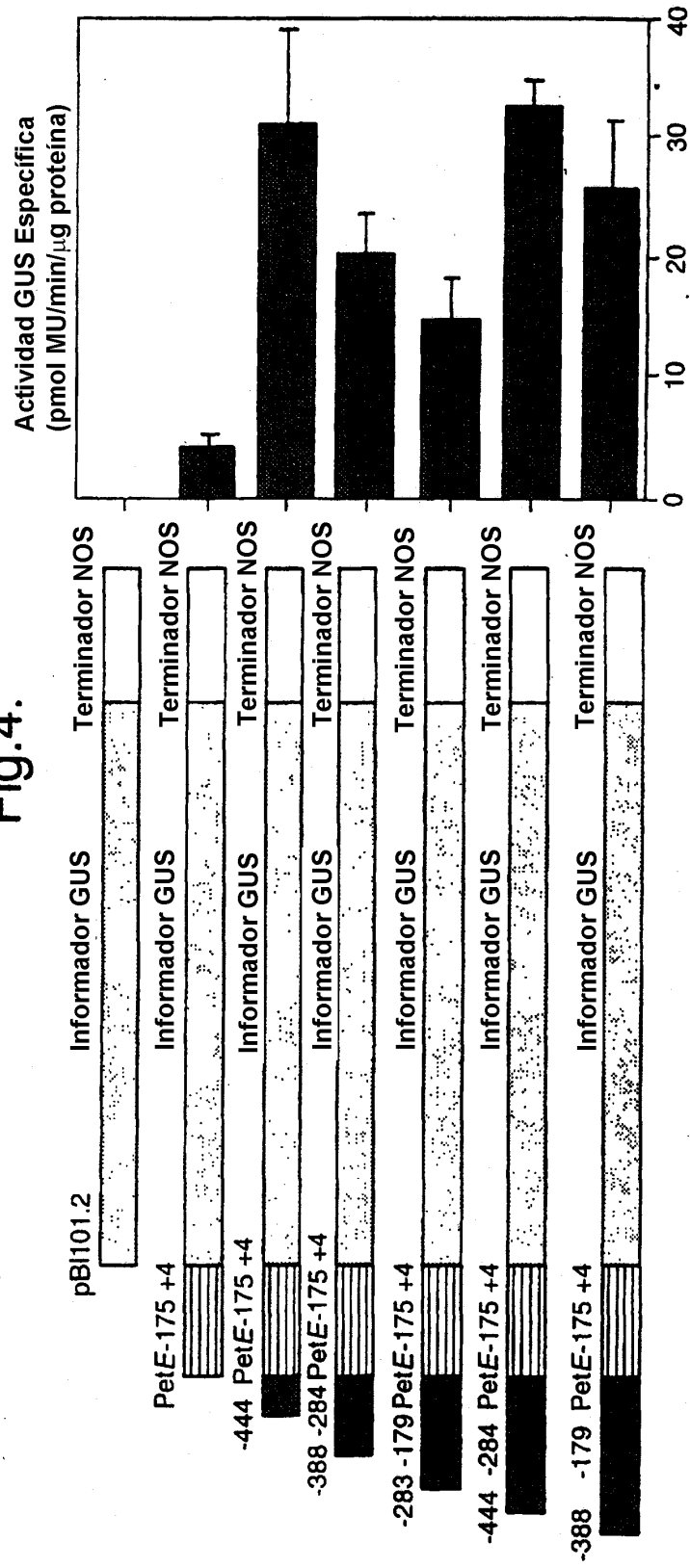


Fig.5.

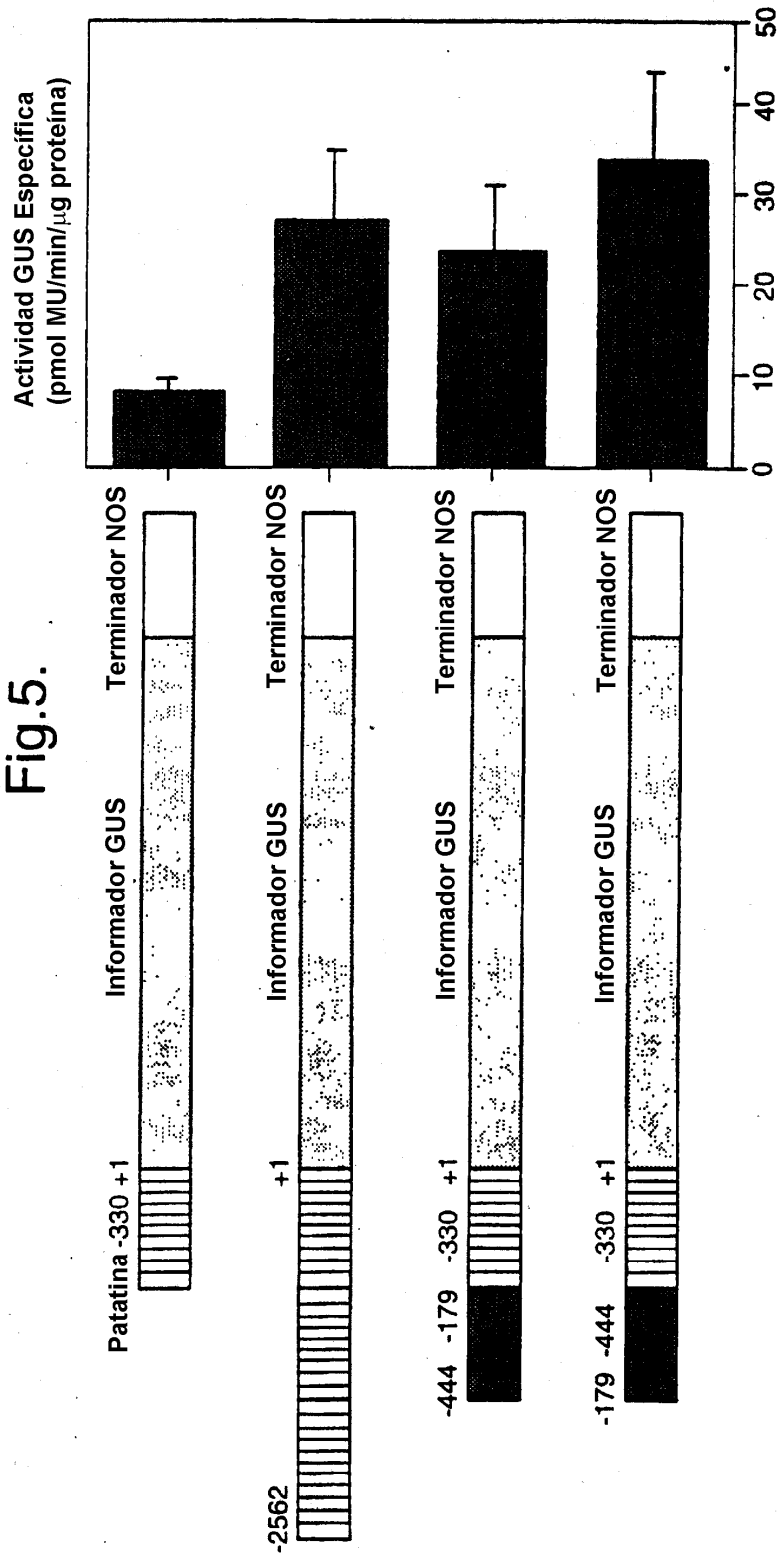


Fig.6.

SEQ. ID1

-444 AGCTTAGTTA ATCATGTTAA ACAACAATTC TTTGTAATAA TAAAATTGTC 50
 -394 TTTCAACTAG TCCAAGTTTA TGAGTTGATT CTTCCGGAATA AATTAGAAAA 100
 -344 TATCTTAGAT TTTATACTTC ATTGATTATT TCATAGAGCA AGTAGGAGAA 150
 -294 ATAAAAATAT ACTAGTATTA TTTACTAAAA AAAATCTAAG CCACGTCGGA 200
 -244 GGATAACATC CAACCCAGCC AATCACAGCA ATGTTCAATCA GATAACCCAC 250
 -194 TTTAAGCCCA CGCACT 266

Longitud: 266

Tipo: Genómico

Cualidad de la Hebra: Sencilla

Topología: Lineal

Fig.7.

SEQ. ID2

GATC AATATACTAG TATTATTTAC TAAAAAAAAT C
TTATATGATC ATAATAAATG ATTTTTTTTA G CTAG

Longitud: 31
Tipo: Genómico
Cualidad de la Hebra: Doble
Topología: Lineal

Fig.8.

SEQ. ID3

AATT ATAATATAAT TTTAATTTAA AA
TATTATATTA AAATTAATT TT TTAA

Longitud: 26
Tipo: Sintético
Cualidad de la Hebra: Doble
Topología: Lineal

Fig.9.

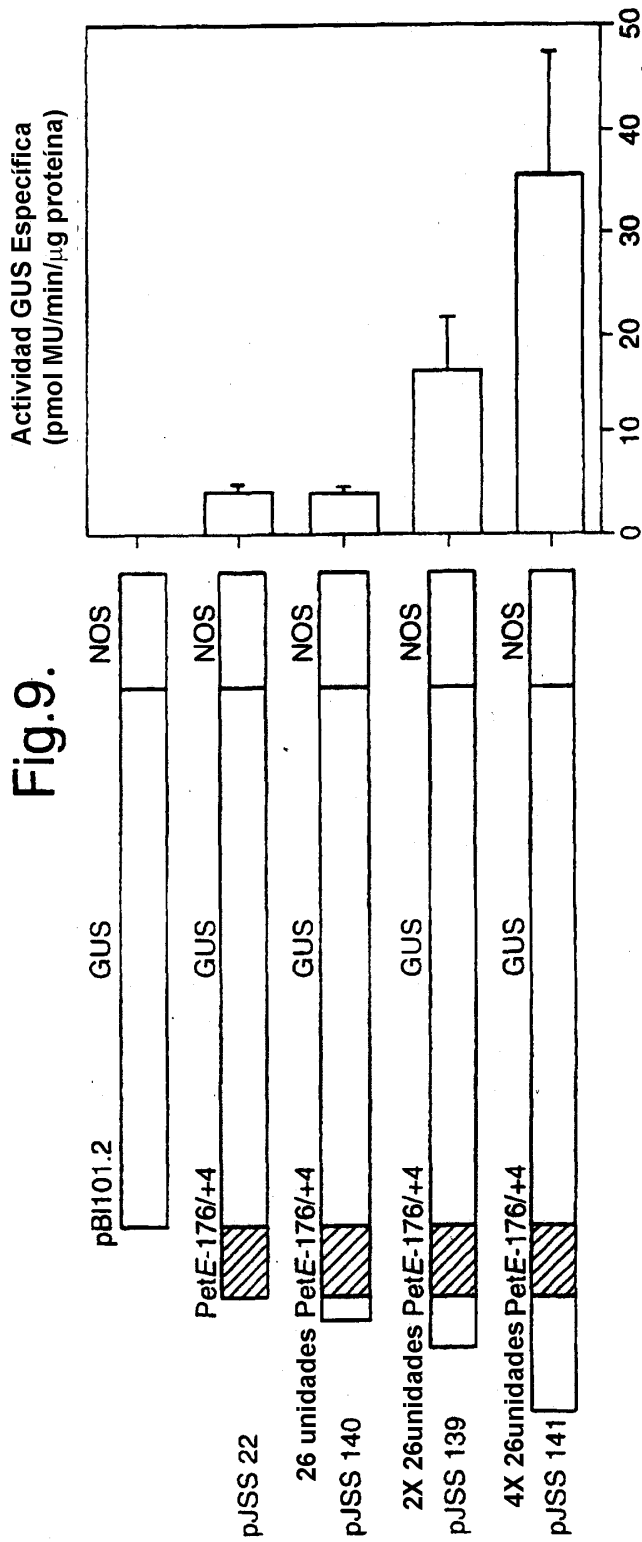


Fig. 10.

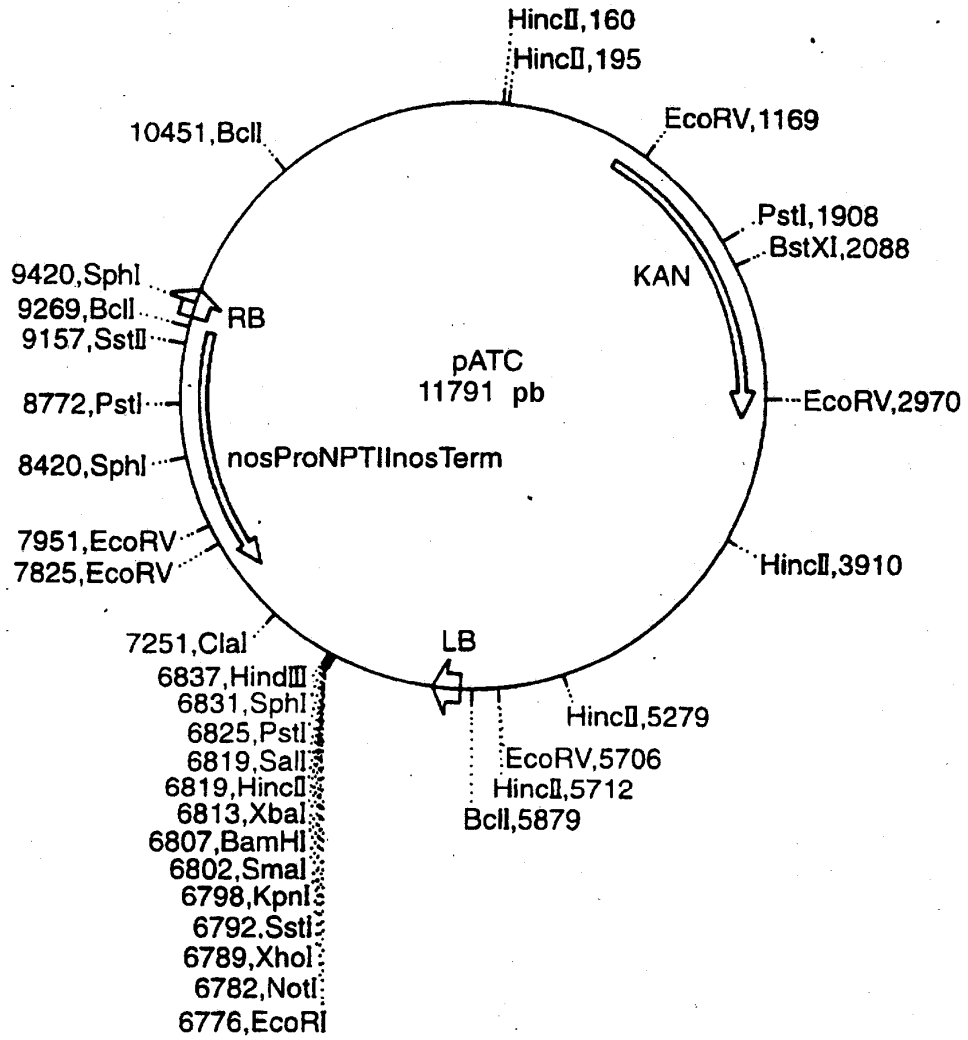


Fig.11.

