

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 953**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.05.2009 PCT/NZ2009/000076**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2009 WO09139649**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2009 E 09746825 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2285968**

54 Título: **Composiciones quiméricas y métodos para la regulación de la expresión génica en plantas**

30 Prioridad:

12.05.2008 NZ 56819008

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

03.01.2017

73 Titular/es:

**THE NEW ZEALAND INSTITUTE FOR PLANT AND
FOOD RESEARCH LIMITED (100.0%)
Mt Albert Research Centre 120 Mt Albert Road
Mt Albert, Auckland, NZ**

72 Inventor/es:

**ESPLEY, RICHARD;
HELLENS, ROGER P;
ALLAN, ANDREW C;
CHAGNE, DAVID y
BRENDOLISE, CYRIL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 595 953 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

Composiciones quiméricas y métodos para la regulación de la expresión génica en plantas.

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a polinucleótidos para la regulación de la expresión génica en plantas y a los usos de los mismos.

10 Antecedentes de la técnica

Un objetivo importante de la agricultura es la producción de plantas con unos rasgos agronómicos beneficiosos. Los recientes avances en la manipulación genética proporcionan las herramientas para transformar las plantas con secuencias de polinucleótidos de interés y para expresar dichas secuencias en las plantas transformadas. Esto ha dado lugar al desarrollo de plantas capaces de expresar productos farmacéuticos y otros productos químicos, a plantas con un aumento en la resistencia a las plagas, con un aumento en la tolerancia al estrés y con otros muchos rasgos beneficiosos.

15

A menudo es deseable controlar la expresión de un polinucleótido de interés, en un tejido en particular, en una fase de desarrollo en particular, o en unas condiciones particulares, en las que el polinucleótido normalmente no es expresado. El polinucleótido de interés puede codificar para una proteína, o como alternativa puede estar destinado a efectuar el silenciamiento de un gen objetivo correspondiente.

20

Las secuencias promotoras vegetales son útiles en la manipulación genética para dirigir la expresión de polinucleótidos en plantas transgénicas. Para conseguir esto a menudo se introduce una construcción genética en una célula vegetal o en una planta. Normalmente, dichos constructos incluyen un promotor vegetal unido operativamente a la secuencia de polinucleótidos de interés. No es necesario que dicho promotor esté normalmente asociado con el gen de interés. Una vez transformado, el promotor controla la expresión del polinucleótido de interés unido operativamente, dando lugar así a la expresión transgénica deseada y dando como resultado las características fenotípicas deseadas en la planta.

25

Los promotores usados en la manipulación genética derivan normalmente de la región no transcrita en 5' de los genes, y contienen elementos reguladores que son necesarios para el control de la expresión del polinucleótido unido operativamente. Los promotores útiles para la biotecnología vegetal pueden clasificarse dependiendo de cuándo y de dónde dirigen la expresión. Por ejemplo, los promotores pueden ser específicos tisulares o constitutivos (capaces de transcribir secuencias en múltiples tejidos). Otras clases de promotores incluyen promotores inducibles que pueden ser desencadenados por estímulos externos, tales como estímulos medioambientales y químicos.

35

A menudo es deseable un nivel de expresión relativamente elevado de la secuencia de interés transformada. Esto se consigue a menudo a través del uso de secuencias promotoras víricas, tales como el promotor del virus del mosaico de la coliflor 35S. En algunas circunstancias puede ser más preferible el uso de un promotor derivado de una planta en lugar de un promotor derivado de un microorganismo. También puede ser preferible en algunas circunstancias usar un promotor derivado de, o producido a partir de, secuencias derivadas de las especies que se van a transformar.

40

Sería beneficioso tener disponible una variedad de promotores con el fin de garantizar que los transgenes son transcritos a un nivel apropiado en los tejidos correctos y en una fase de crecimiento o de desarrollo apropiada.

45

La manzana (especie *Malus*) es una importante especie de fruta que crece en Nueva Zelanda y en otros climas templados de todo el mundo. Algunos rasgos valiosos que pueden mejorarse mediante una manipulación genética de la manzana incluyen: el aroma de la fruta, el color de la fruta, el contenido en componentes que favorecen la salud (tales como antocianinas y flavanoides) en la fruta, la tolerancia/resistencia al estrés, la tolerancia/resistencia a las plagas y la tolerancia/resistencia a las enfermedades.

50

La manipulación genética de dichos rasgos en la manzana, y de éstos y otros rasgos en otras especies, está limitada por la disponibilidad de promotores capaces de controlar apropiadamente la expresión de los genes de interés.

55

Es por lo tanto un objeto de la presente invención proporcionar un promotor útil para el control de la expresión génica en la manzana y en otras plantas y/o al menos proporcionar una elección útil.

60

Sumario de la invención

65

En el primer aspecto, la invención proporciona un método para la producción de un polinucleótido promotor quimérico capaz de controlar la transcripción de un polinucleótido unido operativamente en una célula vegetal o en una planta, en el que el método, según se define en la reivindicación 1, comprende la combinación de:

65

ES 2 595 953 T3

- a) al menos un motivo de secuencia que comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, 11 o 12 y
- b) un promotor natural diferente,

5 en el que el promotor quimérico esta modulado por un factor de transcripción MYB y en el que el promotor quimérico no se encuentra de forma natural en las plantas en su totalidad.

En una realización preferida, el método comprende la combinación de:

- 10 a) al menos dos motivos de secuencia, comprendiendo cada uno una secuencia con al menos un 70 % de identidad con uno cualquiera de la SEQ ID NO: 1, 11 o 12 y
- b) un promotor natural diferente como se ha definido anteriormente.

15 El polinucleótido promotor quimérico se produce más preferentemente mediante la combinación de:

- 15 a) al menos tres, más preferentemente al menos cuatro, más preferentemente al menos cinco, más preferentemente al menos seis y lo más preferentemente al menos siete motivos de secuencia, comprendiendo cada uno una secuencia con al menos un 70 % de identidad con uno cualquiera de la SEQ ID NO: 1, 11 o 12 y
- 20 b) un promotor natural diferente como se ha definido anteriormente.

20 Preferiblemente, al menos uno de los motivos de secuencia de a) comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1.

25 Preferiblemente, al menos un motivo de a) comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 41.

25 Preferiblemente, al menos un motivo de a) comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 42.

En una realización, al menos un motivo de secuencia de a) comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1.

30 En otra realización, al menos un motivo de secuencia de a) comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 11.

En otra realización, al menos un motivo de secuencia de a) comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 12.

35 El promotor quimérico puede comprender varios de los motivos de a) como se ha definido anteriormente. Los motivos del promotor pueden ser todos iguales o pueden ser una combinación de diferentes motivos, como se ha definido anteriormente.

40 En otra realización, al menos uno de los motivos de secuencia está interrumpido por al menos uno de los otros motivos de secuencia.

40 En una realización adicional, el motivo de secuencia de a) es parte de una secuencia de un polinucleótido promotor que aparece de forma natural en una planta.

45 En una realización adicional, el polinucleótido de b) es una secuencia de un polinucleótido promotor que aparece de forma natural en una planta.

En una realización preferida, tanto el motivo de secuencia de a) como el polinucleótido promotor de b) aparecen de forma natural en las plantas.

50 Preferiblemente, el motivo de secuencia de a) y el polinucleótido de b) aparecen de forma natural en la misma especie o en especies interfértiles.

55 Preferiblemente, el motivo de secuencia de a) y el polinucleótido de b) aparecen de forma natural en el mismo promotor.

55 En esta realización puede añadirse una copia o copias adicionales de un motivo con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, 11 o 12, que está presente en un polinucleótido promotor natural, al polinucleótido promotor natural, para producir el polinucleótido promotor quimérico.

60 En una realización alternativa, pueden añadirse uno o más motivos con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, 11 o 12, que aparecen de forma natural en los promotores vegetales, a un promotor natural diferente.

65 El motivo o los motivos con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, 11 o 12, pueden aparecer de forma natural en diferentes especies, o ser promotores diferentes y pueden combinarse con un promotor de una de la misma especie, o de especies diferentes.

En una realización, el polinucleótido promotor natural de b) comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 13.

5 En una realización adicional, el polinucleótido promotor natural comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 13.

En una realización el promotor quimérico es producido mediante la combinación de:

- a) la secuencia de la SEQ ID NO: 14 y
- b) la secuencia de la SEQ ID NO: 8.

10

En una realización el promotor quimérico es producido mediante la combinación de:

- a) la secuencia de la SEQ ID NO: 14 y
- b) la secuencia de la SEQ ID NO: 13.

15

En una realización el promotor quimérico es producido mediante la combinación de:

- a) la secuencia de la SEQ ID NO: 14 y
- b) la secuencia de la SEQ ID NO: 36.

20

En una realización el promotor quimérico es producido mediante la combinación de:

- a) la secuencia de la SEQ ID NO: 14 y
- b) la secuencia de la SEQ ID NO: 38.

25

En una realización adicional, el polinucleótido promotor quimérico comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 15.

30 En una realización adicional, el polinucleótido promotor quimérico comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 15.

En una realización adicional, el polinucleótido promotor quimérico comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 37.

35 En una realización adicional, el polinucleótido promotor quimérico comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 37.

En una realización adicional, el polinucleótido promotor quimérico comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 39.

40 En una realización adicional, el polinucleótido promotor quimérico comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 39.

En una realización adicional, el polinucleótido promotor quimérico comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 40.

45 En una realización adicional, el polinucleótido promotor quimérico comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 40.

En un aspecto más, la invención proporciona un promotor quimérico producido mediante el método de la invención.

50 En un aspecto más, la invención proporciona un polinucleótido promotor quimérico según se define en la reivindicación 3, que es capaz de controlar la transcripción de un polinucleótido unido operativamente en una célula vegetal o en una planta, en el que el polinucleótido promotor comprende:

- a) al menos un motivo de secuencia que comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, 11 o 12
- b) un promotor natural diferente,

55

en el que el promotor quimérico está modulado por un factor de transcripción MYB y en el que el promotor quimérico no se encuentra de forma natural en las plantas en su totalidad.

60 En una realización preferida, el polinucleótido promotor quimérico comprende al menos dos motivos de secuencia que comprenden una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, 11 o 12.

65 El polinucleótido promotor quimérico más preferentemente comprende al menos tres, más preferentemente al menos cuatro, más preferentemente al menos cinco, más preferentemente al menos seis y lo más preferentemente al menos siete motivos de secuencia que comprenden una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, 11 o 12.

- Preferiblemente, al menos uno de los motivos de secuencia comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1.
- 5 Preferiblemente, al menos un motivo de a) comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 41.
- Preferiblemente, al menos un motivo de a) comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 42.
- En una realización, al menos un motivo de secuencia comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1.
- 10 En otra realización, al menos un motivo de secuencia comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 11.
- En otra realización, al menos un motivo de secuencia comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 12.
- 15 El promotor quimérico puede comprender varios de los motivos de a) como se ha definido anteriormente. Los motivos del promotor pueden ser todos iguales, o pueden ser una combinación de diferentes motivos como se ha definido anteriormente.
- En otra realización, al menos uno de los motivos de secuencia está interrumpido por al menos uno de los otros motivos de secuencia.
- 20 En una realización adicional, el motivo de secuencia de a) es parte de una secuencia de un polinucleótido promotor que aparece de forma natural en una planta.
- En una realización adicional, el polinucleótido de b) es una secuencia de un polinucleótido promotor que aparece de forma natural en una planta.
- 25 En una realización preferida tanto el motivo de secuencia de a) como el polinucleótido promotor de b) aparecen de forma natural en las plantas.
- 30 Preferiblemente, el motivo de secuencia de a) y el polinucleótido de b) aparecen de forma natural en la misma especie o en especies interfértiles.
- Preferiblemente, el motivo de secuencia de a) y el polinucleótido de b) aparecen de forma natural en el mismo promotor.
- 35 En esta realización el promotor quimérico puede comprender el promotor natural con una copia o copias adicionales insertadas, de un motivo con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, 12 o 13 que está presente en el polinucleótido promotor natural.
- 40 En una realización alternativa, el promotor quimérico puede comprender un promotor natural con una copia o copias adicionales insertadas de un motivo con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, 12 o 13 que no está presente en el polinucleótido promotor natural.
- 45 El motivo o los motivos que comprenden una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, 11 o 12, pueden aparecer de forma natural en diferentes especies, o ser diferentes promotores y pueden haber sido combinados con un promotor de uno de la misma especie, o de una especie diferente.
- En una realización el polinucleótido promotor natural comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 13.
- 50 En una realización adicional, el polinucleótido promotor natural comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 13.
- En una realización el promotor quimérico comprende:
- 55 a) la secuencia de la SEQ ID NO: 14, combinada con
b) la secuencia de la SEQ ID NO: 8.
- En una realización el promotor quimérico comprende:
- 60 a) la secuencia de la SEQ ID NO: 14, combinada con
b) la secuencia de la SEQ ID NO: 13.
- En una realización el promotor quimérico comprende:
- 65 a) la secuencia de la SEQ ID NO: 14, combinada con
b) la secuencia de la SEQ ID NO: 36.

En una realización el promotor quimérico comprende:

- a) la secuencia de la SEQ ID NO: 14, combinada con
- b) la secuencia de la SEQ ID NO: 38.

5 En una realización adicional, el polinucleótido promotor quimérico comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 15.

10 En una realización adicional, el polinucleótido promotor quimérico comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 15.

En una realización adicional, el polinucleótido promotor quimérico comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 37.

15 En una realización adicional, el polinucleótido promotor quimérico comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 37.

En una realización adicional, el polinucleótido promotor quimérico comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 39.

20 En una realización adicional, el polinucleótido promotor quimérico comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 39.

En una realización adicional, el polinucleótido promotor quimérico comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 40.

25 En una realización adicional, el polinucleótido promotor quimérico comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 40.

En una realización adicional, el polinucleótido promotor quimérico está regulado positivamente, o activado, o regulado por aumento por el factor de transcripción MYB.

30 Preferiblemente, el factor de transcripción MYB comprende un dominio de unión al ADN R2R3.

Preferiblemente, el factor de transcripción MYB comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 6.

35 Preferiblemente, el factor de transcripción MYB comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 6.

Preferiblemente, el factor de transcripción MYB comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 17.

40 Preferiblemente, el factor de transcripción MYB comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 17.

Preferiblemente, el factor de transcripción MYB comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 32.

45 Preferiblemente, el factor de transcripción MYB comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 32.

Preferiblemente, el factor de transcripción MYB comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 34.

50 Preferiblemente, el factor de transcripción MYB comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 34.

Preferiblemente, el polinucleótido promotor quimérico está regulado por aumento por el producto génico del gen con el que está asociado endógenamente a al menos uno de los motivos de secuencia del polinucleótido promotor quimérico.

55 Preferiblemente, al menos uno de los motivos de secuencia del polinucleótido promotor quimérico en su entorno natural está asociado endógenamente con el factor de transcripción MYB. Preferiblemente, el promotor quimérico está regulado positivamente por el factor de transcripción MYB.

60 Preferiblemente, el polinucleótido promotor quimérico es capaz de controlar la transcripción de una secuencia de polinucleótidos unida operativamente constitutivamente en sustancialmente todos los tejidos de una planta.

Más preferentemente, el polinucleótido promotor es capaz de controlar la transcripción de una secuencia de polinucleótidos unida operativamente constitutivamente en cualquier planta, célula vegetal o tejido vegetal en el que se exprese el factor de transcripción MYB.

65

El factor de transcripción MYB puede ser expresado de forma natural en la planta o puede ser expresado en la planta a través de la manipulación genética de la planta.

5 En un aspecto más, la invención proporciona una construcción genética que comprende un polinucleótido promotor quimérico de la invención.

En una realización, el polinucleótido promotor quimérico está unido operativamente a una secuencia de polinucleótidos que se va a expresar.

10 En un aspecto más, la invención proporciona un vector que comprende una construcción genética de la invención.

En un aspecto más, la invención proporciona una célula hospedadora transformada con el polinucleótido promotor quimérico de la invención.

15 En un aspecto más, la invención proporciona una célula vegetal o una planta transformada con el polinucleótido promotor quimérico de la invención.

En un aspecto más, la invención proporciona una célula vegetal o una planta transformada con una construcción genética de la invención.

20 En una realización, la célula vegetal o la planta también está transformada con un polinucleótido o una construcción genética para que exprese un factor de transcripción MYB que modula la expresión del polinucleótido promotor quimérico de la invención.

25 En una realización adicional, la célula vegetal o la planta expresan de forma natural el factor de transcripción MYB.

En una realización adicional, el factor de transcripción MYB comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 70 % de identidad con la secuencia de uno cualquiera de los SEQ ID NO: 6, 17, 32 y 34.

30 Preferiblemente, el factor de transcripción MYB comprende la secuencia de uno cualquiera de los SEQ ID NO: 6, 17, 32 y 34.

En una realización adicional, el factor de transcripción MYB comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 70 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 6.

35 Preferiblemente, el factor de transcripción MYB comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 6.

En una realización adicional, el factor de transcripción MYB comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 70 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 17.

40 Preferiblemente, el factor de transcripción MYB comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 17.

En una realización adicional, el factor de transcripción MYB comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 70 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 32.

45 Preferiblemente, el factor de transcripción MYB comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 32.

En una realización adicional, el factor de transcripción MYB comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 70 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 34.

50 Preferiblemente, el factor de transcripción MYB comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 34.

En un aspecto más, la invención proporciona un método para la producción de una célula vegetal o de una planta con la expresión modificada de al menos un polinucleótido, comprendiendo el método la transformación de la célula vegetal o de la planta con un polinucleótido promotor quimérico de la invención

55 En una realización, la célula vegetal o la planta es transformada con una construcción genética de la invención.

60 En una realización adicional, la célula vegetal o la planta también es transformada con un polinucleótido o con una construcción genética capaz de expresar un factor de transcripción MYB que modula la expresión del polinucleótido promotor quimérico de la invención.

En una realización adicional, la célula vegetal o la planta expresa de forma natural el factor de transcripción MYB.

65 En una realización adicional, el factor de transcripción MYB comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 70 % de identidad con la secuencia de uno cualquiera de los SEQ ID NO: 6,17, 32 y 34.

ES 2 595 953 T3

Preferiblemente, el factor de transcripción MYB comprende la secuencia de uno cualquiera de los SEQ ID NO: 6, 17, 32 y 34.

5 En una realización adicional, el factor de transcripción MYB comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 6.

Preferiblemente, el factor de transcripción MYB comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 6.

10 En una realización adicional, el factor de transcripción MYB comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 17.

Preferiblemente, el factor de transcripción MYB comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 17.

15 En una realización adicional, el factor de transcripción MYB comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 32.

Preferiblemente, el factor de transcripción MYB comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 32.

20 En una realización adicional, el factor de transcripción MYB comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 34.

Preferiblemente, el factor de transcripción MYB comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 34.

25 Los expertos en la materia apreciarán que el polinucleótido promotor quimérico de la invención puede ser transformado en la planta para controlar la expresión de un polinucleótido que está unido operativamente al promotor antes de la transformación.

30 Alternativamente, el polinucleótido promotor puede ser transformado en el genoma de la planta sin un polinucleótido unido operativamente, pero el promotor puede controlar la expresión de un polinucleótido endógeno, normalmente adyacente al sitio del inserto y normalmente, hacia el extremo 3' del polinucleótido promotor insertado.

35 En un aspecto más se proporciona un método para la producción de una célula vegetal o de una planta con un fenotipo modificado, comprendiendo el método la incorporación estable en el genoma de la planta de un polinucleótido promotor quimérico de la invención

En una realización, la célula vegetal o la planta es transformada con una construcción genética de la invención.

40 En una realización adicional, la célula vegetal o la planta también es transformada con una construcción genética para la expresión de un factor de transcripción MYB que modula la expresión del polinucleótido promotor quimérico de la invención.

En una realización adicional, la célula vegetal o la planta expresa de forma natural el factor de transcripción MYB.

45 En una realización adicional, el factor de transcripción MYB comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 70 % de identidad con la secuencia de uno cualquiera de los SEQ ID NO: 6, 17, 32 y 34.

Preferiblemente, el factor de transcripción MYB comprende la secuencia de uno cualquiera de los SEQ ID NO: 6, 17, 32 y 34.

50 En una realización adicional, el factor de transcripción MYB comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 6.

Preferiblemente, el factor de transcripción MYB comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 6.

55 En una realización adicional, el factor de transcripción MYB comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 17.

Preferiblemente, el factor de transcripción MYB comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 17.

60 En una realización adicional, el factor de transcripción MYB comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 32.

Preferiblemente, el factor de transcripción MYB comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 32.

65 En una realización adicional, el factor de transcripción MYB comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 34.

Preferiblemente, el factor de transcripción MYB comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 34.

En un aspecto más, la invención proporciona una célula vegetal o una planta producida mediante un método de la invención.

5 En un aspecto más, la invención proporciona una semilla, un propágulo, una descendencia, una parte, una fruta o el material recogido de una planta de la invención.

10 Preferiblemente, la semilla, el propágulo, la descendencia, la parte, la fruta o el material recogido de la planta comprende un polinucleótido promotor quimérico de la invención.

Las secuencias naturales que pueden usarse para la producción del polinucleótido promotor quimérico de la invención pueden derivar de cualquier especie.

15 En una realización, la secuencia natural deriva de una especie vegetal.

En una realización adicional, la secuencia natural deriva de una especie vegetal gimnosperma.

20 En una realización adicional, la secuencia natural deriva de una especie vegetal angiosperma.

En una realización adicional, la secuencia natural deriva de una especie vegetal dicotiledónea.

En una realización adicional, la secuencia natural deriva de una especie vegetal monocotiledónea.

25 El polipéptido codificado por el polinucleótido que va a ser expresado en un constructo de la invención, puede derivar de cualquier especie y/o puede ser producido sintéticamente o recombinantemente.

En una realización, el polipéptido deriva de una especie vegetal.

30 En una realización adicional, el polipéptido deriva de una especie vegetal gimnosperma.

En una realización adicional, el polipéptido deriva de una especie vegetal angiosperma.

35 En una realización adicional, el polipéptido deriva de una especie vegetal dicotiledónea.

En una realización adicional, el polipéptido deriva de una especie vegetal monocotiledónea.

El factor de transcripción MYB que regula el polinucleótido promotor quimérico de la invención puede derivar de cualquier especie y/o puede ser producido sintéticamente o recombinantemente.

40 En una realización, el factor de transcripción MYB deriva de una especie vegetal.

En una realización adicional, el factor de transcripción MYB deriva de una especie vegetal gimnosperma.

45 En una realización adicional, el factor de transcripción MYB deriva de una especie vegetal angiosperma.

En una realización adicional, el factor de transcripción MYB deriva de una especie vegetal dicotiledónea.

50 En una realización adicional, el factor de transcripción MYB deriva de una especie vegetal monocotiledónea.

Las células vegetales y las plantas de la invención, o producidas mediante los métodos de la invención, pueden derivar de cualquier especie.

55 En una realización, la célula vegetal o la planta deriva de una especie vegetal gimnosperma.

En una realización adicional, la célula vegetal o la planta deriva de una especie vegetal angiosperma.

En una realización adicional, la célula vegetal o la planta deriva de una especie vegetal dicotiledónea.

60 En una realización adicional, la célula vegetal o la planta deriva de una especie vegetal monocotiledónea.

65 Algunas especies vegetales preferidas (a partir de las cuales puede derivar la secuencia natural y las variantes, los polipéptidos y las variantes, el factor de transcripción MYB y las variantes y las células vegetales y) incluyen especies vegetales frutales seleccionadas entre un grupo que comprende, pero no se limita a, los siguientes géneros: *Malus*, *Pirus*, *Prunus*, *Rubus*, *Rosa*, *Fragaria*, *Actinidia*, *Cydonia*, *Citrus* y *Vaccinium*.

Algunas especies vegetales frutales particularmente preferidas son: *Malus domestica*, *Pirus communis*, *Actidinia deliciosa*, *A. chinensis*, *A. eriantha*, *A. arguta* y los híbridos de las cuatro especies de Actinidia, *Fragaria ananassa* y *Prunus persica*.

- 5 Algunas plantas preferidas también incluyen especies vegetales de hortalizas seleccionadas entre un grupo que comprende, pero no se limita a, los siguientes géneros: *Brassica*, *Lycopersicon* y *Solanum*.

Algunas especies vegetales de hortalizas particularmente preferidas son: *Lycopersicon esculentum* y *Solanum tuberosum*.

- 10 Algunas plantas preferidas también incluyen especies vegetales forrajeras seleccionadas entre un grupo que comprende, pero no se limita a, los siguientes géneros: *Glycine*, *Zea*, *Hordeum* y *Oryza*.

Algunas especies vegetales forrajeras particularmente preferidas incluyen *Glycine max*, *Zea mays* y *Oryza sativa*.

- 15 Algunas plantas preferidas también incluyen las de la familia *Rosaceae*.

Algunos géneros preferidos de *Rosaceae* incluyen *Exochorda*, *Maddenia*, *Oemleria*, *Osmaronia*, *Prinsepia*, *Prunus*, *Maloideae*, *Amelanchier*, *Aria*, *Aronia*, *Chaenomeles*, *Chamaemespilus*, *Cormus*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Osmaronia*, *Prinsepia*, *Prunus*, *Maloideae*, *Amelanchier*, *Aria*, *Aronia*, *Chaenomeles*, *Chamaemespilus*, *Cormus*, *Cotoneaster*, *Crataegu*, *Cydonia*, *Dicholomanthes*, *Docynia*, *Docyniopsis*, *Eriobotrya*, *Eriolobus*, *Heteromeles*, *Kageneckia*, *Lindleya*, *Malacomeles*, *Malus*, *Mespilus*, *Osteomeles*, *Peraphyllum*, *Photinia*, *Pseudociclonia*, *Piracantha*, *Pirus*, *Rhaphiolepis*, *Sorbus*, *Stranvaesia*, *Torminalis*, *Vauquelinia*, *Rosoideae*, *Acaena*, *Acomastylis*, *Agrimonia*, *Alchemilla*, *Aphanes*, *Aremonia*, *Bencomia*, *Chamaebatia*, *Cliffortia*, *Coluria*, *Cowania*, *Dalibarda*, *Dendriopoterium*, *Dryas*, *Duchesnea*, *Erythrocoma*, *Fallugia*, *Filipendula*, *Fragaria*, *Geum*, *Hagenia*, *Horkelia*, *Ivesia*, *Kerria*, *Leucosidea*, *Marcetella*, *Margyricarpus*, *Novosieversia*, *Oncostylus*, *Polylepis*, *Potentilla*, *Rosa*, *Rubus*, *Sanguisorba*, *Sarcopoterium*, *Sibbaldia*, *Sieversia*, *Taihangia*, *Tetraglochin*, *Waldsteinia*, *Rosaceae incertae sedis*, *Adenostoma*, *Aruncus*, *Cercocarpus*, *Chamaebatiaria*, *Chamaerhodos*, *Gillenia*, *Holodiscus*, *Lyonothamnus*, *Neillia*, *Neviusia*, *Physocarpus*, *Purshia*, *Rhodotypos*, *Sorbaria*, *Spiraea* y *Stephanandra*.

- 30 Algunas especies preferidas de *Rosaceae* incluyen *Exochorda giraldii*, *Exochorda racemosa*, *Exochorda*, *Exochorda giraldii*, *Exochorda racemosa*, *Exochorda serratifolia*, *Maddenia hypoleuca*, *Oemleria cerasiformis*, *Osmaronia cerasiformis*, *Prinsepia sinensis*, *Prinsepia uniflora*, *Prunus alleghaniensis*, *Prunus americana*, *Prunus andersonii*, *Prunus angustifolia*, *Prunus apetala*, *Prunus argentea*, *Prunus armeniaca*, *Prunus avium*, *Prunus bifrons*, *Prunus brigantina*, *Prunus bucharica*, *Prunus buergeriana*, *Prunus campanulata*, *Prunus caroliniana*, *Prunus cerasifera*, *Prunus cerasus*, *Prunus choreiana*, *Prunus cocomilia*, *Prunus ciclamina*, *Prunus davidiana*, *Prunus debilis*, *Prunus domestica*, *Prunus dulcis*, *Prunus emarginata*, *Prunus fasciculata*, *Prunus ferganensis*, *Prunus fordiana*, *Prunus fremontii*, *Prunus fruticosa*, *Prunus geniculata*, *Prunus glandulosa*, *Prunus gracilis*, *Prunus grayana*, *Prunus hortulana*, *Prunus ilicifolia*, *Prunus incisa*, *Prunus jacquemontii*, *Prunus japonica*, *Prunus kuramica*, *Prunus laurocerasus*, *Prunus leveilleana*, *Prunus lusitanica*, *Prunus maackii*, *Prunus mahaleb*, *Prunus mandshurica*, *Prunus maritima*, *Prunus maximowiczii*, *Prunus mexicana*, *Prunus microcarpa*, *Prunus mira*, *Prunus mume*, *Prunus munsoniana*, *Prunus nigra*, *Prunus nipponica*, *Prunus padus*, *Prunus pensylvanica*, *Prunus persica*, *Prunus petunnikowii*, *Prunus prostrata*, *Prunus pseudocerasus*, *Prunus pumila*, *Prunus rivularis*, *Prunus salicina*, *Prunus sargentii*, *Prunus sellowii*, *Prunus serotina*, *Prunus serrulata*, *Prunus sibirica*, *Prunus simonii*, *Prunus spinosa*, *Prunus spinulosa*, *Prunus subcordata*, *Prunus subhirtella*, *Prunus takesimensis*, *Prunus tenella*, *Prunus texana*, *Prunus tomentosa*, *Prunus tschonoskii*, *Prunus umbellata*, *Prunus verecunda*, *Prunus virginiana*, *Prunus webbii*, *Prunus x yedoensis*, *Prunus zippeliana*, *Prunus sp. BSP-2004-1*, *Prunus sp. BSP-2004-2*, *Prunus sp. EB-2002*, *Amelanchier alnifolia*, *Amelanchier arborea*, *Amelanchier asiatica*, *Amelanchier bartramiana*, *Amelanchier canadensis*, *Amelanchier cusickii*, *Amelanchier fernaldii*, *Amelanchier florida*, *Amelanchier humilis*, *Amelanchier intermedia*, *Amelanchier laevis*, *Amelanchier lucida*, *Amelanchier nantucketensis*, *Amelanchier pumila*, *Amelanchier quinti-martii*, *Amelanchier sanguinea*, *Amelanchier stolonifera*, *Amelanchier utahensis*, *Amelanchier wiegandii*, *Amelanchier x neglecta*, *Amelanchier bartramiana x Amelanchier sp. 'dentata'*, *Amelanchier sp. 'dentata'*, *Amelanchier sp. 'erecta'*, *Amelanchier sp. 'erecta' x Amelanchier laevis*, *Amelanchier sp. 'serotina'*, *Aria alnifolia*, *Aronia prunifolia*, *Chaenomeles cathayensis*, *Chaenomeles speciosa*, *Chamaemespilus alpina*, *Cormus domestica*, *Cotoneasterapiculatus*, *Cotoneaster lacteus*, *Cotoneaster pannosus*, *Crataegus azarolus*, *Crataegus columbiana*, *Crataegus crugalli*, *Crataegus curvisepala*, *Crataegus laevigata*, *Crataegus mollis*, *Crataegus monogyna*, *Crataegus nigra*, *Crataegus rivularis*, *Crataegus sinaica*, *Cydonia oblonga*, *Dichotomanthes tristanii*, *Docynia delavayi*, *Docyniopsis tschonoskii*, *Eriobotrya japonica*, *Eriobotrya prinoides*, *Eriolobus trilobatus*, *Heteromeles arbutifolia*, *Kageneckia angustifolia*, *Kageneckia oblonga*, *Lindleya mespiloides*, *Malacomeles denticulata*, *Malus angustifolia*, *Malus asiatica*, *Malus baccata*, *Malus coronaria*, *Malus doumeri*, *Malus florentina*, *Malus floribunda*, *Malus fusca*, *Malus halliana*, *Malus honanensis*, *Malus hupehensis*, *Malus ioensis*, *Malus kansuensis*, *Malus mandshurica*, *Malus micromalus*, *Malus niedzwetzkyana*, *Malus ombrophilia*, *Malus orientalis*, *Malus prattii*, *Malus prunifolia*, *Malus pumila*, *Malus sargentii*, *Malus sieboldii*, *Malus sieversii*, *Malus sylvestris*, *Malus toringoides*, *Malus transitoria*, *Malus trilobata*, *Malus tschonoskii*, *Malus x domestica*, *Malus x domestica x Malus sieversii*, *Malus x domestica x Prunus communis*, *Malus xiaojinensis*, *Malus yunnanensis*, *Malus sp.*, *Mespilus germanica*, *Osteomeles anthyllidifolia*, *Osteomeles schwerinae*, *Peraphyllum ramosissimum*, *Photinia fraseri*, *Photinia pirifolia*, *Photinia serrulata*, *Photinia*

villosa, *Pseudocyclonia sinensis*, *Piracantha coccinea*, *Piracantha fortuneana*, *Pirus calleryana*, *Pirus caucasica*,
Pirus communis, *Pirus elaeagrifolia*, variedad cultivada híbrida de *Pirus*, *Pirus pirifolia*, *Pirus salicifolia*, *Pirus*
ussuriensis, *Pirus x bretschnideri*, *Rhaphiolepis indica*, *Sorbus americana*, *Sorbus aria*, *Sorbus aucuparia*, *Sorbus*
 5 *californica*, *Sorbus commixta*, *Sorbus hupehensis*, *Sorbus scopulina*, *Sorbus sibirica*, *Sorbus torminalis*, *Stranvaesia*
dauidiana, *Torminalis clusii*, *Vauquelinia californica*, *Vauquelinia corymbosa*, *Acaena anserinifolia*, *Acaena argentea*,
Acaena caesiiglauca, *Acaena cylindristachya*, *Acaena digitata*, *Acaena echinata*, *Acaena elongata*, *Acaena*
eupatoria, *Acaena fissistipula*, *Acaena inermis*, *Acaena laevigata*, *Acaena latebrosa*, *Acaena lucida*, *Acaena*
 10 *macrocephala*, *Acaena magellanica*, *Acaena masafuerana*, *Acaena montana*, *Acaena multifida*, *Acaena*
novaezelandiae, *Acaena ovalifolia*, *Acaena pinnatifida*, *Acaena splendens*, *Acaena subincisa*, *Acaena x anserovina*,
Acomastylis elata, *Acomastylis rossii*, *Acomastylis sikkimensis*, *Agrimonia eupatoria*, *Agrimonia nipponica*, *Agrimonia*
parviflora, *Agrimonia pilosa*, *Alchemilla alpina*, *Alchemilla erythropoda*, *Alchemilla japonica*, *Alchemilla mollis*,
Alchemilla vulgaris, *Aphanes arvensis*, *Aremonia agrimonioides*, *Bencomia brachystachya*, *Bencomia caudata*,
 15 *Bencomia exstipulata*, *Bencomia sphaerocarpa*, *Chamaebatia foliolosa*, *Cliffortia burmeana*, *Cliffortia cuneata*,
Cliffortia dentata, *Cliffortia graminia*, *Cliffortia heterophylla*, *Cliffortia nitidula*, *Cliffortia odorata*, *Cliffortia ruscifolia*,
Cliffortia sericea, *Coluria elegans*, *Coluria geoides*, *Cowania stansburiana*, *Dalibarda repens*, *Dendriopoterium*
menendezii, *Dendriopoterium pulidoi*, *Dryas drummondii*, *Dryas octopetala*, *Duchesnea chrysantha*, *Duchesnea*
indica, *Erythrocoma triflora*, *Fallugia paradoxa*, *Filipendula multijuga* *Filipendula purpurea*, *Filipendula ulmaria*,
Filipendula vulgaris, *Fragaria chiloensis*, *Fragaria daltoniana*, *Fragaria gracilis*, *Fragaria grandiflora*, *Fragaria*
 20 *iinumae*, *Fragaria moschata*, *Fragaria nilgerrensis*, *Fragaria nipponica*, *Fragaria nubicola*, *Fragaria orientalis*,
Fragaria pentaphylla, *Fragaria vesca*, *Fragaria virginiana*, *Fragaria viridis*, *Fragaria x ananassa*, *Fragaria sp.* CFRA
 538, *Fragaria sp.* *Geum andicola*, *Geum borisi*, *Geum bulgaricum*, *Geum calthifolium*, *Geum chiloense*, *Geum*
geniculatum, *Geum heterocarpum*, *Geum macrophyllum*, *Geum montanum*, *Geum reptans*, *Geum rivale*, *Geum*
schofieldii, *Geum speciosum*, *Geum urbanum*, *Geum vernum*, *Geum sp.* 'Chase 2507 K', *Hagenia abyssinica*,
 25 *Horkelia cuneata*, *Horkelia fusca*, *Ivesia gordonii*, *Kerria japonica*, *Leucosidea sericea*, *Marcetella maderensis*,
Marcetella moquiniana, *Margyricarpus pinnatus*, *Margyricarpus setosus*, *Novosieversia glacialis*, *Oncostylus*
cockaynei, *Oncostylus leiopermus*, *Polylepis australis*, *Polylepis besseri*, *Polylepis cristagalli*, *Polylepis hieronymi*,
Polylepis incana, *Polylepis lanuginosa*, *Polylepis multijuga*, *Polylepis neglecta*, *Polylepis pauti*, *Polylepis pepeii*,
Polylepis quadrijuga, *Polylepis racemosa*, *Polylepis reticulata*, *Polylepis rugulosa*, *Polylepis sericea*, *Polylepis*
subsericans, *Polylepis tarapacana*, *Polylepis tomentella*, *Polylepis weberbaueri*, *Potentilla anserina*, *Potentilla arguta*,
 30 *Potentilla bifurca*, *Potentilla chinensis*, *Potentilla dickinsii*, *Potentilla erecta*, *Potentilla fragarioides*, *Potentilla fruticosa*,
Potentilla indica, *Potentilla micrantha*, *Potentilla multifida*, *Potentilla nivea*, *Potentilla norvegica*, *Potentilla palustris*,
Potentilla peduncularis, *Potentilla reptans*, *Potentilla salesoviana*, *Potentilla stenophylla*, *Potentilla tridentata*, *Rosa*
abietina, *Rosa abyssinica*, *Rosa acicularis*, *Rosa agrestis*, *Rosa alba*, *Rosa alba x Rosa corymbifera*, *Rosa altaica*,
 35 *Rosa arkansana*, *Rosa arvensis*, *Rosa banksiae*, *Rosa beggeriana*, *Rosa blanda*, *Rosa bracteata*, *Rosa brunonii*,
Rosa caesia, *Rosa californica*, *Rosa canina*, *Rosa carolina*, *Rosa chinensis*, *Rosa cinnamomea*, *Rosa columnifera*,
Rosa corymbifera, *Rosa cymosa*, *Rosa davurica*, *Rosa dumalis*, *Rosa ecae*, *Rosa eglanteria*, *Rosa elliptica*, *Rosa*
fedtschenkoana, *Rosa foetida*, *Rosa foliolosa*, *Rosa gallica*, *Rosa gallica x Rosa dumetorum*, *Rosa gigantea*, *Rosa*
glauca, *Rosa helenae*, *Rosa henryi*, *Rosa hugonis*, variedad cultivada híbrida de *Rosa*, *Rosa inodora*, *Rosa jundzillii*,
 40 *Rosa laevigata*, *Rosa laxa*, *Rosa luciae*, *Rosa majalis*, *Rosa marretii*, *Rosa maximowicziana*, *Rosa micrantha*, *Rosa*
mollis, *Rosa montana*, *Rosa moschata*, *Rosa moyesii*, *Rosa multibracteata*, *Rosa multiflora*, *Rosa nitida*, *Rosa*
odorata, *Rosa palustris*, *Rosa pendulina*, *Rosa persica*, *Rosa phoenicia*, *Rosa platyacantha*, *Rosa primula*, *Rosa*
pseudoscabriuscula, *Rosa roxburghii*, *Rosa rubiginosa*, *Rosa rugosa*, *Rosa sambucina*, *Rosa sempervirens*, *Rosa*
 45 *sericea*, *Rosa sertata*, *Rosa setigera*, *Rosa sherardii*, *Rosa sicula*, *Rosa spinosissima*, *Rosa stellata*, *Rosa stylosa*,
Rosa subcanina, *Rosa subcollina*, *Rosa suffulta*, *Rosa tomentella*, *Rosa tomentosa*, *Rosa tunquinensis*, *Rosa villosa*,
Rosa virginiana, *Rosa wichurana*, *Rosa willmottiae*, *Rosa woodsii*; *Rosa x damascena*, *Rosa x fortuniana*, *Rosa x*
macrantha, *Rosa xanthina*, *Rosa sp.*, *Rubus alceifolius*, *Rubus allegheniensis*, *Rubus alpinus*, *Rubus amphidasys*,
 50 *Rubus arcticus*, *Rubus argutus*, *Rubus assamensis*, *Rubus australis*, *Rubus bifrons*, *Rubus caesius*, *Rubus caesius x*
Rubus idaeus, *Rubus canadensis*, *Rubus canescens*, *Rubus caucasicus*, *Rubus chamaemorus*, *Rubus*
corchorifolius, *Rubus crataegifolius*, *Rubus cuneifolius*, *Rubus deliciosus*, *Rubus divaricatus*, *Rubus ellipticus*, *Rubus*
jlagellaris, *Rubus fruticosus*, *Rubus geoides*, *Rubus glaberrimus*, *Rubus glaucus*, *Rubus gunnianus*, *Rubus hawaiiensis*,
Rubus hawaiiensis x Rubus rosifolius, *Rubus hispidus*, *Rubus hochstetterorum*, *Rubus humulifolius*, *Rubus idaeus*,
 55 *Rubus lambertianus*, *Rubus lasiococcus*, *Rubus leucodermis*, *Rubus lineatus*, *Rubus macraei*, *Rubus maximiformis*,
Rubus minusculus, *Rubus moorei*, *Rubus multibracteatus*, *Rubus neomexicanus*, *Rubus nepalensis*, *Rubus*
nessensis, *Rubus nivalis*, *Rubus niveus*, *Rubus nubigenus*, *Rubus occidentalis*, *Rubus odoratus*, *Rubus palmatus*,
Rubus parviflorus, *Rubus parvifolius*, *Rubus parvus*, *Rubus pectinellus*, *Rubus pedatus*, *Rubus pedemontanus*,
 60 *Rubus pensilvanicus*, *Rubus phoenicolasius*, *Rubus picticaulis*, *Rubus pubescens*, *Rubus rigidus*, *Rubus robustus*,
Rubus roseus, *Rubus rosifolius*, *Rubus sanctus*, *Rubus sapidus*, *Rubus saxatilis*, *Rubus setosus*, *Rubus spectabilis*,
Rubus sulcatus, *Rubus tephrodes*, *Rubus trianthus*, *Rubus tricolor*, *Rubus trifidus*, *Rubus trilobus*, *Rubus trivalis*,
Rubus ulmifolius, *Rubus ursinus*, *Rubus urticifolius*, *Rubus vigorosus*, *Rubus sp.* JPM-2004, *Sanguisorba albiflora*,
 65 *Sanguisorba alpina*, *Sanguisorba ancistroides*, *Sanguisorba annua*, *Sanguisorba canadensis*, *Sanguisorba filiformis*,
Sanguisorba hakusanensis, *Sanguisorba japonensis*, *Sanguisorba minor*, *Sanguisorba obtusa*, *Sanguisorba*
officinalis, *Sanguisorba parviflora*, *Sanguisorba stipulata*, *Sanguisorba tenuifolia*, *Sarcopoterium spinosum*, *Sibbaldia*
procumbens, *Sieversia pentapetala*, *Sieversia pusilla*, *Taihangia rupestris*, *Tetraglochin cristatum*, *Waldsteinia*
fragarioides, *Waldsteinia geoides*, *Adenostoma fasciculatum*, *Adenostoma sparsifolium*, *Aruncus dioicus*,
Cercocarpus betuloides, *Cercocarpus ledifolius*, *Chamaebatiaria millefolium*, *Chamaerhodos erecta*, *Gillenia*
stipulata, *Gillenia trifoliata*, *Holodiscus discolor*, *Holodiscus microphyllus*, *Lyonothamnus floribundus*, *Neillia affinis*,

Neillia gracilis, *Neillia sinensis*, *Neillia sparsiflora*, *Neillia thibetica*, *Neillia thyrsiflora*, *Neillia uekii*, *Nevusia alabamensis*, *Physocarpus alternans*, *Physocarpus amurensis*, *Physocarpus capitatus*, *Physocarpus malvaceus*, *Physocarpus monogynus*, *Physocarpus opulifolius*, *Purshia tridentata*, *Rhodotypos scandens*, *Sorbaria arborea*, *Sorbaria sorbifolia*, *Spiraea betulifolia*, *Spiraea cantoniensis*, *Spiraea densiflora*, *Spiraea japonica*, *Spiraea nipponica*, *Spiraea x vanhouttei*, *Spiraea sp.*, *Stephanandra chinensis*, *Stephanandra incisa* y *Stephanandra tanakae*.

Algunos géneros particularmente preferidos de *Rosaceae* incluyen: *Malus*, *Pirus*, *Cydonia*, *Prunus*, *Eriobotrya* y *Mespilus*.

Algunas especies particularmente preferidas de *Rosaceae* incluyen: *Malus domestica*, *Malus sylvestris*, *Pirus communis*, *Pirus pirifolia*, *Pirus bretschnideri*, *Cydonia oblonga*, *Prunus salicina*, *Prunus cerasifera*, *Prunus persica*, *Eriobotrya japonica*, *Prunus dulcis*, *Prunus avium*, *Mespilus germanica* y *Prunus domestica*.

Un género particularmente preferido de *Rosaceae* es *Malus*.

Una especie particularmente preferida de *Malus* es *Malus domestica*.

Algunas especies/variedades cultivadas particularmente preferidas de *Malus* incluyen *Malus sieversii* 93.051 G01-048, *Malus aldenhamii*, *Malus pumila* Niedzwetzkyana, *Malus x domestica* cv. 'Prairiefire', *Malus x domestica* cv. 'Geneva', *Malus sieversii* 92.103 30-312.

Una variedad cultivada particularmente preferida de *Malus* es *Malus x domestica* niedzwetzkyana.

Otro género preferido de *Rosaceae* es *Pirus*.

Algunas especies particularmente preferidas de *Pirus* incluyen *Pirus calleryana*, *Pirus caucasica*, *Pirus communis*, *Pirus elaeagnifolia*, variedad cultivada híbrida de *Pirus*, *Pirus pirifolia*, *Pirus salicifolia*, *Pirus ussuriensis*, *Pirus x bretschnideri*.

Una especie particularmente preferida de *Pirus* es *Pirus communis*.

Otro género preferido es *Fragaria*.

Algunas especies preferidas de *Fragaria* incluyen *Fragaria daltoniana*, *Fragaria gracilis*, *Fragaria grandiflora*, *Fragaria iinumae*, *Fragaria moschata*, *Fragaria nilgerrensis*, *Fragaria nipponica*, *Fragaria nubicola*, *Fragaria orientalis*, *Fragaria pentaphylla*, *Fragaria vesca*, *Fragaria virginiana*, *Fragaria viridis*, *Fragaria x ananassa*, *Fragaria sp.* CFRA 538.

Algunas especies particularmente preferidas de *Fragaria* son *Fragaria x ananassa*, *Fragaria chilensis* y *Fragaria vesca*.

Descripción detallada

En esta memoria descriptiva, cuando se ha hecho referencia a memorias descriptivas de patentes, otros documentos externos u otras fuentes de información, esto es generalmente con el fin de proporcionar un contexto para el análisis de las características de la invención. Salvo que específicamente se establezca de otro modo, la referencia a dichos documentos externos no debe ser interpretada como una admisión de que dichos documentos o dichas fuentes de información, en cualquier jurisdicción, son técnica anterior, o forman parte del conocimiento general común en la materia.

Definiciones

El término "que comprende" según se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones, significa "que consiste al menos en parte en"; es decir, cuando se interpretan las afirmaciones de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones que incluyen "que comprende", es necesario que todas las características preferidas por este término en cada afirmación estén presentes, pero también puede haber presentes otras características. Los términos relacionados, tales como "comprender" y "estar comprendido" deben ser interpretados de una forma similar.

Sin embargo, en algunas realizaciones preferidas, "que comprende" puede ser sustituido por "que consiste en". El término "quimérico", según se usa en el presente documento, con respecto al polinucleótido promotor quimérico de la invención, significa comprendido por las secuencias que están "recombinadas". Preferiblemente, las secuencias que están "recombinadas" no se encuentran juntas en la naturaleza.

Normalmente el promotor quimérico está comprendido por los elementos de secuencia que están presentes en los promotores naturales. Por ejemplo, uno o más de los elementos de secuencia presentes en un promotor natural puede ser duplicado o multiplicado, en el contexto de un promotor natural, para producir un promotor quimérico de la

invención. El promotor natural puede ser el mismo promotor que los elementos de secuencia, o puede ser de un promotor diferente.

5 Preferiblemente, la secuencia del polinucleótido promotor quimérico de la invención no se encuentra de forma natural en las plantas en su totalidad. Sin embargo, el promotor quimérico puede ser construido a partir de secuencias naturales que son recombinadas.

10 El término "recombinar" según se usa en el presente documento significa se refiere a cualquier método de unión de polinucleótidos. El término incluye una unión de extremo y extremo y la inserción de una secuencia en otra. El término pretende incluir incluye técnicas de unión física tales como una ligación de extremos adherentes y una ligación de extremos romos. La secuencia del polinucleótido promotor quimérico, o los elementos de la misma, también pueden ser sintetizados artificialmente o recombinantemente para que contengan las secuencias recombinadas.

15 Normalmente el promotor quimérico es sintetizado mediante métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Sin embargo, el promotor quimérico contendrá las secuencias según se han definido o especificado en el presente documento, que normalmente no se encuentran juntas en la naturaleza.

20 Cuando un promotor quimérico de la invención comprende un elemento o un motivo en particular, esto significa que el elemento o el motivo puede encontrarse en la secuencia del promotor quimérico o en cualquier extremo de la secuencia del promotor quimérico.

25 Una secuencia, un promotor o un elemento promotor "natural" es aquel que se encuentra en al menos una especie en la naturaleza.

El término "derivado de" con respecto a plantas o a un tipo de planta en particular, significa lo mismo que una secuencia natural que aparece en esas plantas o planta.

30 El término "motivo de secuencia" según se usa en el presente documento significa un tramo de nucleótidos. Preferiblemente, el tramo de nucleótidos es contiguo.

35 El término "factor de transcripción MYB" es un término bien comprendido por los expertos en la materia para referirse a una clase de factores de transcripción caracterizada por un dominio de unión al ADN conservado estructuralmente que consiste en repeticiones imperfectas individuales o múltiples.

El término "una transcripción MYB con un dominio de unión al ADN R2R3" es un término bien comprendido por los expertos en la materia para referirse a los factores de transcripción MYB de la clase de dos repeticiones.

40 El término "modificado" con respecto a una planta con una "expresión modificada" o un "fenotipo modificado" significa modificado con respecto a la misma planta, o a una planta del mismo tipo, en el estado no transformado.

Polinucleótidos y fragmentos

45 El término "polinucleótido(s)", según se usa en el presente documento, significa un polímero mono o bicatenario de un desoxirribonucleótido o de un ribonucleótido de cualquier longitud, pero preferentemente de al menos 15 nucleótidos, e incluyen, como ejemplos no limitantes, las secuencias codificantes y no codificantes de un gen, complementos de secuencias sentido y antisentido, exones, intrones, ADN genómico, ADNc, pre-ARNm, ARNm, ARNr, ARNip, miARN, ARNt, ribozimas, polipéptidos recombinantes, secuencias aisladas y purificadas de ADN o de ARN natural, secuencias sintéticas de ARN y de ADN, sondas de ácidos nucleicos, cebadores y fragmentos.

50 Un "fragmento" de una secuencia de polinucleótidos proporcionado en el presente documento es una subsecuencia de nucleótidos contiguos que tiene preferentemente al menos 15 nucleótidos de longitud. Los fragmentos de la invención preferentemente comprenden al menos 20 nucleótidos, más preferentemente al menos 30 nucleótidos, más preferentemente al menos 40 nucleótidos, más preferentemente al menos 50 nucleótidos y lo más preferentemente al menos 60 nucleótidos contiguos de un polinucleótido de la invención. Un fragmento de una secuencia de polinucleótidos puede usarse en la tecnología antisentido, de silenciamiento génico, de triple hélice o de ribozima, o como un cebador, una sonda, incluido en una micromatriz o usarse en métodos de selección basados en polinucleótidos.

60 El término "fragmento" en relación con secuencias de polinucleótidos promotores pretende incluir las secuencias que comprenden elementos en cis y regiones de la secuencia del polinucleótido promotor quimérico capaces de regular la expresión de una secuencia de polinucleótidos a la que el fragmento está unido operativamente.

65 Preferiblemente, los fragmentos de las secuencias de polinucleótidos promotores de la invención comprenden al menos 46, más preferentemente al menos 69, más preferentemente al menos 92, más preferentemente al menos 115, más preferentemente al menos 138, más preferentemente al menos 150, más preferentemente al menos 200,

más preferentemente al menos 300, más preferentemente al menos 400, más preferentemente al menos 500, más preferentemente al menos 600, más preferentemente al menos 700, más preferentemente al menos 800, más preferentemente al menos 900, más preferentemente al menos 1.000, más preferentemente al menos 1.100, más preferentemente al menos 1.200, más preferentemente al menos 1.300, más preferentemente al menos 1.400, más preferentemente al menos 1.500, más preferentemente al menos 1.600 y lo más preferentemente al menos 1.700 nucleótidos contiguos del polinucleótido especificado. Los fragmentos de las secuencias de polinucleótidos promotores quiméricos pueden usarse para el control de la expresión de un polinucleótido unido operativamente en las células de una planta o plantas transgénicas.

El término "cebador" se refiere a un polinucleótido corto, que habitualmente tiene un grupo 3' OH libre, que es hibridado con un molde y usado para el cebado de la polimerización de un polinucleótido complementario del molde. Dicho cebador tiene preferentemente al menos 5, más preferentemente al menos 6, más preferentemente al menos 7, más preferentemente al menos 9, más preferentemente al menos 10, más preferentemente al menos 11, más preferentemente al menos 12, más preferentemente al menos 13, más preferentemente al menos 14, más preferentemente al menos 15, más preferentemente al menos 16, más preferentemente al menos 17, más preferentemente al menos 18, más preferentemente al menos 19, más preferentemente al menos 20 nucleótidos de longitud.

El término "sonda" se refiere a un polinucleótido corto que se usa para la detección de una secuencia de polinucleótidos, que es complementaria de la sonda, en un ensayo basado en una hibridación. La sonda puede consistir en un "fragmento" de un polinucleótido según se ha definido en el presente documento. Preferiblemente, dicha sonda tiene al menos 5, más preferentemente al menos 10, más preferentemente al menos 20, más preferentemente al menos 30, más preferentemente al menos 40, más preferentemente al menos 50, más preferentemente al menos 100, más preferentemente al menos 200, más preferentemente al menos 300, más preferentemente al menos 400 y lo más preferentemente al menos 500 nucleótidos de longitud.

Polipéptidos y fragmentos

El término "polipéptido", según se usa en el presente documento, engloba cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, pero preferentemente de al menos 5 aminoácidos, incluyendo proteínas completas, en las que los residuos de aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos covalentes. Los polipéptidos pueden ser productos naturales purificados o pueden producirse parcial o completamente mediante el uso de técnicas recombinantes o sintéticas. El término puede referirse a un polipéptido, a un agregado de un polipéptido tal como un dímero u otro multímero, a un polipéptido de fusión, a un fragmento de un polipéptido, a una variante de un polipéptido, o a un derivado de los mismos.

Un "fragmento" de un polipéptido es una subsecuencia del polipéptido que realiza una función que es necesaria para la actividad biológica y/o que proporciona la estructura tridimensional del polipéptido. El término puede referirse a un polipéptido, a un agregado de un polipéptido tal como un dímero u otro multímero, a un polipéptido de fusión, a un fragmento de un polipéptido, a una variante de un polipéptido, o a un derivado de los mismos capaz de realizar la actividad enzimática mencionada.

El término "aislado" según se aplica a las secuencias de polinucleótidos o de polipéptidos divulgadas en el presente documento, se usa para referirse a las secuencias que se extraen de su entorno celular natural. Una molécula aislada puede obtenerse mediante cualquier método o combinación de métodos, incluyendo técnicas bioquímicas, recombinantes y sintéticas.

El término "derivado de" con respecto a una secuencia de polinucleótidos o de polipéptidos que deriva de un género o de una especie en particular, significa que la secuencia tiene la misma secuencia que una secuencia de polinucleótidos o de polipéptidos que se encuentra de forma natural en ese género o especie. La secuencia, derivada de un género o de una especie en particular, puede por lo tanto ser producida sintéticamente o recombinantemente.

Variantes

Según se usa en el presente documento, el término "variante" se refiere a secuencias de polinucleótidos o de polipéptidos diferentes de las secuencias identificadas específicamente, en las que se han delecionado, sustituido o añadido uno o más nucleótidos o residuos de aminoácidos. Las variantes pueden ser variantes alélicas naturales, o variantes no naturales. Las variantes pueden ser de la misma especie o de otra especie, y pueden englobar homólogos, parálogos y ortólogos. En ciertas realizaciones, las variantes de los polinucleótidos y de los polipéptidos inventivos poseen unas actividades biológicas que son las mismas o similares a las de los polinucleótidos o los polipéptidos inventivos. El término "variante", en referencia a los polinucleótidos y los polipéptidos, engloba todas las formas de los polinucleótidos y de los polipéptidos según se definen en el presente documento.

65

Variantes de polinucleótidos

Las variantes de las secuencias de polinucleótidos preferentemente muestran una identidad de al menos el 50 %, más preferentemente de al menos el 51 %, más preferentemente de al menos el 52 %, más preferentemente de al menos el 53 %, más preferentemente de al menos el 54 %, más preferentemente de al menos el 55 %, más preferentemente de al menos el 56 %, más preferentemente de al menos el 57 %, más preferentemente de al menos el 58 %, más preferentemente de al menos el 59 %, más preferentemente de al menos el 60 %, más preferentemente de al menos el 61 %, más preferentemente de al menos el 62 %, más preferentemente de al menos el 63 %, más preferentemente de al menos el 64 %, más preferentemente de al menos el 65 %, más preferentemente de al menos el 66 %, más preferentemente de al menos el 67 %, más preferentemente de al menos el 68 %, más preferentemente de al menos el 69 %, más preferentemente de al menos el 70 %, más preferentemente de al menos el 71 %, más preferentemente de al menos el 72 %, más preferentemente de al menos el 73 %, más preferentemente de al menos el 74 %, más preferentemente de al menos el 75 %, más preferentemente de al menos el 76 %, más preferentemente de al menos el 77 %, más preferentemente de al menos el 78 %, más preferentemente de al menos el 79 %, más preferentemente de al menos el 80 %, más preferentemente de al menos el 81 %, más preferentemente de al menos el 82 %, más preferentemente de al menos el 83 %, más preferentemente de al menos el 84 %, más preferentemente de al menos el 85 %, más preferentemente de al menos el 86 %, más preferentemente de al menos el 87 %, más preferentemente de al menos el 88 %, más preferentemente de al menos el 89 %, más preferentemente de al menos el 90 %, más preferentemente de al menos el 91 %, más preferentemente de al menos el 92 %, más preferentemente de al menos el 93 %, más preferentemente de al menos el 94 %, más preferentemente de al menos el 95 %, más preferentemente de al menos el 96 %, más preferentemente de al menos el 97 %, más preferentemente de al menos el 98 % y lo más preferentemente de al menos el 99 %, con una secuencia de polinucleótidos especificada. La identidad se encuentra sobre una ventana de comparación de al menos 20 posiciones de nucleótidos, más preferentemente de al menos 50 posiciones de nucleótidos, más preferentemente de al menos 100 posiciones de nucleótidos, más preferentemente de al menos 200 posiciones de nucleótidos, más preferentemente de al menos 300 posiciones de nucleótidos, más preferentemente de al menos 400 posiciones de nucleótidos, más preferentemente de al menos 500 posiciones de nucleótidos, más preferentemente de al menos 600 posiciones de nucleótidos, más preferentemente de al menos 700 posiciones de nucleótidos, más preferentemente de al menos 800 posiciones de nucleótidos, más preferentemente de al menos 900 posiciones de nucleótidos, más preferentemente de al menos 1.000 posiciones de nucleótidos, más preferentemente de al menos 1.100 posiciones de nucleótidos, más preferentemente de al menos 1.200 posiciones de nucleótidos, más preferentemente de al menos 1.300 posiciones de nucleótidos, más preferentemente de al menos 1.400 posiciones de nucleótidos, más preferentemente de al menos 1.500 posiciones de nucleótidos, más preferentemente de al menos 1.600 posiciones de nucleótidos, más preferentemente de al menos 1.700 posiciones de nucleótidos y lo más preferentemente a lo largo de la longitud completa de la secuencia de polinucleótidos especificada. Para los motivos de 23 pb de los promotores quiméricos de la invención, o usados en los métodos de la invención, la identidad se encuentra preferentemente a lo largo de la totalidad de las 23 posiciones de nucleótidos.

La identidad de la secuencia de polinucleótidos puede ser determinada de la siguiente forma. La secuencia de polinucleótidos en cuestión se compara con una secuencia de polinucleótidos candidata mediante el uso de BLASTN (del conjunto de programas BLAST, versión 2.2.5 [noviembre de 2002]) en bl2seq (Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174: 247-250), que está disponible públicamente en el NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>). Se utilizan los parámetros por defecto del bl2seq excepto porque debe desactivarse la filtración de partes de baja complejidad.

La identidad de las secuencias de polinucleótidos puede ser analizada mediante el uso de los siguientes parámetros de líneas de comando de unix:

```
bl2seq -i nucleotideseq1 -j nucleotideseq2 -F F -p blastn
```

El parámetro -F F desactiva el filtrado de las secciones de baja complejidad. El parámetro -p selecciona el algoritmo apropiado para el par de secuencias. El programa bl2seq notifica la identidad de la secuencia tanto en forma del número como del porcentaje de nucleótidos idénticos en una línea "Identidades = ".

La identidad de la secuencia de polinucleótidos también puede calcularse a lo largo de la longitud completa del solapamiento entre las secuencias de polinucleótidos candidata y en cuestión mediante el uso de programas de alineación de secuencias globales (por ejemplo, Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453). Una implementación completa del algoritmo de alineación global de Needleman-Wunsch se encuentra en el programa de aguja del paquete EMBOSS (Rice, P. Longden, I. y Bleasby, A. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Trends in Genetics, junio de 2000, vol 16, nº 6. págs. 276-277) que puede obtenerse en <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Software/EMBOSS/>. El servidor del European Bioinformatics Institute también proporciona el servicio para llevar a cabo alineaciones globales de aguja de EMBOSS entre dos secuencias en línea en <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>.

Alternativamente, puede usarse el programa GAP, que computa una alineación global óptima de dos secuencias sin penalizar los huecos terminales, para calcular la identidad de secuencia. El GAP se describe en la siguiente publicación: Huang, X. (1994) On Global Sequence Alignment. Computer Applications in the Biosciences 10, 227-235.

La identidad de la secuencia también puede ser calculada mediante la alineación de las secuencias que se van a comparar mediante el uso de Vector NTI versión 9.0, que usa un algoritmo Clustal W (Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research 24, 4876-4882), calculando a continuación el porcentaje de identidad de secuencia entre las secuencias alineadas mediante el uso de Vector NTI versión 9.0 (02 de septiembre de 2003 ©1994-2003 InforMax, licencia a favor de Invitrogen).

Las variantes de polinucleótidos de la presente invención también engloban aquellas que muestran una similitud con una o más de las secuencias identificadas específicamente que es probable que preserven la equivalencia funcional de esas secuencias y que razonablemente no podría esperarse que se produjeran por una probabilidad aleatoria. Dicha similitud de la secuencia con respecto a los polinucleótidos puede ser determinada mediante el uso del programa disponible públicamente bl2seq del conjunto de programas BLAST (versión 2.2.5 [noviembre de 2002]) del NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>).

La similitud de las secuencias de polinucleótidos puede analizarse mediante el uso de los siguientes parámetros de líneas de comando de unix:

```
bl2seq -i nucleotideseq1 -j nucleotideseq2 -F F -p tblastx
```

El parámetro -F F desactiva el filtrado de las secciones de baja complejidad. El parámetro -p selecciona el algoritmo apropiado para el par de secuencias. Este programa encuentra regiones de similitud entre las secuencias, y para cada una de dichas regiones notifica un "valor de E" que es el número de veces esperado que se podría esperar ver dicha coincidencia al azar en una base de datos con un tamaño de referencia fijo que contiene secuencias aleatorias. El tamaño de esta base de datos es establecido por defecto en el programa bl2seq. Para unos valores pequeños de E, mucho menores de uno, el valor de E es aproximadamente la probabilidad de que dicha coincidencia sea aleatoria.

Las variantes de las secuencias de polinucleótidos preferentemente muestran un valor de E menor de 1×10^{-10} , más preferentemente menor de 1×10^{-20} , más preferentemente menor de 1×10^{-30} , más preferentemente menor de 1×10^{-40} , más preferentemente menor de 1×10^{-50} más preferentemente menor de 1×10^{-60} , más preferentemente menor de 1×10^{-70} , más preferentemente menor de 1×10^{-80} , más preferentemente menor de 1×10^{-90} y lo más preferentemente menor de 1×10^{-100} cuando se comparan con una cualquiera de las secuencias identificadas específicamente.

Alternativamente, las variantes de los polinucleótidos de la presente invención hibridan con una secuencia de polinucleótidos especificada, o con complementos de la misma en unas condiciones rigurosas.

El término "hibridar en unas condiciones rigurosas", y los equivalentes gramaticales del mismo, se refieren a la capacidad de una molécula de polinucleótido de hibridar con una molécula de polinucleótido objetivo (tal como una molécula de polinucleótido objetivo inmovilizada en una transferencia de ADN o de ARN, tal como una inmunotransferencia Southern o Northern) en unas condiciones definidas de temperatura y de concentración salina. La capacidad para hibridar en unas condiciones de hibridación rigurosas puede ser determinada hibridando inicialmente en unas condiciones menos rigurosas y aumentando después la rigurosidad hasta la rigurosidad deseada.

Con respecto a las moléculas de polinucleótidos mayores de aproximadamente 100 bases de longitud, las condiciones de hibridación rigurosa típicas no son mayores de entre 25 y 30 °C (por ejemplo, 10 °C) por debajo de la temperatura de fusión (Tm) del dúplex nativo (véase de forma general, Sambrook et al., Eds, 1987, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed. Cold Spring Harbor Press; Ausubel et al., 1987, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing,). La Tm de las moléculas de polinucleótidos mayores de aproximadamente 100 bases puede calcularse mediante la fórmula $T_m = 81.5 + 0.41 \% (G + C - \log(Na^+))$. (Sambrook et al., Eds, 1987, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed. Cold Spring Harbor Press; Bolton y McCarthy, 1962, PNAS 84: 1390). Las condiciones rigurosas típicas para un polinucleótido mayor de 100 bases de longitud serían unas condiciones de hibridación tales como un lavado con una solución 6X de SSC, un 0,2 % de SDS; una hibridación a 65 °C, 6X de SSC, un 0,2 % de SDS durante una noche; seguido de dos lavados de 30 minutos cada uno con 1X de SSC, un 0,1 % de SDS a 65 °C y dos lavados de 30 minutos cada uno con un 0,2X de SSC, un 0,1 % de SDS a 65 °C.

Con respecto a las moléculas de polinucleótidos que tienen una longitud menor de 100 bases, un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas son entre 5 y 10 °C por debajo de la Tm. De media, la Tm de una molécula de polinucleótido con una longitud menor de 100 pb se reduce en aproximadamente (500/longitud del oligonucleótido) °C.

Con respecto a los miméticos de ADN conocidos como ácidos nucleicos peptídicos (PNA) (Nielsen et al., Science. 6 de diciembre de 1991; 254 (5037): 1497-500), los valores de la Tm son mayores que para los híbridos de ADN-ADN o de ADN-ARN, y pueden ser calculados mediante el uso de la fórmula descrita en Giesen et al., Nucleic Acids Res. 1 de noviembre de 1998; 26 (21): 5004-6. Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas para un híbrido de ADN-PNA que tiene una longitud menor de 100 bases es de entre 5 y 10 °C por debajo de la Tm.

Las variantes de polinucleótidos, tales como las de los constructos de la invención que codifican para las proteínas que se van a expresar, también incluyen polinucleótidos que difieren de las secuencias especificadas pero que, como consecuencia de la degeneración del código genético, codifican para un polipéptido que tiene una actividad similar a la de un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente invención. Una alteración en la secuencia que no modifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido es una "variación silenciosa". Excepto para ATG (metionina) y TGG (triptófano), pueden cambiarse otros codones para el mismo aminoácido mediante técnicas reconocidas en la materia, por ejemplo, para optimizar la expresión del codón en un organismo hospedador en particular.

También se contemplan las alteraciones en las secuencias de polinucleótidos que dan como resultado unas sustituciones conservativas de uno o de varios aminoácidos de la secuencia del polipéptido codificado sin alterar significativamente su actividad biológica. El artesano experto será consciente de los métodos para la elaboración de sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silenciosas (véase, por ejemplo, Bowie et al., 1990, Science 247, 1306).

Las variantes de polinucleótidos, debido a las variaciones silenciosas y a las sustituciones conservativas en la secuencia del polipéptido codificado, pueden ser determinadas mediante el uso del programa disponible públicamente bl2seq del conjunto de programas BLAST (versión 2.2.5 [noviembre de 2002]) del NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>) a través del algoritmo tblastx, según se ha descrito previamente.

Variantes de polipéptidos

El término "variante", en referencia a los polipéptidos, engloba los polipéptidos naturales y los producidos recombinantemente y sintéticamente. Las variantes de las secuencias de polipéptidos muestran preferentemente al menos un 50 %, más preferentemente al menos un 51 %, más preferentemente al menos un 52 %, más preferentemente al menos un 53 %, más preferentemente al menos un 54 %, más preferentemente al menos un 55 %, más preferentemente al menos un 56 %, más preferentemente al menos un 57 %, más preferentemente al menos un 58 %, más preferentemente al menos un 59 %, más preferentemente al menos un 60 %, más preferentemente al menos un 61 %, más preferentemente al menos un 62 %, más preferentemente al menos un 63 %, más preferentemente al menos un 64 %, más preferentemente al menos un 65 %, más preferentemente al menos un 66 %, más preferentemente al menos un 67 %, más preferentemente al menos un 68 %, más preferentemente al menos un 69 %, más preferentemente al menos un 70 %, más preferentemente al menos un 71 %, más preferentemente al menos un 72 %, más preferentemente al menos un 73 %, más preferentemente al menos un 74 %, más preferentemente al menos un 75 %, más preferentemente al menos un 76 %, más preferentemente al menos un 77 %, más preferentemente al menos un 78 %, más preferentemente al menos un 79 %, más preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 81 %, más preferentemente al menos un 82 %, más preferentemente al menos un 83 %, más preferentemente al menos un 84 %, más preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos un 86 %, más preferentemente al menos un 87 %, más preferentemente al menos un 88 %, más preferentemente al menos un 89 %, más preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 91 %, más preferentemente al menos un 92 %, más preferentemente al menos un 93 %, más preferentemente al menos un 94 %, más preferentemente al menos un 95 %, más preferentemente al menos un 96 %, más preferentemente al menos un 97 %, más preferentemente al menos un 98 %, y lo más preferentemente al menos un 99 % de identidad con las secuencias de la presente invención. La identidad se encuentra a lo largo de una ventana de comparación de al menos un 20 posiciones de aminoácidos, preferentemente de al menos un 50 posiciones de aminoácidos, más preferentemente de al menos un 100 posiciones de aminoácidos, y lo más preferentemente a lo largo de la longitud completa de un polipéptido de la invención.

La identidad de la secuencia de polipéptidos puede ser determinada de la siguiente forma. La secuencia de polipéptidos en cuestión se compara con una secuencia de polipéptidos candidata mediante el uso de BLASTP (del conjunto de programas BLAST, versión 2.2.5 [noviembre de 2002]) en bl2seq, que está disponible públicamente en el NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>). Se utilizan los parámetros por defecto del bl2seq excepto porque debe desactivarse el filtrado de las regiones de baja complejidad.

La identidad de la secuencia de polipéptidos también puede calcularse a lo largo de la longitud completa del solapamiento entre las secuencias de polinucleótidos candidata y en cuestión mediante el uso de programas de alineación de secuencias globales. EMBOSS-needle (disponible en <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>) y GAP (Huang, X. (1994) On Global Sequence Alignment. Computer Applications in the Biosciences 10, 227-235), como se ha analizado anteriormente, también son programas de alineación de secuencias globales adecuados para calcular la identidad de la secuencia de polipéptidos.

La identidad de la secuencia también puede calcularse mediante la alineación de las secuencias que se van a comparar mediante el uso de Vector NTI versión 9.0, que usa un algoritmo Clustal W (Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research 24, 4876-4882), calculando después el porcentaje de identidad en las secuencias entre las secuencias de polipéptidos alineadas mediante el uso de Vector NTI versión 9.0 (02 de septiembre de 2003 ©1994-2003 InforMax, licencia a favor de Invitrogen).

Las variantes de polipéptidos también engloban aquellas que muestran una similitud con una o más de las secuencias identificadas específicamente que es probable que conserven la equivalencia funcional de esas secuencias y que razonablemente no podría esperarse que se produjeran por una probabilidad aleatoria. Dicha similitud en las secuencias con respecto a los polipéptidos puede ser determinada mediante el uso del programa disponible públicamente bl2seq del conjunto de programas BLAST (versión 2.2.5 [noviembre de 2002]) del NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>). La similitud de las secuencias de polipéptidos puede analizarse mediante el uso de los siguientes parámetros de líneas de comando de unix:

```
bl2seq -i peptideseq1 -j peptideseq2 -F F -p blastp
```

Las variantes de las secuencias de polipéptidos muestran preferentemente un valor de E menor de 1×10^{-6} , más preferentemente menor de 1×10^{-9} , más preferentemente menor de 1×10^{-12} , más preferentemente menor de 1×10^{-15} , más preferentemente menor de 1×10^{-18} , más preferentemente menor de 1×10^{-21} , más preferentemente menor de 1×10^{-30} , más preferentemente menor de 1×10^{-40} , más preferentemente menor de 1×10^{-50} , más preferentemente menor de 1×10^{-60} , más preferentemente menor de 1×10^{-70} , más preferentemente menor de 1×10^{-80} , más preferentemente menor de 1×10^{-90} y lo más preferentemente de 1×10^{-100} cuando se comparan con una cualquiera de las secuencias identificadas específicamente.

El parámetro -F F desactiva el filtrado de las secciones de baja complejidad. El parámetro -p selecciona el algoritmo apropiado para el par de secuencias. Este programa encuentra regiones de similitud entre las secuencias, y para cada una de dichas regiones notifica un "valor de E" que es el número de veces esperado que se podría esperar ver dicha coincidencia al azar en una base de datos con un tamaño de referencia fijo que contiene secuencias aleatorias. Para unos valores pequeños de E, mucho menores de uno, es aproximadamente la probabilidad de que dicha coincidencia sea aleatoria.

En la invención también están incluidas las sustituciones conservativas de uno o de varios de los aminoácidos de una secuencia de un polipéptido descrita sin que altere significativamente su actividad biológica. El artesano experto será consciente de los métodos para la elaboración de sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silenciosas (véase, por ejemplo, Bowie et al., 1990, Science 247, 1306).

Constructos, vectores y componentes de los mismos

El término "construcción genética" se refiere a una molécula de un polinucleótido, habitualmente un ADN bicatenario, que puede tener insertada otra molécula de un polinucleótido (la molécula del inserto de polinucleótido) tal como, pero no se limita a, una molécula de ADNc. Una construcción genética puede contener un polinucleótido promotor, tal como un polinucleótido promotor quimérico de la invención, que incluye los elementos necesarios que permitan la transcripción de la molécula del inserto del polinucleótido, y, opcionalmente, la traducción del transcrito en un polipéptido. La molécula del inserto del polinucleótido puede derivar de la célula hospedadora, o puede derivar de una célula o de un organismo diferente y/o puede ser un polinucleótido sintético o recombinante. Una vez en el interior de la célula hospedadora, la construcción genética puede quedar integrada en el ADN cromosómico del hospedador. La construcción genética puede estar unida a un vector.

El término "vector" se refiere a una molécula de un polinucleótido, habitualmente un ADN bicatenario, que se usa para transportar la construcción genética a una célula hospedadora. El vector puede ser susceptible de replicación en al menos un sistema hospedador adicional, tal como *E. coli*.

El término "constructo de expresión" se refiere a una construcción genética que incluye los elementos necesarios que permiten la transcripción de la molécula del inserto de polinucleótido, y, opcionalmente, la traducción del transcrito en un polipéptido.

Un constructo de expresión comprende normalmente, en la dirección de 5' a 3':

- a) un promotor, tal como una secuencia de un polinucleótido promotor quimérico de la invención, funcional de la célula hospedadora en la que se transformará el constructo,
- b) el polinucleótido que se va a expresar, y
- c) un terminador funcional de la célula hospedadora en la que se transformará el constructo.

El término "región codificante" o "marco abierto de lectura" (ORF) se refiere a la hebra sentido de una secuencia de ADN genómico o de una secuencia de ADNc que es capaz de producir un producto de transcripción y/o un polipéptido bajo el control de las secuencias reguladoras apropiadas. La secuencia codificante es identificada por la

presencia de un codón de inicio de la traducción en 5' y un codón de detención de la traducción en 3'. Cuando se inserta en una construcción genética, una "secuencia codificante" es susceptible de ser expresada cuando está unida operativamente a secuencias promotoras y terminadoras.

5 El término "unido operativamente" significa que la secuencia que se va a expresar está colocada bajo el control de elementos reguladores que incluyen promotores, elementos reguladores específicos tisulares, elementos reguladores temporales, potenciadores, represores y terminadores.

10 El término "región no codificante" incluye las secuencias no traducidas que están secuencia arriba del sitio de inicio de la traducción y secuencia abajo del sitio de detención de la traducción. Estas secuencias también se denominan respectivamente UTR en 5' y UTR en 3'. Estas secuencias pueden incluir los elementos requeridos para el inicio y la terminación de la transcripción y para la regulación de la eficacia de la traducción. El término "no codificante" también incluye secuencias intrónicas en los clones genómicos.

15 Los terminadores son secuencias que terminan la transcripción, y se encuentran en los extremos no traducidos en 3' de los genes secuencia abajo de la secuencia traducida. Los terminadores son unos importantes determinantes de la estabilidad del ARNm y en algunos casos se ha encontrado que tienen funciones reguladoras espaciales.

20 El término "promotor" se refiere a una secuencia de polinucleótidos capaz de regular o de dirigir la expresión de una secuencia de polinucleótidos a la que el promotor está unido operativamente en una célula, o en un sistema de transcripción exento de células. Los promotores pueden comprender elementos iniciadores en cis que especifican el sitio de inicio de la transcripción, y cajas conservadas, tales como la caja TATA, y motivos que están unidos por factores de transcripción.

25 Algunos ejemplos de promotores naturales que pueden usarse, totalmente o en parte, en la producción de los promotores quiméricos de la invención incluyen: el promotor del gen del tabaco MYB10 (R2R3-MYB-153; Rushton et al 2008, Plant Physiol. 2008 10.1104/pág. 107.114041); el promotor del gen de Arabidopsis AtMYB75 (Borevitz et al, 2000, Plant Cell 12, 2383-2394); el promotor del gen de de la transferasa de la vitamina C (Laing et al, 2007, PNAS, mayo de 2007; 104: 9534 - 9539); el promotor del gen de Banyuls (Xie et al., 2003, Science. 17 de enero de 2003; 299 (5605): 396-9; Albert et al, 1997); el promotor del gen de MdTT2 (Genbank Nº DQ267900); el promotor del gen de Arabidopsis AtTT2 (Nesi et al, 2001, Plant Cell 13, 2099-2114); el promotor del gen de Arabidopsis AtFT (Kardailsky et al 1999, SCIENCE Volume 286 página 1962); y los promotores de los genes de las ciclasas de oxidoescualeno-triterpenoide de frutas (Husselstein-Muller et al., 2001, Plant Mol Biol. Jan; 45 (1): 75-92). Otros promotores vegetales son conocidos por los expertos en la materia y se describen en la bibliografía científica.

35 Los solicitantes han aislado secuencias de polinucleótidos promotoras de la manzana y de la pera, y han identificado un motivo de secuencia, y variantes del mismo, en dichos promotores que influyen fuertemente en la actividad de dichos promotores. Los solicitantes han demostrado que cuando se añade el motivo de secuencia a un promotor, se altera la actividad de ese promotor, y el promotor queda regulado más positivamente por ciertos factores de transcripción MYB, dando como resultado un aumento significativo en la expresión dirigida por el promotor.

40 La invención, según se define en las reivindicaciones, proporciona un método para la producción de promotores quiméricos que comprende el motivo o motivos de secuencia, y variantes de los mismos. La invención también proporciona dichos promotores quiméricos. La invención proporciona constructos genéticos y vectores que comprenden la secuencia de los polinucleótidos promotores quiméricos, y células vegetales transgénicas y plantas transgénicas que comprenden la secuencia del polinucleótido promotor quimérico, los constructos genéticos o los vectores de la invención.

45 La invención proporciona la oportunidad de producir nuevos promotores con una actividad deseable. La invención también proporciona la oportunidad de alterar la actividad de los promotores existentes mediante la adición o la inserción de los motivos de secuencia, o de variantes de los mismos, en dichos promotores existentes. Dichos promotores quiméricos nuevos o modificados pueden estar regulados por ciertos factores de transcripción MYB. De esta forma, la expresión de las secuencias unidas operativamente a los promotores quiméricos puede ser expresada de una forma deseable y puede estar regulada de forma individual o coordinada por los factores de transcripción MYB. Los factores de transcripción MYB pueden ser expresados de forma natural o pueden ser expresados después de una transformación genética.

50 La invención también proporciona métodos para la producción de plantas con una expresión génica modificada y un fenotipo modificado. La invención también proporciona las plantas producidas mediante los métodos de la invención.

60 *Métodos para el aislamiento o la producción de polinucleótidos*

65 Las moléculas de polinucleótidos de la invención pueden ser aisladas mediante el uso de una variedad de técnicas conocidas por los expertos habituales en la materia. A modo de ejemplo, dichos polinucleótidos pueden ser aislados a través del uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrita en Mullis et al., Eds. 1994 The Polymerase Chain Reaction, Birkhauser. Los polinucleótidos de la invención pueden ser amplificados mediante el

uso de cebadores, según se ha definido en el presente documento, derivados de las secuencias de polinucleótidos de la invención.

5 Algunos métodos adicionales para el aislamiento de los polinucleótidos de la invención, o útiles en los métodos de la invención, incluyen el uso de todos o de porciones de los polinucleótidos establecidos en el presente documento como sondas de hibridación. Pueden usarse técnicas de hibridación de sondas de polinucleótidos marcadas con polinucleótidos inmovilizados sobre soportes sólidos, tales como filtros de nitrocelulosa o membranas de nailon, para el cribado genómico. Un ejemplo de condiciones de hibridación y lavado son: hibridación durante 20 horas a 65 °C en 5.0 X de SSC, 0.5 % de dodecil sulfato de sodio, 1 X de solución de Denhardt; lavado (tres lavados de veinte minutos cada uno a 55 °C) en 1,0 X de SSC, un 1 % (p/v) de dodecil sulfato de sodio, y opcionalmente un lavado (durante veinte minutos) en 0.5 X de SSC, un 1 % (p/v) de dodecil sulfato de sodio, a 60 °C. Puede llevarse a cabo un lavado opcional (durante veinte minutos) en unas condiciones de 0.1 X de SSC, un 1 % (p/v) de dodecil sulfato de sodio, a 60 °C.

15 Los fragmentos de polinucleótidos de la invención pueden ser producidos mediante técnicas bien conocidas en la materia tales como una digestión con endonucleasas de restricción, una síntesis con oligonucleótidos y una amplificación mediante una PCR.

20 Puede usarse una secuencia parcial de polinucleótidos en los métodos bien conocidos en la materia para la identificación de la correspondiente secuencia de polinucleótidos completa y/o del gen y/o del promotor completo. Dichos métodos incluyen métodos basados en la PCR, 5'RACE (Frohman MA, 1993, *Methods Enzymol.* 218: 340-56) y métodos basados en una hibridación, métodos basados en ordenador/base de datos. Además, a modo de ejemplo, una PCR inversa permite la adquisición de secuencias desconocidas, flanqueantes de las secuencias de polinucleótidos divulgadas en el presente documento, partiendo de cebadores basados en una región conocida (Triglia et al., 1998, *Nucleic Acids Res* 16, 8186). El método usa varias enzimas de restricción para generar un fragmento adecuado en la región conocida de un polinucleótido. Después el fragmento se circulariza mediante una ligación intramolecular y se usa como molde para una PCR. Se diseñan cebadores divergentes a partir de la región conocida. Las secuencias promotoras y flanqueantes también pueden ser aisladas mediante una PCR de desplazamiento sobre el genoma mediante el uso de un kit GenomeWalker™ (Clontech, Mountain View, California), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Con objeto de ensamblar físicamente clones completos, pueden usarse las metodologías habituales de biología molecular (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed. Cold Spring Harbor Press, 1987).

35 Cuando se produce una planta transgénica de una especie en particular, puede ser beneficioso transformar dicha planta con una secuencia o secuencias derivadas de esa especie. El beneficio puede ser aliviar la preocupación pública relativa a la transformación entre especies cruzadas en la generación de organismos transgénicos. Adicionalmente, cuando el resultado deseado es una regulación por disminución de un gen, puede ser necesario utilizar una secuencia idéntica (o al menos muy similar) a la de la planta, para la que se desea una expresión reducida. Por estas razones entre otras, es deseable ser capaces de identificar y aislar los ortólogos de un gen en particular en diversas especies vegetales diferentes. Las variantes (incluyendo los ortólogos) pueden ser identificadas mediante los métodos descritos.

45 Las secuencias promotoras divulgadas pueden ser caracterizadas adicionalmente para la identificación de otros fragmentos, tales como elementos y regiones en cis, capaces de regular la expresión de las secuencias unidas operativamente, mediante el uso de técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Dichas técnicas incluyen el análisis de las deleciones en 5' y/o en 3', un análisis de barrido con un conector y varias técnicas de obtención de la impronta de ADN (Degenhardt mediante el uso de técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Dichas técnicas incluyen el análisis de las deleciones en 5' y/o en 3', un análisis de barrido con un conector y varias técnicas de obtención de la impronta de ADN (Degenhardt et al., 1994 *Plant Cell*: 6 (8) 1123-34; *Directed Mutagenesis: A Practical Approach* IRL Press (1991)). Los fragmentos incluyen versiones truncadas de secuencias promotoras más largas que pueden terminar (en el extremo 3') en o cerca del sitio de inicio de la transcripción. Los métodos para la identificación del sitio de inicio de la transcripción de un promotor son bien conocidos por los expertos en la materia (se analizan en Hashimoto et al., 2004, *Nature Biotechnology* 22, 1146-1149).

55 Las técnicas descritas anteriormente pueden usarse para la identificación de un fragmento que define una región esencial del promotor que es capaz de conferir el perfil de expresión deseado. La región esencial puede funcionar por sí misma o estar fusionada con un promotor de núcleo para dirigir la expresión de un polinucleótido unido operativamente.

60 El promotor de núcleo puede ser uno cualquiera de los promotores de núcleo conocidos, tales como el promotor del virus del mosaico de la coliflor 35S o 19S (la Patente de EE.UU. Nº 5.352.605), el promotor de la ubiquitina (Patente de EE.UU. Nº 5.510.474), el promotor de núcleo IN2 (Patente de EE.UU. Nº 5.364.780) o un promotor del virus del mosaico de la escrofularia (Gruber, et al. "Vectors for Plant Transformation" *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*) et al. eds, CRC Press págs. 89-119 (1993)).

65

Puede ensayarse la utilidad de los fragmentos del promotor para dirigir la expresión en cualquier tipo de célula o de tejido en particular, o en cualquier fase de desarrollo en particular, o en respuesta a cualquier estímulo en particular, mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Algunas técnicas incluyen la unión operativa del fragmento del promotor a un indicador o a otro polinucleótido, y la medición de la actividad indicadora o de la expresión del polinucleótido en las plantas. Algunas de dichas técnicas se describen en la sección de Ejemplos de esta memoria descriptiva.

Métodos para la identificación de variantes

Métodos físicos.

Las variantes de polinucleótidos pueden ser identificadas mediante el uso de métodos basados en la PCR (Mullis et al., Eds. 1994 The Polymerase Chain Reaction, Birkhauser).

Alternativamente pueden emplearse métodos de cribado de colecciones, bien conocidos por los expertos en la materia (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed. Cold Spring Harbor Press, 1987). Cuando se identifican variantes de la secuencia de sonda, la rigurosidad de la hibridación y/o del lavado se reducirá típicamente proporcionalmente a cuando se desean unas coincidencias exactas en las secuencias.

Métodos informatizados

Las variantes de polinucleótidos y de polipéptidos también pueden ser identificadas mediante métodos informatizados bien conocidos por los expertos en la materia, mediante el uso de los algoritmos de alineación de secuencias y las herramientas de búsqueda de similitudes entre secuencias para buscar en bases de datos de secuencias de dominio público (las bases de datos de secuencias de dominio público incluyen Genbank, EMBL, Swiss-Prot, PIR y otras). Véase, por ejemplo, Nucleic Acids Res. 29: 1-10 y 11-16, 2001 para algunos ejemplos de recursos en línea. Las búsquedas de similitudes recuperan y alinean las secuencias objetivo para compararlas con una secuencia que se quiere analizar (es decir, una secuencia de consulta). Los algoritmos de comparación de secuencias usan matrices de puntuación para asignar una puntuación global a cada una de las alineaciones.

Un ejemplo de familia de programas útil para la identificación de variantes en las bases de datos de secuencias es el conjunto de programas BLAST (versión 2.2.5 [noviembre de 2002]) que incluyen BLASTN, BLASTP, BLASTX, tBLASTN y tBLASTX, que están disponibles públicamente en (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>) o en el National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine, Building 38A, Room 8N805, Bethesda, MD 20894 Estados Unidos. El servidor del NCBI también proporciona el servicio para usar los programas para cribar varias bases de datos de secuencias disponibles públicamente. BLASTN compara una secuencia de nucleótidos de consulta frente a bases de datos de secuencias de nucleótidos. BLASTP compara una secuencia de aminoácidos de consulta frente a una base de datos de secuencias de proteínas. BLASTX compara una secuencia de nucleótidos de consulta traducida en todos los marcos de lectura frente a una base de datos de secuencias de proteínas. tBLASTN compara una secuencia de proteínas de consulta frente a bases de datos de secuencias de nucleótidos traducidas dinámicamente en todos los marcos de lectura. tBLASTX compara las traducciones de seis marcos de una secuencia de nucleótidos de consulta frente a las traducciones de seis marcos de una base de datos de secuencias de nucleótidos. Los programas BLAST pueden usarse con los parámetros por defecto, o pueden alterarse los parámetros según se requiera para refinar el cribado.

El uso de la familia de algoritmos BLAST, incluyendo BLASTN, BLASTP y BLASTX, se describe en la publicación de Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997.

Los "resultados positivos" de una o más secuencias de bases de datos por parte de una secuencia consultada producida por BLASTN, BLASTP, BLASTX, tBLASTN, tBLASTX, o un algoritmo similar, alinean e identifican porciones de secuencias similares. Los resultados positivos están ordenados según el grado de similitud y la longitud de solapamiento de la secuencia. Los resultados positivos para una secuencia de una base de datos representan generalmente un solapamiento únicamente sobre una fracción de la longitud de la secuencia de la secuencia consultada.

Los algoritmos BLASTN, BLASTP, BLASTX, tBLASTN y tBLASTX también producen unos valores "esperados" para las alineaciones. El valor esperado (E) indica el número de resultados positivos que se podría "esperar" ver por azar cuando se busca en una base de datos del mismo tamaño que contiene secuencias contiguas aleatorias. El valor esperado se usa como un umbral de significación para la determinación de si el resultado positivo con respecto a una base de datos indica una verdadera similitud. Por ejemplo, se interpreta que un valor de E de 0,1 asignado a un resultado positivo para un polinucleótido significa que en una base de datos del tamaño de la base de datos cribada, podría esperarse observar 0,1 coincidencias en la porción alineada de la secuencia con una puntuación similar simplemente por azar. Para las secuencias que tienen un valor de E de 0,01 o menos en las porciones alineadas y emparejadas, la probabilidad de encontrar una coincidencia al azar en esa base de datos es del 1 % o menos mediante el uso del algoritmo BLASTN, BLASTP, BLASTX, tBLASTN o tBLASTX.

Pueden llevarse a cabo múltiples alineaciones de secuencias de un grupo de secuencias relacionadas con CLUSTALW (Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22: 4673-4680, <http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalW/Top.html>) o con T-COFFEE (Cedric Notredame, Desmond G. Higgins, Jaap Heringa, T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment, J. Mol. Biol. (2000) 302: 205-217) o con PILEUP, que usa alineaciones progresivas por parejas. (Feng y Doolittle, 1987, J. Mol. Evol. 25, 351).

Hay disponibles aplicaciones informáticas de reconocimiento de patrones para encontrar motivos o secuencias distintivas. Por ejemplo, MEME (Multiple Em for Motif Elicitation) encuentra motivos y secuencias distintivas en un conjunto de secuencias, y MAST (Motif Alignment and Search Tool) usa estos motivos para identificar motivos similares o iguales en secuencias de consulta. Los resultados de MAST se proporcionan en forma de una serie de alineaciones con los datos estadísticos apropiados y un resumen visual de los motivos encontrados. MEME y MAST se desarrollaron en la University of California, San Diego.

herramientas informáticas apropiadas para asignar una nueva secuencia a una familia conocida de proteínas o para determinar qué dominios conocidos están presentes en la secuencia (Falquet et al., 2002, Nucleic Acids Res. 30, 235). Prosearch es una herramienta que puede buscar en las bases de datos SWISS-PROT y EMBL con una secuencia patrón o distintiva dada.

Métodos para la producción de los constructos y de los vectores

Los constructos genéticos de la presente invención comprenden una o más secuencias de polinucleótidos de la invención, y pueden ser útiles para la transformación, por ejemplo, de organismos bacterianos, fúngicos, de insectos, de mamíferos o particularmente de plantas. Los constructos genéticos de la invención están definidos por las reivindicaciones.

Los métodos para la producción y el uso de constructos genéticos y de vectores son bien conocidos en la materia y se describen de forma general en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed. Cold Spring Harbor Press, 1987; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing, 1987).

Métodos para la producción de células hospedadoras que comprenden los constructos y los vectores

La invención proporciona una célula hospedadora que comprende una construcción genética o un vector de la invención. Las células hospedadoras pueden derivar, por ejemplo, de organismos bacterianos, fúngicos, de insectos, de mamíferos o de plantas.

Las células hospedadoras que comprenden constructos genéticos, tales como constructos de expresión, de la invención, son útiles en métodos bien conocidos en la materia (por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed. Cold Spring Harbor Press, 1987; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing, 1987) para la producción recombinante de polipéptidos. Dichos métodos pueden implicar el cultivo de células hospedadoras en un medio apropiado en unas condiciones adecuadas o conducentes a la expresión de un polipéptido de la invención. El polipéptido recombinante expresado, que opcionalmente puede ser secretado en el cultivo, puede separarse después del medio, de las células hospedadoras o del medio de cultivo mediante métodos bien conocidos en la materia (por ejemplo, Deutscher, Ed., 1990, Methods in Enzymology, Vol. 182, Guide to Protein Purification).

polipéptido, que opcionalmente puede ser secretado en el cultivo, después puede ser separado del medio, de las células hospedadoras o del medio de cultivo mediante métodos bien conocidos en la materia (por ejemplo, Deutscher, Ed., 1990, Methods in Enzymology, Vol. 182, Guide to Protein Purification).

Métodos para la producción de células vegetales y de plantas que comprenden los constructos y los vectores

La invención también proporciona células vegetales que comprenden una construcción genética de la invención, y células vegetales modificadas para alterar la expresión de un polinucleótido o de un polipéptido. Las plantas que comprenden dichas células también forman un aspecto de la invención.

Los métodos para la transformación de células vegetales, de plantas y de porciones de las mismas con polinucleótidos se describen en Draper et al., 1988, Plant Genetic Transformation and Gene Expression. A Laboratory Manual. Blackwell Sci. Pub. Oxford, pág. 365; en Potrykus y Spangenburg, 1995, Gene Transfer to Plants. Springer-Verlag, Berlín; y en Gelvin et al., 1993, Plant Molecular Biol. Manual. Kluwer Acad. Pub. Dordrecht. Una revisión sobre plantas transgénicas, incluyendo técnicas de transformación, se proporciona en Galun y Breiman, 1997, Transgenic Plants. Imperial College Press, Londres.

Las siguientes son publicaciones representativas que divulgan protocolos de transformación genética que pueden usarse para la transformación genética de las siguientes especies vegetales: arroz (Alam et al., 1999, Plant Cell

Rep. 18, 572); manzana (Yao et al., 1995, Plant Cell Reports 14, 407-412); maíz (Patentes de EE.UU. con los números de serie 5.177.010 y 5.981.840); trigo (Ortiz et al., 1996, Plant Cell Rep. 15, 1996, 877); tomate (Patentes de EE.UU. con el número de serie 5.159.135); patata (Kumar et al., 1996 Plant J. 9: 821); mandioca (Li et al., 1996 Nat. Biotechnology 14, 736); lechuga (Michelmores et al., 1987, Plant Cell Rep. 6, 439); tabaco (Horsch et al., 1985, Science 227, 1229); algodón (Patentes de EE.UU. con los números de serie 5.846.797 y 5.004.863); raigrás perenne (Bajaj et al., 2006, Plant Cell Rep. 25, 651); pastos (Patentes de EE.UU. nº 5.187.073, 6.020.539); menta (Niu et al., 1998, Plant Cell Rep. 17, 165); plantas cítricas (Pena et al., 1995, Plant Sci. 104, 183); comino (Krens et al., 1997, Plant Cell Rep. 17, 39); banana (Patentes de EE.UU. con el número de serie 5.792.935); soja (Patentes de EE.UU. nº 5.416.011; 5.569.834; 5.824.877; 5.563.04455 y 5.968.830); piña (Patentes de EE.UU. con el número de serie 5.952.543); chopo (Patente de EE.UU. Nº 4.795.855); monocotiledóneas en general (Patentes de EE.UU. nº 5.591.616 y 6.037.522); col (Patentes de EE.UU. nº 5.188.958; 5.463.174 y 5.750.871); y cereales (Patente de EE.UU. Nº 6.074.877); pera (Matsuda et al., 2005, Plant Cell Rep. 24 (1): 45-51); Prunus (Ramesh et al., 2006, Plant Cell Rep. 25 (8): 821-8); Song y Sink 2005, Plant Cell Rep. 2006; 25 (2): 117-23; González Padilla et al., 2003, Plant Cell Rep. 22 (1): 38-45); fresa (Oosumi et al., 2006, Planta.; 223 (6): 1219-30; Folta et al., 2006, Planta. 14 de abril de 2006; PMID: 16614818); rosa (Li et al., 2003, Planta. 218 (2): 226-32) y Rubus (Graham et al., 1995, Methods Mol Biol. 1995;44: 129-33). La transformación de otras especies también está contemplada por la invención. Los métodos y los protocolos adecuados para la transformación de otras especies están disponibles en la bibliografía científica.

20 *Métodos para la manipulación genética de plantas*

Hay disponibles diversas estrategias para la manipulación genética de plantas (por ejemplo, Birch, 1997, Ann Rev Plant Phys Plant Mol Biol, 48, 297). Por ejemplo, pueden diseñarse estrategias por aumentar la expresión de un polinucleótido/polipéptido en una célula o en un órgano vegetal y/o en una fase de desarrollo en particular en la que se expresa normalmente o se expresa ectópicamente un polinucleótido/polipéptido en una célula, en un tejido, en un órgano o y/o en una fase de desarrollo en particular en la que normalmente no se expresa. También pueden diseñarse estrategias por aumentar la expresión de un polinucleótido/polipéptido en respuesta a estímulos externos, tales como estímulos medioambientales. Algunos estímulos medioambientales pueden incluir estreses medioambientales tales como estreses mecánicos (tales como actividad de herbívoros), por deshidratación, de salinidad y de temperatura. El polinucleótido/polipéptido expresado puede derivar de la especie vegetal que se va a transformar o puede derivar de una especie vegetal diferente.

Pueden diseñarse estrategias de transformación para reducir la expresión de un polinucleótido/polipéptido en una célula o un órgano vegetal y/o en una fase de desarrollo en particular en la que se expresa normalmente o para reducir la expresión de un polinucleótido/polipéptido en respuesta a un estímulo externo. Dichas estrategias son conocidas como estrategias de silenciamiento génico.

Los constructos genéticos para la expresión de genes en plantas transgénicas normalmente incluyen promotores, tales como los polinucleótidos promotores de la invención, para dirigir la expresión de uno o más polinucleótidos clonados, terminadores y secuencias marcadoras seleccionables para detectar la presencia de la construcción genética en la planta transformada.

Algunos ejemplos de terminadores que se usan habitualmente en los constructos genéticos para la transformación de plantas incluyen, por ejemplo, el terminador del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 35S, los terminadores de la sintasa de nopalina o de la sintasa de octopina de *Agrobacterium tumefaciens*, el terminador del gen zin de *Zea mays*, el terminador de pirofosforilasa de ADP-glucosa de *Oryza sativa* y el terminador PI-II de *Solanum tuberosum*.

Algunos marcadores seleccionables usados habitualmente en la transformación de plantas incluyen el gen de la fofotransferasa de neomicina II (NPT II) que confiere resistencia a la kanamicina, el gen aadA, que confiere resistencia a la espectinomicina y a la estreptomycin, la transferasa de fosfinotricin acetilo (gen *bar*) para la resistencia a Ignite (AgrEvo) y Basta (Hoechst), y el gen de la fosfotransferasa de higromicina (*hpt*) para la resistencia a la higromicina.

También se contempla el uso de constructos genéticos que comprenden genes indicadores (secuencias codificantes que expresan una actividad que es foránea al hospedador, habitualmente una actividad enzimática y/o una señal visible (por ejemplo, luciferasa, GUS, GFP) que puede usarse para el análisis de la expresión del promotor en plantas y en tejidos vegetales. La bibliografía sobre genes indicadores está revisada en Herrera-Estrella et al., 1993, Nature 303, 209, y Schrott, 1995, en: Gene Transfer to Plants (Potrykus, T., Spangenberg, Eds) Springer Verlag, Berline, páginas 325-336.

Las estrategias de silenciamiento génico pueden centrarse en el propio gen o en los elementos reguladores que efectúan la expresión del polipéptido codificado. "Elementos reguladores" se usa aquí en el sentido más amplio posible, e incluye otros genes que interactúan con los genes de interés.

Los constructos genéticos diseñados para disminuir o silenciar la expresión de un polinucleótido/polipéptido pueden incluir una copia antisentido de un polinucleótido. En dichos constructos, el polinucleótido está ubicado en una orientación antisentido con respecto al promotor y al terminador.

5 Un polinucleótido "antisentido" se obtiene invirtiendo un polinucleótido o un segmento del polinucleótido, de forma que el transcrito producido será complementario del transcrito del ARNm del gen, por ejemplo,

5'GATCTA 3' (hebra codificante) 3'CTAGAT 5' (hebra antisentido)
3'CUAGAU 5' ARNm 5'GAUCUCG 3' ARN antisentido

10 Los constructos genéticos diseñados para el silenciamiento génico también pueden incluir una repetición invertida. Una "repetición invertida" es una secuencia que se repite cuando la segunda mitad de la repetición está en la hebra complementaria, por ejemplo,

15 5'-GATCTA.....TAGATC-3'
3'-CTAGAT.....ATCTAG-5'

20 El transcrito formado puede experimentar un apareamiento de bases complementario para formar una estructura en horquilla. Habitualmente se requiere un separador de al menos 3-5 pb entre la región repetida para permitir la formación de la horquilla.

Otra metodología de silenciamiento implica el uso de un ARN antisentido pequeño dirigido al transcrito equivalente a un miARN (Llave et al., 2002, Science 297, 2053). El uso de dicho ARN antisentido pequeño correspondiente a un polinucleótido de la invención está contemplado expresamente.

25 El término construcción genética, según se usa en el presente documento, también incluye ARN antisentido pequeños y otros de dichos polinucleótidos útiles para efectuar el silenciamiento génico.

30 La transformación con un constructo de expresión, según se define en el presente documento, también puede dar como resultado un silenciamiento génico a través de un proceso conocido como supresión sentido (por ejemplo, Napoli et al., 1990, Plant Cell 2, 279; de Carvalho Niebel et al., 1995, Plant Cell, 7, 347). En algunos casos, la supresión sentido puede implicar la sobreexpresión de la secuencia codificante total o parcial, pero también puede implicar la expresión de una región no codificante del gen, tal como un intrón o una región no traducida (UTR) en 5' o en 3'. Pueden usarse constructos sentido parciales quiméricos para el silenciamiento coordinado de múltiples genes (Abbott et al., 2002, Plant Physiol. 128 (3): 844-53; Jones et al., 1998, Planta 204: 499-505). También se contempla el uso de dichas estrategias de supresión sentido para silenciar la expresión de una secuencia unida operativamente al promotor de la invención.

40 Los insertos de polinucleótidos en los constructos genéticos diseñados para el silenciamiento génico pueden corresponderse con la secuencia codificante y/o con la secuencia no codificante, tal como una secuencia promotora y/o un intrón y/o una secuencia UTR en 5' o en 3', o el gen correspondiente.

45 Otras estrategias de silenciamiento génico incluyen metodologías negativas dominantes y el uso de constructos de ribozimas (McIntyre, 1996, Transgenic Res, 5, 257)

El término "planta" pretende incluir una planta completa o cualquier parte de una planta, los propágulos y la descendencia de una planta.

50 El término 'propágulo' significa cualquier parte de una planta que puede usarse en la reproducción o en la propagación, tanto sexual como asexual, incluyendo semillas y esquejes.

Una planta "transgénica" o transformada" se refiere a una planta que contiene nuevo material genético como resultado de una manipulación o de una transformación genética. El nuevo material genético puede derivar de una planta de la misma especie que la planta transgénica o transformada resultante, o de una especie diferente. Una planta transformada incluye una planta que está transformada de forma estable y temporal con nuevo material genético.

60 Las plantas de la invención pueden cultivarse y bien autocruzarse o bien cruzarse con una cepa vegetal diferente, y pueden identificarse los híbridos resultantes, con las características fenotípicas deseadas. Pueden cultivarse dos o más generaciones. Las plantas resultantes de dichas metodologías de cruce habituales también forman parte de la presente invención, en la medida en que están en las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

65 La Figura 1 muestra la secuencia de un polinucleótido promotor de la SEQ ID NO: 5, que muestra la posición de los motivos repetitivos (1, 2, 3A, 3B, 4, 5 y 6), el microsatélite (microsat) y varios sitios de enzimas de restricción.

La Figura 2 muestra una representación esquemática del promotor MdMYB 10 R₁ de la variedad cultivada de piel blanca con un único motivo repetitivo (1) y el microsatélite (MS). La figura también muestra una representación esquemática de la estructura y de la ubicación de la unidad repetitiva adicional formada por las unidades repetitivas 2, 3a, 3b, 4, 5 y 6 que se encuentra en el promotor de la variedad cultivada de piel roja R₆, con respecto al promotor de la variedad cultivada de piel blanca. A la izquierda se muestran algunos ejemplos de fenotipos de las versiones del promotor MdMYB10 R₁ y R₆, *Malus x domestica* Royal Gala (i) y *Malus x domestica* niedzwetzkyana (ii).

La Figura 3 muestra la porción de la secuencia del promotor de la variedad cultivada de manzana de piel roja que incluye los motivos repetitivos 1, 2, 3a, 3b, 4, 5 y 6 y la región microsatélite.

Las unidades repetitivas 2, 3a, 3b, 4, 5 y 6 que se encuentran en el promotor de la variedad cultivada de piel roja R₆, con respecto al promotor de la variedad cultivada de piel. A la izquierda se muestran algunos ejemplos de fenotipos de las versiones del promotor MDMYB10 R₁ y R₆, *Malus x domestic* Royal Gala (i) y *Malus x domestica* niedzwetzkyana (ii).

La Figura 3 muestra la porción de la secuencia del promotor de la variedad cultivada de manzana de piel roja que incluye los motivos repetitivos 1, 2, 3a, 3b, 4, 5 y 6 y la región microsatélite.

La Figura 4 muestra la transactivación de los promotores en las variedades cultivadas de piel blanca (R₁) y de piel roja (R₆) por parte del gen MdMYB10 en ensayos de transformación temporal en tabaco. Ambos promotores fueron infiltrados con y sin MdMYB10. Las barras de error mostradas son las medias \pm D. T. de las medias de 6 experimentos replicados.

La Figura 5 muestra que la amplificación del producto de una PCR que comprende el motivo minisatélite sirve como un marcador que distingue las variedades cultivadas de manzana de piel blanca y de piel roja. Se cribó un total de 87 variedades cultivadas mediante el uso del par de cebadores de la PCR descrito en el Ejemplo 3. Los productos de la PCR se separaron con geles de agarosa al 0,9 % y se tiñeron con bromuro de etidio. La figura muestra la amplificación mediante una PCR obtenida sobre un subconjunto de 10 variedades de manzana. Se encontraron dos alelos: un fragmento de 496 pb correspondiente al promotor de la SEQ ID NO: 5, que sólo estaba presente en las variedades de piel roja (carriles 1-6) y que estaba ausente en las variedades de piel blanca (carriles 7-10), y un alelo de 392 pb presente en ambos tipos de fruta. Variedades de piel roja 1: (OP) *Malus* 'Mildew Immune Seedling' 93.051 G01-048 de polinización abierta; 2: *M. x purpurea Aldenhamensis*'; 3: *M. pumila* var. *niedzwetzkyana*; 4: *M. prairifire*'; 5: OP *M. pumila* var. *niedzwetzkyana* 'Geneva'; 6: OP *M. x domestica* 'Pomme Grise' 92.103 30-312; 7: *M. x domestica* 'Granny Smith'; 8: *M. x domestica* 'Royal Gala'; 9: *M. x domestica* 'Fuji'; 10: *M. x domestica* 'Braeburn'.

La Figura 6 muestra que el promotor nativo de manzana que contiene el minisatélite induce la acumulación ectópica de antocianina. (a) Apareció un color rojo alrededor del sitio de infiltración en las hojas de *Nicotiana tabacum* 8 días después de una transformación temporal con R₆:MdMYB10 (i) y con 35S:MdMYB10 (ii) pero no con R₁. Los tres fueron infiltrados conjuntamente con 35S:MdbHLH3. (b) Regeneración de callos de manzana Royal Gala transformada con R₆:MdMYB10. R₁ = promotor nativo de *Malus domestica* 'Royal Gala'. R₆ = promotor nativo de *Malus x pumila* var. *niedzwetzkyana*.

La Figura 7 muestra la interacción de los promotores de manzana nativos y MdMYB10 en los ensayos temporales dobles de luciferasa en el tabaco. Para comparar la actividad de transactivación de los promotores de manzana a 35S, estos se infiltraron conjuntamente con las fusiones de promotor-luciferasa R₁ y R₆. Los resultados proporcionan una medida de la actividad potencial de los promotores de manzana, y muestran un aumento significativo en el caso del MdMYB10 guiado por R₆. R₁ = promotor nativo de *Malus domestica* 'Royal Gala'. R₆ = promotor nativo de *Malus x pumila* var. *niedzwetzkyana*.

La Figura 8 muestra que el número de unidades repetitivas afecta a la tasa de transactivación. (a) Viñeta (no mostrada a escala) de los diferentes promotores con unidades repetitivas que varían desde cero (R₀) hasta seis (R₆). Están marcados los dos promotores nativos de la manzana, R₁ de *Malus x domestica* 'Royal gala' y R₆ de *Malus x pumila* var. *niedzwetzkyana*. Se muestra la posición de las unidades repetitivas (en negro) con respecto al microsatélite (caja gris diagonal). R₁+ está diferenciado con un sombreado vertical en gris para representar la secuencia sustituida que reemplaza el efecto espacial del minisatélite. (b) Resultados de los promotores R₀ hasta R₆ infiltrados conjuntamente sólo con 35S:MdMYB10 (barras grises claras) y con 35S:MdMYB10 y 35SMdbHLH3 (barras grises oscuras). Las barras de error mostradas son las medias \pm D. T. de 6 reacciones replicadas.

La Figura 9 muestra la identificación de las áreas del promotor críticas para la transactivación mediante el estudio de delección. (a) Viñeta (no mostrada a escala) de las diferentes delecciones de los promotores de R₁ (i) y de R₆, (ii), indicadas como Δa - Δd . Las áreas delecionadas se muestran en color blanco con unas líneas punteadas, y las posiciones relativas de la unidad repetitiva R₁ con respecto al microsatélite y al minisatélite. (b) datos correspondientes de los estudios de la elección del promotor con fusiones de luciferasa de R₁, (i) y (ii), y de R₆, (iii) y (iv), infiltradas conjuntamente con MdMYB10, (i) y (iii) respectivamente (barras grises claras) y con

MdMYB10 y MdbHLH3, (ii) y (iv) respectivamente (barras grises oscuras). Las barras de error mostradas son las medias \pm D. T. de 6 reacciones replicadas.

5 La Figura 10 muestra una representación esquemática de la clonación de las unidades repetitivas minsatélite (copias 1-6) del promotor de manzana MdMYB10 R₆ (MdMYB10 largo) en el promotor MYB10 de la pera (PcMYB10(GP)) para producir el promotor quimérico PcMYB10R6(GP-R6). En la figura se incluye el promotor MdMYB10 de la manzana de piel blanca (MdMYB10 corto) como referencia. También se muestra la posición de los sitios de restricción (DraI y BsgI) y los sitios de cebado de la PCR (CB02 y RE16).

10 La Figura 11 muestra el efecto de los constructos MdMYB10 genómico y 35S:PcMYB10 sobre gen indicador de la luciferasa guiado por el promotor PcMYB10 que contiene o no repeticiones R6 del promotor MdMYB10. La actividad está expresada como una proporción entre la actividad de la luciferasa (LUC) y la de la CaMV35S-Renilla (REN). Las barras de error representan el error estándar (EE) para 4 replicados. Todas las secuencias promotoras están fusionadas con el indicador de la luciferasa y se abrevian como sigue: DFR, promotor DFR de Arabidopsis; Md10s, promotor R1 de MdMYB10; Md10R6, promotor R6 de MdMYB10; Pc10S, promotor PcMYB10R1, y Pc10R6, promotor PcMYB10R6. Todos los constructos de factores de transcripción están guiados por el promotor CaMV35S y son como sigue: MdM10, MdMYB10; PcM10, PcMYB10; b33, MdbHLH33 y b2, *Arabidopsis thaliana* bHLH2.

20 La Figura 12 muestra una alineación entre las secuencias de los promotores MYB10 de la manzana de piel blanca y la pera, y destaca en subrayado el motivo repetitivo conservado de 23 pb.

25 La Figura 13 muestra que otras secuencias MYB10 pueden transactivar el promotor R6:MdMYB10 en un ensayo doble temporal de luciferasa en el tabaco. Se infiltraron hojas de *N. benthamiana* con fusiones del promotor pMdMYB10R1-LUC o del pMdMYB10R6-LUC por sí mismos o infiltrados conjuntamente con 35S:MYB y bHLH según se indica. Se midió la luminiscencia de LUC y de REN 3 días después y se expresó como una proporción entre LUC y REN. Las barras de error son el EE para 4 reacciones replicadas.

30 La Figura 14 muestra una representación esquemática de la estrategia para la clonación del dominio R6 de manzana en los promotores PcMYB10, AtPAP1 y VitC2. El dominio R6 se amplificó a partir del alelo 'Red Field' R6:MdMYB10, se digirió con DraI y se insertó en los promotores PcMYB10, AtPAP1 y VitC2 que guían el gen indicador de la luciferasa en los sitios de restricción indicados. Cada caja azul representa una repetición individual de 23 pb, la caja amarilla representa la posición relativa de la región de minisatélite.

35 La Figura 15 muestra que MdMYB10 combinado con bHLH3 transactiva otras fusiones de promotores quiméricos MYB10 que contienen copias del recuento repetido de 23 pb. A. Se infiltraron conjuntamente hojas de *N. benthamiana* con las fusiones del promotor MYB de manzana, de pera y de Arabidopsis, tanto conteniendo como no el dominio R6 de manzana, y los factores de transcripción MdMYB10/bHLH3. B. Se infiltraron hojas con el promotor de pera MYB10 o con el promotor AtPAP1, tanto conteniendo como no el dominio R6, y con sus correspondientes cofactores MYB/bHLH. Se midió la luminiscencia de LUC y de REN 3 días después y se expresó como una proporción entre LUC y REN. Las barras de error son el EE para 4 reacciones replicadas.

45 La Figura 16 muestra que MdMYB10 junto con bHLH3 transactiva los promotores VitC2 que contienen el dominio R6 de manzana en un ensayo doble temporal de luciferasa. Se infiltraron conjuntamente hojas de *N. benthamiana* con las fusiones del promotor VitC2 de kiwi, tanto conteniendo como no el dominio R6, y el factor de transcripción MdMYB10 solo o combinado con bHLH3. En cada caso, la presencia del dominio R6 está asociada con un elevado nivel de transactivación del promotor de fusión. Se midió la luminiscencia de LUC y de REN 3 días después y se expresó como una proporción entre LUC y REN. Las barras de error son el EE para 4 reacciones replicadas.

50 La Figura 17 muestra una representación esquemática del motivo R6 amplificado mediante los cebadores CB02 y RE161. También se muestra en cajas la posición de cada motivo repetitivo R1-R6 de 23 pb, y la posición del sitio de restricción DraI.

55 Ejemplos

La invención se ilustrará ahora en referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

60 Ejemplo 1: aislamiento de los polinucleótidos promotores MdMYBIO completos a partir de variedades cultivadas de manzana de piel blanca y de piel roja, e identificación de elementos adicionales en el promotor de la variedad cultivada de piel roja.

Aislamiento del ADN genómico

65 El ADN genómico se aisló a partir de las hojas de una variedad cultivada de manzana de piel blanca (*Malus domestica* Royal Gala) y a partir de las hojas de una variedad cultivada de manzana de piel roja (*Malus x pumila*

niedwetzkyana) mediante el uso de un Mini Kit Qiagen DNeasy Plant, según las instrucciones de los fabricantes (Qiagen, Valencia, California).

Aislamiento del promotor

5 Se aisló una región de 1,7-1,8 Kb de la región reguladora secuencia arriba del gen MdMYB10 a partir del ADN de ambas variedades cultivadas de piel blanca y de piel roja mediante una PCR de desplazamiento sobre el genoma mediante el uso de un kit GenomeWalker™ (Clontech, Mountain View, California), siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

10 Los promotores aislados fueron secuenciados mediante las técnicas convencionales. La secuencia del promotor de la variedad cultivada de piel roja se muestra en la SEQ ID NO: 5. La secuencia del promotor de la variedad cultivada de piel blanca se muestra en la SEQ ID NO: 8.

15 La secuencia del polipéptido MdMYB10 se muestra en la SEQ ID NO: 6. La secuencia de polinucleótidos (ADNc) que codifica para el polipéptido MdMYB10 se muestra en la SEQ ID NO: 7.

20 Mediante una comparación de las secuencias de los promotores de las variedades cultivadas de piel blanca y de piel roja, los solicitantes identificaron un motivo de secuencia de 23 pares de bases que se encuentra en ambos promotores. En el promotor de la variedad cultivada de piel blanca, el motivo está presente en forma de una única copia (con una diferencia de 1 pb con respecto al motivo del promotor de la variedad cultivada de piel roja). En el promotor de la variedad cultivada de piel roja, el motivo está presente en una posición correspondiente, pero además, el motivo está duplicado en cinco repeticiones en tándem para formar una unidad repetitiva de minisatélite.

25 La secuencia del motivo repetitivo se muestra en la SEQ ID NO: 1.

La secuencia de la unidad de minisatélite que comprende cinco copias de motivo repetitivo se muestra en la SEQ ID NO: 2.

30 La Figura 1 muestra la secuencia del promotor de la variedad de piel roja que muestra la posición de los motivos repetitivos. La unidad de minisatélite precede a un microsatélite dinucleotídico que se encuentra en ambos promotores.

35 La secuencia del microsatélite se muestra en la SEQ ID NO: 3.

40 La Figura 2 muestra una representación esquemática del promotor de la variedad cultivada de piel blanca y muestra la posición relativa y la estructura de la unidad repetitiva de minisatélite adicional que se encuentra en el promotor de la variedad cultivada de piel roja. Se ha demostrado que los minisatélites, similares a éstos, tienen un efecto sobre la regulación transcripcional en los seres humanos (Kominato et al., (1997). J. Biol. Chem. 272, 25890, Lew et al., (2000). Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 97, 12508 y que producen una alteración fenotípica en *Saccharomyces cerevisiae* (Verstrepen et al., (2005) Nat. Genet. 37, 986).

45 Ejemplo 2: demostración de la regulación de la expresión de las secuencias de polinucleótidos unidas operativamente por los polinucleótidos promotores de la invención.

Ensayo doble de luciferasa con hojas de tabaco transformadas temporalmente

50 Se insertaron por separado las secuencias promotoras para MdMYB10 de las variedades cultivadas de piel roja y de piel blanca (SEQ ID NO: 4 y 5 respectivamente) en el sitio de clonación de pGreen 0800-LUC (Hellens et al., 2005, R. P. Hellens, A. C. Allan, E. N. Friel EN, K. Bolitho, K. Grafton, M. D. Templeton, S. Karunairetnam, W. A. Laing, Plant Methods 1:13). En el mismo constructo, un gen de luciferasa de *Renilla* (REN), bajo el control de un promotor 35S, proporcionó una estimación de la magnitud de la expresión temporal. La actividad se expresa como una proporción entre la actividad de LUC y de REN. Se usó la fusión promotor-LUC en una transformación temporal mediante la mezcla de 100 µl de la cepa de *Agrobacterium* GV3101 (MP90) transformada con el casete indicador con o sin otro cultivo de *Agrobacterium* (900 µl) transformado con un casete que contiene MdMYB10 fusionado con el promotor 35S. Se cultivaron plantas de *Nicotiana tabacum* 'Samsun' hasta que había disponibles al menos 6 hojas para su infiltración con *Agrobacterium*. Se resuspendió un bucle de 10 µl de la bacteria confluente en 10 ml de medio de infiltración (MgCl₂ 10 mM, acetosiringona 0,5 µM), hasta una DO₆₀₀ de 0,2, y se incubó a la temperatura ambiente sin agitación durante 2 h antes de la infiltración. Se infiltraron aproximadamente 150 µl de esta mezcla de *Agrobacterium* en seis puntos de una hoja joven de *N. tabacum* y se analizó la expresión temporal 3 días después de la inoculación. Se extrajeron seis replicados técnicos de discos de hoja 0 de 3 mm de cada planta mediante el uso de un punzón perforador de hojas y solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se llevaron a cabo ensayos en placa mediante el uso de un luminómetro de microplaca Berthold Orion (Berthold Detection Systems, Oak Ridge, TN, EE.UU.) según las especificaciones del fabricante para el ensayo doble de luciferasa, mediante el uso de los reactivos de ensayo Dual Glow (Promega, Madison, WI) para la luciferasa de luciérnaga y para la luciferasa de

Renilla. La luminiscencia se calculó mediante el uso del programa informático Simplicity versión 4.02 (Berthold Detection Systems).

Los resultados, según se muestra en la Figura 4, muestran que el promotor (R_6) de la variedad cultivada de piel roja que contiene la unidad repetitiva de minisatélite, dirige la expresión de la secuencia unida operativamente que codifica para la luciferasa a un nivel de expresión 7 veces el de la expresión guiada por el promotor (R_1) de la variedad cultivada de piel blanca (en la que la unidad repetitiva de minisatélite está ausente) cuando también se expresa la proteína MdMYB10. Este resultado demuestra la significación de la secuencia adicional presente en el promotor R_6 (incluyendo las copias adicionales del motivo repetitivo) de la variedad de piel roja.

Los resultados también muestran que la expresión conjunta del factor de transcripción MdMYB10 da como resultado un aumento de 10 veces en la expresión de la secuencia de la luciferasa que está unida operativamente al promotor (R_6) de la variedad cultivada de piel roja. El efecto del MdMYB10 de la variedad cultivada de piel blanca es mucho menor. Este resultado demuestra que el polinucleótido promotor de la invención está regulado positivamente por el factor de transcripción MYB MdMYB10.

Ejemplo 3: la presencia de la unidad de minisatélite en el promotor de la invención está coherentemente asociada con la piel roja en las variedades de manzana de piel roja naturales.

Amplificación mediante PCR y secuenciación de la región de minisatélite

La piel de la fruta (corteza) de la mayoría de las variedades cultivadas de manzana es de un color blanco o blanquecino. La piel habitualmente es de color verde o rojo, enrojeciéndose la piel en respuesta a señales de desarrollo, hormonales y luminosas (Ubi et al., 2006, Plant Sci. 170, 571). Sin embargo existen varias manzanas de piel roja con mucha antocianina, incluyendo *Malus x pumila* niedzwetzkyana, originarias de los bosques de manzanas silvestres de Khazakhstan.

En la manzana, la acumulación de antocianina está regulada específicamente por el MdMYB10, estando los niveles del transcrito MdMYB10 muy elevados en las variedades de piel roja (Espley et al., 2007, Plant J. 49, 414).

Las muestras de ADN genómico de diversas variedades cultivadas de manzana de piel roja y de piel blanca recogidas en la siguiente Tabla 1 fueron suministradas por Charles J Simon y Philip Forsline, Agricultural Research Services USDA.

Se amplificó el ADN genómico de manzana de 19 variedades cultivadas mediante el uso de un par de cebadores de la PCR ubicados en el promotor MdMYB10 (directo: 5'-GGAGGGGAATGAAGAAGAGG-3' - SEQ ID NO: 9; inverso: 5'-TCCACAGAAGCAAACACTGAC- 3' - SEQ ID NO: 10). Las reacciones de la PCR se llevaron a cabo en un volumen de 16,5 μ l que contiene 1x de mezcla de tampón de PCR (Invitrogen, Carlsbad, California), $MgCl_2$ 1,3 mM, 100 μ M de cada dNTP, formamida al 0,72 %, 10 μ M de cada cebador, 0,5 U de polimerasa de ADN Taq Platinum® (Invitrogen) y 2 ng de ADN genómico. Las amplificaciones mediante la PCR se llevaron a cabo en un ciclador térmico Hybaid PCR Express (Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts) con las siguientes condiciones: 94 °C durante 2 min 45 s, seguido de 40 ciclos a 94 °C durante 55 s, 55 °C durante 55 s y 72 °C durante 1 min 39 s, y un alargamiento final a 72 °C durante 10 min. Los productos obtenidos de la PCR se clonaron mediante el uso del kit de clonación TOPO TA® (Invitrogen). Se secuenciaron cuatro clones para cada producto de la PCR. Las secuencias se alinearon mediante el uso de Vector NTI (Invitrogen).

Asociación del minisatélite con el fenotipo de piel roja

Previamente hemos demostrado que el MdMYB10 está relacionado con el fenotipo de piel roja y con la hoja roja en la manzana (Chagné et al, 2007, BMC Genomics, 8, 212). Además, la amplificación mediante una PCR de la región del promotor de las variedades de piel roja y blanca demostró coherentemente que el minisatélite R_6 estaba amplificado en todos los fenotipos de color rojo (Figura 3). Determinamos la asociación del motivo repetitivo con el fenotipo de piel roja mediante la secuenciación de la región que engloba el motivo de minisatélite a lo largo de 19 variedades de manzana diversas (11 de piel roja y 8 de piel blanca; Tabla 1). Se encontraron diversas variaciones de la secuencia en la región secuencia arriba, pero únicamente el polimorfismo del minisatélite está perfectamente asociado con la elevada acumulación de antocianinas que causa el color rojo y la hoja roja. Se amplificó la misma región mediante una PCR de un conjunto adicional de 68 variedades cultivadas de manzana de piel blanca y de registros silvestres tomados a partir de dos colecciones de especies de *Malus*, y en cada caso, el producto correspondiente al motivo del minisatélite estaba ausente (datos no mostrados). Todas las variedades de piel blanca ensayadas contenían únicamente la versión R_1 , mientras que las versiones de piel roja contenían tanto R_1 como R_6 o únicamente R_6 .

Tabla 1

Registro	Color de la piel	G/T SNP Pos 81	Motivo de minisatélite	A/T SNP Pos 448
<i>Malus x domestica</i> 'Babine'*	Rojo	G:G	R ₁	R ₆ A:T
<i>Malus x domestica</i> 'Okanagan'*	Rojo	G:G	R ₁	R ₆ A:T
<i>Malus x domestica</i> 'Simcoe'*	Rojo	G:G	R ₆	R ₆ T:T
<i>Malus x domestica</i> 'Slocan'*	Rojo	G:T	R ₁	R ₆ A:T
<i>Malus marjorensis</i> 'Formosa'*	Rojo	G:T	R ₁	R ₆ A:T
<i>Malus sieversii</i> 629319*	Rojo	G:G	R ₆	R ₆ T:T
<i>Malus sieversii</i> FORM 35 (33-01)*	Rojo	G:T	R ₁	R ₆ A:T
<i>Malus sieversii</i> 01P22*	Rojo	G:G	R ₆	R ₆ T:T
<i>Malus sieversii</i> 3563.q*	Rojo	G:G	R ₆	R ₆ T:T
<i>Malus Aldenhamii</i>	Rojo	T:T	R ₁	R ₆ A:T
<i>Malus x domestica</i> 91.136 B6-77	Rojo	G:T	R ₁	R ₆ A:T
<i>Malus x domestica</i> 'Close'	Blanco	G:T	R ₁	R ₁ A:T
<i>Malus x domestica</i> 'Mr Fitch'	Blanco	T:T	R ₁	R ₁ A:A
<i>Malus x domestica</i> 'Guldborg'	Blanco	G:T	R ₁	R ₁ A:T
<i>Malus x domestica</i> 'Alkmene'	Blanco	T:T	R ₁	R ₁ A:A
<i>Malus x domestica</i> 'Red Melba'	Blanco	T:T	R ₁	R ₁ A:A
<i>Malus x domestica</i> 'Rae Ime'	Blanco	G:G	R ₁	R ₁ T:T
<i>Malus x domestica</i> 'Lady Williams'	Blanco	T:T	R ₁	R ₁ A:A
<i>Malus x domestica</i> 'Granny Smith'	Blanco	G:T	R ₁	R ₁ A:A
Prueba de asociación (r ²)		0,185	1	0,491

"R₁" se refiere a la ausencia de la unidad de minisatélite según se encuentra en el promotor de la variedad cultivada de piel blanca Royal Gala. "R₆" se refiere a la presencia de la unidad de minisatélite según se encuentra en el promotor de la variedad cultivada de piel roja *Malus x pumila* niedzwetzkyana.

5 Dado que la unidad repetitiva individual está presente en el promotor de la piel blanca, es probable que la presencia de unidades repetitivas adicionales en el promotor de la variedad cultivada de piel roja se corresponda con el conocido aumento en el nivel de expresión de MdMY10 y la resultante acumulación de antocianina en las variedades cultivadas de manzana de piel roja.

10 Ejemplo 4: la expresión del factor de transcripción MDMYB10 guiada por el promotor de la invención da como resultado la producción de antocianina en tabaco transformado temporalmente.

15 Algunos estudios previos han demostrado que cuando el MdMYB10 se fusionaba con 35S y se infiltraban conjuntamente en *N. tabacum* con un cofactor bHLH guiado por 35S, podía detectarse un elevado nivel de pigmentación de antocianina en el sitio de infiltración (Espley et al, 2007, The Plant Journal 49, 414-427). Por lo tanto, los solicitantes infiltraron *Nicotiana tabacum* con suspensiones de MdMYB10 de *Agrobacterium* guiado por las secuencias promotoras R₁ y R₆. R₁ es el promotor nativo de *Malus domestica* 'Royal Gala'. R₆ es el promotor nativo de *Malus xpumila* var. niedzwetzkyana. Cuando R₆:MdMYB10 se infiltró conjuntamente con 35S:MdbHLH3, se consiguió un nivel de coloración similar al conseguido con 35S:MdMYB10 (Figura. 6A). Los solicitantes no fueron capaces de detectar una acumulación de antocianina con la infiltración R₁:MdMYB10, con o sin 35S:MdbHLH3.

20 Para investigar las propiedades del promotor R₆ en la manzana, los solicitantes transformaron Royal Gala con ADNc de MdMYB10 guiado por uno de los promotores R₆ o R₁. Mientras que el promotor R₁ se encuentra en Royal Gala, R₆ no se encuentra. Previamente se ha demostrado que cuando Royal Gala se transforma con 35S:MdMYB10, se producen callos de color rojo que se regeneran para producir plantas de color rojo (Espley et al, 2007, The Plant Journal 49, 414-427). Los solicitantes observaron un fenotipo calloso similar cuando Royal Gala se transformaba con R₆:MdMYB10, con brillantes áreas de color rojo en el callo en regeneración (Figura 6B). Sin embargo, mientras que 35S:MdMYB10 era capaz de guiar la acumulación de antocianina en los callos transformados en ausencia de luz, apreciamos que los transformantes R₆:MdMYB10 necesitaban luz para la inducción de la pigmentación. No se observó una pigmentación sostenida en la regeneración de los callos de manzana transformados con R₁:MdMYB10. De forma análoga, los callos transformados con un casete de vector vacío no mostraron pigmentación.

30

Ejemplo 5: la expresión del factor de transcripción MdMYB10 guiada por el promotor de la invención puede transactivar la expresión del gen indicador a un nivel similar o mayor que la expresión guiada por el promotor CaMV35S del factor de transcripción MdMYB10.

5 Para investigar adicionalmente el efecto del promotor sobre el transcrito MdMYB10 y los niveles predichos de proteína, los solicitantes repitieron el ensayo del Ejemplo 2, sustituyendo el promotor 35S por uno de los promotores R₁ o R₆. Los resultados indicaron que la elevada abundancia del transcrito de MdMYB10 guiado por el promotor R₆ permite la transactivación del indicador, particularmente cuando el indicador está fusionado con R₆ (Figura 7). Los resultados muestran un nivel de actividad similar del promotor 35S. Con la fusión R₁ luciferasa, parece que R₆:MdMYB10 ejerce una transactivación más fuerte que 35S:MdMYB10. La fusión R₁:MdMYB10 no influyó en la transactivación en el mismo grado.

Ejemplo 6: el número de copias de la unidad repetitiva de 23 pb influye en la transcripción.

15 Se construyó una serie de constructos mediante el uso de las técnicas de biología molecular habituales, para ensayar el efecto sobre la transcripción del número de unidades repetitivas de 23 pb presentes en la región secuencia arriba. Estos constructos se basaron en las secuencias promotoras nativas, pero con unas unidades repetitivas que varían desde una (R₁) hasta seis (R₆), y se fusionaron con el indicador de la luciferasa como anteriormente (Figura 8a). Para ensayar el efecto espacial que pudiera ejercer la presencia de la secuencia de minisatélite sobre otros motivos no identificados, se construyó un constructo adicional (R₁₊) en el que la secuencia de minisatélite de R₆ fue sustituida por un ADN no específico de la misma longitud procedente de un vector de clonación (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Los resultados indican una correlación entre el número de unidades repetitivas y la activación del promotor (Figura 8b). Cuando se infiltra conjuntamente con 35S:MdMYB10, existe una actividad basal de ambos R₁ y R₁₊ y una activación creciente desde R₂ hasta R₆. Existen numerosos ejemplos de la relación entre los cofactores reguladores de la antocianina MYB y bHLH, y previamente se ha demostrado la dependencia de MdMYB10 de un cofactor bHLH en ensayos temporales (Espley et al, 2007, The Plant Journal 49, 414-427). En este ensayo, la activación de ambos promotores R₁ y R₆ se mejora mediante la adición de 35S:MdbHLH3 en todos los constructos ensayados.

30 Ejemplo 7: el análisis de la delección del promotor de la invención enfatiza la importancia de la región de minisatélite, que contiene múltiples copias de la unidad repetitiva de 23 pb, en la mejora de la transcripción.

Para definir la región secuencia arriba directamente responsable de la mejora transcripcional, se sometieron ambas versiones del promotor nativo (R₁ y R₆) a diversos tratamientos de delección de la secuencia (Figura 9a). Las cinco versiones de cada promotor nativo se fusionaron con la luciferasa y se infiltraron conjuntamente en tabaco con 35S:MdMYB10, +/- 35S:MdbHLH3.

40 Cuando se infiltraron las versiones de delección de R₁:LUC sólo con 35S:MdMYB10, la actividad de la luciferasa apenas era detectable y era significativamente inferior a la de la versión nativa no deleccionada (Figura 9b). Únicamente cuando 35S:MdbHLH3 se filtraba conjuntamente con 35S:MdMYB10 aparecía la luminiscencia por encima del fondo. Aunque existe un supuesto dominio de unión de bHLH en el extremo 5' de la región del promotor aislada, cuando éste se deleccionaba (R₁Aa) todavía había un aumento significativo en la proporción LUC:REN con la infiltración conjunta de bHLH, lo que sugiere que puede haber un sitio alternativo para la unión de bHLH. Las delecciones R₆:LUC estaban menos afectadas que R₁ con la actividad reducida a la mitad para R₆Aa y R₆Ab y una menor reducción con R₆Ac. Con la restauración del supuesto dominio de unión de bHLH en ambos R₁Ac y R₆Ac, existe un aumento en la actividad cuando se infiltra conjuntamente con 35S:MdbHLH3.

50 En este ensayo, los promotores R₆:LUC parecían mostrar una menor dependencia del bHLH para un aumento en la actividad, aunque esto puede ser debido a una saturación o a un agotamiento de uno u otro de los factores de transcripción infiltrados conjuntamente. Para ambos R₁Ad y R₆Ad había una actividad apenas detectable, con o sin el bHLH, lo que confirma el requisito de la región 3' para la transactivación. Los datos sugieren que el promotor R₆ todavía puede activar la transcripción de la luciferasa en su forma truncada (500 pb), mientras que la correspondiente versión de R₁ (R₁Ab) no puede.

55 Procedimientos experimentales

Aislamiento de la región promotora MdMYB10 secuencia arriba

60 Para el aislamiento de la región promotora secuencia arriba, se extrajo el ADN genómico de *Malus x domestica* 'Sciros' (Pacific Rose™, derivada de un cruce entre 'Gala' y 'Splendour'). Se diseñaron cebadores anidados para la región codificante de MdMYB10; primario 5'-CACTTCCCTCTCCATGAATCTCAAC-3 (SEQ ID NO: 18), y secundario 5'-CAGGTTTTCGTTATATCCCTCCATCTC-3 (SEQ ID NO: 19). Se aisló una región de 1,7 Kb del ADN secuencia arriba inmediatamente adyacente al sitio de inicio de la transcripción a partir del ADN genómico mediante una PCR de desplazamiento sobre el genoma mediante el uso de un kit GenomeWalker™ (Clontech, Mountain View, California, EE.UU.), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Posteriormente se aisló el ADN genómico de *Malus x domestica* 'Granny Smith', de *Malus x domestica* 'Royal Gala' y de *Malus x pumila* var. *niedzwetzkyana*

mediante el uso de los cebadores directo e inverso 5'-ACCCTGAACACGTGGGAACCG-3 (SEQ ID NO: 20) y 5'-GCTAAG CTTAG CT - GCTAGCAGATAAGAG-3 (SEQ ID NO: 21) respectivamente. Los productos de la PCR se clonaron mediante el uso de kit de clonación TOPO TA® (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.) y las secuencias se alinearon mediante el uso de Vector NTI (Invitrogen).

5

Amplificación mediante una PCR y secuenciación de la región de minisatélite

Se amplificó el ADN genómico de manzana de 19 variedades cultivadas mediante el uso de un par de cebadores de la PCR ubicados en el promotor *MYB10* (directo: 5'-GGAGGGGAATGAAGAAGAGG-3' [SEQ ID NO: 22]; inverso: 5'-TCCACAGAAGCAAACACTGAC-3' [SEQ ID NO: 23]). Las reacciones de la PCR se llevaron a cabo en un volumen de 16,5 µl que contiene 1x de mezcla de tampón de PCR (Invitrogen), MgCl₂ 1,3 mM, 100 µM de cada dNTP, formamida al 0,72 %, 10 µM de cada cebador, 0,5 U de polimerasa de ADN *Taq* Platinum (Invitrogen) y 2 ng de ADN genómico. Las amplificaciones mediante la PCR se llevaron a cabo en un ciclador térmico Hybaid PCR Express (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, EE.UU.) con las siguientes condiciones: 94 °C durante 2 min 45 s, seguido de 40 ciclos a 94 °C durante 55 s, 55 °C durante 55 s y 72 °C durante 1 min 39 s, y un alargamiento final a 72 °C durante 10 min. Los productos obtenidos de la PCR se clonaron mediante el uso del kit de clonación TOPO TA® (Invitrogen). Se secuenciaron cuatro clones para cada producto de la PCR. Las secuencias se alinearon mediante el uso de Vector NTI (Invitrogen).

10

15

20

Construcción del plásmido

Los constructos indicadores de luciferasa derivaban de pGreen 0800-LUC (Hellens et al. 2005, Plant Methods 1, 13) en el que se insertaron la secuencia promotora del promotor nativo MdMYB10 o los fragmentos de delección. Las secuencias promotoras nativas se amplificaron mediante una PCR mediante el uso de los cebadores 5' - ACCCTGAACACGTGGGAACCG - 3' (SEQ ID NO: 24) y 5'-GCTAAGCTTAGCTGCTAGCAGATAAGAG - 3' (SEQ ID NO: 25) y se clonaron en la región de multiclonación de pGreen 0800-LUC. Se clonaron fragmentos de los promotores R₁ y R₆ como secuencias promotoras nativas, mientras que los cambios en la frecuencia de las repeticiones se sintetizaron para los fragmentos de los promotores R₂, R₃ y R₄ (Geneart AG, Regensburg, Alemania) y se clonaron en R₁ mediante el uso de las enzimas de restricción *SpeI* y *DraI*. Se usó una metodología de PCR inversa para el constructo R₁₊ con la inclusión de sitios de restricción únicos (*Bam*HI y *SacI*) para la clonación del ADN no específico (de pGEM T Easy, Promega, Madison, WI, EE.UU.) mediante el uso de los cebadores 5'-GGATCCTTCTGCACGACAACATTGACAA - 3' (SEQ ID NO: 26) y 5' - GAGCTCATGTTAGCTTTTCTATATATCGA - 3' (SEQ ID NO: 27). El constructo pSAK para 35S:MdMYB10 y 35S:MdbHLH3 era como se ha descrito previamente (Espley et al, 2007, The Plant Journal 49, 414-427), mientras que las secuencias promotoras fueron sustituidas por las versiones R₁ y R₆:MdMYB10. Todos los constructos fueron verificados mediante una secuenciación del ADN.

25

30

35

Análisis de transactivación mediante el uso de hojas de tabaco transformadas

Se insertaron las secuencias promotoras de *MdMYB10* en el sitio de clonación de pGreen 0800-LUC (Hellens et al, 2005, Plant Methods 1, 13). En el mismo constructo, un gen de luciferasa de *Renilla* (REN), bajo el control de un promotor 35S, proporcionó una estimación de la magnitud de la expresión temporal. La actividad se expresó como una proporción entre la actividad de LUC y de REN. Se usaron las fusiones promotor-LUC en la transformación temporal mezclando 100 µl de la cepa de *Agrobacterium* GV3101 (MP90) transformada con el casete indicador, con o sin otro(s) cultivo(s) de *Agrobacterium* (900 µl) transformados con un casete que contiene *MYB10* fusionado con los promotores 35S, R₁ o R₆ y MdbHLH3 fusionado con el promotor 35S. Se cultivaron plantas de *Nicotiana tabacum* 'Samsun' hasta que había disponibles al menos 6 hojas para su infiltración con *Agrobacterium*. Se resuspendió un bucle de 10 µl de la bacteria confluyente en 10 ml de medio de infiltración (MgCl₂ 10 mM, acetosiringona 0,5 µM), hasta una DO⁶⁰⁰ de 0,2, y se incubó a la temperatura ambiente sin agitación durante 2 h antes de la infiltración. Se infiltraron aproximadamente 150 µl de esta mezcla de *Agrobacterium* en seis puntos de una hoja joven de *N. tabacum*. La expresión temporal se analizó tres días después de la inoculación. Se extrajeron seis replicados técnicos de discos de hoja 0 de 3 mm de cada planta mediante el uso de un punzón perforador de hojas y solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se llevaron a cabo ensayos en placa mediante el uso de un luminómetro de microplaca Berthold Orion (Berthold Detection Systems, Oak Ridge, TN, EE.UU.) según las especificaciones del fabricante para el ensayo doble de luciferasa, mediante el uso de los reactivos de ensayo Dual Glow (Promega) para la luciferasa de luciérnaga y para la luciferasa de *Renilla*. La luminiscencia se calculó mediante el uso programa informático Simplicity versión 4.02 (Berthold Detection Systems).

40

45

50

55

Inducción de la pigmentación de antocianina en el tabaco

Se cultivó *N. tabacum* como se ha mencionado previamente y se mantuvo en el invernadero durante la duración del experimento. Los cultivos de *Agrobacterium* se incubaron como para el ensayo doble de luciferasa, y se mezclaron las cepas individuales que contienen el gen MdMYB10 fusionado con las secuencias promotoras 35S, R₁ o R₆ y el gen MdbHLH3 fusionado con el promotor 35S (500 µl de cada uno) y se infiltraron en la superficie foliar abaxial. Se realizaron seis infiltraciones individuales en hojas de *N. tabacum* (dos plantas por tratamiento) y se observaron los cambios de color a lo largo de un periodo de ocho días. Para controlar la variabilidad entre las hojas, se infiltraron al

60

65

menos 2 hojas, y cada una incluía un control positivo (cultivos de *Agrobacterium* que contienen 33S:MdMYB10 + 35S:MdbHLH3) y negativo (vector vacío con *Agrobacterium*).

Transformación de la manzana

Se transfirió el vector binario pSAK277 que contiene el ADNc de *MdMYB10* guiado por los promotores R₆ o R₁ a la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 mediante un método de congelación y descongelación. Se generaron plantas transgénicas *Malus domestica* 'Royal Gala' mediante una transformación mediada por *Agrobacterium* de trozos de hojas, mediante el uso de un método notificado previamente (Yao et al. 1995, Plant Cell Reports, 14, 407-412).

Ejemplo 8: aislamiento del promotor PcMYB10 de la pera e identificación de un motivo de secuencia análogo al motivo repetitivo encontrado en los promotores MdMYB10 de manzana.

Aislamiento del promotor MYB10 de pera

Se aisló el ADN genómico a partir de las hojas de una variedad cultivada de pera (*Pirus communis* 'William's Bon Chretien') mediante el uso de un Mini Kit Qiagen DNeasy Plant, según las instrucciones de los fabricantes (Qiagen, Valencia, California). Las secuencias promotoras se aislaron mediante una PCR mediante el uso de los cebadores RE158 (5'-ACCCTGAACACGTGGGAACCG-3', SEQ ID NO: 28) y RE159 (5'-CTCTTATCTGCTAGCAGCTAAGCTTAGC-3', SEQ ID NO: 29).

Mediante la comparación de la secuencia del promotor MYB10 de la manzana (Ejemplo 1) y de la pera, los solicitantes identificaron la presencia de un motivo de 23 pb, en el promotor de la pera, muy similar al encontrado en las proteínas MYB10 de manzana.

Una alineación del promotor MYB10 de la manzana de piel blanca y de la pera, que destaca en subrayado el motivo de 23 pb, se muestra en la Figura 12.

Los promotores tanto de la manzana como de la pera mostraron una cierta conservación de la posición de R1, que está en la posición -220 (con respecto al sitio ATG) en la manzana, y en la posición -227 en la pera. De forma análoga, la posición del microsatélite parecía estar conservada, empezando la posición del microsatélite en la manzana en la posición -253, y en la pera en -259.

Los solicitantes identificaron tres versiones del elemento de 23 pb, de la manzana de piel blanca, de la manzana de piel roja y de la pera, según se resume en la siguiente en la Tabla 2.

Tabla 2. Comparación de los motivos de 23 pb de la manzana y de la pera, destacando las posiciones variables

SEQ ID NO	Secuencia	Especies en las que se encuentra
1	gtagactgtagctattaaca	manzana de piel blanca, manzana de piel roja
11	gtagactgtagctaataaca	manzana de piel blanca
12	gtagaccgtagctaataaca	pera

El porcentaje de identidad entre las secuencias se muestra en la siguiente Tabla 3.

Tabla 3. Porcentaje de identidad entre los motivos de 23 pb de la manzana y de la pera

	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
SEQ ID NO: 1	100 %	96 %	91 %
SEQ ID NO: 11		100 %	96 %
SEQ ID NO: 12			100 %

El alto grado de conservación entre estas tres secuencias, y su posición conservada en los promotores, procediendo de diferentes fuentes, sugiere fuertemente que cada una de las tres secuencias lleva a cabo la misma función.

Ejemplo 9: producción de un promotor quimérico con una actividad alterada mediante la inserción de copias del motivo repetitivo del promotor MdMYB10 de la manzana de piel roja en el promotor PcMYB10 de la pera.

Introducción

El MdMYB10 controla la acumulación de antocianina en la manzana. Los experimentos temporales descritos en los anteriores Ejemplos han mostrado que la proteína MYB10 es capaz de autorregular su propio promotor dando lugar a un elevado nivel de expresión del gen indicador de la luciferasa guiado por la versión larga del promotor MdMYB10

(que incluye las 6 repeticiones del supuesto sitio de unión del factor de transcripción), cuando se infiltra conjuntamente con un factor de transcripción. Ahora los solicitantes han introducido las 6 repeticiones en el promotor de la pera verde MYB10 que controla el gen indicador de la luciferasa y han evaluado la actividad indicadora en presencia de los factores de transcripción PcMYB10 y MdMYB10.

5

Materiales y métodos

Se clonó el promotor de la pera verde MYB10 (SEQ ID NO: 13) en el vector pGreen0800LUC. La región R6 (SEQ ID NO: 14) del promotor MdMYB10 fue amplificada mediante el uso de los cebadores CB02F/RE161, digerida con Dra1 y clonada en el promotor PcMYB10 en el sitio despuntado Bsg1 (véase la Figura 10) para producir el promotor quimérico recombinante de la SEQ ID NO: 15.

10

Todos los constructos (incluyendo MdMYB10 genómico, 35S:PcMYB10, AtbHLH2 y bHLH33 y los diferentes constructos indicadores de LUC: DFR-LUC, MdMYB10short-LUC, MdMYB10long-LUC, PcMYB10short-LUC, PcMYB10R6-LUC) fueron transformados en GV3101 mediante una electroporación y se usaron para infiltrar hojas de *Nicotiana benthamiana* según se ha descrito previamente (Hellens et al. 2005, Plant Methods 1, 13). Después de 5 días, se recogieron discos foliares y se midieron las actividades de la luciferasa de luciérnaga (LUC) y de la luciferasa de renilla (REN) con un luminómetro mediante el uso de los reactivos Dual Glow™ (PROMEGA).

15

Resultados

Los constructos MYB10 de la manzana y de la pera, en presencia de bHLH33 y de bHLH2 respectivamente, activan fuertemente los promotores DFR, MdMYB10R6 y PcMYB10R6, y sólo activan levemente los promotores MdMYB10R1 y PcMYB10R1. La introducción de las repeticiones R6 de la manzana en el promotor de la pera da lugar a un aumento de 6 veces en la actividad de la luciferasa en presencia del constructo 35S:PcMYB10 y a un aumento de 8 veces en presencia del constructo genómico MdMYB10.

25

Ejemplo 10: el promotor MdMYB10, que contiene 6 copias de la unidad repetitiva de 23 pb, es activado por varias secuencias del factor de transcripción R2R3.

30

Introducción

Se midió el efecto de tres secuencias MYB10 (de la pera [PcMYB10], de la fresa [FaMYB10] y de Arabidopsis [PAP1]) sobre dos versiones del promotor MdMYB10, R1 y R6, que contienen 1 y 6 repeticiones de la unidad repetitiva de 23 pares de bases, respectivamente, mediante el uso del ensayo de transformación temporal descrito en los ejemplos anteriores, en el tabaco.

35

Materiales y métodos

Las versiones R1 y R6 del promotor nativo MdMYB10 son según se ha descrito previamente (Espley et al., 2009, Plant Cell 21, 168-183). Los promotores R1 y R6 de MdMYB10 fusionados con el indicador de la luciferasa son según se ha descrito en el Ejemplo 2.

40

Se han clonado las secuencias codificantes MdMYB10 y bHLH3 en el vector binario pSAK según se ha descrito previamente (Espley et al., 2007, The Plant Journal 49, 414-427). Se ha aislado la secuencia codificante genómica del PcMYB10 a partir del ADN genómico de la pera de WBC y se ha clonado en el vector pGreenII 0029 62-SK bajo el control del promotor 35S. Se ha aislado la secuencia codificante AtbHLH2 (EGL3, Atlg63650) del ADNc de Arabidopsis y se ha clonado en el vector binario pHEX bajo el control del promotor 35S. Se ha aislado la secuencia codificante FaMYB10 (SEQ ID NO: 33) del ADNc de *Fragaria ananassa* (fresa de jardín) y se ha clonado en el vector binario pGreenII 0029 62-SK bajo el control del promotor 35S (Gleave, 1992, Plant Mol Biol 20, 1203-1207). Se ha aislado la secuencia codificante MdMYB8 del ADNc de la fruta madura *Malus domestica* 'Royal Gala' y se ha clonado en el vector binario pART277 (Gleave, 1992, (Gleave, 1992, Plant Mol Biol 20, 1203-1207). También se clonaron las secuencias codificantes de AtPAP1 (nº de registro CAB09230), de AtbHLH2 (nº de registro Q9CAD0) y de MdbHLH3 (nº de registro CN934367) secuencia arriba del promotor CaMV35 según se ha descrito aquí para MdMYB10 y en el Ejemplo 2.

50

55

Las secuencias promotoras de MYB10 se insertaron en el sitio de clonación de pGreen 0800-LUC (Hellens et al., 2005, Plant Methods 1, 13) para controlar la expresión del gen indicador de la LUC. En el mismo constructo, un gen de luciferasa de REN, bajo el control de un promotor 35S, proporcionó una estimación de la magnitud de la expresión temporal. La actividad se expresa en forma de una proporción entre la actividad de LUC y de REN. Se usaron las fusiones promotor-LUC en la transformación temporal de *Nicotiana benthamiana*. Se mezclaron 0,1 ml de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (MP90) transformada con el casete promotor-LUC, con 0,45 ml de otros dos cultivos de *Agrobacterium* transformados respectivamente con los constructos 35S:MYB y 35S:bHLH. La infiltración de la hoja de *N. benthamiana* y la medición de la quimioluminiscencia son según se ha descrito previamente (Espley et al., 2007, The Plant Journal 49, 414-427).

60

65

Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 13. Los resultados del ensayo indican que la presencia del motivo R6 en el promotor MYB10 de manzana da lugar a un gran aumento (de entre 7 y 12 veces) en la actividad de la luciferasa en presencia de las diferentes secuencias MYB10 cuando se infiltra conjuntamente con el bHLH. No se midió un aumento significativo en la actividad de la luciferasa en presencia del factor de transcripción MdMYB8 (Figura 13). Estos resultados demuestran que la presencia del motivo R6 confiere la capacidad para que el promotor MdMYB10 sea regulado por MdMYB10 y por otros MYB R2R3 (PcMYB10, FaMYB10 y PAP1).

Ejemplo 11: promotores quiméricos producidos mediante la combinación de copias de la unidad repetitiva de 23 pb y de los promotores naturales MYB10.

Introducción

Para demostrar la producción de los promotores quiméricos funcionales de la invención, se introdujo el dominio R6 del promotor de manzana MYB10 en los promotores MYB10 de pera (véase la SEQ ID NO: 13) y PAP1 de Arabidopsis (véase la SEQ ID NO: 36), 275 pb y 489 pb, respectivamente, secuencia arriba del ATG (Figura 15), y estos constructos se ensayaron mediante el ensayo luminiscente temporal en tabaco.

Materiales y métodos

Los promotores R1 y R6 de MdMYB10 son según se han descrito en el Ejemplo 10. Se amplificó una secuencia de 4,6 Kb del promotor PcMYB10 (SEQ ID NO: 13) a partir del ADN genómico de pera 'William Bon Chretien' (WBC), se amplificaron 1,9 Kb de la secuencia del promotor AtPAP1 (AtMYB75, AT1G56650) (SEQ ID NO: 36) del ADN genómico de Arabidopsis y se clonaron en el vector pGreen 0800-LUC (Hellens et al., 2005, Plant Methods 1, 13). El dominio R6 fue amplificado a partir del promotor nativo R6:MdMYB10 de 'Red Field' descrito previamente (Espley et al., 2009, Plant Cell 21, 168-183), mediante el uso de los cebadores CB02 5'-TGCAGAAATGTTAGACTGGTAGCTATTAAC-3' (SEQ ID NO: 30) y RE161 5'-CCAGTGACGTG CATGTCTGATATCC-3' (SEQ ID NO: 31). El fragmento de la PCR que contiene el motivo R6 (según se muestra en la Figura 17) fue digerido con Dra1, purificado en gel y clonado despuntado en los promotores PcMYB10 y AtPAP1 en los sitios BsgI y HindIII, respectivamente, para producir los constructos pPcMYB10R6-LUC y pAtPAP1R6-LUC.

La secuencia del promotor quimérico PcMYB10/R6 se muestra en la SEQ ID NO: 15. La secuencia del promotor quimérico AtPAP1/R6 se muestra en la SEQ ID NO: 37.

Se han clonado las secuencias codificantes MdMYB10 y bHLH3 en el vector binario pSAK según se ha descrito previamente (Espley et al., 2007, The Plant Journal 49, 414-427). La secuencia codificante genómica del PcMYB10 se ha aislado a partir del ADN genómico de pera de WBC y se ha clonado en el vector pGreenII 0029 62-SK bajo el control del promotor 35S. Se ha aislado la secuencia codificante de AtbHLH2 (EGL3, Atlg63650) del ADNc de Arabidopsis y se ha clonado en el vector binario pHEX bajo el control del promotor 35S.

La expresión de los genes indicadores bajo cada constructo de promotor en presencia de los constructos del factor de transcripción se ensayó en el ensayo temporal según se ha descrito en los ejemplos previos.

Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 15. Los resultados indican que la presencia del motivo R6 en los promotores de pera y de Arabidopsis da lugar a un aumento en la actividad de la luciferasa cuando se infiltran conjuntamente MYB10 y bHLH3 de manzana (Figura 3). Se obtuvieron unos resultados similares cuando estos promotores se infiltraron conjuntamente con sus correspondientes ortólogos MYB10 (es decir, el promotor de pera infiltrado con PcMYB10/bHLH2 y el promotor de Arabidopsis infiltrado con AtPAP1/bHLH2). Estos resultados demuestran que los promotores quiméricos funcionales pueden ser producidos mediante la combinación de copias de la unidad repetitiva de 23 pb con los promotores (MYB10) de un factor de transcripción natural R2R3. Los resultados también demuestran la autorregulación de los promotores quiméricos por el producto codificado por el gen con el que están actualmente asociados los promotores naturales (es decir, el factor de transcripción MYB10).

Ejemplo 12: producción de un promotor quimérico funcional mediante la combinación de múltiples copias de la unidad repetitiva de 23 pb con un promotor natural no relacionado, y demostración de la regulación del promotor quimérico por los factores de transcripción MYB R2R3.

Introducción

Se introdujo el motivo R6 de la manzana en la región promotora del gen VitC2 de *Aeriantha* 221 pb secuencia arriba de la UTR en 5' (694 pb secuencia arriba del ATG) (Figura 14) y el constructo se ensayó según se ha descrito en los ejemplos previos, en el tabaco. La VitC2 es una guaniltransferasa de GDP-L-galactosa que se ha averiguado que es una etapa limitante de la velocidad en la biosíntesis del ácido ascórbico (Bulley et al., 2009, J Exp Bot 60, 765-778).

Materiales y métodos

Se amplificaron 2,1 Kb de la secuencia promotora VitC2 (SEQ ID NO: 38) a partir del ADN genómico de *Actinidia eriantha* (Laing et al., 2007, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 104, 9534-9539), y se clonaron en el vector pGreen 0800-LUC (Hellens et al., 2005, Plant Methods 1, 13). Se amplificó el dominio R6 (SEQ ID NO: 14) del promotor nativo R6:MdMYB10 de 'Red Field' según se ha descrito previamente (Espley et al., 2009, Plant Cell 21, 168-183), mediante el uso de los cebadores CB02 5'-T G CAGAAATGTTAGACT - GGTAGCTATTAAC-3' (SEQ ID NO: 30) y RE161 5'-CCAGTGACGTGCATGTCTGATATCC-3' (SEQ ID NO: 31). El fragmento de la PCR que contiene el motivo R6 (según se muestra en la Figura 17) se digirió con Dra1, se purificó en gel y se clonó despuntado en los promotores VitC2 en el sitio HpaI para producir el constructo pVitC2R6-LUC. Las dos inserciones en tándem de los motivos R6 se clonaron en el promotor VitC2 para producir el pVitC2R12-LUC. La secuencia del promotor quimérico Vit C/R6 promotor se muestra en la SEQ ID NO: 39. La secuencia del promotor quimérico VitC2/R12 se muestra en la SEQ ID NO: 40. Las secuencias codificantes MdMYB10 y bHLH3 se han clonado en el vector binario pSAK según se ha descrito previamente (Espley et al., 2007, The Plant Journal 49, 414-427).

La expresión de los genes indicadores bajo cada constructo de promotor en presencia de los constructos del factor de transcripción se ensayó en el ensayo temporal según se ha descrito en los ejemplos previos.

Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 16. Los resultados indican que la presencia del motivo R6 en el promotor VitC2 da lugar a un aumento significativo en la actividad de la luciferasa (de hasta 10 veces) cuando se infiltran conjuntamente MdMYB10 y bHLH3 (Figura 16). De forma interesante, un elevado número de repeticiones (R12) aumenta adicionalmente el nivel de activación por parte del MdMYB10 solo, aunque este efecto no se observa cuando se infiltran conjuntamente MdMYB10 y bHLH3.

Los Ejemplos anteriores ilustran la práctica de la invención.

SUMARIO DE SECUENCIAS:

SEQ ID NO:	Tipo de secuencia	Información	Especie
1	polinucleótido	motivo de secuencia de 23 pb, versión 1	<i>Malus domestica</i> y <i>Malus domestica niedwetzkyana</i>
2	polinucleótido	unidad repetitiva de minisatélite, del promotor MdMYB10 de la variedad cultivada de piel roja <i>Malus x domestica niedwetzkyana</i> , incluyendo los motivos repetitivos 2, 3A, 3B, 4, 5 y 6	<i>Malus domestica niedwetzkyana</i>
3	polinucleótido	microsatélite	<i>Malus domestica niedwetzkyana</i>
4	polinucleótido	región del promotor MdMYB10 de la variedad cultivada de piel roja <i>Malus x domestica niedwetzkyana</i> , incluyendo la unidad repetitiva del minisatélite, el microsatélite y la unidad repetitiva 1	<i>Malus domestica niedwetzkyana</i>
5	polinucleótido	promotor MdMYB10 completo de la variedad cultivada de piel roja <i>Malus x domestica niedwetzkyana</i>	<i>Malus domestica niedwetzkyana</i>
6	polipéptido	MdMYB10	<i>Malus domestica</i>
7	polinucleótido	región codificante de MdMYB10	<i>Malus domestica</i>
8	polinucleótido	promotor MdMYB10 completo de la variedad cultivada de piel blanca <i>Malus domestica</i> Royal Gala	<i>Malus domestica</i>
9	polinucleótido	cebador directo	artificial
10	polinucleótido	cebador inverso	artificial
11	polinucleótido	motivo de secuencia de 23 pb, versión 2	<i>Malus domestica</i>
12	polinucleótido	motivo de secuencia de 23 pb, versión 3	<i>Pirus communis</i>
13	polinucleótido	promotor PcMYB10 completo de la pera	<i>Pirus communis</i>
14	polinucleótido	secuencia del minisatélite de manzana que fue insertada en los promotores de la pera (PcMYB10), de Arabidopsis (PAP1) y de kiwi (VitC2)	<i>niedwetzkyana</i>
15	polinucleótido	promotor quimérico de manzana/pera	artificial
16	polipéptido	PcMYB10 de la pera	<i>Pirus communis</i>
17	polinucleótido	secuencia codificante de PcMYB10 de la pera	<i>Pirus communis</i>
18	polinucleótido	cebador	artificial

ES 2 595 953 T3

SEQ ID NO:	Tipo de secuencia	Información	Especie
19	polinucleótido	cebador	artificial
20	polinucleótido	cebador	artificial
21	polinucleótido	cebador	artificial
22	polinucleótido	cebador	artificial
23	polinucleótido	cebador	artificial
24	polinucleótido	cebador	artificial
25	polinucleótido	cebador	artificial
26	polinucleótido	cebador	artificial
27	polinucleótido	cebador	artificial
28	polinucleótido	cebador	artificial
29	polinucleótido	cebador	artificial
30	polinucleótido	cebador	artificial
31	polinucleótido	cebador	artificial
32	polipéptido	FaMYB10 de la fresa	<i>Fragaria ananassa</i>
33	polinucleótido	secuencia codificante de FaMYB10 de la fresa	<i>Fragaria ananassa</i>
34	polipéptido	PAP1 de Arabidopsis	<i>Arabidopsis thaliana</i>
35	polinucleótido	secuencia codificante de PAP1 de Arabidopsis	<i>Arabidopsis thaliana</i>
36	polinucleótido	promotor PAP1 de Arabidopsis	<i>Arabidopsis thaliana</i>
37	polinucleótido	promotor PAP1 R6 quimérico	artificial
38	polinucleótido	promotor VitC2 del kiwi	<i>Actinidia eriantha</i>
39	polinucleótido	promotor VitC2 R6 quimérico	artificial
40	polinucleótido	promotor VitC2 R6 quimérico	artificial
41	polinucleótido	motivo consenso	artificial
42	polinucleótido	motivo consenso	artificial

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> THE NEW ZEALAND INSTITUTE FOR PLANT AND FOOD RESEARCH LIMITED

<120> COMPOSICIONES QUIMÉRICAS Y MÉTODOS PARA LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN PLANTAS

10 <130> 586999 HCF

<150> NZ 568190

<151> 12-05-2008

15 <160> 42

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

20 <211> 23

<212> ADN

<213> *Malus domestica*

25 <400> 1

gtagactgg tagctattaa caa 23

<210> 2

<211> 118

<212> ADN

30 <213> *Malus domestica* niedwetzkyana

ES 2 595 953 T3

<400> 2

g t t a g a c t g g t a g c t a t t a a c a a g t t a g a c t g g t t a g a c t g g t a g c t a t t a a c a a g t t a g 60
a c t g g t a g c t a t t a a c a a c t g g t a g c t a t t a a c a a g t t a g a c t g g t a g c t a t t a a c a a 118

5 <210> 3
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> *Malus domestica* niedwetzkyana

10 <400> 3
 g t g t g t g t g t 13

15 <210> 4
 <211> 172
 <212> ADN
 <213> *Malus domestica* niedwetzkyana

<400> 4

g t t a g a c t g g t a g c t a t t a a c a a g t t a g a c t g g t t a g a c t g g t a g c t a t t a a c a a g t t a g 60
a c t g g t a g c t a t t a a c a a c t g g t a g c t a t t a a c a a g t t a g a c t g g t a g c t a t t a a c a a g t 120
t a g a c t g t g t g t g t g t g t g t a t t t c a c a a g t t a g a c t g g t a g c t a t t a a c a a 172

20
 <210> 5
 <211> 1795
 <212> ADN
 <213> *Malus domestica* niedwetzkyana

<400> 5

t a c c c t g a a c a c g t g g g a a c c g g c c c g t t t g t a a c a g a c t g a g a t a g g t c c g g t t c t a t t 60
t c t t a a a a a c c c a a c a c c c g c t a c g t t c c a t t t a t a a a c g g g t c g g t c t g g t c c c t c c a a 120

ctttgagccc ggctcgactt gtgcccactc ctaaactaaa ccatataaaa accaagattt 180
 ccctttcatc tttcacacat atcacgttac tttccaacaa caattcaaca atcacaacaa 240
 ataatcaacc atcaagatca tatatcacgt cactaataaa gacaaccttc ataagggttg 300
 ccgtagttct ctacttgaaa tccaattgtc tagcattgta accctaagtt acagacacaa 360
 acataaactt gagcaacttc tatgcataag aatctagggg tttggactaa ctcaacagaa 420
 cctaacaaga aataatattc tggaccgctt aacggaatcc aacgaagaca aggtttcgga 480
 ccaactcaacg gaacaaataa gggaaagggg tataaacat tcaacgaaat ccatctttag 540
 aatagcata gtccccaat acggattaac caagtggaga catacgccat ctgatagcgt 600
 ggtcccgcaa gacagttaac caagtaggac caccgatggg ataatgtgac caagtaagca 660
 gtgaccctaa atgtagatta accacgtgga gttaaattaa caaggctgaa ccacctatga 720
 aaataatgta agcctgaaat cttaggagag aattcttgct ctaggggaca aatgattttc 780
 gtatgcctaa gtgttttttt agtgacagta aactaagatt tgagtacaga gacattaact 840
 gagattgact cttgtgaaag cttagtgagt tgaagcacgt agccaattat attgagcaat 900
 gtgttaggtg tagcgtctaa acttccgtag gagttttgta cagcaatata gtgggggtgc 960
 cgcaaaatgc agacagtagc aataaattac gggctaggat tttctcctct ttttttttcg 1020
 ttccattcca tccattcctc tcacattctt tattttgtct ttctctttct ataaaaaatt 1080
 aatataagat gttaatgtaa cttgaccgtg actattcaaa taggagggga atgagaaga 1140
 gggaaaaaaaa gagaggagag aatcctactc cgtaaattac aagcaaacac tttttttttt 1200
 tttggacaag cagaagcaaa caaacacttg aaaaagcagc gaaagcatga taaaggtatc 1260
 ttatgggtggc caaagatgtg tgttgtaact agttacacga ttctgcattc acattcatag 1320
 aatgtgcttt tgaatattat attacagcta gagaatttta tgcctggga ttgatttccc 1380
 ttgtcaatgt tgtcgtgcag aatggttaga ctggtagcta ttaacaagtt agactgggta 1440
 gactggtagc tattaacaag ttagactggg agctattaac aactggtagc tattaacaag 1500
 ttagactggg agctattaac aagttagact gtgtgtgtgt gtgtatttca caagttagac 1560
 tggtagctat taacaactgt tggaatgttt taaacttgtc agtgtttgc tctgtggata 1620
 tcagacatgc acgtcactgg ccttgaaga ttaattaggc cgatggatc catagcgta 1680
 acgtcatggc aaacacactc taattatata taatggtagc taggtgtctt tctggagtct 1740
 atgaagtggg tagcaggcaa aagataagct aagcttagct gctagcagat aagag 1795

<210> 6
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> *Malus domestica*

<400> 6

Met Glu Gly Tyr Asn Glu Asn Leu Ser Val Arg Lys Gly Ala Trp Thr
 1 5 10 15

5

10

ES 2 595 953 T3

Arg Glu Glu Asp Asn Leu Leu Arg Gln Cys Val Glu Ile His Gly Glu
 20 25 30

Gly Lys Trp Asn Gln Val Ser Tyr Lys Ala Gly Leu Asn Arg Cys Arg
 35 40 45

Lys Ser Cys Arg Gln Arg Trp Leu Asn Tyr Leu Lys Pro Asn Ile Lys
 50 55 60-

Arg Gly Asp Phe Lys Glu Asp Glu Val Asp Leu Ile Ile Arg Leu His
 65 70 75 80

Arg Leu Leu Gly Asn Arg Trp Ser Leu Ile Ala Arg Arg Leu Pro Gly
 85 90 95

Arg Thr Ala Asn Ala Val Lys Asn Tyr Trp Asn Thr Arg Leu Arg Ile
 100 105 110

Asp Ser Arg Met Lys Thr Val Lys Asn Lys Ser Gln Glu Met Arg Glu
 115 120 125

Thr Asn Val Ile Arg Pro Gln Pro Gln Lys Phe Asn Arg Ser Ser Tyr
 130 135 140

Tyr Leu Ser Ser Lys Glu Pro Ile Leu Asp His Ile Gln Ser Ala Glu
 145 150 155 160

Asp Leu Ser Thr Pro Pro Gln Thr Ser Ser Ser Thr Lys Asn Gly Asn
 165 170 175

Asp Trp Trp Glu Thr Leu Leu Glu Gly Glu Asp Thr Phe Glu Arg Ala
 180 185 190

Ala Tyr Pro Ser Ile Glu Leu Glu Glu Glu Leu Phe Thr Ser Phe Trp
 195 200 205

Phe Asp Asp Arg Leu Ser Pro Arg Ser Cys Ala Asn Phe Pro Glu Gly
 210 215 220

His Ser Arg Ser Glu Phe Ser Phe Ser Thr Asp Leu Trp Asn His Ser
 225 230 235 240

Lys Glu Glu

<210> 7
 <211> 729
 <212> ADN
 <213> *Malus domestica*
 <400> 7

5

ES 2 595 953 T3

atggagggat ataacgaaa cctgagtgtg agaaaagggtg cctggactcg agaggaagac 60
aatcttctca ggcagtcgt tgagattcat ggagagggaa agtggacca agtttcatac 120
aaagcaggct taaacagggtg caggaaaagt tgcagactta gatggttgaa ttatttgaag 180
ccaaatatca agagaggaga ctttaaagag gatgaagtag atcttataat tagacttcac 240
aggcttttgg gaaacagggtg gtcattgatt gctagaagac ttccaggaag aacagcaaat 300
gctgtgaaaa attattggaa cactcgattg cggatcgatt ctcgcatgaa aacggtgaaa 360
aataaatctc aagaaatgag agagaccaat gtgataagac ctcagcccca aaaattcaac 420
agaagttcat attacttaag cagtaaagaa ccaattctag accatattca atcagcagaa 480
gatttaagta cgccaccaca aacgtcgtcg tcaacaaaga atggaaatga ttggtgggag 540
accttgtag aaggtgagga tacttttgaa agagctgcat atcccagcat tgagtttagag 600
gaagaactct tcacaagttt ttggtttgat gatcgactgt cgccaagatc atgcgccaat 660
tttctgaag gacatagtag aagtgaattc tcctttagca cggacctttg gaatcattca 720
aaagaagaa 729

<210> 8
<211> 1696
<212> ADN
<213> *Malus domestica*

5

<400> 8

ES 2 595 953 T3

```

accctgaaca cgtgggaacc ggcccgtttg taaccgactg agatagggtcc ggttctatTT 60
cttaaaaacc caacacccgc tatgttctat ttataaacgg gtccgggtctg gtccctccaa 120
ctttgagccc ggctcgactt gtgcccactc ctaaactaaa ccatataaaa accaagattt 180
cccttttctt ctttcacaca tatcacgtta cttccaaca acaattcaac aatcacaaca 240
aataatcaac catcaagatc atatatcacg tcactaataa agacaacctt cacaagggtt 300
gtcgtagttc tctactggaa atccaattgt ctagcattgt aaccctaagt tacagacaca 360
aacataaact tgagcaactt ctatgcataa gaatctgggg ttttgacta actcaacaga 420
acctaacaag aaataatatt ctggaccgct taacggaatc caacgaagac aaggtttcgg 480
accactcaac ggaacaaata agggaaaggg atataaacca ttcaacgaaa tccatcttta 540
gaatagcat agtctcccaa tacggattaa ccaagtgaga acatagcca tctgatagcg 600
tgggtccgca agacagataa ccaagtagga ccaccgatgg tataatgtga ccaagtaagc 660
agtgacccta aatgtagatt aaccacatgg agttaaatta acaaggctga accacctatg 720
aaaataatgt aagcctgaaa tcttaggaga gaattcttgc tctaggggac aaatgatttt 780
cgtatgccta agtgTTTTT tagtgacagt aaactaagat ttgagtacag agacattaac 840
tgagattgac tcttgTgaaa gcttagtgag ttgaagcacg taggccaatt atattgagca 900
atgtgttagg tgtagcgtct aaacttccgt aggagTTTTg tacagcaata tagtgggggt 960
gccgcaaat gcagacagta gcaataaatt acgggctagg attttctcct cttttttttt 1020
cgttccattc catccattcc tctcacattt tttattttgt ctttctcttt ctataaaaaa 1080

ttaatataag atgttaatgt aacttgaccg tgactattca aataggaggg gaatgaagaa 1140
gagggaaaaa aaggagagaa tcctactcca taaattacaa gcaaacactt tttttttttt 1200
tttgacaagc agaagcaaac aaacacttga aaaagcagcg aaagcatgat aaaggatctt 1260
tatggTggTc aaagatgtgt gttgtaacta gttacacgat tctgcattca cattcataga 1320
atgtgctttt gaatattata ttacagctag agaattttat gccctgggat tgatttccct 1380
tgtcaatgTt gtcgtgcaga aatgttagct tttctatata tcgagtgtgt gtgtgtgtgt 1440
gtatttcaca agttagactg gtagctaata acaactgttg gaatgtttta aacttgTcag 1500
tgTTTgcttc tgtggatatt agacatgcac gTcactggcc ttgtaagatt aattaggccg 1560
atggtatcca tagcgttaat gTcatggcaa acacactcta attatatata atggtagcta 1620
ggTgtctttc tggagtgtat gaagtgggta gcaggcaaaa gaatagctaa gcttagctgc 1680
tagcagataa gagatg 1696

```

<210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> cebador

10

<400> 9
 ggaggggaat gaagaagagg

20

ES 2 595 953 T3

5	<210> 10 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
10	<400> 10 tccacagaag caaacactga c	21
15	<210> 11 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Malus domestica</i>	
20	<400> 11 gtagactgg tagctaataa caa	23
25	<210> 12 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Pyrus communis</i>	
30	<400> 12 gtagaccgg tagctaataa caa	23
	<210> 13 <211> 2001 <212> ADN <213> <i>Pyrus communis</i>	
	<400> 13	

ggtgttgagg gggagtgttg aagatcaaca ccagcccaat tgggtgtttgt gttgaagtgt 60
 aatcttgcct tggcccaaga tggatcgaac ccatggacaa agaaatatcc atacacatgc 120
 tagaaaattc tagcaaagtt caagttggtg gaacagttta gaagaatggt gaggagaagg 180
 catccacacc atctgtatca attaagaaga ctaagtgaga gtgagaagta ggagtagtct 240
 tgtgaggagt gtgagtgtc taaagtttgt ctctagaaag agtgagtgtc atagcttcaa 300
 atagtgtctt tgagagtttg tgtgctataa tttttgtga gttaatacaa gtaattgttt 360
 acttgtgttg tctctcaac acttgtgtta aagttgtgta ctctaagttt tccccacat 420
 atatcacttc actaataaag acaaccttcg taagggttgc cgtagttctc tacttgaat 480
 ccaattatct agcattgtaa ccctaagtta cagacacaaa cataaacttg agcaacttct 540
 atgcataaga atctaggggt tcagactaac tcaatggaac ctaacaagaa ataatatccg 600
 gaccgctaac gatgcatcca atcgaagaca aggtttcggg cactcaacgg aacaataag 660
 ggaaaaggat ataaaccact caacgaagtt catctctaga atacgtatag tccccaatc 720
 ggattaacca agtgagaaca tacaccatct aatagcatgg tcctgcaaga tagataacta 780
 ggtaggacca ccgatggtat aatgtgacca agtaagtagt gaccctaat gtagattaac 840
 caagtggagt taaattttaga atgcatatgc accctacccc cccaagacag actaaccagg 900
 cagaaccata tgcattcccc caatagtgtg gttccttaat gcagattgac aaggcggaac 960
 cacctatgaa aataatgtaa ctaggtaggg cccgacgaat atctattgcc tgaaatctta 1020
 ggagagaatt ctgtctctag gggacaaatg attttcgtat gcctaagtat tttttattta 1080
 gtgacagtaa actaagattt gagtacagag acattaactg agattgactc ttgtgaaagc 1140
 ttagtgagtt gaagcactta ggccaattat attgagcaat gtgttaggtg tagcgtctaa 1200
 acttccgtag gagtttttta caacaagata gtgggggtgc cgcaaatgc agacagtagc 1260
 aataaattac gggctaggat tatctcccct cgtttttttg ttccattcca tcccttctc 1320
 tcacattctc tttttgtct ttcttttct aaaaaaatt aatataagat gttgatatag 1380
 cttaaccggg accgttcaaa taagagggga aggaagaaga ggaaaaaaaa aagagaggaa 1440
 ggaagaagag gaaaaaaaaa aaaaaagaga ggaagagat tttactttat aaattacaag 1500
 cagacacttt ttgtttttt tttttttga caaggagaag caaacaaca cttgaaaaag 1560
 cagcgaagc aggctaaagg tatcttatgg tggcacaaga tgtgtgtgtg aactagttac 1620
 acgattctgc cttcacattc atagaatgtg cttttgaata ttatattaca gctagagaat 1680
 ttgatgtctt aggaatgttg tcgtgcagaa atgtcagctt ttctatatat agcgtgtgtg 1740
 tatttcacaa gttagaccgg tagctaataa caactgttga aatgtttcaa acgtgtcact 1800
 gtttgcttct gtggatatca gacatgcacg tcactggcct tggaagatta attagtccga 1860
 tggtatccat agcgttaacg tcatggcaaa cacactctaa atatatatat atatataatg 1920
 gtagctaggt gtctttctgg agtatgaagt gggtagcagg caaaagataa gctaagttta 1980

gctgctagca gatacgagat g

2001

5

<210> 14
 <211> 195
 <212> ADN
 <213> *Malus domestica* niedwetzkyana

<400> 14

ctgcagaaat gttagactgg tagctattaa caagttagac tggttagact ggtagctatt 60
aacaagttag actggtagct attaacaact ggtagctatt aacaagttag actggtagct 120
attaacaagt tagactgtgt gtgtgtgtat ttcacaagtt agactggtag ctattaacaa 180
ctgttggaaat gtttt 195

10

<210> 15
 <211> 2199
 <212> ADN
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Promotor quimérico

<400> 15

gagttggtgt tgaggggggag tgttgaagat caacaccagc ccaattggtg tttgtgttga 60
agtgtaatct tgccttggcc caagatggat cgaacccatg gacaaagaaa tatccataca 120
catgctagaa aattctagca aagttcaagt tgggtgaaca gtttagaaga atggtgagga 180
gaaggcatcc acaccatctg tatcaattaa gaagactaag tgagagtgag aagtaggagt 240
agtcttgtga ggagtgtgag tggctaaag tttgtctcta gaaagagtga gtgtcatagc 300
ttcaaatagt gtctttgaga gtttgtgtgc tataatattt tgtgagttaa tacaagtaat 360
tgtttacttg tgttgtctct ccaacacttg tgttaaagtt gtgtactcta agttttcccc 420
aacatatatc acttactaa taaagacaac cttcgtaagg gttgccgtag ttctctactt 480
gaaatccaat tatctagcat tgtaacccta agttacagac acaaacataa acttgagcaa 540
cttctatgca taagaatcta gggtttcaga ctaactcaat ggaacctaac aagaaataat 600
atccggaccg ctaacgatgc atccaatcga agacaaggtt tcggacactc aacggaacaa 660
ataagggaaa aggatataaa ccaactcaacg aagttcatct ctagaatacg tatagtcccc 720
aatacggatt aaccaagtga gaacatacac catctaatag catggtcctg caagatagat 780
aactaggtag gaccaccgat ggtataatgt gaccaagtaa gtagtgacct taaatgtaga 840
ttaaccaagt ggagttaaatt ttagaatgca tatgcaccct acccccccaa gacagactaa 900
ccaggcagaa ccatatgcat tcccccaata gtgtggttcc ttaatgcaga ttgacaaggc 960
ggaaccacct atgaaaataa tgtaactagg tagggcccga cgaatatcta ttgcctgaaa 1020
tcttaggaga gaattcttgc tctaggggac aatgatttt cgtatgccta agtatttttt 1080
atntagtgac agtaactaa gatttgagta cagagacatt aactgagatt gactcttgtg 1140
aaagcttagt gagttgaagc acttaggcca attatattga gcaatgtggt aggtgtagcg 1200

20

ES 2 595 953 T3

tctaaacttc	cgtaggagtt	ttttacaaca	agatagtggg	ggtgccgcaa	aatgcagaca	1260
gtagcaataa	attacgggct	aggattatct	cccctcgttt	ttttgttcca	ttccatccct	1320
tcctctcaca	ttctctatct	tgtctttctt	tttctaataa	aaattaatat	aagatggtga	1380
tatagcttaa	ccgggaccgt	tcaaataaga	ggggaaggaa	gaagaggaaa	aaaaaaagag	1440
aggaaggaag	aagaggaaaa	aaaaaaaaaa	agagagggaa	gagattttac	tttataaatt	1500
acaagcagac	actttttggt	tttttttttt	tttgacaagg	agaagcaaac	aaacacttga	1560
aaaagcagcg	aaagcaggct	aaaggtatct	tatggtggtc	aaagatgtgt	gttgtaacta	1620
gttacacgat	tctgccttca	cattcataga	atgtgctttt	gaatattata	ttacagctag	1680
agaatttgat	gtcttaggaa	tgtgtcgtg	cagaaatgtc	agcttttctg	cagaaatggt	1740
agactggtag	ctattaacaa	gtagactggt	ttagactggt	agctattaac	aagttagact	1800
ggtagctatt	aacaactggt	agctattaac	aagttagact	ggtagctatt	aacaagttag	1860
actgtgtgtg	tgtgtatttc	acaagttaga	ctggtagcta	ttaacaactg	ttggaatggt	1920
ttatatatag	cgtgtgtgta	tttcacaagt	tagaccggtg	gctaataaca	actggtgaaa	1980
tgtttcaaac	gtgtcactgt	ttgcttctgt	ggatatcaga	catgcacgtc	actggccttg	2040
gaagattaat	tagtccgatg	gtatccatag	cgttaacgtc	atggcaaaca	cactctaaat	2100
atatatatat	atataatggt	agctaggtgt	ctttctggag	tatgaagtgg	gtagcaggca	2160
aaagataagc	taagtttagc	tgctagcaga	tacgagatg			2199

<210> 16
 <211> 244
 <212> PRT
 <213> *Pyrus communis*
 <400> 16

5

ES 2 595 953 T3

Met Glu Gly Tyr Asn Val Asn Leu Ser Val Arg Lys Gly Ala Trp Thr
1 5 10 15

Arg Glu Glu Asp Asn Leu Leu Arg Gln Cys Ile Glu Ile His Gly Glu
20 25 30

Gly Lys Trp Asn Gln Val Ser Tyr Lys Ala Gly Leu Asn Arg Cys Arg
35 40 45

Lys Ser Cys Arg Gln Arg Trp Leu Asn Tyr Leu Lys Pro Asn Ile Lys
50 55 60

Arg Gly Asp Phe Lys Glu Asp Glu Val Asp Leu Ile Leu Arg Leu His
65 70 75 80

Arg Leu Leu Gly Asn Arg Trp Ser Leu Ile Ala Arg Arg Leu Pro Gly
85 90 95

Arg Thr Ala Asn Asp Val Lys Asn Tyr Trp Tyr Thr Arg Leu Arg Ile
100 105 110

Asp Ser Arg Met Lys Thr Val Lys Asn Lys Ser Gln Glu Thr Arg Lys
115 120 125

Thr Asn Val Ile Arg Pro Gln Pro Gln Lys Phe Ile Lys Ser Ser Tyr
130 135 140

Tyr Leu Ser Ser Lys Glu Pro Ile Leu Glu His Ile Gln Ser Ala Glu
145 150 155 160

Asp Leu Ser Thr Pro Pro Gln Thr Ser Ser Ser Thr Lys Asn Gly Asn
165 170 175

Asp Trp Trp Glu Thr Leu Phe Glu Gly Glu Asp Thr Phe Glu Arg Ala
180 185 190

Ala Cys Pro Ser Ile Glu Leu Glu Glu Glu Leu Phe Thr Ser Phe Trp
195 200 205

Phe Asp Asp Arg Leu Ser Ala Arg Ser Cys Ala Asn Phe Pro Glu Glu
210 215 220

Gly Gln Ser Arg Ser Glu Phe Ser Phe Ser Met Asp Leu Trp Asn His
225 230 235 240

Ser Lys Glu Glu

<210> 17
<211> 732
<212> ADN
<213> *Pyrus communis*

5

ES 2 595 953 T3

<400> 17
atggaggggat ataacgtaa cttgagtggtg agaaaagggtg cctggactcg agaggaagac 60
aatctttctca ggcagtgcat tgagattcat ggagaggggaa agtggaaacca agtttcatac 120
aaagcaggct taaacaggtg taggaagagc tgcagacaaa gatggttaa ctatctgaag 180
ccaaatatca agagaggaga ctttaaagag gatgaagtag atcttatact tagacttcac 240
aggcttttgg gaaacaggtg gtcattgatt gctagaagac ttccaggaag aacagcgaat 300
gatgtgaaaa attattggta cactcgattg cggatcgatt ctccatgaa aacggtgaaa 360
aataaatctc aagaaacgag aaagaccaat gtgataagac ctcagcccca aaaatttadc 420
aaaagttcat attacttaag cagtaaagaa ccaattctag aacatattca atcagcagaa 480
gatttaagta cgccaccaca aacgtcgtcg tcaacaaaga acggaaatga ttggtgggag 540
accttgttcg aaggcgagga tacttttgaa agggctgcat gtcccagcat tgagttagag 600
gaagaactct tcacaagttt ttggtttgat gatcgactgt cggcaagatc atgtgccaat 660
tttctgaag aaggacaaag tagaagtga ttctccttta gcatggacct ttggaatcat 720

tcaaaagaag aa 732

5 <210> 18
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 18
 cactttccct ctccatgaat ctcaac 26

15 <210> 19
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador

25 <400> 19
 caggtttctg ttatatccct ccatctc 27

30 <210> 20
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

35 <400> 20
 accctgaaca cgtgggaacc g 21

40 <210> 21
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>

ES 2 595 953 T3

<223> cebador
 <400> 21
 5 gctaagctta gctgctagca gataagag 28
 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 22
 15 ggaggggaat gaagaagagg 20
 <210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 23
 tccacagaag caaacactga c 21
 <210> 24
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 35 <400> 24
 accctgaaca cgtgggaacc g 21
 <210> 25
 <211> 28
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 45 <400> 25
 gctaagctta gctgctagca gataagag 28
 <210> 26
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> cebador
 <400> 26
 60 ggatccttct gcacgacaac attgaca 28
 <210> 27
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65 <220>

ES 2 595 953 T3

	<223> cebador	
5	<400> 27 gagctcatgt tagctttct atatcga	29
	<210> 28 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador	
15	<400> 28 accctgaaca cgtgggaacc g	21
	<210> 29 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador	
25	<400> 29 ctcttatctg ctagcagcta agcttagc	28
	<210> 30 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador	
35	<400> 30 cagaaatggt agactggtag ctattaac	28
40	<210> 31 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> cebador	
50	<400> 31 ccagtgacgt gcatgtctga tatcc	25
	<210> 32 <211> 233 <212> PRT <213> <i>Fragaria ananassa</i>	
55	<400> 32	

ES 2 595 953 T3

Met Glu Gly Phe Gly Val Arg Lys Gly Ala Trp Thr Lys Glu Glu Asp
 1 5 10 15

Glu Leu Leu Lys Gln Phe Ile Glu Ile His Gly Glu Gly Lys Trp His
 20 25 30

His Val Pro Leu Lys Ser Gly Leu Asn Arg Cys Arg Lys Ser Cys Arg
 35 40 45

Leu Arg Trp Leu Asn Tyr Leu Lys Pro Asn Ile Lys Arg Gly Glu Phe
 50 55 60

Ala Glu Asp Glu Val Asp Leu Ile Ile Arg Leu His Lys Leu Leu Gly
 65 70 75 80

Asn Arg Trp Ser Leu Ile Ala Gly Arg Leu Pro Gly Arg Thr Ala Asn
 85 90 95

Asp Val Lys Asn Tyr Trp Asn Thr Tyr Gln Arg Lys Lys Asp Gln Lys
 100 105 110

Thr Ala Ser Tyr Ala Lys Lys Leu Lys Val Lys Pro Arg Glu Asn Thr
 115 120 125

Ile Ala Tyr Thr Ile Val Arg Pro Arg Pro Arg Thr Phe Ile Lys Arg
 130 135 140

Phe Asn Phe Thr Glu Arg Tyr Ala Asn Ile Glu His Asn His Ser Glu
 145 150 155 160

Val Ser Tyr Thr Ser Ser Leu Pro Thr Glu Pro Pro Gln Thr Leu Gln
 165 170 175

Leu Glu Asn Val Thr Asp Trp Trp Lys Asp Phe Ser Glu Asp Ser Thr
 180 185 190

Glu Ser Ile Asp Arg Thr Met Cys Ser Gly Leu Gly Leu Glu Asp His
 195 200 205

Asp Phe Phe Thr Asn Phe Trp Val Glu Asp Met Leu Leu Ser Ala Ser
 210 215 220

Asn Asp Leu Val Asn Ile Ser Tyr Val
 225 230

- 5
- <210> 33
 - <211> 702
 - <212> ADN
 - <213> *Fragaria ananassa*
 - <400> 33

ES 2 595 953 T3

```

atggaggggt tcggtgtgag aaaaggtgca tggactaaag aggaagatga gcttctgaaa    60
cagttcatcg aaatccatgg agaaggcaaa tggcatcatg ttcctctcaa atcaggctta    120
aacagatgca ggaagagctg tagactgagg tggctgaatt atttgaagcc gaatatcaag    180
agaggagagt ttgcagagga tgaagttgat ttgatcatca ggcttcataa gcttctagga    240
aacaggtggt ctttaattgc cggaagattg ccaggaagaa ctgccaatga tgtgaagaac    300
tattggaata cttatcaaag gaaaaaggat caaaagacgg cttcatacgc aaagaaactg    360
aaagttaaac cccgagaaaa tacaatagct tacacaattg taagacctcg accacgaacc    420
ttcatcaaaa ggttcaattt tacagagaga tacgcaaata tagagcataa tcattcagaa    480
gtgagttata ctagtctttt accaacagaa ccaccacaga ctctacaatt agaaaatgta    540
actgattggt ggaaagattt ctcagaagat agtacagaga gcattgatag aacaatgtgt    600
tctggtcttg gtttagagga tcatgacttc ttcacaaact tttgggttga agatatgcta    660
ctatcggcaa gcaatgatct agtcaacatc tcctacgtat ga                          702

```

<210> 34
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> *Arabidopsis thaliana*

5

<400> 34

ES 2 595 953 T3

Met Glu Gly Ser Ser Lys Gly Leu Arg Lys Gly Ala Trp Thr Thr Glu
1 5 10 15

Glu Asp Ser Leu Leu Arg Gln Cys Ile Asn Lys Tyr Gly Glu Gly Lys
20 25 30

Trp His Gln Val Pro Val Arg Ala Gly Leu Asn Arg Cys Arg Lys Ser
35 40 45

Cys Arg Leu Arg Trp Leu Asn Tyr Leu Lys Pro Ser Ile Lys Arg Gly
50 55 60

Lys Leu Ser Ser Asp Glu Val Asp Leu Leu Leu Arg Leu His Arg Leu
65 70 75 80

Leu Gly Asn Arg Trp Ser Leu Ile Ala Gly Arg Leu Pro Gly Arg Thr
85 90 95

Ala Asn Asp Val Lys Asn Tyr Trp Asn Thr His Leu Ser Lys Lys His
100 105 110

Glu Pro Cys Cys Lys Ile Lys Met Lys Lys Arg Asp Ile Thr Pro Ile
115 120 125

Pro Thr Thr Pro Ala Leu Lys Asn Asn Val Tyr Lys Pro Arg Pro Arg
130 135 140

Ser Phe Thr Val Asn Asn Asp Cys Asn His Leu Asn Ala Pro Pro Lys
145 150 155 160

Val Asp Val Asn Pro Pro Cys Leu Gly Leu Asn Ile Asn Asn Val Cys
165 170 175

Asp Asn Ser Ile Ile Tyr Asn Lys Asp Lys Lys Lys Asp Gln Leu Val
180 185 190

Asn Asn Leu Ile Asp Gly Asp Asn Met Trp Leu Glu Lys Phe Leu Glu
195 200 205

Glu Ser Gln Glu Val Asp Ile Leu Val Pro Glu Ala Thr Thr Thr Glu
210 215 220

Lys Gly Asp Thr Leu Ala Phe Asp Val Asp Gln Leu Trp Ser Leu Phe
225 230 235 240

Asp Gly Glu Thr Val Lys Phe Asp
245

<210> 35
<211> 747
<212> ADN
<213> *Arabidopsis thaliana*

5

<400> 35

ES 2 595 953 T3

```

atggaggggtt cgtccaaagg gctgcgaaaa ggtgcttggg ctactgaaga agatagtctc      60
ttgagacagt gcattaataa gtatggagaa ggcaaatggc accaagttcc tgtaagagct      120
gggctaaacc ggtgcaggaa aagttgtaga ttaagatggt tgaactatit gaagccaagt      180
atcaagagag gaaaacttag ctctgatgaa gtcgatcttc ttcttcgctt tcataggctt      240
ctaggggaata ggtggtcttt aattgctgga agattacctg gtcggaccgc aaatgacgct      300
aagaattact ggaacactca tctgagtaag aaacatgaac cgtggtgtaa gataaagatg      360
aaaaagagag acattacgcc cattcctaca acaccggcac taaaaaaca tgtttataag      420
cctcgacctc gatccttcac agttaacaac gactgcaacc atctcaatgc cccaccaaaa      480
gttgacgtta atcctccatg ccttggactt aacatcaata atgtttgtga caatagtatc      540
atatacaaca aagataagaa gaaagaccaa ctagtgaata atttgattga tggagataat      600
atgtgggttag agaaattcct agaggaaagc caagaggtag atattttggt tcctgaagcg      660
acgacaacag aaaaggggga caccttggct tttgacgttg atcaactttg gagtcttttc      720
gatggagaga ctgtgaaatt tgattag                                     747

```

<210> 36
 <211> 1023
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

5

```

<400> 36
atgcttttct tagaaaatga taataaacgg gcgttttata tataagtgtt tctttttctc      60
ttctgtccag aagtaaatca ttaagaacca atatggcttt tcttaacta atctccgtga      120
taatcaaadc tttgatcatt ctccacacaa tcccatcaac aacatcgatc tcaactagatg      180
caccaacaat gattctaate ggcactacta actatagaga tagttgtccc aaaaaaaaaa      240
aaaaaaaaacta actagagaga taaatcatat tcaatacatg tactatttct actatactta      300
agaaaatttg tataccacta tcttaactct taacactgaa catactatac actatcttaa      360
ctcccaactc ttgtaaaaga atatctaatt ttaagaaaag acttcaaagc cttgttaaat      420
ttctagttaa gatgcacatt ctaaaaactg gtaaaatggt aagaaaaaaaa tatataaaaa      480
aatagcctta ttaaaattta tatctcctat ttctctatcc aaactacacg gatgaagctt      540
attgttattc atccaccctt tttctcaatt ctgtcctatt tcttgtgcat gaaacttctc      600
catcttgtaa tcggataaat catacccaaa ttttttcttt ctgaaaacat atatacccga      660
acattaatta ctatcgtcct ttctcctaatt tttgttaaga aacatgtttg tttgttttta      720
gtactgaaaa aggatggaga tacttgctag atcctatgaa ccttttctct ctaggacaaa      780
tcagtaacca aacaataact tagcaaatga agcacgacag ctaatacata aaatgtggat      840
atcaaacatg cacgtcactt ccttttttcc gtcacgtggt ttataaatt ttctcacata      900

ctcacactct ctataagacc tccaatcatt tgtgaaacca tactatatac accctcttcc      960
ttgaccaatt tacttatacc ttttacaatt tgtttatata ttttacgtat ctatctttgt      1020
tcc                                                                 1023

```

<210> 37
 <211> 1227

10

ES 2 595 953 T3

<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> Promotor quimérico

<400> 37

```

atgcttttct tagaaaatga taataaacg gcgttttata aataagtgtt tctttttctc      60
ttctgtccag aagtaaatca ttaagaacca atgtggcttt tcttaaacta atctccgtga     120
taatcaaate tttgatcatt ctccacacaa tccatccac aacatcgatc tcactagatg     180
caccaacaat gattctaate ggcactacta actatagaga tagttgtccc aaaaaaaaaa     240
aaaaaaaaacta actagagaga taaatcatat tcaatacatg tactatttct actatactta     300
agaaaatttg tataccacta tcttaactct taacactgaa catactatac actatcttaa     360
ctcccaactc ttgtaaaaga atatctaatt ttaagaaaag acttcaaag cttgttaaat     420
ttctagttaa gatgcacatt ctaaaaactg gtaaaatggt aagaaaaaaaa tatataaaaa     480
aatagcctta ttaaaattta tatctcctat ttctctatcc aaactacacg gatgaagctt     540
gtgcagaaat gtttagactgg tagctattaa caagttagac tggtttagact ggtagctatt     600
aacaagttag actggttagct attaacaact ggtagctatt aacaagttag actggttagct     660
attaacaagt tagactgtgt gtgtgtgtgt atttcacaag ttagactggt agctattaac     720
aactgttggg atgttttagc ttattgttat tcatccacc tttttctcaa ttctgtccta     780
ttcttgtgac atgaaacttc tccatcttgt aatcggataa atcataccca aattttttct     840
ttctgaaaac atatataccc gaacattaat tactatcgtc ctttctccta attttgtaa     900
gaaacatggt tgttggtttt tagtactgaa aaaggatgga gatacttgct agatcctatg     960
aaccttttct ctctaggaca aatcagtaac caaacaataa cttagcaaat taagcacgac    1020
agctaataca taaaatgtgg atatcaaaca tgcacgtcac ttctttttt ccgtcacgtg    1080
tttttataaa ttttctcaca tactcacact ctctataaga cctccaatca ttgtgccgaa    1140
accatactat atatacctc ttcttgacc aatttactta taccttttac aatttgttta    1200
tatattttac gtatctatct ttgttcc                                     1227

```

10 <210> 38
<211> 2130
<212> ADN
<213> *Actinidia eriantha*

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (556)..(556)
<223> n es a, c, g o t

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (1261)..(1261)
<223> n es a, c, g o t

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (1750)..(1750)
<223> n es a, c, g o t

ES 2 595 953 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1754)..(1755)
 <223> n e s a, c, g o t

5

<400> 38

```

atcccaaat atttgttcac ttagaaaatt aactgataaa ataatgcaa ctctccttt 60
tgttctctc ttttgaattg acgtgacaca tttatctttt taattttaga taatttcgaa 120
ttattgaaaa aaaattaaac tgttttccaa ataataattt tttagaaata atgcaaataa 180
tagtttttta aactattttc caaatatttt ttttcaaaaa taatgcatta ttaagaataa 240
tattaaaaaa tatcttcaaa tattaaaaaa tatatttttg ataaaattta ataatatata 300
aaaataaatg aatgtttttg tttgcataaa caatttctaa taaaatattt tgcgaaaatg 360
tttttgtttg cataaacaat ttctaataaa atattttgcg aaaatgtttt tgttcgcata 420
aacaatttct gataaaatft tttgcaaac taaacctaac acaaatgggt agcatttttg 480
cttctttaa atcttggatt ccctaatta gacaaataaa ttgggacgga tcaacattta 540
ttttcttctt aattwntttc tctaactact caacaaaata attaaataga taagaaaaga 600
gaaaaaggaa cttgagaacc caccacactt ttaaacattg cagttgggtc cttccgtacg 660
ttgcagtggg cctccacaac gtccacatga accacatggg cgtgggtaat acaacgcacc 720
ccactctctc tctctctctc tctctctcga taattgtctc cattcgcagt aaaattacca 780
aggccactcg tcccacagtg cacaccacgg ccgatccaca gccacactca ccaatcacct 840
ctctctctct ctctctctct agaatttatt tgttgctctt ggagcaacac gtcacttttt 900
gacacgtggg ggtcggatcc aatcatctca cgccatccaa gcaactcagtt tcatgtgttt 960
gccacgtcac cacaacaatt ccaccacaaa ccaggtaaa cacaagacta acagaacctc 1020
actccgttaa tgccatcttc ctgtcgtga ctgcgatgaa ataccaccac ttttggaaac 1080
caaacgccag aaaagattac tctcaccaat attctctatg aacaagaaa ttgggttatt 1140
atattattat tacaagaaat aaatggcacc aaccaaattt aaaaagacgt ctctgcagcg 1200
attttcacct cattttattt tttgagcttt taggtgtctc gtccgaaacc gacgccttct 1260
ntattatgca atttttcact cttctttgcc ttctcagtcg cgaaatgact attttcaggg 1320
aacatcatag ggtgattggg ttgtttagct atgtaggtac gaaatctaaa aatttgaatt 1380
tgtaaagttt atgaatattt catcgcacg agtactggcg gaatgttcac ggggttaaca 1440
ggatttgaac tccgttattt ctttcttgag taaacggacg tggctgaata cacggacaac 1500
    
```

ES 2 595 953 T3

caattaaatg gtgtatgata tttcgtgtgg agcaccacgc gtagaaagtg aggtgttgcg 1560
tcaagagcat caaataatth ctcctctctc tctctccctc ttctctatct atatatcccc 1620
caatctggcc tctcctcacc tcacccccaa agtctacaca gaatcaacce ttcattctccc 1680
gcataggcct cccaaaccca cctcttctcc acaatccaga cacacctcga gtggccggag 1740
tttagagagn agannagag agagattttc tgcttcgatc ggggggtaaa acccggtggt 1800
tgacaagttg tagacatcac ggctataatc ggagtttctc ggccgctcat acatgtccgg 1860
tctgtacgac gcaagggttg tgtagtcgag agcaaccctt cgccgcacgg cggacgtggc 1920
gccttgccgt ccgaaggcgg tagccctctc gacctctctt tcctcgccgg cggcggtcac 1980
ttcgctttct ccgtctacta gcttattagg tttattctta cttagttagt aattcgctct 2040
attatagttc gtaagttcat caaagatctg ttacttgatt cgtctttcgt tgctcgagtc 2100
ttgggtgttt ttgcgttttc tgagttcgag 2130

5 <210> 39
<211> 2320
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Promotor quimérico

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (556)..(556)
<223> n es a, c, g o t

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (1261)..(1261)
<223> n es a, c, g o t

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (1937)..(1937)
<223> n es a, c, g o t

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (1941)..(1942)
<223> n es a, c, g o t

<400> 39
atcccaaat atttgttcac tttagaaaatt aactgataaa ataatgcaa ctctcctttt 60
tgttctctc ttttgaattg acgtgacaca tttatctttt taattttaga taatttcgaa 120
ttattgaaaa aaaattaaac tgttttccaa ataataatth ttttagaata atgcaaataa 180
tagtttttta aactattttc caaatattth ttttcaaaaa taatgcatta ttaagaataa 240
tattaaaaaa tatcttcaaa tattaaaaaa tatatttttg ataaaattta ataatatata 300
aaaataaatg aatgtttttg tttgcataaa caatttctaa taaaatattt tgcgaaaatg 360
tttttgtttg cataaacaat ttctaataaa atattttgcg aaaatgtttt tgttcgcata 420

ES 2 595 953 T3

aacaatttct gataaaattt ttgcaaaac taaacctaac acaaatgggt agcatttttg 480
cttctttaaa atcttgatt ccctaaatta gacaaataa ttgggacgga tcaacattta 540
ttttcttctt aattwnttc tctaacta caacaaaata attaataga taagaaaaga 600
gaaaaaggaa cttgagaacc cacccaactt taaacattg cagttgggtc cttccgtacg 660
ttgcagtggg cctccacaac gtccacatga accacatggg cgtgggtaat acaacgcacc 720
ccactctctc tctctctctc tctctctcga taattgtctc cattcgcagt aaaattacca 780
aggccactcg tcccacagtg cacaccacgg ccgatccaca gccacactca ccaatcacct 840
ctctctctct ctctctctct agaatttatt tgttgctctt ggagcaacac gtcacttttt 900
gacacgtggg ggtcggatcc aatcatctca cgccatcca gcactcagtt tcatgtgttt 960
gccacgtcac cacaacaatt ccaccacaaa cccaggtaaa cacaagacta acagaacctc 1020
actccgtaa tgccatctc ctgctcgtga ctgcgatgaa ataccaccac ttttgaaac 1080
caaacgccag aaaagattac tctaccaat attctctatg aacaaagaaa ttgggttatt 1140
atattattatt tacaagaaat aaatggcacc aaccaaattt aaaaagacgt ctctgcagcg 1200
attttcacct cattttattt tttgagcttt taggtgtctc gtccgaaacc gacgccttct 1260
ntattatgca attttctact cttctttgcc ttctcagtcg cgaaatgact attttcaggc 1320
aacatcatag ggtgattggg ttgtttagct atgtaggtag gaaatctaaa aatttgaatt 1380
tgtaaagttt atgaatattt catcgcacg agtactggcg gaatgttcac ggggtaatgt 1440
tagactggta gctattaaca agttagactg gttagactgg tagatattaa caagttagac 1500
tggtagctat taacaactgg tagctattaa caagttagac tggtagctat taacaagtta 1560
gactgtgtgt gtgtgtattt cacaagttag actggtagct attaacaact gttggaatgt 1620
tttaacagga ttgaaactcc gttatttctt tcttgagtaa acggacgtgg ctgaatacac 1680
ggacaaccaa ttaaattggtg tatgatattt cgtgtggagc accacgcgta gaaagtgagg 1740
tgttgcgtca agagcatcaa ataatttctc ctctctctct ctccctctc tctatctata 1800
tatcccccaa tctggcctct cctcacctca ccccaaagt ctacacagaa tcaacccttc 1860
atctcccgca taggcctccc aaaccacct cttctccaca atccagacac acctcgagtg 1920
gccggagttt agagagnaga nngagagaga gattttctgc ttcgatcggg gggtaaaacc 1980
cgggtgtttga caagttgtag acatcacggc tataatcgga gtttctcggc cgctcataca 2040
tgtccggtct gtacgacgca agggttgtgt agtcgagagc aacccttcgc cgcacggcgg 2100
acgtggcgcc ttgccgtccg aaggcggtag cccctccgac ctctcttcc tcgccggcgg 2160
cggtcacttc gctttctccg tctactagct tattaggttt attcttactt agtgagtaat 2220
tcgtcctatt atagttcgta agttcatcaa agatctgtta cttgattcgt ctttcgttgc 2280
tcgagtcttg gtgttttttg cgttttctga gttcgagatg 2320

<210> 40
<211> 2510
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Promotor quimérico

ES 2 595 953 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (556)..(556)
 <223> n es a, c, g o t
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1261)..(1261)
 <223> n es a, c, g o t
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2130)..(2130)
 <223> n es a, c, g o t
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2134)..(2135)
 <223> n es a, c, g o t
 20
 <400> 40
 atcccaaat atttgttcac ttagaaaatt aactgataaa ataatgcaa ctctcctttt 60
 tgttctctc ttttgaattg acgtgacaca tttatctttt taattttaga taatttcgaa 120
 ttattgaaaa aaaattaaac tgttttccaa ataataattt tttagaaata atgcaaataa 180
 tagtttttta aactattttc caaatatttt ttttcaaaaa taatgcatta ttaagaataa 240
 tattaaaaaa tatcttcaaa tattaaaaaa tatatttttg ataaaattta ataatatata 300
 aaaataaatg aatgtttttg tttgcataaa caatttctaa taaaatattt tgcgaaaatg 360
 tttttgtttg cataaacaat ttctaataaa atattttgcg aaaatgtttt tgttcgcata 420
 aacaatttct gataaaaattt tttgcaaac taaacctaac acaaatgggt agcattttttg 480
 ctctcttaaa atcttggatt ccctaaatta gacaaataaa ttgggacgga tcaacattta 540
 ttttcttctt aattwntttc tctaactact caacaaaata attaaataga taagaaaaga 600
 gaaaaaggaa cttgagaacc cacccaactt ttaaacattg cagttgggtc cttccgtacg 660
 ttgcagtggg cctccacaac gtccacatga accacatggg cgtggttaat acaacgcacc 720
 ccactctctc tctctctctc tctctctcga taattgtctc cattcgcagt aaaattacca 780
 aggccactcg tcccacagtg cacaccacgg ccgatccaca gccacactca ccaatcacct 840
 ctctctctct ctctctctct agaatttatt tgttgctctt ggagcaacac gtcacttttt 900
 gacacgtggg ggtcggatcc aatcatctca cgccatccaa gcactcagtt tcatgtgttt 960
 gccacgtcac cacaacaatt ccaccacaaa cccaggtaaa cacaagacta acagaacctc 1020
 actccgttaa tgccatcttc ctgtcgtga ctgcgatgaa ataccaccac ttttggaac 1080
 caaacgccag aaaagattac tctcaccaat attctctatg aacaaagaaa ttgggttatt 1140
 atttattatt tacaagaaat aaatggcacc aaccaaattt aaaaagacgt ctctgcagcg 1200
 attttcacct cattttattt tttgagcttt taggtgtctc gtccgaaacc gacgccttct 1260

ES 2 595 953 T3

ntattatgca atttttcact cttctttgcc ttctcagtc cgaatgact attttcaggc 1320
 aacatcatag ggtgattggg ttgttttagct atgtaggtac gaaatctaaa aatttgaatt 1380
 tgtaaagttt atgaatattt catcgcatcg agtactggcg gaatgttcac ggggttaatg 1440
 ttagactggg agctattaac aagtttagact ggtagactg gtagatatta acaagttaga 1500
 ctggtagcta ttaacaactg gtagctatta acaagttaga ctggtagcta ttaacaagtt 1560
 agactgtgtg tgtgtgtatt tcacaagtta gactggtagc tattaacaac tgttggaaatg 1620
 ttttgcagaa atgttagact ggtagctatt aacaagttag actggttaga ctggtagcta 1680
 ttaacaagtt agactggtag ctattaacaa ctggtagcta ttaacaagtt agactggtag 1740
 ctattaacaa gttagactgt gtgtgtgtgt atttcacaag ttagactggg agctattaac 1800
 aactgttggg atgttttaca ggatttgaac tccgttattt ctttcttgag taaacggacg 1860
 tggctgaata cacggacaac caattaaatg gtgtatgata tttcgtgtgg agcaccacgc 1920
 gtagaaagtg aggtgttgcg tcaagagcat caaataattt ctcctctctc tctctccctc 1980
 ttctctatct atatatcccc caatctggcc tctctcacc tcaccccaa agtctacaca 2040
 gaatcaacc ttcatctccc gcataggcct ccāaaacca cctcttctcc acaatccaga 2100
 cacacctcga gtggccggag tttagagagn agannagag agagatttct tgcttcgac 2160
 ggggggtaaa acccgggtgt tgacaagttg tagacatcac ggctataatc ggagtttctc 2220
 ggccgctcat acatgtccgg tctgtacgac gcaaggggtg tgtagtcgag agcaaccctt 2280
 cgccgcacgg cggacgtggc gccttgccgt ccgaaggcgg tagccctctc gacctctct 2340
 tcctcgccgg cggcggtcac ttcgctttct ccgtctacta gcttattagg tttattctta 2400
 cttagtgagt aattcgtcct attatagttc gtaagttcat caaagatctg ttacttgatt 2460
 cgtctttcgt tgctcgagtc ttgggtgttt ttgcgttttc tgagttcgag 2510

5 <210> 41
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> motivo consenso

 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n es a, c, g o t

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> n es a, c, g o t

 <400> 41
 gttagacngg tagctantaa caa 23

 25 <210> 42
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 595 953 T3

<220>
<223> motivo consenso

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> donde n = c o t

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> donde y = a o t

15 <400> 42
gttagacngg tagctaytaa caa 23

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la producción de un polinucleótido promotor quimérico capaz de controlar la transcripción de un polinucleótido unido operativamente en una célula vegetal o en una planta, en el que el método comprende la combinación de:
- a) al menos un motivo de secuencia de un promotor natural, motivo que comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, 11 o 12, y
 - b) un promotor natural diferente,
- 10 en el que el promotor quimérico esta modulado por un factor de transcripción MYB, y en el que el promotor quimérico no se encuentra de forma natural en las plantas en su totalidad.
- 15 2. El método de la reivindicación 1 en el que el al menos un motivo de secuencia de a) comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en:
- i) una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1,
 - ii) la secuencia de la SEQ ID NO: 41,
 - iii) la secuencia de la SEQ ID NO: 42,
 - iv) la secuencia de la SEQ ID NO: 1,
 - v) la secuencia de la SEQ ID NO: 11, y
 - vi) la secuencia de la SEQ ID NO: 12.
- 20
- 25 3. Un polinucleótido promotor quimérico capaz de controlar la transcripción de un polinucleótido unido operativamente en una célula vegetal o en una planta, en el que el polinucleótido promotor quimérico comprende:
- a) al menos un motivo de secuencia de un promotor natural, motivo que comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, 11 o 12; y
 - b) un promotor natural diferente,
- 30 en el que el promotor quimérico está modulado por un factor de transcripción MYB, y en el que el promotor quimérico no se encuentra de forma natural en las plantas en su totalidad.
- 35 4. El polinucleótido promotor quimérico de la reivindicación 3 en el que el al menos un motivo de secuencia de
- a) comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en:
- i) una secuencia con al menos un 70 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1,
 - ii) la secuencia de la SEQ ID NO: 41,
 - iii) la secuencia de la SEQ ID NO: 42,
 - iv) secuencia de la SEQ ID NO: 1,
 - v) la secuencia de la SEQ ID NO: 11, y
 - vi) la secuencia de la SEQ ID NO: 12.
- 40
- 45 5. El polinucleótido promotor quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4, en el que el polinucleótido promotor quimérico está modulado positivamente, o activado, o regulado por aumento por el factor de transcripción MYB.
- 50 6. El polinucleótido promotor quimérico de la reivindicación 5, en que el polinucleótido promotor quimérico es capaz de controlar la transcripción de una secuencia de polinucleótidos unida operativamente en cualquier planta, célula vegetal o tejido vegetal en el que se exprese el factor de transcripción MYB.
- 55 7. Una construcción genética que comprende un polinucleótido promotor quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6.
- 60 8. Una célula hospedadora, una célula vegetal o una planta transformada con el polinucleótido promotor quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 o la construcción genética de la reivindicación 7.
- 65 9. La célula hospedadora, célula vegetal o planta de la reivindicación 8 que:
- i) también está transformada con un polinucleótido o una construcción genética para que exprese un factor de transcripción MYB que modula la expresión del polinucleótido promotor quimérico, o
 - ii) que expresa de forma natural un factor de transcripción MYB que modula la expresión del polinucleótido promotor quimérico.

10. Un método para la producción de una célula vegetal o de una planta con la expresión modificada de al menos un polinucleótido, comprendiendo el método la transformación de la célula vegetal o de la planta con un polinucleótido promotor quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, o con una construcción genética de la reivindicación 7.

5 11. El método de la reivindicación 10, en el que la célula vegetal o la planta también está transformada con un polinucleótido o una construcción genética capaz de expresar un factor de transcripción MYB que modula la expresión del polinucleótido promotor quimérico, o que expresa de forma natural un factor de transcripción MYB que modula la expresión del polinucleótido promotor quimérico.

10 12. Una semilla, un propágulo, una descendencia, una parte, una fruta o un material recogido de una planta seleccionado entre el grupo que consiste en:

- 15 i) una planta de la reivindicación 8,
ii) una planta de la reivindicación 9, y
iii) una planta producida mediante el método de la reivindicación 10 u 11,

20 en los que la semilla, el propágulo, la descendencia, la parte, la fruta o el material recogido comprende un polinucleótido promotor quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6.

Figura 1

```

1   TACCTGAAC AGGTGGAAAC CGGCCCGTTT GTAACAGACT GAGATAGGTC CGGTTCTAVT TCTTAAAAAC CCAACACCCG CTAGCTTCCA TTTATAAACG
101  ATGGGACTTG TCCACCCTTG GCGGGCCAAA CATTGCTCGA CTCATCCAG GCGAAGATA AGAATTTTGG GGTGCTGGCC GATGCARAGT AATATTTTGC
    GGTGGGCTG GTCCCTCCAA CTTTGGAGCC GGTGCGACTT GTGCCACTC CTAACTAAA CATAATANA ACCAAGATTT CCCTTTCATC TTTACACAT
    CCGCCAGAC CAGGGAGGTT GAACTCGGG CCGAGCTGAA CACGGGTGAG GATTTGATTT GGTATATTTT TGGTTTANA GGGAAAGTAG AAGGTGTGTA
201  ATCAGGTTAC TTTCCACAA CAATCAACA ATCAACAAC ATAACTAAC ATCAAGATCA TATATACGT CACTAATAAA GACAACCTTC ATAAGGGTTG
    ATGCGCAATG ARAAGTGTGT GTTAAGTGTG TATTAATGAG TATATGAGT ATATAGTGA GTGATATTTT CTGTGGAG ATATCCCNAC
301  CCGTAGTCT CTACTTGAHA TCCAAITGTC TAGCAITGTA ACCTAAGTT ACAGACAA CTAAACTTCT GAGCAACTTC TATGCGAAG AATCTAGGGT
    GGCATCAAGA CTCAACTTT AGGTTAACAG ATCTAACAT TGGATTCGA TGTCTGTGTT TGTATTTGAA CTCGTTGAG ATAGCTATTC TTAACATCCA
401  TTTGACTAA CTCAACAA CCTAACAA AATAATATC TGGACCGTT AAGGAAATCC AAGAACAA AGSITTCGGA CCACTCAACG GAACAATA
    AAACCTGATT GAGTTGCTT GATTTTCT TTAATPAA ACCTGGGA TTGCTCTGAG TTGCTCTGAG TCCAAAGCCT GGTGAGTTC CTGTGTTAT
501  GGGAAAGGA TATAACCAT TCACGMAAT CCATCTTTAG ATACGCATA GTCCCCCAAT ACGGATTAAC CAAGTAGMA CATAGGCCAT CTGATAGCGT
    CCCTTTCCCT ATATTTGGTA AGTTCGTTA GGTAGAAATC TTATCGTAT TGCCTAATG TGCTACTT GTATCGGTA GACTATGCA
601  GGTCCGCA GACAGTTAAC CAAGTAGAC CACCGATGT ATATGTGAC GTACCCCTNA ATGTAGATA ACCAGTGA GTTAATTA
    CCAAGGGGTT GTGCAATG GTTCATCTG GTGGCTACA TATPACTG CTGCTGCTT CACTGGGAT TACATCTAAT TGGTGCACCT CAATTTAAT
    EcoRI
701  CARGCTGA CCACCTATGA AATAATGTA AGCCTGAAT CTTAGGAG AGTCTTGTCT CTAGGGACA AATGATTTTC GTATGCCATA GTGTTTTTTT
    GTTCGGACTT GGTGGTACT TTATTAGT TCGGACTTTA GATCCTCTC TTAGAACGA GATCCCTGT TTACTAAMAG CATAGGATT CACAAAAAAA
    HindIII
801  AGTCAGTA AACTAAGATT TGAGTACAGA GACATTAAT GAGATTGACT CTTGTGAAG CTTAGTCAGT TCAAGCAGCT AGCCAAATAT ATTGAGCAAT
    TCAGTGCAT TTGATCTAA ACTCATGCT CTGTAATGA GAACTATTC GAACTATTC GAACTATTC GAACTATTC GAACTATTC GAACTATTC
901  GTGTAGGTG TAGGCTTAA ACTTCCGTA GAGTTTGTG GAGCAATA GAGGAGGAGT GCGAAATGC AGACAGTAGC AATAAATAC GGGCTAGAT
    CAAATCCAC ATCCGATC TGAAGGCATC CTCAAACAT GTGCTATAT CACCCACAG GGTGCTACG TTAATTAATG CCGATGCTA
1001  TTTCTCCTC TTTTCTTTCG TTTCAATCCA TCCATCTC TCACATCTT TATTTTGTCT TTTCTTCTI ATABAAAT TATATAGAT GTTATGTA
    AAGAGAGA AAAAAAAGC AAGTAAAGT AGTAAAGAG ATAAACAGA AAGAAAGA TATTTTTTAA TTAATCTA CAATTCAT
1101  CTTAGCCGT ACTATCANA TAGGAGGA ATGAAAGA GGGAAAAA ATCTACTC CGTAAATAC AAGCAACAC TTTTTTTT
    GAACTGGCAC TGATAAGTT ATCCTCCCTT TACTTCTCT CCGTTTTTTT CTCTCTCTC TTAGATGAG GCAITTAATG TTGTTTTGTG AAAAAAAA
    SpeI
1201  TTTGACAAG CAGAAGAAA CAACACTTG AAAAAAGC GAAGCATGA TAAAGTATC TTATGGTGT CAAAGATGTG TGTTGTAAT AGTTACACAG
    AAACCTGTC GTCTTGGTT GTTGTGAAC TTTTTCGTG CTTTCTACT ATTTCCATAG AATACACCA GTTCTACAC ACAACATTA TCAATGTGT
    SacII
1301  TTCTGCATC ACATTCATAG AATGTGTTT TGAATATAT ATTACAGCTA GAAATTTTA TCCCTGGGA TTGATTTCCC TACCGGGTG TCAATGTTG
    AAGAGTAAG TGTAAATATC TTACAGAAA ACTTATAATA TAATGTCCAT CTCTTAAAT ACGGCACCT AACTAAMAGG ATGGGGCAC AGTTACAACA
    Repetición 4
1401  CGTGCAGAA TGTAGACTG GTAGCTATA ACAAGTAGA CTGGTAGC TGGTAGCTAT TACAGTGA GACTGGTAGC TATTAACAAC TGGTAGCTAT
    GCAGCTTTT ACAATCTGAC CATCGATAA TGTCAATCT GACCAATCTG ACCATCGATA ATTGTCAAT CTGACCAATCG AATAATGTTG ACCATCGATA
    Repeat 3B
-----
    Repetición 2          Microsat          Repetición 1
1501  TAAAGTGA GACTGGTAGC TATTAACAAG TTAGCTGTG TGTGTGTG TATTTCACAA GTTAGACTGG TAGCTATTA CAATGTGTG AATGTTTTAA
    ATTGTCAAT CTGACCATCG ATATTTGTTT MATCTGAC ACACACAC ATAAAGTGTI CAATCTGACC ATCGATAAT GTTGCAACC TTAGCAAAIT
1601  ACTGTCACT GTTCTCTCT GTGGATATCA GACTGCACG TCAGTGGCT TGTAGATA ATTAGGCGA TGGTATCAT AGCTTAAAC TCAITGGCAA
    TGAACAGTCA CAAGCAAGA CACCTATAGT GTTACGTGCT AGTGACCGA ACAITCTAAT TAATCCGGCT ACCAPAGGA TCGCAATTC AGTACCGTTT
    HindIII
1701  CACACTCTAA TTATATATA TGGTAGCTAG GTGCTTTCT GGAGTCTATC AAGTGGGTAG CAGGCAAG ATAGCTAAG CTTAGCTGCT ACCAGATAAG
    AGTGTGAGATT AATATATAT ACCATCGATC CACAGAAA CCTCAGATAC TTCACCATC GTCCGTTTTT TATTCGATTC GAATCGACGA TCGTCTATTC
1801  AG
    TC

```

Figura 2

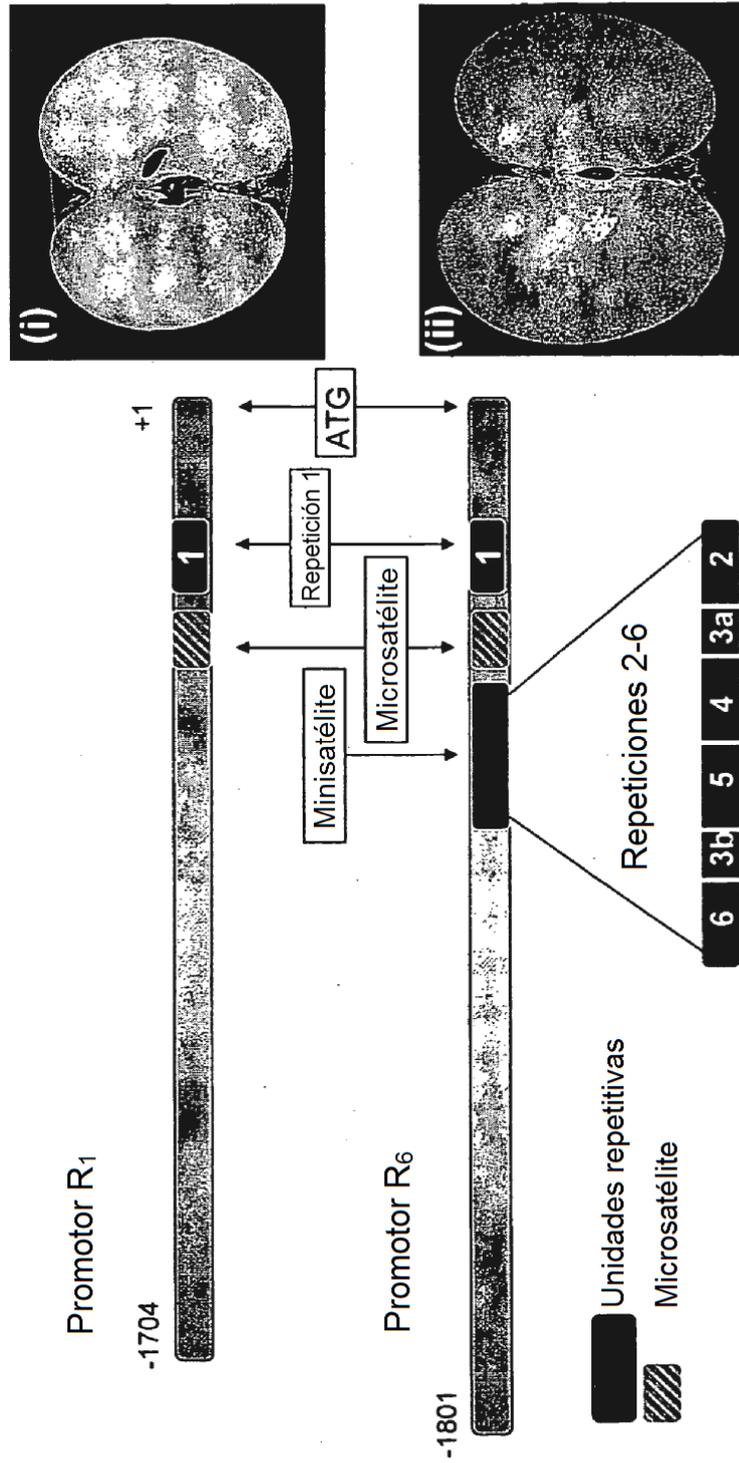


Figura 3

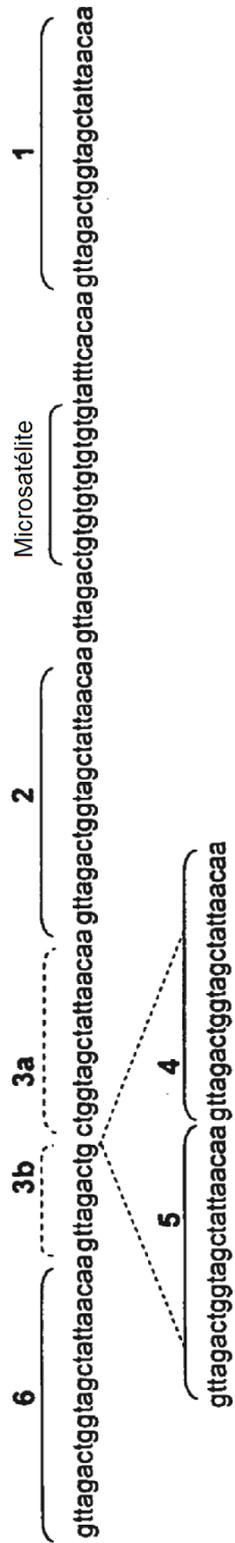


Figura 4

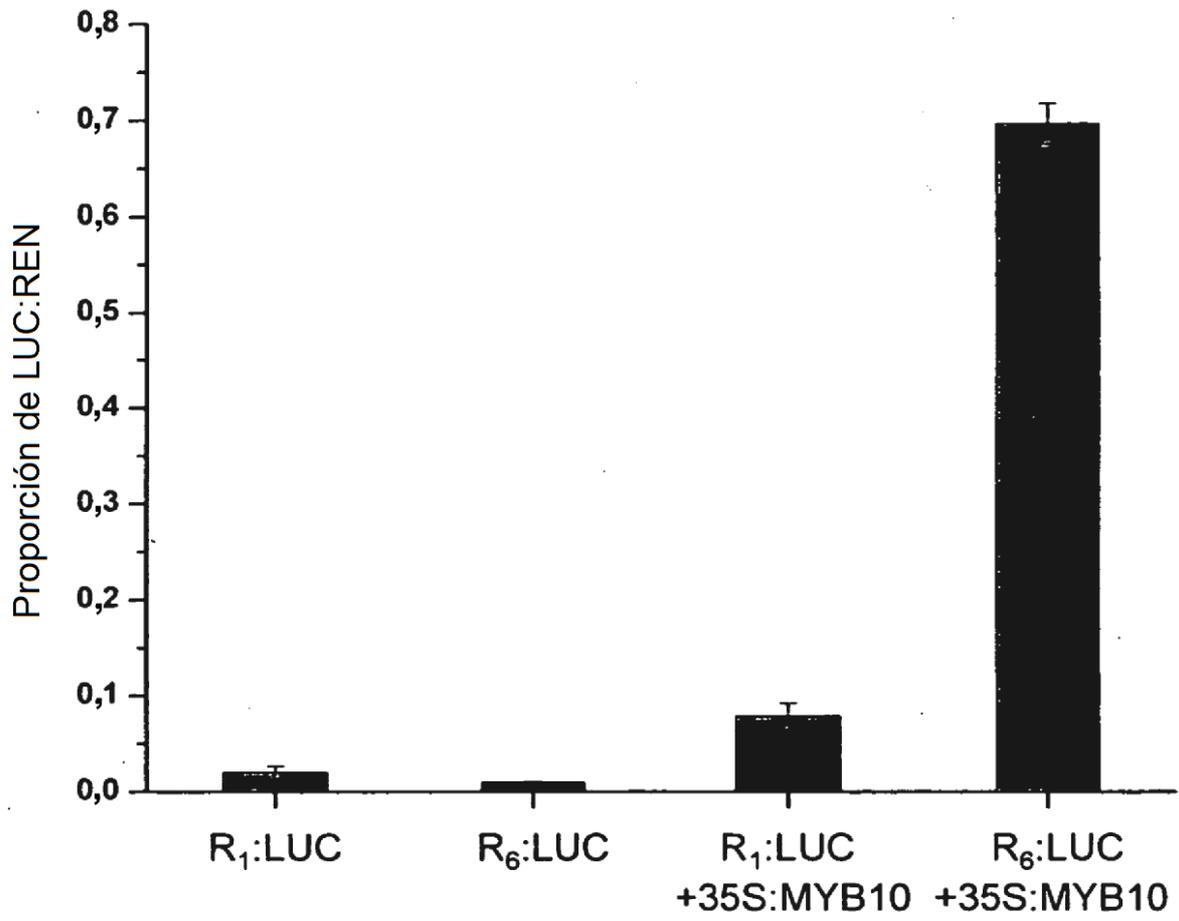


Figura 5

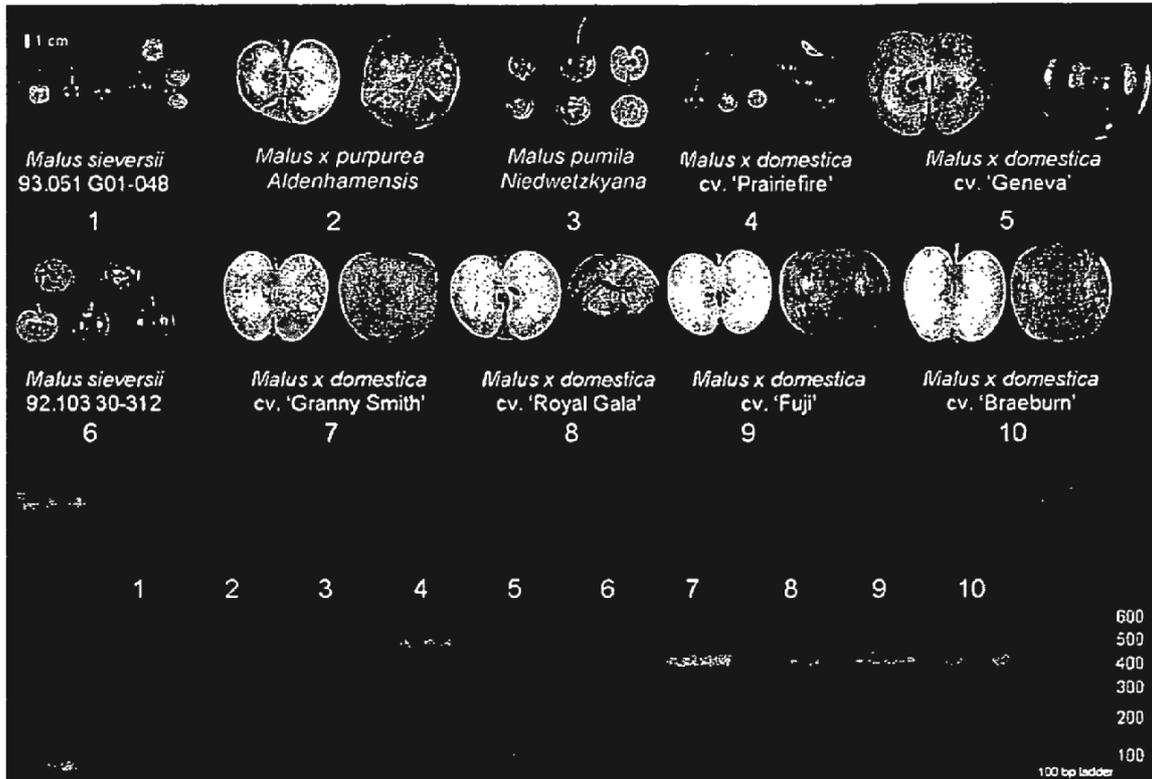
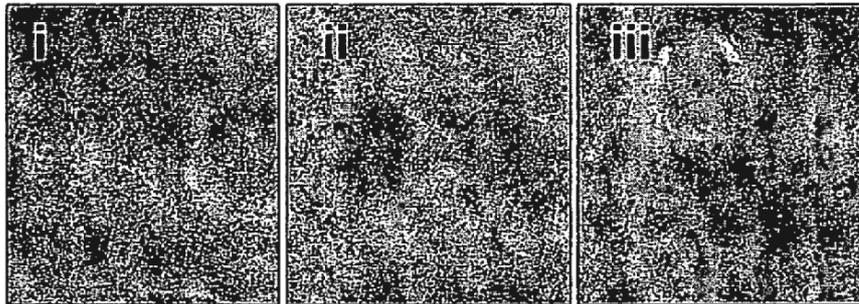


Figura 6

(a)



(b)



Figura 7

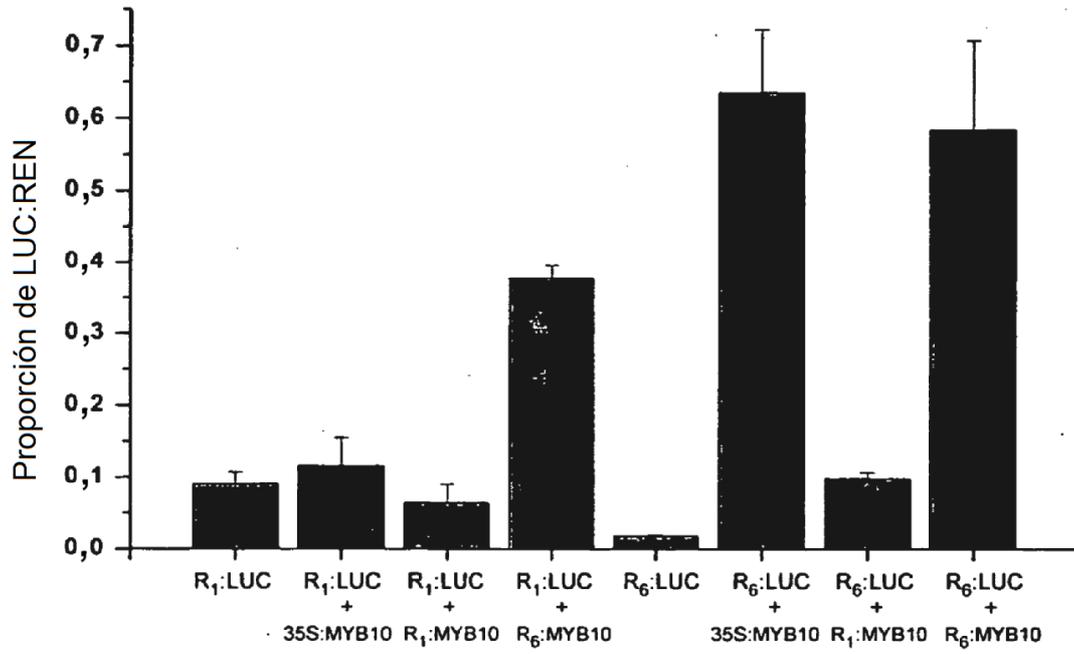


Figura 8

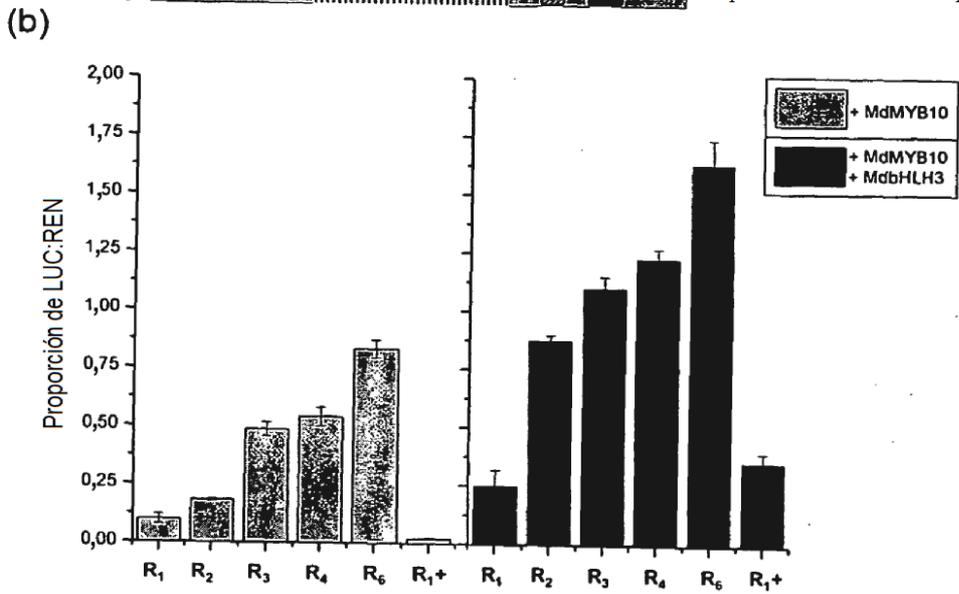
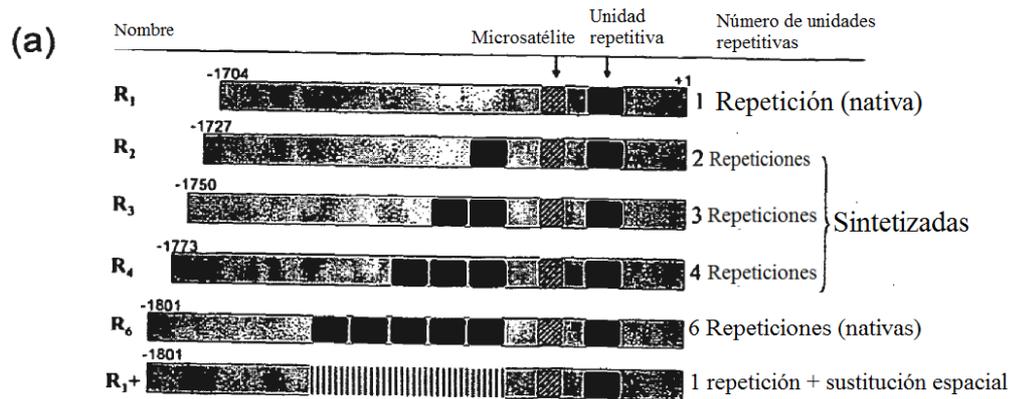


Figura 9a

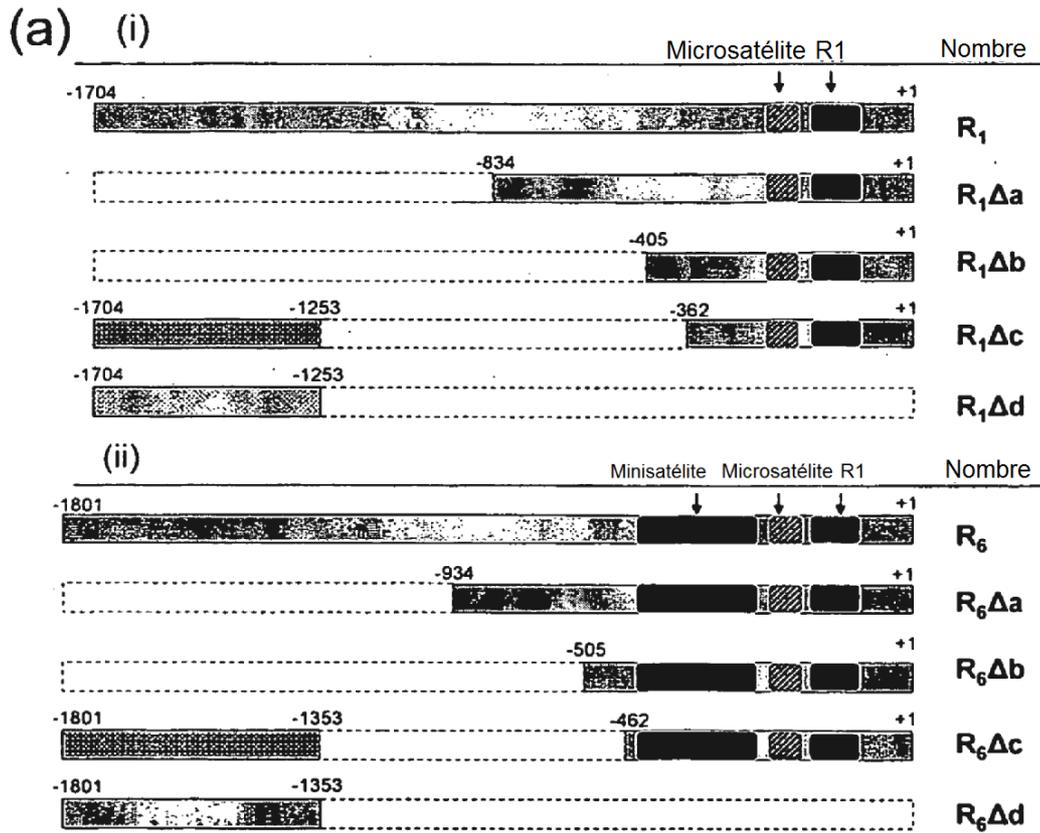


Figura 9b

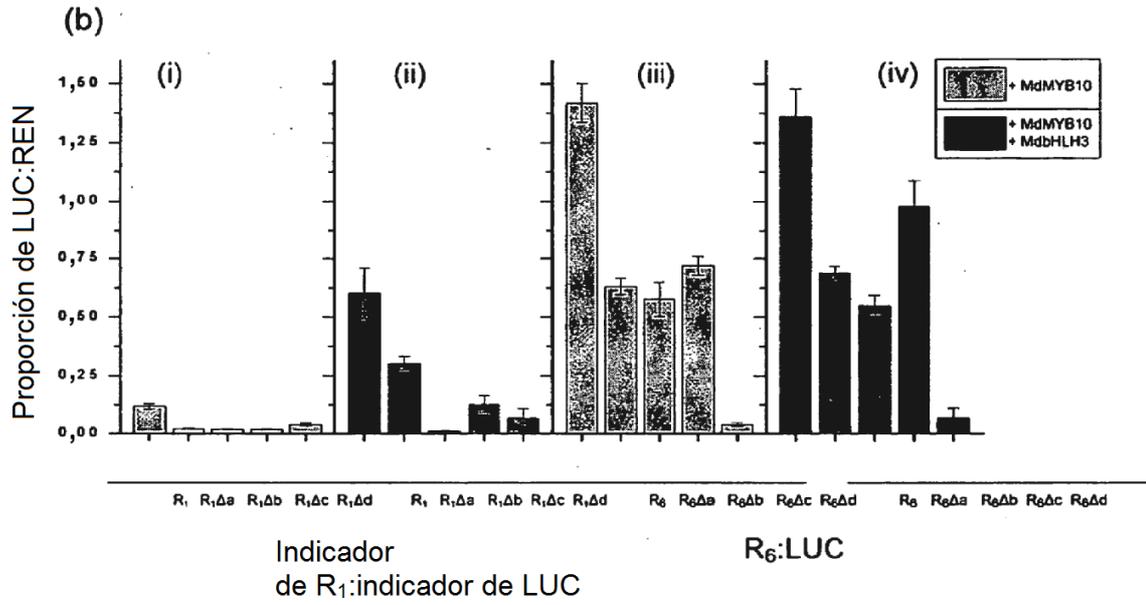


Figura 10

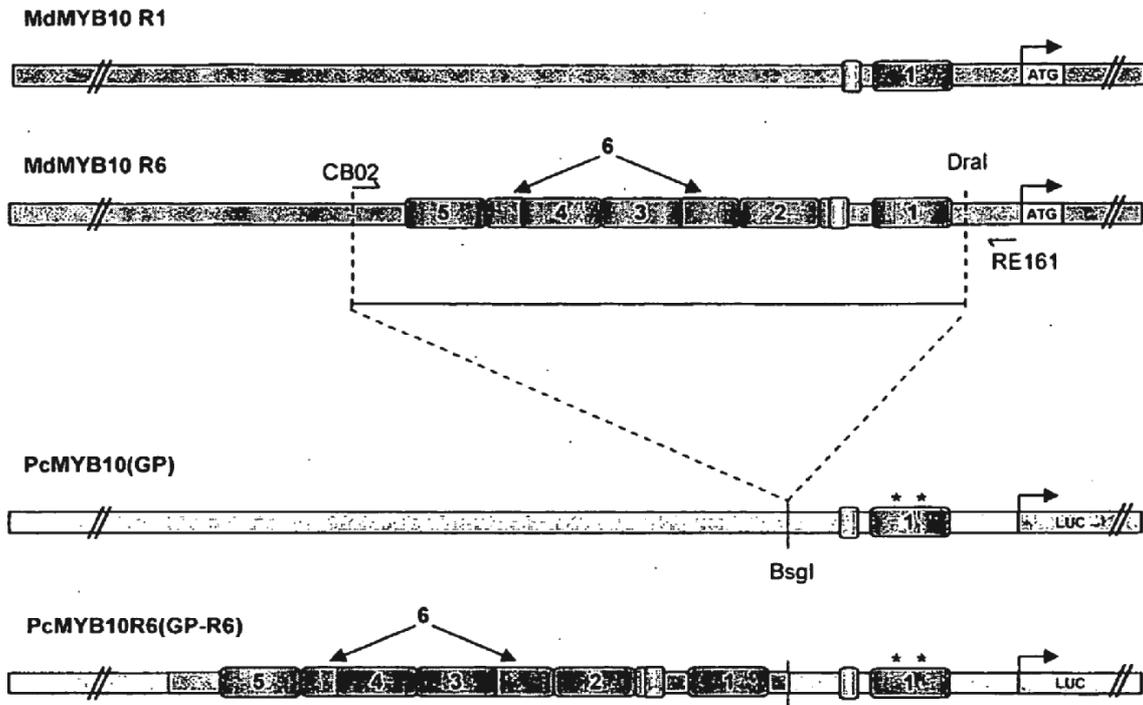


Figura 11

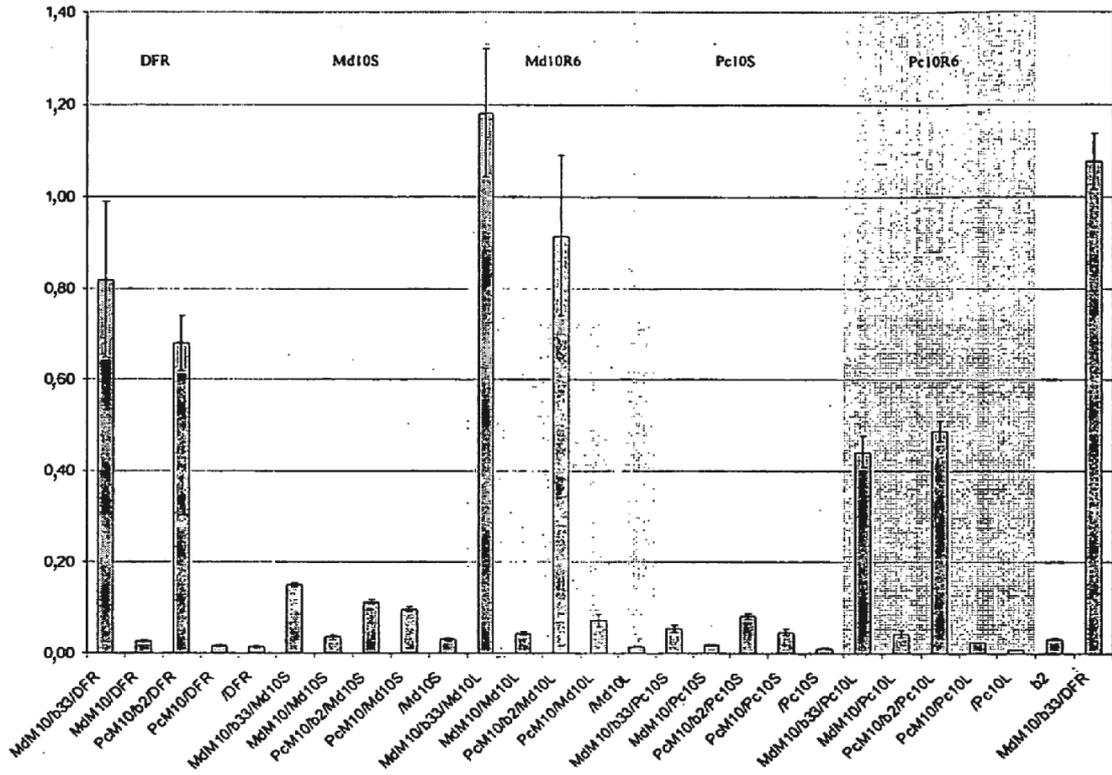


Figura 12

Promotor GP3-3 de pera	1				50
Promotor MdMYB10 (corto)	GGTGGTTGAGG	GGGAGTGTG	AAGATCAACA	CCAGCCCAAT	TGGTGGTTTGT

Promotor GP3-3 de pera	51				100
Promotor MdMYB10 (corto)	GTTGAAGTGT	AATCTTGCCT	TGGCCCAAGA	TGGATCGAAC	CCATGGACAA

Promotor GP3-3 de pera	101				150
Promotor MdMYB10 (corto)	AGAAATATCC	ATACACATGC	TAGAAAATTC	TAGCAAAGTT	CAAGTTGGTG
ATGAGCT	CACCCTG...
Promotor GP3-3 de pera	151				200
Promotor MdMYB10 (corto)	GAACAGTTTA	GAA..GAATG	GTGAGGAGAA	GGCATCCACA	...CCATCTG
	.AACACGTGG	GAACCGGCC	GTTTGTAAAC	GACTGAGATA	GGTCCGGTTC
Promotor GP3-3 de pera	201				250
Promotor MdMYB10 (corto)	TATCAATTAA	GAAGACTAAG	TGAGAGTGAG	AAGTAGGAGT	AGTCTTGTGA
	TATTTCTTAA	AAACCC.AAC	ACCCGCTATG	TTCTATTTAT	AAACGGGTCC
Promotor GP3-3 de pera	251				300
Promotor MdMYB10 (corto)	GGAGTGTGAG	TGGTCTAAAG	TTTGTCTCTA	GAAAGAGTGA	GTGTCATAGC
	GGTCTG...G	TCCCTCCAAC	TTTGAGCCCG	GCTCGACTT.	GTGCCACTC
Promotor GP3-3 de pera	301				350
Promotor MdMYB10 (corto)	TTCAAATAGT	GTCTTTGAGA	GTTTGTGTGC	TATAATATTT	TGTGAGTTAA
	CTAAACTAAA	CCATATAAAA	ACCAAGAT..	..TTCCCTTT	TCTTCTTTCA
Promotor GP3-3 de pera	351				400
Promotor MdMYB10 (corto)	TACAAGTAAT	TGTTTACTTG	TGTTGTCTCT	CCAACACTTG	TGTTAAAGTT
	CACATATCAC	.GTTACTTTC	CAACAACAAT	TCAACAATCA	CAACAAA...
Promotor GP3-3 de pera	401				450
Promotor MdMYB10 (corto)	GTGTACTCTA	AGTTTTCCCC	AACATATATC	ACTTCACTAA	TAAAGACAAC
	...TAATCAA	CCA..TCAAG	ATCATATATC	ACGTCACTAA	TAAAGACAAC
Promotor GP3-3 de pera	451				500
Promotor MdMYB10 (corto)	CTTCGTAAGG	GTTGCCGTAG	TTCTCTACTT	GAAATCCAAT	TATCTAGCAT
	CTTCACAAGG	GTTGTCGTAG	TTCTCTACTG	GAAATCCAAT	TGTCTAGCAT
Promotor GP3-3 de pera	501				550
Promotor MdMYB10 (corto)	TGTAACCCTA	AGTTACAGAC	ACAAACATAA	ACTTGAGCAA	CTTCTATGCA
	TGTAACCCTA	AGTTACAGAC	ACAAACATAA	ACTTGAGCAA	CTTCTATGCA
Promotor GP3-3 de pera	551				600
Promotor MdMYB10 (corto)	TAAGAATCTA	GGGTTTCAGA	CTAACTCAAT	GGAACCTAAC	AAGAAATAAT
	TAAGAATCTG	GGGTTTTGGA	CTAACTCAAC	AGAACCTAAC	AAGAAATAAT
Promotor GP3-3 de pera	601				650
Promotor MdMYB10 (corto)	ATCC.GGACC	GCT.AACGAT	GCATCCAATC	GAAGACAAGG	TTTCGGAC.A
	ATTCTGGACC	GCTTAACG..	GAATCCAA.C	GAAGACAAGG	TTTCGGACCA
Promotor GP3-3 de pera	651				700
Promotor MdMYB10 (corto)	CTCAACGGAA	CAAATAAGGG	AAAAGGATAT	AAACCACTCA	ACGAAGTTCA
	CTCAACGGAA	CAAATAAGGG	AAAGGGATAT	AAACCATTCA	ACGAATTTCA

ES 2 595 953 T3

Promotor GP3-3 de pera	701				750
Promotor MdMYB10 (corto)	TCTCTAGAAT	ACGTATAGTC	.CCCAATACG	GATTAACCAA	GTGAGAACAT
	TCTTTAGAAT	ACGCATAGTC	TCCCAATACG	GATTAACCAA	GTGAGAACAT
Promotor GP3-3 de pera	751				800
Promotor MdMYB10 (corto)	ACACCATCTA	ATAGCATGGT	CCTGCAAGAT	AGATAACTAG	GTAGGACCAC
	ACGCCATCTG	ATAGCGTGGT	CCC GCAAGAC	AGATAACCAA	GTAGGACCAC
Promotor GP3-3 de pera	801				850
Promotor MdMYB10 (corto)	CGATGGTATA	ATGTGACCAA	GTAAGTAGTG	ACCCTAAATG	TAGATTAACC
	CGATGGTATA	ATGTGACCAA	GTAAGCAGTG	ACCCTAAATG	TAGATTAACC
Promotor GP3-3 de pera	851				900
Promotor MdMYB10 (corto)	AAGTGGAGTT	AAATTTAGAA	TGCATATGCA	CCCTACCCCC	CCAAGACAGA
	ACATGGAGTT	AAATTA...A
Promotor GP3-3 de pera	901				950
Promotor MdMYB10 (corto)	CTAACCAGGC	AGAACCATAT	GCATTCCCC	AATAGTGTGG	TTCCTTAATG

Promotor GP3-3 de pera	951				1000
Promotor MdMYB10 (corto)	CAGATTGACA	AGGCGGAACC	ACCTATGAAA	ATAATGTAAC	TAGGTAGGGC
CA	AGGCTGAACC	ACCTATGAAA	ATAATGTAA.
Promotor GP3-3 de pera	1001				1050
Promotor MdMYB10 (corto)	CCGACGAATA	TCTATTGCCT	GAAATCTTAG	GAGAGAATTC	TTGCTCTAGG
GCCT	GAAATCTTAG	GAGAGAATTC	TTGCTCTAGG
Promotor GP3-3 de pera	1051				1100
Promotor MdMYB10 (corto)	GGACAAATGA	TTTTTCGTATG	CCTAAGTATT	TTTTATTTAG	TGACAGTAAA
	GGACAAATGA	TTTTTCGTATG	CCTAAGTATT	TTTT...TAG	TGACAGTAAA
Promotor GP3-3 de pera	1101				1150
Promotor MdMYB10 (corto)	CTAAGATTG	AGTACAGAGA	CATTAAGTGA	GATTGACTCT	TGTGAAAGCT
	CTAAGATTG	AGTACAGAGA	CATTAAGTGA	GATTGACTCT	TGTGAAAGCT
Promotor GP3-3 de pera	1151				1200
Promotor MdMYB10 (corto)	TAGTGAGTTG	AAGCACTTAG	GCCAATTATA	TTGAGCAATG	TGTTAGGTGT
	TAGTGAGTTG	AAGCACGTAG	GCCAATTATA	TTGAGCAATG	TGTTAGGTGT
Promotor GP3-3 de pera	1201				1250
Promotor MdMYB10 (corto)	AGCGTCTAAA	CTTCCGTAGG	AGTTTTTTAC	AACAAGATAG	TGGGGGTGCC
	AGCGTCTAAA	CTTCCGTAGG	AGTTTTGTAC	AGCAATATAG	TGGGGGTGCC
Promotor GP3-3 de pera	1251				1300
Promotor MdMYB10 (corto)	GCAAAATGCA	GACAGTAGCA	ATAAATTACG	GGCTAGGATT	ATCTCCCCTC
	GCAAAATGCA	GACAGTAGCA	ATAAATTACG	GGCTAGGATT	TTCTCCTCTT
Promotor GP3-3 de pera	1301				1350
Promotor MdMYB10 (corto)	GTTTTTTTGT	TCCATTCCAT	CCCTTCTCT	CACATTCTCT	ATTTTGTCTT
	TTTTTTTCGT	TCCATTCCAT	CCATTCTCT	CACATTTTTT	ATTTTGTCTT
Promotor GP3-3 de pera	1351				1400
Promotor MdMYB10 (corto)	TCTTTTTCTA	AAAAAATTA	ATATAAGATG	TTGATATAGC	TTAACCGGGA
	TCTCTTTCTA	TAAAAAATTA	ATATAAGATG	TTAATGTAAC	TTGACCGTGA
Promotor GP3-3 de pera	1401				1450
Promotor MdMYB10 (corto)	CCGTTCAAAT	AAGAGGGGAA	GGAAGAAGAG	GAAAAAATAA	AGAGAGGAAG
	CTATTCAAAT	AGGAGGGGAA	TGAAGAAGAG	GGAAAAAA.GG...
Promotor GP3-3 de pera	1451				1500
	GAAGAAGAGG	AAAAAATAA	AAAAAGAGAG	GGAAGAGATT	TTACTTTATA

Figura 13

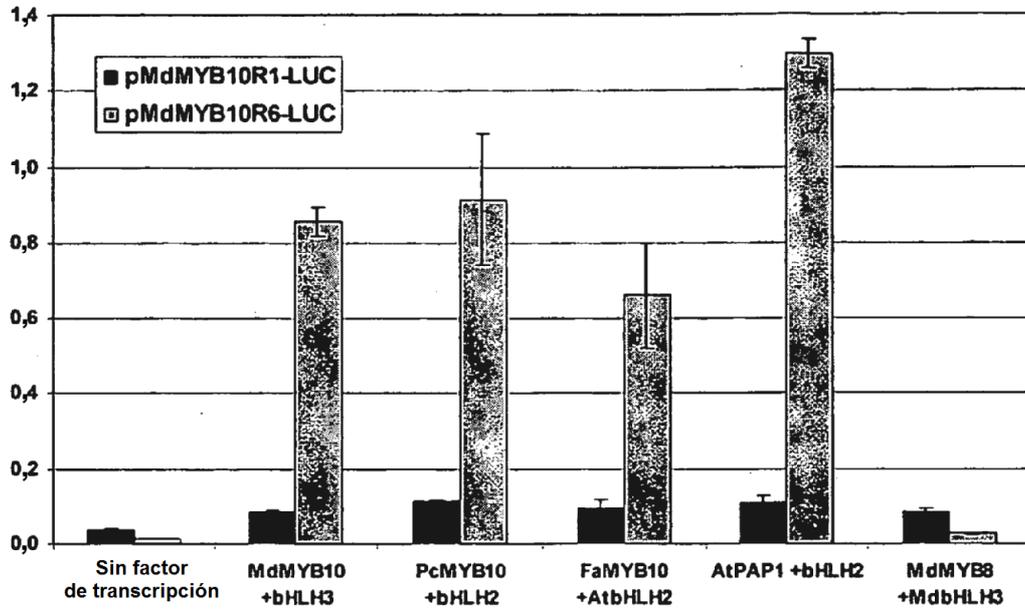


Figura 14

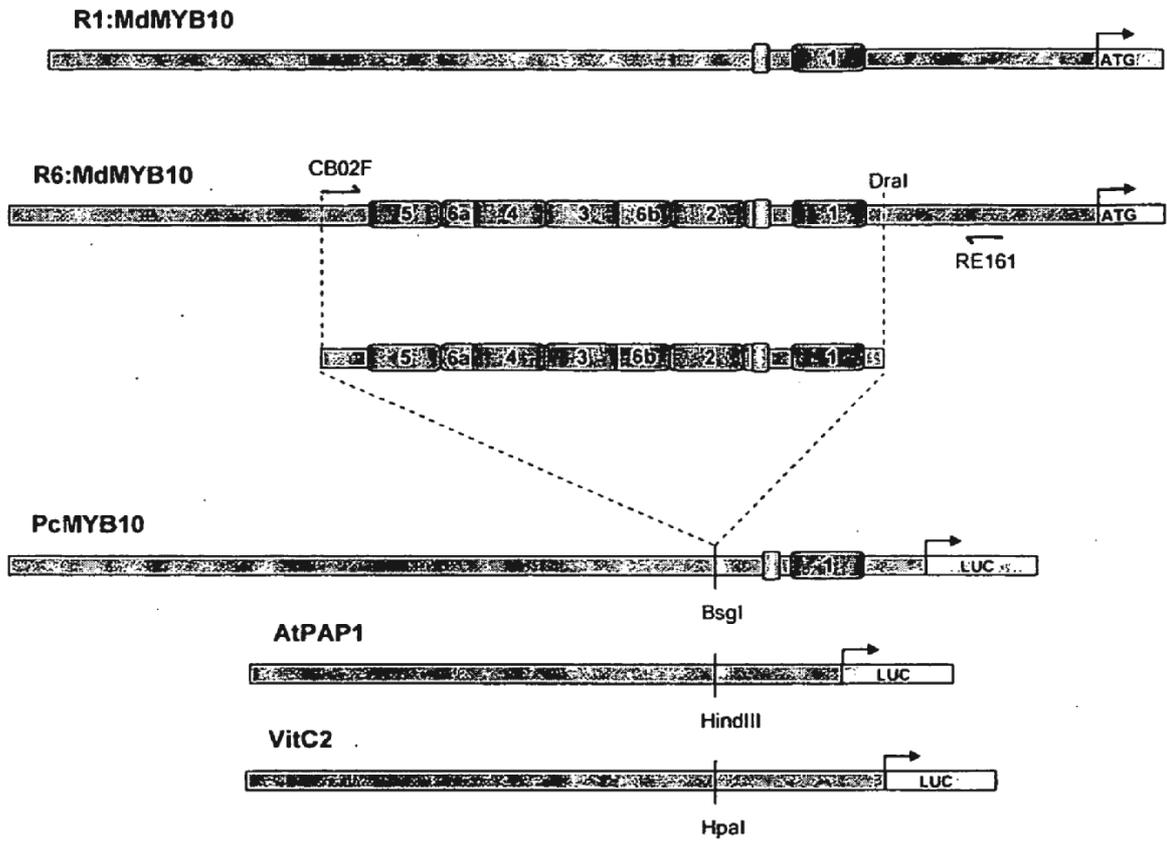


Figura 15

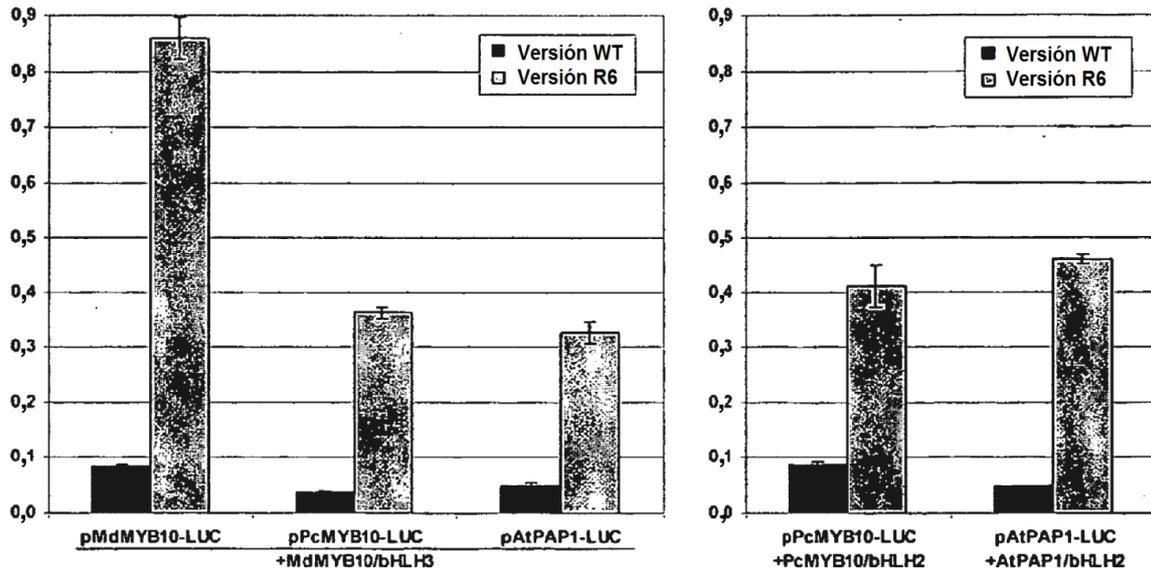


Figura 16

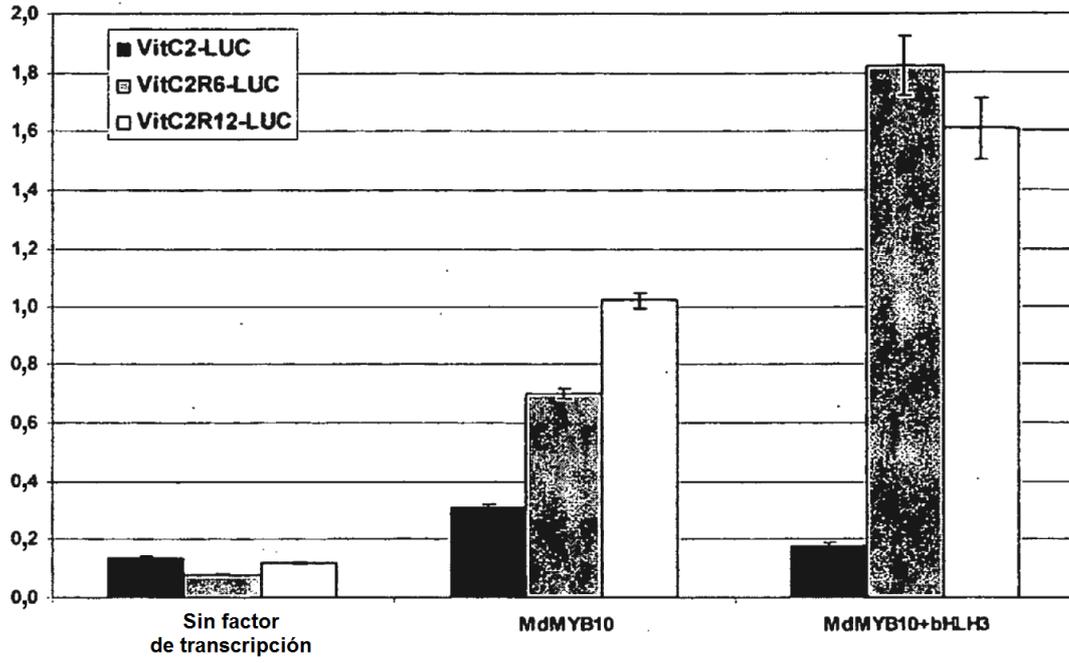


Figura 17

