

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 714**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.11.2013 PCT/NL2013/050863**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.06.2014 WO14084739**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2013 E 13802738 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2925869**

54 Título: **Promotores específicos de los tricomas**

30 Prioridad:

30.11.2012 US 201261731739 P
30.11.2012 NL 2009915

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.01.2018

73 Titular/es:

KEYGENE N.V. (100.0%)
P.O. Box 216
6700 AE Wageningen, NL

72 Inventor/es:

DIERGAARDE, PAUL JOHAN;
PRINS, MARINUS WILLEM y
DE VOS, MARTIN

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 651 714 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Promotores específicos de los tricomas

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a promotores vegetales específicos de los tricomas y sus usos. Los promotores se pueden utilizar para la expresión de proteínas homólogas o heterólogas en células de los tricomas, o para la expresión de moléculas de ácido nucleico activas, tales como ARN sentido y/o antisentido. Se proporcionan secuencias de ácido nucleico con actividad de promotor, al igual que genes quiméricos, vectores y células (transgénicas) recombinantes y organismos que los comprenden. También se proporcionan métodos para la realización de células y organismos transgénicos, especialmente plantas y células vegetales, que comprenden los promotores. Los promotores son útiles para la producción de varios compuestos en tricomas, tales como pesticidas, aceites volátiles, sabores o fragancias, componentes farmacéuticos, proteínas citotóxicas y similares.

Antecedentes de la invención

[0002] Los tricomas son varias excrecencias de la epidermis de las plantas que incluyen pelo ramificado y no ramificado, vesículas, ganchos, espinas y pelos punzantes. Los tricomas son estructuras salientes multicelulares apiladas que se consideran importantes para la protección de las plantas frente a los herbívoros, pero también ante la pérdida de agua por transpiración e irradiación UV (Mauricio & Rausher, 1997, *Evolution* 51, 1435; Wagner et al. 2004, *Ann Bot* 93, 3), como sumideros para metales pesados tóxicos y xenobióticos (Salt et al., 1995, *Plant Phys* 109, 1427; Domínguez-Solís et al. 2001, *J Biol Chem* 276, 9297; Gutiérrez-Alcalá et al. 2000, *PNAS* 97, 11108).

[0003] Los tricomas glandulares que contienen varios compuestos secundarios están presentes en el follaje de muchas especies de solanáceas y su papel en la resistencia ante varias plagas ha sido bien documentado. Los tricomas glandulares en el tomate contienen altas cantidades de terpenos (van der Hoeven et al., *Plant Cell* 2000, vol. 12(11):2283-2294) y metilcetonas (Fridman et al., *Plant Cell* 2005, vol. 17(4):1252-1267). Los tricomas se han categorizado en tipos I a VII (Luckwill, 1943, Aberdeen University Press, Reino Unido) con los tipos I, IV, VI y VII como tipos de tricoma glandular y II, III y V como no glandular. Los tipos IV, V y VI son los tricomas predominantes en el tomate salvaje *S. habrochaites* (Simmons y Gurr, 2005, *Agricultural and Forest Entomol* 7, 265). En el *S. pennelli* la resistencia ante plagas está predominantemente relacionada con la química y densidad de los tricomas glandulares del tipo IV, que cubren todas las partes de la planta (Simmons et al., 2003, *Aus J Entomol* 43, 196, 2004, *Entomol Exp App* 113, 95). Cuando los exudados de los tricomas glandulares se retiran físicamente, aumenta la supervivencia y la longevidad de las plagas mientras que se reduce la mortalidad y el atrapamiento (Simmons y Gurr, 2005, *Agricultural and Forest Entomol* 7, 265). Los tipos de tricoma IV y VI se han correlacionado positivamente con el control de plagas.

[0004] Se han explorado tricomas no glandulares de óvulos de algodón como objetivos de la biotecnología con alta importancia económica (Kim y Triplett, 2001, *Plant Physiol* 127, 1361). La capacidad de los tricomas glandulares para segregar varios fitoquímicos, tales como azúcares de acilo en *S. pennelli* y cetonas de metilo y terpenos en *S. habrochaites*, hace que estas estructuras sean potencialmente adecuadas para la aplicación biotecnológica y proporciona oportunidades para gestionar las plagas a base de tricomas.

[0005] La expresión de proteína en los tricomas se puede utilizar para la producción de compuestos útiles tales como pesticidas, componentes farmacéuticos, aceites volátiles, sabores y fragancias (Callow, 2000 *Advances in botanical research*, eds. Hallahan y Gray, San Diego Academic Press; Wagner 2004 *Ann Bot* 93, 3). Para generar componentes específicamente en tricomas, es necesaria la regulación de la expresión genética en el tricoma vegetal. La posibilidad de dirigir la expresión de proteína en estructuras o células especializadas evita la interferencia en las vías metabólicas de la planta y en consecuencia en el rendimiento de la planta.

[0006] Promotores fuertes constitutivos tales como el bien conocido promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S) se usan generalmente en los estudios de expresión ectópica. Sin embargo este tipo de promotor no es muy adecuado para la expresión de compuestos específicos y posiblemente fitotóxicos, tales como los terpenos. Además, el agotamiento de los depósitos metabólicos puede ser problemático.

[0007] Gutiérrez-Alcalá (2005, *J Exp Bot* 56, 2487) describe el gen promotor de la *Arabidopsis thaliana* *OASA1*, que tiene actividad tanto en tricomas glandulares como no glandulares del tabaco.

[0008] Wang et al. (2002, *J Exp Bot* 53, 1891) describe un promotor específico de los tricomas del gen del tabaco P450, CYP71D16, que muestra expresión en los tricomas glandulares del tabaco en todas las etapas de desarrollo.

[0009] WO2004/111183 describe promotores específicos de los tricomas del tomate y de las hojas de tabaco. Sin embargo, tras examinar los transgénicos que se describen en WO2004/111183 se obtuvieron resultados no satisfactorios en el sentido de que la expresión no era específica de los tricomas (por ejemplo expresión adicional en las venas de la hoja) y la expresión era débil.

[0010] WO2009/082208 describe promotores específicos de los tricomas del tomate. Aunque estos promotores han demostrado ser estrictamente específicos de los tricomas, su actividad es relativamente baja.

[0011] A pesar de haber aislado los promotores específicos de los tricomas, ninguno muestra una combinación de especificidad de los tricomas y alta actividad de promotor. Hay una necesidad clara para promotores altamente activos específicos de los tricomas o preferidos de los tricomas. Además, idealmente se deberían identificar varios tales promotores para diseñar exitosamente la producción de compuestos en tricomas útiles. La biosíntesis de estos compuestos requiere frecuentemente el uso de múltiples genes, y así idealmente estos múltiples genes se expresan en los tricomas, preferiblemente utilizando varios promotores.

[0012] Tales nuevos promotores vegetales deberían tener idealmente los requisitos siguientes: i. especificidad de órgano/tejido, los promotores deberían ser estrictamente específicos de los tricomas para evitar la producción de compuesto potencialmente no deseado en otros tejidos (por ejemplo en una parte comestible); ii. actividad de promotor elevada.

La presente invención proporciona secuencias reguladoras de la transcripción específicas de los tricomas que son adecuadas para dirigir la expresión de moléculas de ácido nucleico operativamente enlazadas en tricomas glandulares y no glandulares, especialmente en los tricomas glandulares que se encuentran en varias superficies de las plantas (partes aéreas tales como hojas, tallos, órganos florales) mientras que, en algunas especies, se ausentan de superficies particulares de las plantas como la fruta y las semillas. Los tricomas simples están presentes en las superficies aéreas de la mayoría de angiospermas y algunas gimnospermas y briófitas (Wagner et al. 2004, Ann Bot 93, 3). En las angiospermas, los tricomas pueden darse en hojas, pétalos, peciolo, pedúnculos, tallos y revestimientos de semilla, dependiendo de las especies. Los tricomas glandulares se encuentran en quizás el 30 % de plantas vasculares (Dell y McComb, 1978, Adv Bot Res 6, 227; Fahn, 2000, Adv Bot Res 31, 37).

Resumen de la invención

[0013] Se proporcionan secuencias de ácido nucleico, fragmentos de secuencias de ácido nucleico, usos y aplicaciones de los promotores de ShzFPS, ShZIS y ShTPS9.

[0014] Se proporciona una planta o célula vegetal o tejido vegetal u órgano transgénico que comprende un gen quimérico integrado en su genoma, caracterizado por el hecho de que dicho gen quimérico comprende un promotor específico de los tricomas operativamente enlazado a una secuencia de ácido nucleico homóloga o heteróloga, donde el promotor se selecciona del grupo de:

- (a) la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N°: 4 o SEQ ID N°: 3; y
- (b) una secuencia de ácido nucleico que comprende al menos una identidad de secuencia del 70 % con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N°: 4 o SEQ ID N°: 3.

[0015] También se proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada con actividad de promotor cuando se introduce en células vegetales, donde dicha secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada de:

- (a) la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N°: 4 o SEQ ID N°: 3; y
- (b) una secuencia de ácido nucleico que comprende al menos una identidad de secuencia del 70 % con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N°: 4 a lo largo de toda su longitud o una secuencia de ácido nucleico que comprende al menos una identidad de secuencia del 95 % con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N°: 3.

[0016] Los vectores, genes quiméricos y células huéspedes que comprenden las secuencias anteriores son también una forma de realización de la invención.

[0017] Además, se proporciona un método para hacer una planta o célula vegetal transgénica, que incluye las etapas de:

- (a) generar un gen quimérico que comprende un promotor como se ha descrito anteriormente, operativamente enlazado a la secuencia de ácido nucleico que se va a transcribir, y opcionalmente además enlazado a una secuencia de ácido nucleico UTR 3', o un vector que comprende el promotor como se ha descrito anteriormente o un gen quimérico como se ha descrito anteriormente;
- (b) transformar una planta o célula vegetal con dicho gen quimérico o vector; y, opcionalmente,

(c) regenerar plantas o células vegetales transgénicas.

[0018] El método puede comprender además cultivar la planta transgénica (o un derivado de la misma, tal como un derivado del cruce o la autofecundación y donde el derivado retiene el gen quimérico) y cosechar los tricomas o partes de los mismos (exudados de los tricomas) para otro uso (agricultura molecular).

[0019] Alternativamente, por ejemplo si el gen quimérico aumenta la resistencia ante plagas y/o patógenos de la planta, el método puede comprender además cultivar la planta transgénica (o un derivado de la misma, tal como un derivado del cruce o la autofecundación y donde el derivado retiene el gen quimérico) y cosechar la totalidad o parte de la planta, tal como las hojas, fruta, semillas, etc. para otro uso.

[0020] Las secuencias del promotor aquí proporcionadas muestran una expresión de alta actividad y específica de los tricomas, preferiblemente específica de los tricomas glandulares. A diferencia de los promotores específicos de los tricomas anteriormente mencionados, las secuencias del promotor aquí proporcionadas son altamente específicas de los tricomas y suponen una alta expresión de los genes que conducen. Adicionalmente, se muestra aquí que la secuencia del promotor de un tomate salvaje es activa en los tricomas de un tomate cultivado y otras especies de plantas portadoras de tricomas.

[0021] Finalmente, se describen usos y aplicaciones de las secuencias o fragmentos de secuencias de ácido nucleico de los promotores de ShzFPS y ShZIS en combinación con sus secuencias codificantes respectivas para proporcionar plantas, células vegetales u órganos vegetales que muestren alta expresión de zFPS y ZIS en los tricomas, preferiblemente en los tricomas glandulares, y altos niveles de acumulación en los tricomas de 7-epizingibereno o terpenoides semejantes.

Definiciones generales

[0022] "Tricoma" abarca aquí diferentes tipos de tricomas, tanto tricomas glandulares como tricomas no glandulares.

"Células de los tricomas" se refiere a las células que forman la estructura del tricoma, como la glándula, o células secretoras, células de base y peciolo, o células de estipe, cavidad extracelular y células de cutícula. Los tricomas también pueden consistir en una célula única.

"Agricultura molecular" se refiere aquí a la producción y/o recuperación de compuestos útiles de tricomas de plantas transgénicas con expresión de uno o más genes quiméricos en tricomas, por la cual se producen por ejemplo metabolitos secundarios, compuestos farmacéuticos, fragancias o aromas en los tricomas.

El término "secuencia de ácido nucleico" (o molécula de ácido nucleico) se refiere a una molécula de ADN o de ARN en forma monocatenaria o bicatenaria, particularmente un ADN con actividad de promotor según la invención o un ADN que codifica una proteína o fragmento de proteína. Una "secuencia de ácido nucleico aislado" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que ya no está en el ambiente natural del que ha sido aislada, por ejemplo la secuencia de ácido nucleico en una célula huésped bacteriana o en el genoma nuclear o plástido vegetal.

Los términos "proteína" o "polipéptido" se usan de forma intercambiable y se refieren a moléculas consistentes en una cadena de aminoácidos, sin referencia a un modo específico de acción, tamaño, estructura tridimensional u origen. Un "fragmento" o "porción" de una proteína puede por tanto ser todavía referido como una "proteína". Una "proteína aislada" se utiliza para referirse a una proteína que ya no está en su ambiente natural, por ejemplo *in vitro* o en un recombinante bacteriano o en una célula huésped vegetal.

[0023] El término "gen" significa una secuencia de ADN que comprende una región (región transcrita), que se transcribe en una molécula de ARN (por ejemplo un ARNm) en una célula, operativamente enlazada a regiones reguladoras de la transcripción adecuadas (por ejemplo un promotor). Un gen puede así comprender diferentes secuencias operativamente enlazadas, tales como un promotor, una secuencia líder no traducida 5' (también referida como UTR 5', que corresponde a la secuencia de ARNm transcrita que precede al codón de inicio de traducción) que comprende por ejemplo secuencias implicadas en la iniciación de la traducción, una región de codificación (de proteína) (ADNc o ADN genómico) y una secuencia no traducida 3' (también referida como región no traducida 3', o UTR 3') que comprende por ejemplo sitios de terminación de la transcripción y sitio de poliadenilación (tal como por ejemplo AAUAAA o variantes de los mismos).

Un "gen quimérico" (o gen recombinante) se refiere a cualquier gen, que no se encuentra normalmente por naturaleza en una especie, en particular un gen donde una o más partes de la secuencia de ácido nucleico que están presentes no se asocian entre ellas en la naturaleza. Por ejemplo el promotor no se asocia en la naturaleza con parte o con la totalidad de la región transcrita o con otra región reguladora. El término "gen quimérico" se entiende que incluye constructos de expresión donde una secuencia del promotor o reguladora de la transcripción está operativamente enlazada a una o más secuencias sentido (por ejemplo secuencias codificantes) o a una secuencia antisentido (complemento inverso de la cadena sentido) o de repetición invertida (sentido y antisentido, en la que la transcripción de ARN forma ARN bicatenario tras la transcripción).

Una "UTR 3'" o "secuencia no traducida 3'" (también frecuentemente referida como región no traducida 3', o extremidad 3') se refiere a la secuencia de ácido nucleico que se encuentra aguas abajo de la secuencia codificante de un gen, que comprende, por ejemplo, un sitio de terminación de transcripción y (en la mayoría,

pero no en todos los ARNm eucarióticos) una señal de poliadenilación (tal como por ejemplo AAUAAA o variantes de la misma). Después de la terminación de la transcripción, la transcripción de ARNm se puede dividir aguas abajo de la señal de poliadenilación y se puede añadir una cola de poli(A), que se implica en el transporte del ARNm al citoplasma (donde se hace la traducción).

5 "Expresión de un gen" se refiere al proceso donde una región de ADN, que está operativamente enlazada a regiones reguladoras apropiadas, particularmente un promotor, se transcribe a un ARN, que es biológicamente activo, es decir que es capaz de ser traducido en una proteína activa biológicamente o un péptido (o fragmento de péptido activo) o que es él mismo activo (por ejemplo en el silenciamiento génico postranscripcional o ARNi, o en silenciamiento a través de ARNmi). Una proteína activa en ciertas formas de realización se refiere a una
10 proteína con una función negativa dominante debido a un dominio represor que está presente. La secuencia codificante está preferiblemente en la orientación de sentido y codifica una proteína biológicamente activa y deseada o un péptido, o un fragmento de péptido activo. En los métodos de silenciamiento génico, la secuencia de ADN está preferiblemente presente en la forma de un ADN antisentido o un ADN de repetición invertida, que comprende una secuencia corta del gen objetivo con orientación antisentido o en sentido y en antisentido.
15 La regulación en reducción de expresión de un gen puede también ocurrir a través de la acción de microARN (ARNmi), pequeños ARN de 21-24 nucleótidos endógenos procesados a partir de los precursores de ARN en tallo-bucle (pre-ARNmi), incorporados en un complejo de silenciamiento (RISC) inducido por ARN, los ARNmi regulan en reducción la expresión génica por escisión de ARNm o represión de la traducción.

20 "Expresión ectópica" se refiere a la expresión en un tejido donde el gen es normalmente no expresado.

[0024] Una "secuencia reguladora de la transcripción" se define aquí como una secuencia de ácido nucleico que es capaz de regular el índice de transcripción de una secuencia de ácido nucleico operativamente enlazada a la secuencia reguladora de la transcripción. Una secuencia reguladora de la transcripción como se define aquí comprenderá todos los elementos de secuencia necesarios para iniciar la transcripción (elementos promotores),
25 para mantener y para regular la transcripción, incluyendo por ejemplo atenuadores o potenciadores, pero también silenciadores. Aunque esta definición se refiere principalmente a las secuencias reguladoras de la transcripción aguas arriba de una secuencia codificante, también se abarcan las secuencias reguladoras encontradas aguas abajo (3') de una secuencia codificante. Como se utiliza en este caso, el término "promotor" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que funciona para controlar la transcripción de uno o más genes, ubicados aguas arriba (5') con respecto a la dirección de transcripción del sitio de iniciación de la transcripción del gen (el inicio de la transcripción se refiere a una posición +1 de la secuencia y se refiere a cualquier nucleótido aguas arriba relativo a ella utilizando números negativos), y se identifica estructuralmente por la presencia de un sitio de unión para polimerasa de ARN dependiente del ADN, sitios de iniciación de la transcripción y cualesquiera otros dominios de ADN (secuencias de actuación en cis), incluyendo, pero no
30 limitado a, sitios de unión de factores de la transcripción y sitios de unión a proteínas de represión y activación, y cualquier otra secuencia de nucleótidos conocida por alguien formado en la técnica para actuar directa o indirectamente para regular la cantidad de transcripción del promotor. Ejemplos de secuencias de actuación en cis eucariotas aguas arriba del inicio de la transcripción (+1) incluyen la caja TATA (comúnmente en una posición aproximada de -20 a -30 del inicio de la transcripción), la caja CAAT (comúnmente en una posición aproximada de -75 relativa al inicio de la transcripción), potenciador 5' o elementos de silenciador, etc.

Un promotor "constitutivo" (tal como el promotor CaMV 35S) es un promotor que es activo en esencialmente todos los tejidos y órganos bajo la mayoría de condiciones fisiológicas y/o de desarrollo. Más preferiblemente, un promotor constitutivo es activo bajo esencialmente todas las condiciones fisiológicas y de desarrollo en todos los órganos principales, tales como al menos las hojas, tallos, raíces, semillas, frutas y flores. De la forma más
45 preferible, el promotor es activo en todos órganos bajo la mayoría de (preferiblemente todas) las condiciones fisiológicas y de desarrollo.

Sin embargo, un promotor específico de tejido o preferido de tejido (tal como los promotores según la invención) también puede referirse como que es "activo constitutivamente". El promotor es así activo bajo la mayoría de las condiciones de desarrollo y/o fisiológicas, aunque en solo un tejido específico o principalmente en un tejido específico. Un "promotor que tiene actividad constitutiva" o que es "constitutivo" en una planta o célula vegetal se refiere, por lo tanto, a una secuencia de ácido nucleico que confiere transcripción en la planta o células vegetales en el tejido específico bajo la mayoría de condiciones fisiológicas y de desarrollo.

Un promotor "inducible" es un promotor que está regulado fisiológicamente (por ejemplo por aplicación externa de ciertos compuestos) o desarrollalmente.

[0025] Un promotor "específico de tejido" solo es activo en tipos específicos de tejidos o células, tales como las células de los tricomas. La actividad de promotor puede por lo tanto describirse refiriéndose a las circunstancias bajo las que el promotor confiere la transcripción de la secuencia de ácido nucleico operativamente enlazada aguas abajo (3') del promotor.

Un promotor de "tejido preferido" es preferentemente, pero no exclusivamente, activo en tejidos o células determinados, tales como por ejemplo en las células de los tricomas y en las células de la epidermis.

Un promotor que es "insensible a uno o más estreses bióticos y/o abióticos" o cuya actividad "no se reduce cuando se expone a una o más condiciones de estrés biótico o abiótico" se refiere a una secuencia de ácido nucleico con actividad de promotor bajo condiciones fisiológicas normales y de desarrollo, en la que la actividad no se reduce, o al menos no significativamente, de forma cuantitativa cuando se ejerce estrés biótico y/o abiótico en el organismo (por ejemplo planta) o células o tejidos u órganos que comprenden el promotor.

"Estrés" se refiere a condiciones o presiones de origen físico, químico o biológico que actúan en una planta o células vegetales que pueden resultar en la pérdida de rendimiento y/o pérdida de calidad de una planta, pero que no es letal para la planta. "Condiciones no estresadas" se refiere aquí a condiciones en las que la fisiología y el desarrollo son normales u óptimos. "Estrés biótico" se refiere al estrés provocado por agentes (vivos) bióticos, tales como hongos, virus, organismos como micoplasma, insectos, artrópodos, bacterias, nematodos, etc. (es decir especialmente plagas y patógenos de las plantas). "Estrés abiótico" se refiere a estrés provocado por agentes (inertes) abióticos, tales como estrés de temperatura (frío/congelación, calor), salinidad (sal), viento, metales, duración del día (fotoperiodo), estrés hídrico (tal como disponibilidad de agua demasiado escasa o demasiado abundante, es decir sequía, deshidratación, encharcamiento, etc.), etc.

Como se utiliza en este caso, el término "operativamente enlazado" se refiere a una conexión de elementos polinucleótidos en una relación funcional. Un ácido nucleico está "operativamente enlazado" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor, o una secuencia reguladora de la transcripción, está operativamente enlazado a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia codificante. Operativamente enlazado significa que las secuencias de ADN enlazadas son típicamente contiguas y se dan donde es necesario para unir dos regiones de codificación de proteína, contiguas y en el marco de lectura para producir una "proteína quimérica". Una "proteína quimérica" o "proteína híbrida" es una proteína compuesta por varios "dominios" (o motivos) de proteína que no se encuentran como tal en la naturaleza pero que se unen para formar una proteína funcional, que muestra la funcionalidad de los dominios juntados (por ejemplo un dominio de unión de ADN o una represión de función del dominio que conduce a una función negativa dominante). Una proteína quimérica también puede ser una proteína de fusión de dos o más proteínas que ocurre en la naturaleza. El término "dominio" como se utiliza aquí significa cualquier parte(s) o dominio(s) de la proteína con una estructura o función específica que se puede(n) transferir a otra proteína para proporcionar una proteína híbrida nueva con al menos la característica funcional del dominio.

[0026] El término "péptido objetivo" se refiere a secuencias de aminoácidos que abordan una proteína para órganos intracelulares tales como plástidos, preferiblemente cloroplastos, mitocondria, o para el espacio extracelular (péptido señal de secreción). Una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido objetivo se puede fusionar (en el marco) con la secuencia de ácido nucleico que codifica el extremo terminal de amino (extremo N-terminal) de la proteína. Por ejemplo, los péptidos objetivos para células de los tricomas incluyen péptidos que abarcan leucoplastos, cloroplastos, mitocondria, núcleos, peroxisomas, retículo endoplasmático, plástidos, cavidades extracelulares o vacuolas de las células de los tricomas.

Un "constructo de ácido nucleico" o "vector" se entiende aquí que significa una molécula de ácido nucleico artificial resultante del uso de tecnología de ADN recombinante y que se usa para entregar ADN exógeno en una célula huésped.

El esqueleto del vector puede por ejemplo ser un vector binario o superbinario (véase por ejemplo US 5,591,616; US2002138879 y WO 95/06722), un vector cointegrado o un vector T-ADN, como se conoce en la técnica y como se describe en otra parte de este documento, en el que se integra un gen quimérico o, si ya está presente una secuencia reguladora de la transcripción adecuada/un promotor, solo una secuencia de ácido nucleico deseada (por ejemplo una secuencia codificante, una secuencia antisentido o una secuencia de repetición invertida) se integra aguas abajo de la secuencia reguladora de la transcripción/el promotor. Los vectores normalmente comprenden además elementos genéticos para facilitar su uso en la clonación molecular, tales como por ejemplo marcadores seleccionables, lugares de clonación múltiples y similares (véase a continuación).

Una "célula huésped" o una "célula huésped recombinante" o "célula transformada" son términos que se refieren a una célula individual nueva (u organismo), que surge como resultado de la introducción en dicha célula de al menos una molécula de ácido nucleico, que comprende especialmente un gen quimérico que codifica una proteína deseada o una secuencia de ácido nucleico que tras la transcripción produce un ARN antisentido o un ARN de repetición invertida (o ARN en horquilla) para el silenciamiento de un gen/familia genética objetivo. La célula huésped es preferiblemente una célula vegetal, pero también puede ser una célula bacteriana, una célula fúngica (incluyendo una célula de levadura), etc. La célula huésped puede contener el constructo de ácido nucleico como una molécula de replicación (episomal) extracromosómica, o más preferiblemente, comprende el gen quimérico integrado en el genoma nuclear o plástido de la célula huésped.

El término "marcador seleccionable" es un término familiar para alguien con conocimiento ordinario en la técnica y se utiliza en este caso para describir cualquier entidad genética que, cuando se expresa, puede utilizarse para seleccionar una célula o células que contienen el marcador seleccionable. Los productos genéticos de marcador seleccionable confieren, por ejemplo, resistencia antibiótica, o más preferiblemente, resistencia herbicida u otra característica seleccionable tal como una característica fenotípica (por ejemplo un cambio en la pigmentación) o un requisito nutricional. El término "indicador" se usa principalmente para referirse a marcadores visibles, tales como proteína verde fluorescente (GFP), eGFP, luciferasa, GUS y similares, al igual que marcadores nptII y similares. El término "ortólogo" de un gen o proteína se refiere aquí al gen o proteína homólogo encontrado en otras especies, que tiene la misma función que el gen o proteína, pero que (normalmente) diverge en la secuencia desde el punto temporal en que las especies que albergan los genes divergieron (es decir los genes evolucionaron a partir de un ancestro común por especiación). Los ortólogos de un gen de una especie vegetal pueden así identificarse en otras especies vegetales basándose en comparaciones de ambas secuencias (por ejemplo basándose en los porcentajes de identidad de secuencia de porcentajes a lo largo de la secuencia entera o sobre dominios específicos) y análisis funcional.

Los términos "homóloga" y "heteróloga" se refieren a la relación entre una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos y su organismo o célula huésped, especialmente en el contexto de organismos transgénicos. Una secuencia homóloga se encuentra así naturalmente en las especies huéspedes (por ejemplo una planta de tomate transformada con un gen de tomate), mientras que una secuencia heteróloga no se encuentra naturalmente en la célula huésped (por ejemplo una planta de tomate transformada con una secuencia de plantas de patata). Dependiendo del contexto, el término "homóloga" u "homólogas" puede alternativamente referirse a secuencias que son descendientes a partir de una secuencia ancestral común (por ejemplo pueden ser ortólogas).

"Condiciones de hibridación astringentes" puede utilizarse para identificar secuencias de nucleótidos, que son sustancialmente idénticas a una secuencia de nucleótidos determinada. La astringencia de las condiciones de hibridación depende de las secuencias y será diferente en circunstancias diferentes. Generalmente, las condiciones de astringencia se seleccionan para ser aproximadamente 5°C inferiores al punto de fusión térmico (T_m) de las secuencias específicas a una fuerza iónica y un pH definidos. El T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y un pH definido) en la que el 50 % de la secuencia objetivo hibrida a una sonda perfectamente unida. Típicamente se elegirán las condiciones de astringencia en las que la concentración de sal (NaCl) sea de aproximadamente 0,02 molar a pH 7 y la temperatura sea de al menos 60°C. La reducción de la concentración de sal y/o el aumento de la temperatura aumenta la astringencia. Las condiciones de astringencia para hibridaciones ARN-ADN (ensayos Northern Blot utilizando una sonda de por ejemplo 100 nt) son por ejemplo aquellas que incluyen por lo menos un lavado en 0,2X SSC a 63°C durante 20 min, o condiciones equivalentes. Las condiciones de astringencia para hibridación ADN-ADN (ensayos Southern Blot utilizando una sonda de por ejemplo 100 nt) son por ejemplo aquellas que incluyen por lo menos un lavado (normalmente 2) en 0,2X SSC a una temperatura de al menos 50°C, normalmente de aproximadamente 55°C, durante 20 min, o condiciones equivalentes. Véase también Sambrook et al. (1989) y Sambrook y Russell (2001).

Se pueden proporcionar condiciones de "alta astringencia", por ejemplo, mediante hibridación a 65°C en una solución acuosa que contiene 6x SSC (20x SSC contiene 3,0 M NaCl, 0,3 M Na-citrato, pH 7,0), 5x Denhardt's (100X Denhardt's contiene 2 % de Ficoll, 2 % de pirrolidona de polivinilo, 2 % de albúmina de suero bovino), 0,5 % de dodecilsulfato sódico (SDS), y 20 µg/ml de ADN portador desnaturalizado (ADN de esperma de pescado monocatenario, con una longitud media de 120 - 3000 nucleótidos) como competidor no específico. Tras la hibridación, se puede hacer un lavado de alta astringencia en diferentes pasos, con un lavado final (aproximadamente 30 min) a la temperatura de hibridación en 0,2-0,1x SSC, 0,1 % de SDS.

[0027] "Astringencia moderada" se refiere a condiciones equivalentes a la hibridación en la solución que se ha descrito anteriormente pero a alrededor de 60-62°C. En este caso el lavado final se realiza a la temperatura de hibridación en 1x SSC, 0,1 % de SDS.

"Astringencia baja" se refiere a condiciones equivalentes a la hibridación en la solución que se ha descrito anteriormente a alrededor de 50-52°C. En este caso, el lavado final se realiza a la temperatura de hibridación en 2x SSC, 0,1 % de SDS. Véase también Sambrook et al. (1989) y Sambrook y Russell (2001).

La "identidad de secuencia" y "similitud de secuencia" se pueden determinar mediante el alineamiento de dos péptidos o dos secuencias de nucleótidos usando algoritmos de alineamiento global o local, dependiendo de la longitud de las dos secuencias. Secuencias de longitudes similares se alinean preferiblemente utilizando un algoritmo de alineamiento global (por ejemplo Needleman Wunsch) que alinea las secuencias óptimamente a lo largo de toda la longitud, mientras que las secuencias de longitudes sustancialmente diferentes se alinean preferiblemente utilizando un algoritmo de alineamiento local (por ejemplo Smith Waterman). Se puede referir entonces a secuencias como "sustancialmente idénticas" o "esencialmente similares" cuando estas (cuando están alineadas óptimamente con por ejemplo los programas GAP o BESTFIT que usan parámetros por defecto) comparten al menos un determinado porcentaje mínimo de identidad de secuencia (como se define a continuación). GAP usa el algoritmo de alineamiento global de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias a lo largo de toda su longitud (longitud total), maximizando el número de coincidencias y minimizando el número de espacios. Un alineamiento global se usa adecuadamente para determinar la identidad de secuencia cuando las dos secuencias tienen longitudes similares. Generalmente, se usan los parámetros por defecto de GAP, con una penalización de creación de espacio = 50 (nucleótidos) / 8 (proteínas) y penalización de extensión de espacio = 3 (nucleótidos) / 2 (proteínas). Para los nucleótidos, la matriz de puntuación por defecto usada es nwsgapdna y para las proteínas la matriz de puntuación por defecto es Blosum62 (Henikoff y Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919). Se pueden determinar alineamientos de secuencia y puntuaciones para el porcentaje de identidad de secuencia utilizando programas informáticos, tales como el GCG Wisconsin Package, versión 10.3, disponible en Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752 EE.UU., o usando software de código abierto, como el programa "needle" (que utiliza el algoritmo global de Needleman Wunsch) o "water" (que utiliza el algoritmo local de Smith Waterman) en EmbossWIN versión 2.10.0, usando los mismos parámetros que con GAP anteriormente mencionados, o utilizando los ajustes por defecto (tanto para "needle" como para "water" y tanto para proteína como para alineamientos de ADN, la penalización de apertura de espacio por defecto es de 10,0 y la penalización por extensión de espacio predeterminada es de 0,5; matrices de puntuación por defecto son Blossum62 para proteínas y DNAFull para ADN). Cuando las secuencias tienen unas longitudes globales sustancialmente diferentes, se prefieren los alineamientos locales, tales como los que usan el algoritmo de Smith Waterman. Alternativamente el porcentaje de similitud o identidad se puede determinar mediante la búsqueda en bases de datos públicas, usando algoritmos tales como FASTA, BLAST, etc.

La abreviatura "Sh" delante de un nombre de gen indica que el gen se deriva de *Solanum habrochaites*, mientras que la abreviatura "Sl" delante de un nombre de gen denota que el gen se deriva de *Solanum lycopersicum*. La abreviatura "FPS" se refiere a farnesil pirofosfato sintasa, la abreviatura "ZIS" se refiere a zingibereno sintasa, y la abreviatura "TPS9" se refiere a terpeno sintasa 9, que es una germacreno sintasa. La abreviatura "zFPS" se refiere a una Z,Z-farnesil pirofosfato sintasa (también referida como "Z,Z-farnesil difosfato sintasa").

En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para significar que los ítems que siguen después de la palabra se incluyen, pero los ítems no mencionados específicamente no son excluidos. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que más de una unidad del elemento esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que allí sea una unidad y solo una de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" significa por lo tanto normalmente "al menos uno/una". Se entiende además que, cuando se hace referencia a "secuencias" en este documento, se hace referencia generalmente a las moléculas físicas reales con una secuencia determinada de subunidades (por ejemplo aminoácidos). Siempre que se hace referencia a una "planta" o "plantas" (o una pluralidad de plantas) según la invención, se entiende que también se incluyen las partes de las plantas (células, tejidos u órganos, semillas, partes cortadas o cosechadas, hojas, plántulas, flores, polen, fruta, tallos, raíces, callos, protoplastos, etc.), descendencia o propagaciones clónicas de las plantas que retienen las características distintivas de los padres (por ejemplo la presencia de un transgén), así como las semillas obtenidas por autofecundación o cruce, por ejemplo las semillas híbridas (obtenidas por el cruce de dos líneas parentales innatas), plantas híbridas y partes de planta derivadas de las mismas, a menos que se indique lo contrario.

Descripción detallada

[0028] Un promotor constitutivo tal como el promotor CaMV 35S (promotor 35S único, descrito por Franck et al., 1980, Cell 21, 285-294) no se considera útil para la expresión génica que necesita regularse en un nivel de tejido específico, por ejemplo, en floema o en tricomas, o solo bajo condiciones específicas, por ejemplo condiciones inducidas por estrés.

[0029] En la presente invención se proporcionan diferentes promotores vegetales que muestran una actividad constitutivamente elevada pero actividad específica en tejido en tricomas, y son opcionalmente esencialmente insensibles ante uno o más estreses bióticos y/o abióticos. Se desean tales promotores para la expresión controlada de secuencias de ácido nucleico en plantas transgénicas.

[0030] En una forma de realización la invención proporciona regiones de promotor de genes de tomate (terpeno sintasas de tomate y ortólogos y homólogos de las mismas) que confieren una alta expresión específica de los tricomas, preferiblemente específica de los tricomas glandulares, en plantas huéspedes, tales como el tomate cultivado (*Solanum lycopersicum*), otras *Solanaceae* y otras familias y especies vegetales.

Secuencias de ácido nucleico, genes quiméricos y vectores

[0031] En una forma de realización, se proporcionan secuencias de ácido nucleico aisladas (preferiblemente secuencias de ADN genómicas o sintéticas), con actividad de promotor en células vegetales, que muestran una actividad específica de los tricomas transcripcionales, preferentemente constitutiva, elevada y fuerte en tricomas vegetales, tales como los tricomas que se encuentran en hojas, tallos y órganos de flor. Preferiblemente, los promotores son activos en uno o más tricomas glandulares (tipos I, IV, VI y/o VII).

[0032] Preferiblemente la actividad de promotor de las secuencias de ácido nucleico según la invención no se reduce, o al menos no se reduce significativamente, cuando la planta transgénica, o tejido u órgano vegetal, se somete a uno o más estreses abióticos y/o bióticos. Una reducción significativa en este aspecto se refiere a una reducción (cuantitativa) significativa estadísticamente de actividad de promotor de un 1 % o más (por ejemplo 2 %, 3 %, 5 %, 10 %, etc., hasta el 100 %) en comparación con la actividad en los mismos tejidos u órganos bajo condiciones sin estrés. Así, preferiblemente los promotores permanecen fuertes y constitutivos (en las células de los tricomas) bajo una o más condiciones de estrés.

[0033] En una forma de realización, se describe un promotor específico de los tricomas que comprende o consiste en SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 1 o SEQ ID N°: 2, o una secuencia de nucleótidos esencialmente similar a las mismas (referidas como "variantes", véase la definición a continuación), o fragmentos (funcionales) activos de cualquiera de estas que tienen actividad de promotor en uno o más tipos de tricoma y/o células de los tricomas, tales como fragmentos de al menos 200, 300, 400, 500, 600, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 2400 o más nucleótidos consecutivos de SEQ ID N°: 4, 3, 1 o 2, o de variantes de las mismas.

[0034] "Fragmentos activos" o "fragmentos funcionales", o "fragmentos con actividad de promotor" se refiere a fragmentos de ácido nucleico que son capaces de conferir la transcripción de uno o más tipos de tricoma y/o una o más células de los tricomas encontradas en uno o más tipos diferentes de tejidos u órganos vegetales (por ejemplo en tallos, hojas, capullos de flor o partes de flor). Fragmentos preferiblemente activos confieren una expresión específica de los tricomas y/o al menos preferida de los tricomas, y ellos preferiblemente tienen al

menos una fuerza similar (o fuerza más alta) que el promotor de SEQ ID N°: 4, 3, 1 o 2. Esto se puede evaluar como se describe abajo, transformando una planta con tal fragmento, preferiblemente operativamente enlazado a un gen reportero, y evaluando la actividad de promotor cualitativamente (transcripción espaciotemporal) y/o preferiblemente de forma cuantitativa en tricomas. Obviamente, se pueden generar fragmentos de ADN de varias formas, por ejemplo utilizando *de novo* síntesis de ADN, o enzimas de restricción, o nucleasas terminales, etc. Análisis de delección, por los que se generan fragmentos que comprenden delecciones 5' de varios tamaños pueden por ejemplo usarse para crear actividad transcripcional más fuerte y/o más específica.

[0035] En una forma de realización, la fuerza de los promotores y/o fragmentos promotores es de forma cuantitativa esencialmente idéntica a, o superior a, la del promotor 35S cuando se mide en el tricoma glandular. Preferiblemente, la fuerza de los promotores y/o fragmentos promotores es de forma cuantitativa también esencialmente idéntica a, o superior a, la del promotor de metilcetona sintasa 1 de *Solanum lycopersicum* (MKS1) (promotor de MKS1; Sol Genomics Network entrada Solyc01g108780.2) cuando se mide en el tricoma glandular.

[0036] En la presente descripción, los promotores que comprenden o consisten en SEQ ID N°: 4, 3, 1 o 2, variantes de las mismas o fragmentos funcionales de cualquiera de estas, son preferiblemente insensibles a al menos un (pero preferiblemente más, de la forma más preferible cualquier) estrés/estreses biótico(s) y/o abiótico(s) a los que la planta o célula(s) vegetales, tejidos u órganos que comprenden el promotor puedan estar expuestos (véase a continuación). Así, la actividad permanece constitutiva y fuerte en los tricomas durante la exposición a una o más condiciones de estrés.

[0037] En la presente descripción, también se enseñan "variantes" de los promotores específicos de los tricomas anteriormente mencionados, y fragmentos funcionales de tales variantes. Estas variantes incluyen secuencias de ácido nucleico esencialmente similares a SEQ ID N°: 4 y/o SEQ ID N°: 3 y/o SEQ ID N°: 1 y/o SEQ ID N°: 2 (y fragmentos funcionales de estas secuencias variantes, como se ha descrito anteriormente), y tienen actividad de promotor, es decir que son también capaces de proporcionar transcripción (preferiblemente constitutiva, más preferiblemente constitutivamente alta) en los tricomas vegetales. Las secuencias que son "esencialmente similares" a SEQ ID N°: 4 y/o 3 y/o 1 y/o SEQ ID N°: 2 son secuencias de ácido nucleico que comprenden al menos aproximadamente una identidad de secuencia de ácido nucleico del 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 % o más a SEQ ID N°: 4 y/o a la SEQ ID N°: 3 y/o SEQ ID N°: 1 y/o SEQ ID N°: 2, utilizando el alineamiento por pares de Needleman y Wunsch o de Smith Waterman (por ejemplo el programa "needle" o "water" en Emboswin, por ejemplo versión 2.10.0, con las penalizaciones de creación de espacio y de extensión de espacio predeterminadas) y que son específicas de los tricomas en su actividad. En una forma de realización preferida, la actividad de las variantes (y fragmentos funcionales) es fuerte en tricomas, es decir de forma cuantitativa al menos tan fuerte como (o más fuerte que) la actividad proporcionada por SEQ ID N°: 4, 3, 2 o 1. También la especificidad del tipo de célula es al menos como la especificidad de SEQ ID N°: 4, 3, 2 o 1 o más específica. En otra forma de realización, la actividad de estas variantes (y fragmentos funcionales de las mismas) es insensible a uno o más estreses bióticos y/o abióticos.

[0038] Está claro que se pueden utilizar muchos métodos para identificar, sintetizar o aislar variantes o fragmentos funcionales de las secuencias de ácido nucleico proporcionadas aquí, tales como hibridación de ácido nucleico, tecnología PCR, análisis *in silico* y síntesis de ácido nucleico, y similares. Por ejemplo, se puede utilizar hibridación de ácido nucleico para identificar secuencias de ADN en otras especies o variedades vegetales que hibridan a SEQ ID N°: 4, 3, 1 o 2, o a fragmentos de estas, bajo condiciones de hibridación astringentes o moderadamente astringentes.

[0039] Alternativamente, se pueden examinar bases de datos de secuencias *in silico* para secuencias variantes usando algoritmos conocidos, tales como BLAST, FASTA, etc. De esta manera resulta realizable aislar secuencias variantes de otras especies vegetales o de otras variedades de tomate. Se incluyen especialmente aquí los promotores de otros alelos de los mismos genes (ShzFPS, ShZIS y ShTPS9) encontrados en otras variedades de tomate o en otras especies vegetales, especialmente especies del género *Solanum*, como se describe a continuación. Por ejemplo, se pueden construir bancos de ADNc de una o más especies vegetales, una o más variedades, o tejidos diferentes de una especie o variedad. Los bancos de ADNc se pueden examinar para monoterpene sintasa 1 o ADNc de sesquiterpene sintasa 1 (usando por ejemplo sondas o cebadores derivados de SEQ ID N°: 4, 3, 1, 2, o fragmentos o variantes de las mismas). Igualmente, se pueden utilizar métodos de exposición diferenciales (tales como ADNc-AFLP) para identificar tales transcripciones. Métodos tales como TAIL-PCR (Liu et al. 1995, Genomics 25(3):674-81; Liu et al. 2005, Methods Mol Biol. 286:341-8), Linker-PCR, o PCR inverso (IPCR) se pueden utilizar para aislar la región reguladora de la transcripción aguas arriba del gen.

[0040] En la presente descripción, variantes de los mismos genes, es decir ortólogos y/o homólogos de la sintasa de los genes que codifican farnesil difosfato sintasa (ShzFPS), zingibereno sintasa (ShZIS) y germacreno sintasa (ShTPS9), respectivamente, incluyen por ejemplo secuencias de ácido nucleico (ADN o ARN) o secuencias de aminoácidos que comprenden al menos una identidad de secuencia de ácido nucleico o aminoácidos del 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 % o más con la secuencia de ácido nucleico o la secuencia de

aminoácidos del número de registro de GenBank FJ194969 (*S. habrochaites* zFPS ADNc y proteína; Sallaud et al., 2009 - Plant Cell), JN990661 (*S. habrochaites* ZIS; Gonzalezs-Vigil et al., 2012 - Plant Journal cDNA and protein), y JN402388 (*S. habrochaites* TPS9 ADNc; Bleeker et al. 2011 - Plant Mol. Biol. 77(4-5):323-336). Preferiblemente se identifica la identidad de secuencia por alineamiento por pares utilizando el alineamiento por pares de Needleman y Wunsch o de Smith Waterman (por ejemplo el programa "needle" o "water" en Embosswin, por ejemplo versión 2.10.0, con penalizaciones de creación de espacio y de extensión de espacio predeterminadas). Los promotores de estas variantes son preferiblemente también específicos de los tricomas en su actividad. Se pueden utilizar métodos tales como ADNc-AFLP, otros métodos basados en PCR o hibridación Northern para aislar o identificar tales genes. Su promotor se puede clonar usando métodos conocidos. En una forma de realización preferida, el promotor se obtiene a partir de un gen de ShzFPS, ShZIS o ShTPS9 a partir de una planta de la familia *Solanaceae*, tales como especies del género *Solanum* (incluyendo la especie reclasificada de *Lycopersicon*), *Nicotiana*, *Capsicum*, *Petunia*, *Coffea*, etc. Se desean especialmente ortólogos de especies salvajes.

[0041] Si una secuencia de ácido nucleico (o fragmento de una variante) tiene actividad de promotor constitutiva, es decir es capaz de conferir transcripción específicamente en tricomas, si la actividad es "fuerte", y si la actividad de la secuencia de ácido nucleico es insensible a al menos un (pero preferiblemente a más, de la forma más preferible a cualquier) estrés biótico y/o abiótico al que la célula, tejido, órgano u organismos transgénicos (especialmente planta o célula vegetal), puedan estar expuestos, se puede determinar utilizando varios métodos. Generalmente, uno puede distinguir métodos cualitativos y métodos cuantitativos. Los métodos cualitativos (tales como coloración de GUS histológica) se utilizan para determinar la actividad espaciotemporal del promotor (si el promotor es o no activo en un tejido u órgano determinado, o bajo determinadas condiciones medioambientales/de desarrollo), mientras que los métodos cuantitativos (tales como ensayos de GUS fluorométricos) también cuantifican el nivel de actividad, en comparación con los controles. Controles adecuados son, por ejemplo, plantas transformadas con vectores vacíos (control negativo) o transformadas con constructos que comprenden otros promotores, como el promotor *Arabidopsis* CER6 (Hooker et al. 2002, Plant Phys 129, 1568) que es activo en la epidermis y los tricomas de *N. tabacum*, o plantas de *Arabidopsis* no transgénicas.

[0042] En la presente descripción, para evaluar y opcionalmente cuantificar la actividad relativa o absoluta, una molécula de ácido nucleico clonada o sintética, tales como SEQ ID N°: 4, 3, 1 o 2, o variantes de las mismas, o fragmentos de cualquiera de estas, puede ser operativamente enlazada a una secuencia de ácido nucleico conocida (por ejemplo un gen reportero, tal como *gusA*, o cualquier gen que codifica una proteína específica) y se puede usar para transformar una célula vegetal usando métodos conocidos y regenerar una planta a partir de la misma.

[0043] La actividad del promotor puede, por ejemplo, ser ensayada (y opcionalmente cuantificada) detectando el nivel de transcripciones de ARN de la secuencia de ácido nucleico aguas abajo, especialmente en las células de los tricomas. Esto se puede realizar usando métodos cuantitativos, tales como por ejemplo RT-PCR cuantitativo u otros métodos basados en PCR y similares. Alternativamente, la proteína reportera o la actividad de la proteína reportera se puede ensayar y cuantificar. Por ejemplo, si el gen reportero es el gen *gus*, se puede utilizar un ensayo de GUS fluorométrico, como se describe en los ejemplos. De esta manera, los niveles de actividad de promotor cuantitativa de plantas transformadas o células vegetales mantenidas bajo condiciones fisiológicas normales (sin estrés) pueden ser comparados con los niveles de plantas o células vegetales que están expuestas a uno o más estreses bióticos o abióticos. También, se pueden comparar los niveles de actividad relativa o absoluta en las células de los tricomas con los promotores de control constitutivos, tales como el promotor 35S, promotor doble 35S, o con otros promotores que tienen actividad en tricomas, tales como el promotor MKS1, promotor CYP71D16 o promotor OASA1. Se entiende que los niveles de actividad de promotor medios preferiblemente se determinan y comparan usando métodos estadísticos.

[0044] Así, se puede evaluar si se descubre actividad en células de los tricomas en un tiempo determinado (actividad espaciotemporal), por ejemplo, mediante la transformación de plantas o células vegetales con un constructo de gen promotor-reportero y analizando los tricomas durante varias etapas de desarrollo para la transcripción de ARN o la proteína reportera (o su actividad). Una prueba simple emplea por ejemplo coloración de GUS histoquímica, en la cual la evaluación visual de color de azul indica actividad en tricomas y en varias etapas de desarrollo de los tricomas.

[0045] Como se ha mencionado anteriormente, se prefiere que la actividad de promotor sea constitutiva y fuerte preferiblemente también en las células de los tricomas, especialmente en las especies huéspedes o en la variedad en la que se introduce la secuencia. Actividad constitutiva significa que la transcripción de cualquier secuencia de ácido nucleico operativamente enlazada al promotor se produce preferiblemente en las células de los tricomas bajo la mayoría de condiciones (normales, sin estrés) fisiológicas y de desarrollo. En una forma de realización, los promotores según la invención son preferiblemente inactivos en células epidérmicas. Preferiblemente los promotores son activos en todos los tricomas glandulares encontrados en tallos, flores y/u hojas (jóvenes).

[0046] Preferiblemente, los promotores enseñados aquí proporcionan actividad fuerte constitutiva en tricomas de todas las especies vegetales, tanto especies dicotiledóneas como especies monocotiledóneas, tales como las que se describen a continuación (por ejemplo tomate, tabaco, *Brassica*, melón y lechuga y otras).

5 [0047] La fuerza (actividad cuantitativa) de los promotores según la presente descripción (incluyendo fragmentos o variantes) en cuanto a su capacidad para conducir la expresión de secuencias de ácido nucleico enlazada (3')
 10 aguas abajo se puede determinar de forma cuantitativa usando varios métodos conocidos. Por ejemplo, la cantidad de transcripción transcrita (ARNm) se puede cuantificar usando el método de ensayo Northern Blot RT-PCR cuantitativo o secuenciación de última generación. Preferiblemente, la fuerza del promotor es al menos
 15 esencialmente igual a la actividad en los tricomas del CaMV 35S (Franck et al., supra) bajo condiciones normales (sin estrés). "Fuerte" significa, por tanto, que la fuerza del promotor es preferiblemente al menos aproximadamente idéntica, pero más preferiblemente más fuerte que la del promotor 35S en tricomas bajo
 20 condiciones normales no estresadas. De la forma más preferible, la actividad de promotor cuantitativa media en los tricomas es al menos equivalente a la actividad del promotor CaMV 35S, o es al menos un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 70 %, 75 %, o más, superior a la actividad media del promotor CaMV 35S en tricomas. Se entiende que se debería comparar el mismo número de copias y nivel de cigosidad de transformantes, por ejemplo hemicigotos u homocigóticos para el transgén. Preferiblemente, se identifican y comparan transformantes de copia única. La fuerza del promotor 35S en los tricomas de una planta huésped se puede evaluar analizando y preferiblemente cuantificando por ejemplo la expresión génica de GUS en una planta p35S-GUS y comparándola con la expresión de los promotores según la invención.

25 [0048] Preferiblemente, la fuerza del promotor es al menos esencialmente igual a la actividad en tricomas del promotor de metilcetona sintasa 1 de *Solanum lycopersicum* (SIMKS1) (Fridman et al., supra) bajo condiciones fisiológicas (no estresadas). "Fuerte" significa, por tanto, que la fuerza del promotor es preferiblemente al menos aproximadamente idéntica, pero más preferiblemente más fuerte que la del promotor SIMKS1 en tricomas bajo
 30 condiciones fisiológicas no estresadas. De la forma más preferible, la actividad de promotor cuantitativa media en los tricomas es al menos equivalente a la actividad del promotor SIMKS1, o es al menos dos veces, 4 veces, 6 veces, 8 veces, 10 veces o más, superior a la actividad media del promotor SIMKS1 en tricomas. Se entiende que se debería comparar el mismo número de copias y nivel de cigosidad de transformantes, por ejemplo hemicigotos u homocigóticos para el transgén. Preferiblemente, se identifican y comparan transformantes de copia única. La fuerza del promotor SIMKS1 en los tricomas de una planta huésped se pueden evaluar analizando y preferiblemente cuantificando por ejemplo la expresión génica de GUS en una planta p SIMKS1-GUS y comparándola con la expresión de los promotores según la invención.

35 [0049] Así, la fuerza de los promotores según la presente descripción permanece preferiblemente esencialmente intacta, o al menos no se reduce (o no se reduce significativamente), cuando los tejidos u órganos vegetales o las plantas que comprenden el promotor están expuestos a condiciones de estrés, seleccionadas de al menos una o preferiblemente de varias de: estrés por sequía, estrés por calor, estrés hídrico (tanto por exceso como por
 40 carencia), estrés por patógenos (por ejemplo infección viral tal como CMV, infección fúngica, infección bacteriana, etc.), estrés por plaga (por ejemplo alimentación de insecto), herida, estrés por sal, estrés por radiación, etc. Nuevamente, se pueden utilizar pruebas cuantitativas para determinar esto. Por ejemplo, plantas recombinantes que comprenden el promotor se pueden transferir a partir de un ambiente de temperatura normal a un ambiente caliente (tal como de aproximadamente 27°C a hasta aproximadamente 50°C), y la actividad de promotor en varios tejidos se puede comparar con la actividad en los mismos tejidos bajo las condiciones de
 45 temperatura normales y calientes.

[0050] En la presente descripción, se proporciona el uso de cualquiera de los promotores anteriores para la expresión de secuencias de ácido nucleico homólogas o heterólogas en una célula u organismo recombinante, especialmente una célula vegetal o planta. Este uso comprende conectar operativamente el promotor a una
 50 secuencia de ácido nucleico homóloga o heteróloga y transformar una planta o célula vegetal, como se describe más adelante.

[0051] Aunque el foco anterior está sobre el uso de los promotores según la presente descripción en plantas y células vegetales, es también una forma de realización de la invención el uso de los promotores para la
 55 expresión de secuencias de ácido nucleico homólogas o heterólogas en otras células y organismos, tales como en cualquier célula u organismo eucariótica o procariótica, por ejemplo bacterias, hongos (incluyendo levaduras, tales como *Pichia*, *Hansenula*, etc.), mamíferos, células o líneas celulares humanas, etc.

Genes quiméricos y vectores según la invención

60 [0052] En una forma de realización de la presente descripción, cualquiera de las secuencias de ácido nucleico anteriores con actividad de promotor se utiliza para hacer genes quiméricos y vectores que las comprenden para transferir el gen quimérico a una célula huésped y una expresión de una secuencia de ácido nucleico homóloga o heteróloga operativamente enlazada en células huéspedes, tales como células, tejidos, órganos u organismos enteros derivados de la(s) célula(s) transformada(s).
 65

[0053] Las células huésped son preferiblemente células vegetales. Cualquier planta puede ser un huésped adecuado, tales como plantas monocotiledóneas o plantas dicotiledóneas, por ejemplo maíz/grano (especie *Zea*, por ejemplo *Z. Mays*, *Z. diploperennis* (chapultepec), *Zea luxurians* (teosinte guatemalteco), *Zea mays* subesp. *huehuetenangensis* (teosinte de San Antonio Huista), *Z. Mays* subesp. *mexicana* (teosinte mexicano), *Z. Mays* subesp. *parviglumis* (teosinte de Balsas), *Z. perennis* (teosinte perenne) y *Z. ramosa*, trigo (especie *Triticum*), cebada (por ejemplo *Hordeum vulgare*), avena (por ejemplo *Avena sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*), centeno (*Secale cereale*), soja (especies *Glicina*, por ejemplo *G. max*), algodón (especies *Gossypium*, por ejemplo *G. hirsutum*, *G. barbadense*), especies *Brassica*. (por ejemplo *B. napus*, *B. juncea*, *B. oleracea*, *B. rapa*, etc.), girasol (*Helianto annuus*), tabaco (especies *Nicotiana*), alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (especies *Oryza*, por ejemplo *O. sativa* de grupo cultivar *indica* o grupo cultivar *japonica*), hierbas de forraje, mijo de aljofar (especies *Pennisetum*, por ejemplo *P. glaucum*), especies arbóreas, especies vegetales, tales como especies *Lycopersicon* (recientemente reclasificadas como del género *Solanum*), por ejemplo tomate (*Solanum lycopersicum*, sin. *L. esculentum*) tales como por ejemplo tomate cherry, var. *cerasiforme* o tomate corriente, var. *pimpinellifolium* o tomate arbóreo (*S. betaceum*, sin. *Cyphomandra betaceae*), patata (*Solanum tuberosum*) y otras especies *Solanum*, tales como berenjena (*Solanum melongena*), pepino (*S. muricatum*), cocona (*S. sessiliflorum*) y naranjilla (*S. quitoense*); pimientos (*Capsicum annum*, *Capsicum frutescens*), guisante (por ejemplo *Pisum sativum*), judía (por ejemplo especies *Phaseolus*), zanahoria (*Daucus carota*), especies *Lactuca* (tales como *Lactuca sativa*, *Lactuca indica*, *Lactuca perennis*), pepino (*Cucumis sativus*), melón (*Cucumis melo*), calabacín (*Cucurbita pepo*), calabacín (*Cucurbita maxima*, *Cucurbita pepo*, *Cucurbita mixta*), calabaza (*Cucurbita pepo*), sandía (*Citrullus lanatus* sin. *Citrullus vulgaris*), especies de fruta carnosa (uvas, melocotones, ciruelas, fresa, mango, melón), especies ornamentales (por ejemplo especies de rosa, *Petunia*, *Chrysanthemum*, azucena, tulipán, *Gerbera*), árboles leñosos (por ejemplo especies de *Populus*, *Salix*, *Quercus*, *Eucalyptus*), especies fibrosas por ejemplo lino (*Linum usitatissimum*) y cáñamo (*Cannabis sativa*). En una forma de realización, se prefieren especies vegetales, especialmente especies *Solanum* (incluyendo la especie *S. lycopersicum*).

[0054] Así, por ejemplo se pueden transformar especies de los siguientes géneros: *Cucurbita*, *Rosa*, *Vitis*, *Juglans*, *Fragaria*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Vigna*, *Citrus*, *Linum*, *Geranium*, *Manihot*, *Daucus*, *Arabidopsis*, *Brassica*, *Raphanus*, *Sinapis*, *Atropa*, *Capsicum*, *Datura*, *Cucumis*, *Hyoscyamus*, *Lycopersicon*, *Solanum*, *Nicotiana*, *Malus*, *Petunia*, *Digitalis*, *Majorana*, *Cichorium*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Bromus*, *Citrullus*, *Asparagus*, *Antirrhinum*, *Heterocallis*, *Nemesis*, *Pelargonium*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Ranunculus*, *Senecio*, *Salpiglossis*, *Browaalia*, *Glycine*, *Pisum*, *Phaseolus*, *Gossypium*, *Glycine*, *Lolium*, *Festuca*, *Agrostis*. Otra preferencia es para cada género de *Cucurbita*, *Brassica*, *Lycopersicon*, *Solanum*, *Oryza* y *Zea*. Una preferencia es para cada género de *Avena*, *Medicago*, *Capsicum*, *Nicotiana*, *Lactuca*, *Pisum*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Brassica*, *Solanum* (incluyendo *Lycopersicon*), *Oryza* y *Zea*.

[0055] La construcción de genes quiméricos y vectores para la introducción de genes quiméricos en el genoma de células huésped se conoce generalmente en la técnica. Para generar un gen quimérico la secuencia del promotor específico de los tricomas se enlaza operativamente a otra secuencia de ácido nucleico que se debe transcribir a las células huésped usando técnicas de biología molecular estándar. La secuencia del promotor puede ya estar presente en un vector de modo que la secuencia de ácido nucleico que se va a transcribir se inserta simplemente en el vector aguas abajo de la secuencia del promotor. El vector se usa después para transformar las células huésped y el gen quimérico se inserta preferiblemente en el genoma nuclear o en el genoma plásmido, mitocondrial o cloroplasto, de modo que la secuencia de ácido nucleico aguas abajo sea expresada debido a la actividad del promotor (por ejemplo, Me Bride et al., 1995 Bio/Technology 13, 362; US 5,693,507).

[0056] Un gen quimérico, por lo tanto, preferiblemente comprende un promotor específico de los tricomas como se ha descrito anteriormente, operativamente enlazado a una secuencia de ácido nucleico homóloga o heteróloga, y opcionalmente seguido de una secuencia de ácido nucleico no traducida 3' (UTR 3'). La secuencia de ácido nucleico homóloga o heteróloga puede ser una secuencia que codifica una proteína o péptido, o puede ser una secuencia que se transcribe en una molécula de ARN activa, tal como un ARN sentido y/o antisentido (ARN sentido y antisentido incluye por ejemplo ARNbc o estructuras de ARN en tallo-bucle) adecuado para silenciar un gen o familia genética en la célula o en el organismo huésped.

[0057] El gen quimérico que comprende un promotor específico de los tricomas se puede insertar de forma estable de una manera convencional en el genoma nuclear de una célula vegetal única, y la célula vegetal así transformada se puede usar de una manera convencional para producir una planta transformada que tenga un fenotipo alterado debido a la expresión del gen quimérico.

[0058] A este respecto, un vector T-ADN, que comprende un promotor específico de los tricomas (o variante o fragmento como se ha descrito anteriormente) operativamente enlazado a otra secuencia de ácido nucleico, en *Agrobacterium tumefaciens* se puede utilizar para transformar la célula vegetal, y luego, una planta transformada se puede regenerar a partir de la célula vegetal transformada utilizando los procedimientos descritos, por ejemplo, en EP 0 116 718, EP 0 270 822, publicación PCT WO 84/02913 y solicitud de patente europea publicada EP 0 242 246 y en Gould et al. (1991, Plant Physiol. 95, 426-434). La construcción de un vector T-ADN para la transformación vegetal por medio de *Agrobacterium* se conoce bien en la técnica. El vector T-ADN puede

ser bien un vector binario como se describe en EP 0 120 561 y EP 0 120 515 o bien un vector cointegrado que se puede integrar en el plásmido-Ti de *Agrobacterium* mediante recombinación homóloga, como se describe en EP 0 116 718.

5 [0059] En la presente descripción, los vectores de T-ADN preferidos contienen cada uno un promotor específico de los tricomas operativamente enlazado a la secuencia de ácido nucleico que se va a transcribir entre secuencias de borde de T-ADN, o al menos situado a la izquierda de la secuencia de borde adecuada. Las secuencias de borde se describen en Gielen et al. (1984, EMBO J 3, 835-845). Por supuesto, se pueden utilizar otros tipos de vectores para transformar la célula vegetal, usando procedimientos tales como transferencia de gen directa (como se describe en, por ejemplo en EP 0 223 247, o bombardeo con partículas o microproyectiles como se describe en US 2005/055740 y WO 2004/092345), transformación mediada por polen (como se describe, por ejemplo en EP 0 270 356 y WO 85/01856), transformación de protoplasto como, por ejemplo, se describe en US 4,684, 611, transformación de planta mediada por virus, transformación mediada por liposoma (como se describe, por ejemplo en US 4,536,475), y otros métodos tales como los métodos descritos para la transformación de ciertas líneas de maíz (por ejemplo, US 6,140,553; Fromm et al., 1990, Bio/Technology 8, 833-839; Gordon-Kamm et al., 1990, The Plant Cell 2, 603-618) y arroz (Shimamoto et al., 1989, Nature 338, 274-276; Datta et al. 1990, Bio/Technology 8, 736-740) y el método para transformar monocotiledóneas generalmente (WO 92/09696). Para la transformación de algodón véase también WO 00/71733, y para la transformación de arroz véase también los métodos descritos en WO 92/09696, WO 94/00977 y WO 95/06722. Para la transformación de sorgo véase por ejemplo Jeoung JM et al. 2002, Hereditas 137: 20-8 o Zhao ZY et al. 2000, Plant Mol Biol. 44:789-98). Para transformación de tomate o tabaco véase también An G. et al., 1986, Plant Physiol. 81: 301-305; Horsch R.B. et al., 1988, en: Plant Molecular Biology Manual A5, Dordrecht, Países Bajos, Kluwer Academic Publishers. pp. 1-9; Koornneef M. et al., 1986, en: Nevins D.J. y R.A. Jones, eds. Tomato Biotechnology, Nueva York, NY, EE.UU., Alan R. Liss, Inc. pp. 169-178). Asimismo, la selección y regeneración de plantas transformadas a partir de células transformadas es bien conocida en la técnica. Obviamente, para especies diferentes e incluso para variedades diferentes o cultivos de una única especie, los protocolos se adaptan específicamente para la regeneración de transformantes a alta frecuencia.

30 [0060] Además de la transformación del genoma nuclear, también la transformación del genoma plástido, preferiblemente el genoma de cloroplasto, se incluye en la invención. Una ventaja de la transformación de genoma plástido es que el riesgo de extensión del transgén (los transgenes) puede ser reducido. La transformación de genoma plástido puede llevarse a cabo como se conoce en la técnica, véase por ejemplo Sidorov VA et al. 1999, Plant J.19: 209-216 o Lutz KA et al. 2004, Plant J. 37(6):906-13.

35 [0061] La planta transformada resultante se puede usar en un esquema de cultivo de planta convencional para producir plantas más transformadas con el transgén. Se pueden seleccionar transformantes de copia única usando por ejemplo análisis de ensayo Southern Blot o métodos basados en PCR o el ensayo de tecnología Invader® (Third Wave Technologies, Inc.). Las células y plantas transformadas pueden distinguirse fácilmente de las no transformadas por la presencia del gen quimérico. Las secuencias del ADN de la planta que flanquean el sitio de inserción del transgén también pueden ser secuenciadas, con lo que se puede desarrollar un método de detección "específico de evento", para uso rutinario. Véase por ejemplo WO 01/41558, que describe equipos de detección de evento élite (tales como equipos de detección PCR) basados por ejemplo en la secuencia integrada y la secuencia (genómica) flanqueante.

45 [0062] En la presente descripción, la secuencia de ácido nucleico que va a ser transcrita, y opcionalmente traducida (si es una secuencia codificante), se inserta en el genoma de la planta de modo que la secuencia que se va a transcribir está aguas arriba (es decir 5') de las señales de regulación de la transcripción de extremidad 3' ("extremidad 3'") adecuadas (es decir señales de formación de transcripción y de poliadenilación). Las señales de poliadenilación y de formación de transcripción incluyen las del gen de nopalina sintasa ("3' nos" (Depicker et al., 1982 J. Molec. Appl. Genetics 1, 561-573.), el gen de octopina sintasa ("3' ocs") (Gielen et al., 1984, EMBO J 3, 835-845) y el gen T-ADN 7 ("3' gen 7) (Velten y Schell, 1985, Nucleic Acids Research 13, 6981-6998), que actúan como secuencias de ADN sin traducir 3' en células vegetales transformadas, y otras.

55 [0063] En una forma de realización la secuencia de extremidad 3' (o UTR 3') usada es la de una ShzFPS, ShZIS o ShTPS9, como la extremidad 3' del gen asociado a SEQ ID N°: 4, 3, 1 o 2 o una variante de las mismas.

60 [0064] La secuencia de ácido nucleico que se va a expresar es en una forma de realización de la presente descripción una secuencia que codifica una proteína o péptido, incluyendo proteínas o péptidos híbridos o proteínas de fusión. La secuencia codificante puede ser de cualquier origen, es decir vegetal, fúngico (incluyendo levadura), animal, bacteriano, sintético, vírico, humano, etc. También puede comprender una secuencia que codifica un péptido objetivo, tal como un péptido señal de secreción o una señal objetiva de plástido. Una secuencia codificante también se puede enlazar dentro del marco de lectura a un gen que codifica una etiqueta seleccionable o evaluable, tal como por ejemplo el gen neo (o *nptII*) (EP 0 242 236) que confiere resistencia a la kanamicina, de modo que la célula expresa una proteína de fusión que es detectable fácilmente. Aunque se puede utilizar la región de codificación (ADNc o ADN genómico) de cualquier gen, ejemplos de las regiones de

codificación de los siguientes genes son preferiblemente operativamente enlazados a un promotor según la presente descripción:

- 5 1. vías o genes de vía de transducción de señales de enfermedad de plagas o patógenos, o genes o vías de resistencia de enfermedad; por ejemplo proteínas antifúngicas o antivíricas, proteínas insecticidas, y similares.
2. genes o vías repelentes de herbívoros
3. genes o vías de atrayentes de plagas, patógenos o herbívoros (para generar cultivos intermedios o trampa)
- 10 4. genes o vías de biosíntesis de metabolito secundario, incluyendo genes para la producción de (sesqui)terpenos tales como epizingibereno, flavonoides o aceites, productos terapéuticos y/o farmacológicamente y cosméticamente importantes o compuestos valiosos industrialmente, genes que proporcionan compuestos nutricionales o nutraceuticos, saborizantes o fragancias, aromas (hierbas), genes atrayentes polinizadores
- 15 5. aplicaciones de fitorremediación por ejemplo genes de secreción de iones y de metales contaminantes (Psaras et al., 2000, Ann Bot 86, 73)

[0065] Los genes quiméricos o vectores según la presente descripción también pueden usarse para transformar microorganismos, tales como bacterias (por ejemplo *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, etc.) u hongos o algas o insectos, o los genes o vectores se pueden utilizar para diseñar virus. La transformación de bacterias con secuencia de ácido nucleico de esta invención, incorporada en un vehículo de clonación adecuado, puede llevarse a cabo de una manera convencional, preferiblemente utilizando técnicas de electroporación convencional como se describe en Maillon et al. (1989, FEMS Microbiol. Letters 60, 205) y WO 90/06999. Para la expresión de secuencias codificantes en la célula huésped procariótica, el uso del codón de la secuencia de ácido nucleico se puede optimizar consecuentemente (asimismo, para la expresión de secuencias codificantes en células vegetales, el uso del codón de la secuencia de ácido nucleico se puede optimizar como se conoce). Se deberían quitar las secuencias de intrones y se pueden hacer otras adaptaciones para una expresión óptima como se conoce.

[0066] Para obtener una expresión mejorada de una secuencia de ácido nucleico en plantas monocotiledóneas tales como especies gramíneas, por ejemplo maíz o arroz, un intrón, preferiblemente un intrón de monocotiledónea, se puede añadir al gen quimérico. Por ejemplo se ha probado que la inserción del intrón del gen de maíz Adh1 en la región reguladora 5' mejora la expresión en el maíz (Callis et. Al., 1987, Genes Develop. 1: 1183). Asimismo, el intrón HSP70, como se describe en US 5,859,347, se puede utilizar para mejorar la expresión. Así, se puede insertar uno o más intrones opcionalmente en cualquiera de las secuencias del promotor según la invención, o en la UTR 5' o la secuencia codificante.

[0067] También se incluyen en la presente descripción las plantas transgénicas (y partes de las mismas) que comprenden promotor específico de los tricomas, operativamente enlazado a una proteína o polipéptido que codifica una secuencia de ácido nucleico, como se describe más adelante.

[0068] En una forma de realización diferente de la presente descripción los promotores según la invención se utilizan para hacer un gen quimérico y vector para el silenciamiento génico, por el cual el promotor se enlaza operativamente a una secuencia de ácido nucleico sentido y/o antisentido de un gen objetivo (gen endógeno o familia genética que va a ser silenciado específicamente en células de los tricomas).

[0069] "Silenciamiento génico" se refiere a la reducción o inhibición completa de la expresión génica de uno o más genes objetivos. El uso de ARN inhibitorio para reducir o abolir la expresión génica está bien establecido en la técnica y es el objeto de diferentes reseñas (por ejemplo Baulcombe, 1996, Plant Cell 8: 1833-1844; Stam et al., 1997, Plant Journal 12: 63-82; Depicker y Van Montagu, 1997, Curr. Opin Cell Biol. 9: 373-382). Hay una serie de tecnologías disponibles para conseguir el silenciamiento génico en plantas, tales como genes quiméricos que producen ARN antisentido de todos o de parte de los genes objetivos (véase por ejemplo EP 0 140 308 B1, EP 0 240 208 B1 y EP 0 223 399 B1), o que producen ARN sentido (también referido como cosupresión), véase EP 0 465 572 B1.

[0070] El método más exitoso hasta el momento sin embargo ha sido la producción de ARN tanto sentido como antisentido del gen objetivo ("repeticiones invertidas"), que forma ARN bicatenario (ARNbc) en la célula y silencia el gen (los genes) objetivo(s). Los métodos y vectores para producción de ARNbc y silenciamiento génico se han descrito en EP 1 068 311, EP 983 370 A1, EP 1 042 462 A1, EP 1 071 762 A1 y EP 1 080 208 A1.

[0071] Un vector según la presente descripción puede por lo tanto comprender un promotor específico de los tricomas operativamente enlazado a un fragmento de ADN sentido y/o antisentido de un gen objetivo. Tramos cortos (sentidos y antisentidos) de la secuencia de gen objetivo, tales como al menos aproximadamente 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos de la secuencia codificante o no codificante pueden ser suficientes. Secuencias más largas son frecuentemente también usadas, tales como al menos aproximadamente 100, 200, 250, 300, 400, 500, 1000, 1500 nucleótidos, o más. Preferiblemente, los fragmentos sentidos y antisentidos se

separan por una secuencia separadora, tal como un intrón, que forma un bucle (u horquilla) tras la formación de ARNbc. Cualquier tramo del gen objetivo se puede utilizar para hacer un vector de silenciamiento génico y una planta transgénica donde el gen o familia genética objetivo se silencia. Una manera conveniente de generar constructos en horquilla es usar vectores genéricos tales como pHANNIBAL y pHELLSGATE, vectores basados en la tecnología Gateway® (véase Wesley et al. 2004, *Methods Mol Biol.* 265:117-30; Wesley et al. 2003, *Methods Mol Biol.* 236:273-86 y Helliwell & Waterhouse 2003, *Methods* 30(4):289-95.).

[0072] Mediante la elección de las secuencias de ácido nucleico conservadas del gen objetivo, los miembros de la familia de una planta huésped se pueden silenciar en las células de los tricomas.

[0073] Se incluyen aquí en la presente descripción también plantas transgénicas que comprenden promotor específico de los tricomas, operativamente enlazado a un fragmento de ADN sentido y/o antisentido de una secuencia de ácido nucleico de gen objetivo y que muestran un fenotipo de silenciamiento de gen objetivo. El fenotipo dependerá de la función del gen, y puede ser un cambio químico o molecular, visible o no visible de forma macroscópica. Tales genes quiméricos y vectores pueden, por lo tanto, también usarse para determinar o verificar la función de genes en tricomas.

[0074] Los genes quiméricos según la invención se pueden introducir de forma estable en el genoma huésped o pueden estar presentes como una unidad episomal.

Células y organismos transgénicos según la invención

[0075] Las células y organismos transgénicos, especialmente plantas, células vegetales, tejidos u órganos se describen obtenibles por los métodos anteriores. Estas células y organismos se caracterizan por la presencia de un gen quimérico en sus células o genoma por la presencia de un promotor según la invención. Además, la transcripción de ARNm o la proteína traducida pueden alterar el fenotipo de las células u organismo, por ejemplo los tricomas vegetales, especialmente los tricomas glandulares. En una forma de realización de la presente descripción el gen quimérico introducido en la planta está compuesto de partes que se dan todas naturalmente en el género o la especie huésped, por ejemplo si una planta huésped del género *Solanum* debe ser transformada, preferiblemente se usa el promotor según la invención a partir del género *Solanum* y se enlaza operativamente a una secuencia de ácido nucleico también a partir del género *Solanum* y opcionalmente a una UTR 3' a partir del género *Solanum*. Lo mismo se puede aplicar a las especies del huésped. Aunque la planta llevará un transgén, todos los elementos nucleótidos de la misma se encuentran naturalmente en el género o especie huésped (aunque no en esta combinación), reduciendo problemas reguladores y mejorando la aceptación pública.

[0076] La posición del gen quimérico en el genoma puede afectar a la actividad del promotor y el nivel de expresión del gen quimérico. Por lo tanto, los transformantes ("eventos" o "eventos de transformación") con expresión de niveles elevados constitutivos de proteína o de la transcripción sentido y/o antisentido (cuando se usan constructos de silenciamiento) se pueden seleccionar mediante por ejemplo análisis del número de copias (análisis de ensayo Southern Blot), niveles de transcripción de ARNm (por ejemplo análisis de ensayo Northern Blot o RT-PCR) o analizando la presencia y nivel de proteína codificada por la secuencia de ácido nucleico (por ejemplo SDS-PAGE seguido de análisis de ensayo Western Blot; ensayos ELISA, ensayos inmunocitológicos, etc.). Los transformantes también pueden ser evaluados para la estabilidad de la expresión bajo una o más condiciones de estrés biótico y/o abiótico y aquellos eventos que retienen una elevada expresión constitutiva bajo una o más de las condiciones deseadas se pueden identificar y seleccionar para otro uso.

[0077] Las plantas transgénicas se pueden usar en los métodos de cultivo tradicional, tales como cruce, autofecundación, retrocruce, etc. Con la autofecundación de los transformantes, se pueden generar plantas que sean homocigóticas para el transgén. Procedimientos de cultivo se conocen en la técnica y se describen en libros de texto estándar de cultivo vegetal, por ejemplo, Allard, R.W., *Principles of Plant Breeding* (1960) Nueva York, NY Wiley, pp. 485; Simmonds, N.W., *Principles of Crop Improvement* (1979), Londres, Reino Unido, Longman, pp. 408; Snee, J. et al., (1979) *Tomato Breeding* (p. 135-171) en: *Breeding of Vegetable Crops*, Mark J. Basset, (1986; editor), *The Tomato crop: a scientific basis for improvement*, por Atherton, J.G. & J. Rudich (editores), *Plant Breeding Perspectives* (1986); Fehr, *Principles of Cultivar Development-Theory and Technique* (1987) Nueva York, NY, MacMillan.

[0078] Las células u organismos transgénicos también pueden usarse en cultivos de células (cultivos de célula vegetal, cultivos de célula fúngica o bacteriana tales como cultivos de levadura, cultivos de células de humanos o mamíferos, cultivos de células de insecto), por ejemplo para la producción a gran escala de proteínas recombinantes. En una forma de realización de la presente descripción se prevé un cultivo celular, que comprende células que comprenden un promotor según la invención.

Métodos y usos según la invención

[0079] También se proporciona un método para hacer una planta o célula vegetal transgénica, que incluye las etapas de:

- (a) generar un gen quimérico o un vector que comprende un promotor según la invención, operativamente enlazado a una secuencia de ácido nucleico que se va a expresar;
- (b) transformar una planta o célula vegetal con dicho gen quimérico o vector; y, opcionalmente,
- (c) regenerar una planta o plantas transgénicas.

[0080] En una forma de realización de este método según la presente descripción, un vector que comprende un promotor de la invención se usa en la etapa a), y dicho vector comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N°: 1, operativamente enlazado a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 5 (ShzFPS) o una variante de la misma teniendo al menos una identidad del 80 % con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 5, dicha secuencia de aminoácidos tiene actividad de farnesil difosfato sintasa. Dicha variante de SEQ ID N°: 5 puede tener al menos una identidad de secuencia del 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 5, preferiblemente a lo largo de la longitud total.

[0081] En una forma de realización de la presente descripción, un segundo vector que comprende un segundo promotor de la invención se usa en la etapa a), y dicho segundo vector comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N°: 2, operativamente enlazada a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 6 o una variante de la misma con al menos una identidad del 92 % con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 6, dicha secuencia de aminoácidos tiene actividad de zingibereno sintasa. Variantes de 7-epizingibereno sintasa (SEQ ID N°: 6) incluyen, por ejemplo, proteínas con al menos una identidad de secuencia de aminoácidos del 92 %, 92,5 %, 93 %, 93,5 %, 94 %, 94,5 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,5 % o más, tal como el 100 %, preferiblemente a lo largo de toda la longitud, con SEQ ID N°: 6.

[0082] Debe observarse que el vector y el segundo vector pueden combinarse en un vector único para los fines de la presente invención.

[0083] Así, el gen ShzFPS y el gen ShZIS son preferiblemente expresados en una planta o célula vegetal transgénica bajo control de su propio promotor. En una forma de realización de la presente descripción, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 5 y/o SEQ ID N°: 6 está precedida por una secuencia objetivo, por ejemplo, para el objetivo del Z-Z-farnesil pirofosfato sintasa y/o la 7-epizingibereno sintasa para organelos intracelulares tales como plástidos, preferiblemente cloroplastos, o mitocondria, o para secreción desde la célula. El objetivo para plástidos es particularmente atractivo ya que la sobreproducción de sesquiterpenos en el citosol es normalmente tóxica para las células, mientras que la sobreproducción de sesquiterpenos en plástidos no padece este problema. La secuencia de identificación puede ser la secuencia de identificación natural de dicha Z-Z-farnesil pirofosfato sintasa (como se expone en SEQ ID N°: 7) y/o la secuencia de identificación natural de la 7-epizingibereno sintasa (como se expone en SEQ ID N°: 8). Alternativamente, se puede utilizar otra secuenciación objetiva. La persona experta será capaz de seleccionar una secuencia objetiva adecuada si es necesario.

[0084] Preferiblemente, dicha planta o célula vegetal no es una planta o célula vegetal de *Solanum habrochaites*.

[0085] La invención también enseña una planta transgénica o célula vegetal obtenible por el método aquí expuesto. En una forma de realización, dicha planta o célula vegetal no es una planta o célula vegetal de *Solanum habrochaites*. Preferiblemente, dicha planta o célula vegetal es una planta o célula vegetal de *Solanum lycopersicum*.

[0086] La planta regenerada (o descendiente de la misma que retiene el transgén) o partes de la misma se pueden utilizar para varios fines, tales como en la agricultura como tal o para agricultura molecular. El otro uso depende del fenotipo conferido por el transgén. Por ejemplo, si la planta transgénica produce altos niveles de un metabolito secundario en los tricomas, se cultivarán las plantas y se cosechará el metabolito. Así, se puede cosechar la totalidad o parte de las plantas bien para consumo humano o animal o bien para uso industrial, dependiendo del transgén. También, se pueden cosechar partes diferentes de la planta para usos diferentes, por ejemplo la fruta o semillas se pueden cosechar para consumo, mientras que las hojas, tallos y/o flores se pueden cosechar para uso industrial.

[0087] Obviamente, el fenotipo conferido por el transgén puede ser evaluado, por ejemplo en pruebas de campo (por ejemplo pueden llevarse a cabo pruebas de resistencia a enfermedades o plagas usando métodos convencionales).

[0088] Se pueden identificar plantas transgénicas que proporcionan actividad de promotor constitutivamente alta en tricomas bajo condiciones sin estrés, y en las cuales la actividad de promotor permanece esencialmente intacta (al menos no se reduce, o no se reduce significativamente) cuando la planta está expuesta a uno o más estreses bióticos y/o abióticos.

5

[0089] Las plantas se pueden utilizar en métodos agrícolas y de cultivo convencionales.

[0090] Los siguientes ejemplos no limitativos describen el uso de promotores según la presente descripción. A menos que se indique de otro modo en los ejemplos, todas las técnicas de ADN recombinantes se realizan según protocolos estándar como se describe en Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, y Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; y en los volúmenes 1 y 2 de Ausubel et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, EE.UU. Se describen materiales y métodos estándar para el trabajo molecular de planta en *Plant Molecular Biology Labfax* (1993) por R.D.D. Croy, publicado conjuntamente por BIOS Scientific Publications Ltd (Reino Unido) y Blackwell Scientific Publications, Reino Unido.

10

15

Breve descripción de las figuras

20

[0091]

La figura 1 muestra coloración GUS específica de los tricomas de una planta *Solanum lycopersicum* que fue transformada con pTPS9:GUS. Muestra que el promotor TPS9 era específicamente activo en tricomas de *S. lycopersicum*.

25

La figura 2 muestra coloración GUS específica de los tricomas de una planta *Solanum lycopersicum* que fue transformada con pzFPS:GUS. Muestra que el promotor zFPS era específicamente activo en tricomas de *S. lycopersicum*.

30

La figura 3 muestra expresión de GUS específica de los tricomas. Se realizó Q-PCR con dos conjuntos independientes de cebadores para determinar la expresión de GUS en tricomas de 3 plantas transgénicas independientes transformadas con GUS conducido por el promotor *ShTPS9* (SEQ ID N°: 4). La expresión de un gen de tomate específico de los tricomas endógeno, *MKS1*, se estableció en 100 %. Evidentemente, la actividad del promotor *ShTPS9* excedió ampliamente (10-100 veces) la actividad del promotor *SIMKS1*.

35

La figura 4 muestra expresión específica de los tricomas de GUS. Se realizó Q-PCR con dos conjuntos independientes de cebadores para determinar la expresión de GUS en tricomas de 2 plantas transgénicas independientes transformadas con GUS conducido por el promotor *zFPS* (SEQ ID N°: 1). La expresión de un gen de *Solanum lycopersicum* específico de los tricomas endógeno, *MKS1*, se estableció en 100 %. Evidentemente, la actividad del promotor *ShzFPS* excedió ampliamente (8-65 veces) la actividad del promotor *SIMKS1*.

40

Listado de secuencias

[0092]

45

SEQ ID N°: 1: secuencia del promotor *ShzFPS*.

TGGCCATTACGTGGACTAATTTTTTTACAATAAATGATCACTTTATTTTTTAACAAGTATGAT
TAATAATTAATTGAAATTAGTGAGTTTGAAATTTGACTTTTTGTTTAGCCTATGAGCAAACC

ES 2 651 714 T3

TTTAAAGTTAATTCAAAATTTAAAAGTTATTGATTTTTAATCATGTTTATGAATCAAATGTGA
TCAAAGGTCAAATCAACTGTCTCCCAAATAATTTTTTAAACTCGAGATGATTTGAAAT
TTTTTCAACCAATAGTTATATTTTCCAATGTCATATTATTA AAAACTTGAGGCTAATCCA
TCCTGGAATTTATGACTATAGTTATAGTTATCTTAGACTCTTAGCTGCGTTATAGTCAGAC
TTGATAATTATTA AAAAGTGTGTGACTCTGATTTTTACATATGACGATTTGAGAAATTGA
TAATCTAGAAAGCTATATCATGAAAAATTCTAAGAATGATTGAAGATAATAAGAATATTTT
GAAATATCGCAACCCTACCACAAAGTTTTACCAACCTATTTTCTTTTATATAGATATGAGC
TATATGACACATGGAAATACAATTATAAAGCAGTAGTTAGAGGTGAATTAATATTGAATTT
TAAAGGGAATAATCAATGGATGATATCTTTTTACTTTTTTTCTTTTATCACTAAAAGTGC
ATTCATTGTAGACTAAAACACATTAATAGAGTTTTATATCCTTTTCTCATACATGGTCCC
TCATTTTCTTCTTAGTCTTGTATTATAAGTCACCTCTTTTTAAAATAATTGGATCATAATA
TATGTTATTTTATAAAATTTATGCATAAAATATCATATTTTGCTCATTATATTTTATTGATT
AATTAATAATCTTAAAATATATTTATTTTGACTGATCTTGAAAATCAATAACTAATTAATA
AGGGCATAGAAATAAAATTATCTTATTTCTTGTTACAAGTACAAATACAAAAGTGA CTTA
TAATATGGGACGGGGGGAGTAATTAAGTGAAAGGTTATTCGTTCTTTATTGGTATTATCA
GTTATTTAGGAGATAACTGATTTAGCAATTTTTAGTCTTTATTTATTTTATACACAGTTTAT
AAACATACTTACATTTTTGAACTTGGTGATGGCGTAGCCCAGGGGTGTTAAATGGGCG
GGTTGGGTTGAAATTGAAATATTACTATGGGTGAATAGAAATTGGGTTGGGTTTGACC
CGCCCAAATTTACTTTGGGCTCAAATGAGCTAAAATATGGGTTGGGTCTTGACCCGCTC
AATTTGACCCGCTTAATCTTAGTTATTTAACATATTGATATTTAATTTTTATAATCACAATTT
GAATCTCCGTTCAAGAATTTTTTTTTTATAATAAAAGTAACAAATGGATAGATAAATCATA
AAAAAAAAGCAACAAATCGATAATAATTCATACTGTAAATATAGGAACATATCTTAATACT
AAGTTATAAAACAGGTTGAAATTAGTAATTGAATTGGGCTCAATTGAGAATTCTCTTCAA
TAGGTTAAGCTTGAATGGGTTGAGGTTGAACCCAACTCAAATTATCTTGAGCTCAATCCT
TAAATTCTGAGCGTATTGGGCATGTTACCATGTTTGGGTTCAATTTTAAACGCCCTAGC
GTAGTCGAAAGAAGTCAATCCATGAGGTTTGTAAAACAAATGCGAATAATTTACTCTACC
ATTGAGCTTGTTAGTCATATGGTGTAGCAAATGGTAGATTATCGAAAAATATCTTAATT
ATGCTTCATAGTTATAATTTGTTAATTACAATTAGTAGCTACATGTTATATGGAGGAGAGT
GGCGAGCGAGATTGGGAGAGGAAAGAGAGAAGTGAGTGAGACAAGGTAGAGAGTGGG
AGAGAGGCGAACTGCATATGCATATTTGTCAAATAATTGTATATATGTA ACTGGTATAC
ATACGTATTCGTATATCTGGTGAGTGAGGAGAGAAAAGAGAGAAGCGAGCGAGATTGG
AAGAGGAAAGAGAGAGCCGAGCGAGAGAGGACAATAATTTATGTAATTCGCATCTCATT
TGTATAATTAATTTGTTTCGAAATGCGGTTCAATATAATTTTTTAAACCATAAGCATAAACAA
CCCTATATAGA ACTATTGATCAATATAGA ACTATTGATCTATTGATCAAAGAGTCATACC
ATAATTCTATTTAAACACCACCTCCCTTGTTTCACTTCACAATAAAATAAATTTGAGTAATA
AAGC

SEQ ID N°: 2: secuencia del promotor ShZIS.

ES 2 651 714 T3

CTCTCTCTAAAGAAGTTGAAGATACCTTCTTCCAGTAAGTGGGACTGGAGGGGGAGATT
TGTTGAATCCATCCCATTTTTTTTTGGTCAACTTTAGCTACTCAATTGGTACAAGCAATTGT
TAAAAAGGAATAGTAATTGGAGTTGAAAAGAAAAGATTTGGTAGTTGGCAAATTGGTAAG
ATTTGCAACCATTTTTGACTTTGCTATGTTTACATATGTCATTAGTGACATAGGTATGGTT
TTATCCTTCTATAAATAGCGCACTCTTGCTCATTGTAGAACACACCAAGTTAGAGAGAA
AAACAATTTTGAGAGCAAAGTGAGGTATTCCATAGACTATATAAGAAAATAGTCTGTGAA
GAAAATAGAGTGTGAGCGATATTTAGTAAGACGGAACCAAAGAGTGGTTGTTCCCTTT
TGAGTGTGTAGTAGTCACTTTGAGTATTGTATTGCTGACTACACAGTGAAAATTCCTTA
CTATAGTAATATCAATTGCTCCTCTTAGTCCGCGGTTTTTTCCCTTATTCAGAAGGGTTTC
CACGTAATAATTCTTGGTGTCAATTATTTCCATTTTATTTCCATTACTTTTACCATATATAC
TTTTGTGCTTGTCCGCGTTTTCCCAACAAGATGGTGTAAATAGAATTATGGTATGACTC
TTTTGATCAATAGTTCTATATAGGGTTGTTTCATGCTTATGGTTAAAAAATCATATTGAATC
GCATTTCGAATCAAATTGATAATACAAATGAGATGCGAAGCTTGCATGAGTTCCAAAAA
ATATAAATAACGGTAAAATGGTAAAGTTACATCATTTTTTAATGCAACTGCAAAGTAAAAA
TATAACATATAAAATGAGACAGAGGAAGTATGAAAATCAATAATGAATATGTATTACTCC
CTCTATTTTATAAATAACTTAAGCTTTGAAGTGTTCACACCCTTTAAAAAAGTAGGTTAG
GACATAAATGAACATAATTTTTTCAATTTTTGTCCTTATTAATTATTGTCAAAAATAACTAAAC
ATTAATTATAAATAACTAATCCAATACTAACTTAATGGGTAAAATTAGAAGAAATTTTTTAA
AATAGTCTTGAAAATTTAAACATAAGTTAATTGAAAATGGAAAGAAAAAAGCTCAAA
TCTTGTTATTATGTAATGGAGGGAGTATTAGACAGAGAAATTATTAATTRCTCCCTCCGT
CCCATATTATAAGTCACTTTTTTCAATTTGTAAGTGGCAACAAGAAATAAGATAATTTTATTTT
TATGCCCTTTGTTATAGATTTTTCAAATTAGTCAAAGTAAATATATTTTCAAAYTAATTA
TTAATCAATAAGGATATAATGAGCAAAATATGGTATTTAGTATAAATTTATAAATACATATA
TTATGATCAATATTTAGAGAAGGTGACCTATAATATGAAGGAAGAAATGAGGACCATATA
TGAGAAAGGATATAAACTCTATTTAATGTGTTTAGTGTACAATGAATGCACCTTTAGTGATA
AAGAAAAAGTTAAAAAATATCATCCATGATTATCCCTTTAAAATTTCGATATTAGTTCA
CCTCTAACTACTTACAATAATTGATTTCCATGTGTCATATAGCTCATATTTATATAAGAA
AATAGGTTGGTAAAACCTTTGTGGTAGGTTTGAGATATTTCAAATATTCTTATAATTTTC
AATTATTCTTCCAATTTTTTTCATGATATAGCTTTCTAGATCATCAATTTTCTTAAATCGTCA
TATGTGAAAATTGGAGTCACACACTTTTTAATAGTTATCAAGTTTGACTATAGCGCAGCTA
AGAGTCTAAGATAACTATAACAATAATCATAAATTACAGGATGGAATTAGCCTCAAGTTT
GTAATAACATGACATTCGAAAATATAACCATTGGATAAAAAAATTTCAAATCATCTCGAG
TTTATAAAAATTTTGGAGAGACAGTTGATTTTTGACCTTTTGATCACGTGTGATTCATAAA
CATGATCAAAAATCAACAATTTTTAATTTTTAATTGACTTTAAAGGTTTGCTAATAGGCTAA
ACGGAAGTCAAATTTCAAACACTACTATTTCAATTAATTATTAATCATACTATGTTAAAAATA
GTCCACGTAATGGCCAACAACCTAGCAAACTTATCACGAGATTCTATATGATACTATATA

ES 2 651 714 T3

TGCTTTGTTTTTCGATATTCATTTTATTTAAAGTTTGATATTTATATTTAAATTTAAATAGA
TTTTAAATTTGTATTAAGAAAATTCATTATAAAAGGTTGAAACATTTTCTAACAAAAAGATA
TGATGTCCACTTGAATCAAAGAGTAATAATGCTCATATACTTTTTCTGCTTTGAAATAAGA
TATGCGATAATGATTGACTAATAAAAATTAAGACTAGTCATTTATAGGGCAAACGTGC
ATTTTTACATTTAATTACACATCAAGKTTATACCAAAGTGAGATATTATAAGGAAAAATCTT
TGTGGCCAAAATTTTTGGACAGAACGATATTTTATTTATGTTATTTTAATTTAATACATTT
TAACTACAAAATGGAAAAATAACAGTTTATTATAAAATAAAAAAATATTTTAGTTTTTTTT
ATTTTTTTAGTCAATTTTTCTAGCCATTTAGCTCTTTCCATATTATAATATAAAGAGAAAAG
TATTTAAATATCTCTAAATTTGGTGTGAATTAATAGGTTTGTCTCCGAATTATTGACAAC
ATTAAACTACTCTCTACTTGACAAATTGAACTTAAACATATATACCCTTGATCTTGTCAC
ATCAGTGATATACAATCCCAAATTCCTCGTCAACTTTAGGGGTATTTTGAACACTTCTTTTTG
ACATTTTATTAAGAGTCTCACGTTCTACAAGAGTTTGAGACTACTTGATATGCCATGTG
GCAGACTGGAGTGTATTTTAAGTTCAGTTAGTCAACTAAACAATTTTTTTAGAGTAAATTT
TAGGTTTAAACAAACATAAAAATCATATATGTATGTTAATAATTATAGTTGGTATAATTGCG
CTTCATAGCAAACCTTTATGTTTGCTATGACTATTAATTTGTATATTTTGATATACATATA
AAAGAATGAATTGTATAATCTCTATTTGTATAAAGCGAGAACGAGAGAAGACAAATGAAA
ACTGGTAGCGAGAAATGGAGAGTGACGAAAGACAACACTGTTAATTTGAATCAATGATTT
GCTATTTTATACATTTTTTCTTATTTTTAAGACTATCAATAATTGAGTGACGAAATTAATA
ATTTGCATTAAATTTAATTAATAAATATTTTCAACATTTCTCTCCGCTAAATATTTATTTATAA
CGAGGAAACAAAATCAAAGACAAACACAAAATAGGAGAAATTTCTTCATTTTTGACCCCT
CCTACTCCCAAAAACAACACACAATATTCAAGG

SEQ ID N°: 3: secuencia del promotor ShTPS9.

TTATTTCACTAATTAATTTATTTCTTAAATATTTATATATATTTATTTTGCTATGCTAATTTAT
TTTTTTTATAATAAAATTTAGTTGAGTGATTTGATGGATACAAAGTCATAAATTGAATGACTT
AACTAAATAAATTATTAAGTTGAATGATATTATTGATAAAAAGACATAAATTGAATAATTT
TTTTGATATAAAATAAAGTTCAGATATTGTTACACAATTAACCATCCTTTTCAATTTTAATA
AATAAACTCCTCTTTAATATCGTTCTAATGAAAATTTCTTCCAACAACATAAATAATAAGT
TCATCATTTATCGACTAATTCATAAATATTATTTGAGTAATATCTATGCAATTTTTTACAAT
GTTTATATTATGTCATTTAAAAGATAAAGGACAGATGCCGGTAAGCATTACAATAAGTGGT
AGTAACTACATTATAAATAGGCCCATCCAATTAGCATAACTTAAACCCACAAATTAAGCTT
5 GAAAAAAAAGAGCAAACCTTAGAACAAACAAGCA

SEQ ID N°: 4: secuencia del promotor ShTPS9 (larga).

TTTAAATTTTATATTTATATTTAAACATTTTATTAATATATATATATATATAGCTATAAACTCA
ATAATTACGATGACTTACTATAAATTCGATTTTAAAGTTTGAACCTCAAAAATTTCTTAAACTC
10 TAATTCTACTTGTGTATTTCATCTAGCCTCTTATGACACGTaAAAAAAAATACAATAAATAAA

TTGCAATAACTCAAATTATTTATATGTGACATAAAGAATCGTGTGGCTCTAAAATTTTATTT
 CTCTGCGGTCCAATTAAGTTTTGATAATCCACCAAATTGAAGACTTAAAATGCCTTATTG
 AGGTGCCAAATACTAATGAAGAAGAAAACAAAACAAAATAAAAACACCTACTCATAAATT
 ATAATATAACTGTATCTCATTGCTAATATGACATTTAATAGGAGAGTATGAAAATCGATAA
 TTAGGATATATTGTTAATATATAATCAAACGTTTTATTTCTTCCTAGTGGTAGAGTAAGGT
 TCTAATCTAGAGCCCCTATCCCCTTACCATTACTGTTTAGTATTATGCAAGTTATTTTTTTA
 CTTTGATTATCTCTAATTTTTACTGTCGTTATTTTTGTTTTTTAATATAATTTTTGTCAT
 ATTTTTGCTGTTACAATACTTTCAAATCATGTTTTGAAGAATGATTTCTTGATCCGAGGA
 TCTATAGTAAACATTCTTTCTATCAAATAAAGATACATATAACTTATAAGGTCTGCATACAT
 AACTATCCTTCTCAAACCCCACTTATATGAAATGATACCAGATGACTGAGTCAATATCT
 CAAAAGTCACTCAAGTTAAGAATATATCTAGTAAAGTTATTAACCTTTCTTTACTATCA
 AATAAATCACTTAACTTAGATACGTGGATCAATAAAATCACTCAACTCAATTTATCATTAA
 AAAAATTATCATAGATAAATAATTTTTATGCCATGTAAATATGAACTCCATAAATTAATAA
 AATTAATAAATCCATCAAGACTTTTTTATGAATAAATTAATAATTTATTAGGATATTAT
 TATATAATTCTAATGTATTATTACGAGCTTTATTAAGAAAAAGTTAGGGTATTGTATGGTA
 AATAATTGGGGGTACATGATTTTTATCATATAAAAATATATAGACATTGGCTTAATAACTC
 TAACTCTGCAAATATACTCTGTTACGATCATTAAATTATAAAAATAAATTGACGTCTTATA
 ATTATTTTTCGTTGCAATCATTAAAGCCCTATGACAATATCAGTATATAGTAATTGGTAATG
 TAACATTCATTCTGATACCAATTTAAGTGCATAATAATATTATATTAATATTTATTTCACTA
 ATTAATTTATTCTTAAATATTTATATATATTTATTTTGTCTATGCTAATTTATTTTTTTATAA
 TAAAATTAGTTGAGTGATTTGATGGATACAAAGTCATAAATTGAATGACTTAACTAAATAA
 ATTATTAAGTTGAATGATATTATTGATAAAAAGACATAAATTGAATAATTTTTTTGATATA
 AAATAAAGTTCAGATATTGTTACACAATTAACCATCCTTTTCAATTTAATAAATAAACTCC
 TCTTTAATATCGTTCTAATGAAAATTTCTTCAAACAACATAAATAATAAGTTCATCATTTA
 TCGACTAATTCATAAATATTATTTGAGTAATATCTATGCAATTTTTTACAATGTTTATATTAT
 GTCATTTAAAAGATAAAGGACAGATGCCGGTAAGCATTACAATAAGTGGTAGTAACTACAT
 TATAAATAGGCCCATCCAATTAGCATAACTTAAACCCACAAATTAAGCTTGAAAAAAAAA
 GAGCAAACCTTAGAACAAACAAGCA

SEQ ID:5: Secuencia de aminoácido de Z,Z-farnesil-difosfato sintasa (zFPS) de *Solanum habrochaites*.

ARGLNKISCSLSLQTEKLCYEDNDNDLDEELMPKHIALIMDGNRRWAKDKGLDVSEGHKHL
 FPKLKEICDISSKLGIVITAFVSTENWKRAKGEVDFLMQMFEELYDEFSSRSGVRVSIIGCKT
 DLPMTLQKICIALTEETTKGNKGLHLVIALNYGGYYDILQATKSIVNKAMNGLLDVENINKNLFD
 QELESKCPNPDLLIRTGGVQRVSNFLLWQLAYTEFYFTKTLFPDFGEEDLKEAIINFQQRHR
 5 RFGGHTY

SEQ ID N°: 6: Secuencia de aminoácidos de 7-epi-zingibereno (ZIS) de *Solanum habrochaites*.

CSHSTPSSMNGFEDARDRIRESFGKVELSPSSYDTAWVAMVPSKHSLNEPCFPQCLDWIIE
 NQREDGSWGLNPSHPLLLKDSLSTLACLALTKWRVGDEQIKRGLGFIETQSWAIDNKDQI
 SPLGFEIIFPSMIKSAEKLNLNLAINKRDSTIKRALQNEFTRNIEYMSEGFELCDWKEIILHQ
 RQNGSLFDSPATTAALYHQHDKKCYEYLNLSILQQHKNWVPTMYPTKIHSLLCLVDLQNL
 GVHRHFKSEIKKALDEIYRLWQQKNEEIFSNVTHCAMAFRLLRISYYDVSSDELAEFVDEEHF
 FATSGKYTSHVEILELHKASQLAIDHEKDDILDKINNWTRTFMEQKLLNNGFIDRMSKKEVEL
 ALRNFYIISDLAENRRYIKSYEENNFKILKAAYRSPNINNKDLFIFSIRDFFELCQAQHQEELQQL
 KRWFEDCRDLQGLLSEQFISASYLCAIPIVPGPELSDARLVYAKYVMLLTIVDDHFESFASTD
 ECLNIIELVERWDDYASVGYKSERVKVLFMSFYKSIEEATIAEIKQGRSVKNHLINLWLKVMK
 LMLMERVEWCSGKTIPRIEELYVSSITFGSRLIPLTTQYFIGIKISKDLLESDEIYGLCNFTGIV
 LRLNLDLQDSKREQKEGSINLVTLMLKSISEEEAIMKMKKEILEMKRRELFKMVLVQKKGSQLP
 QLCKEIFWRTCKWAHFTYSQTDYRFPPEEMENHIDEVFKPLNH

5 SEQ ID N°: 7: Secuencia objetiva (secuencia de aminoácidos) de Z,Z-farnesil-difosfato sintasa (zFPS) de *Solanum habrochaites*.

MSSLVLQCWKLSSPSLILQQNTSISMGAFKGIHKLQIPNSPLTVS

10 SEQ ID N°:8: Secuencia objetiva (secuencia de aminoácidos) de 7-epi-zingibereno (ZIS) de *Solanum habrochaites*.

MIVGYRSTIITLSHPKLGNGKTISSNAIFRRSCRVR

15 **Ejemplos**

Selección de gen para aislamiento de promotor

[0093] Bancos de ADNc específico de los tricomas de *S. lycopersicum* y de tomate salvaje *S. habrochaites* fueron secuenciados utilizando tecnología de secuenciación de última generación (Illumina HiSeq 2000). Se utilizó el equipo TruSeq (Illumina) para preparar los bancos de ADNc. Tras la secuenciación, el análisis de datos mostró que la frecuencia de lecturas para farnesil difosfato sintasa de *S. habrochaites* (ShzFPS; FJ194969), zingibereno sintasa de *S. habrochaites* (ShZIS; JN990661), y germacreno sintasa de *S. habrochaites* (ShTPS9 JN402388) fue muy alta en comparación con otros genes específicos de los tricomas conocidos expresados en los tricomas de *S. habrochaites* (LA1777 y PI127826) y *S. lycopersicum* (por ejemplo, ShMKS1 y SIMTS1; véase la tabla 1). Posteriormente, se aisló ARN de diferentes tejidos de *S. lycopersicum* cv Moneymaker y de tomate salvaje *S. habrochaites*. Se evaluaron niveles de expresión específica de tejido de *ShzFPS*, *ShZIS* y *ShTPS9* en diferentes órganos vegetales que incluyen tricomas. La expresión de los genes *ShzFPS*, *ShZIS* y *ShTPS9* fue mucho superior que la de otros genes específicos de los tricomas bien conocidos (por ejemplo, *ShMKS1* y *SIMTS1*; tabla 1). Además, se mostró que la expresión de *ShzFPS* y *ShTPS9* era específica de los tricomas (figuras 1 y 2).

Tabla 1. El número de lecturas/transcripciones que se aplican a los genes siguientes como un % del número total de lecturas/transcripciones del banco.

Genes	S. hab LA_1777	S. hab PI127826	S. lyc LA_4024
ShzFPS	0,2354	0,1939	n/d
ShZIS	0,1406	0,1929	n/d
ShTPS9	0,0563	0,0036	n/d
ShMKS1	0,0058	0,0002	n/d
SIMTS1	n/d	n/d	0,0001

35 *Aislamiento de secuencia del promotor*

[0094] Para obtener secuencias del promotor se realizó un paseo genómico en el ADN genómico según el equipo Clontech GenomeWalkerUniversal. Se aisló el ADN genómico total del *S. habrochaites* PI127826. Dos µg de

ADNg fueron digeridos separadamente con diferentes enzimas de restricción de corte romo de reconocimiento de 6 bases, seguido de ligamiento de adaptador y dilución. Se realizó un primer ciclo de amplificación con el cebador adaptador 1 y un cebador específico de gen. Posteriormente, se realizó amplificación anidada secundaria con el cebador adaptador 2 y un cebador específico de gen anidado. Se realizaron ciclos adicionales de amplificación anidada. Los fragmentos de PCR amplificados fueron clonados y secuenciados con el método Sanger.

[0095] Un PCR anidado en los diferentes fragmentos de ADN genómico con cebadores adaptadores y específicos resultó en los nuevos fragmentos de secuencia del promotor. La clonación de productos PCR se realizó con el equipo Original TA Cloning® de Invitrogen usando plásmido pCR®2.1. Después de la secuenciación, se podrían diseñar nuevos cebadores inversos en la nueva secuencia fragmentada del promotor. Un PCR en ADN genómico con cebadores que contienen sitios de restricción apropiados para la clonación resultó en los fragmentos de ácido nucleico reguladores de ADN finales.

[0096] Basándose en la información de la secuencia 5' de las secuencias de ácido nucleico como se representan en los registros del GenBank n°. FJ194969 (ShzFPS), JN990661 (ShZIS) y JN402388 (ShTPS9) se diseñaron cebadores inversos específicos.

Equipo de cebadores:

[0097] Cebador adaptador 1 (AP1; 22-mer)
5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
Cebador adaptador anidado 2 (AP2; 19-mer)
5'-ACTATAGGGCAGCGTGGT-3'

Cebadores usados para paseo genómico para promotor ShzFPS (SEQ ID N°: 1)

Nombre de cebador	Secuencia 5' - 3'
Ciclo 1	
Intrón 1 de ShzFPS	GTGTACGTATATAAGGTATGAACAAAACTAC
Cebador anidado	CTAAAGTAATTAATTCCCATAGTAATTAAC
Ciclo 2	
Cebador promotor 1	GATTGACTTCTTTGACTACGCTAGGGGCG
Cebador anidado	CCCAAACATGGTAACATGCCAATACGCTC
Ciclo 3	
Cebador promotor 2	CTCTATTTAATGTGTTTTAGTCTACAATGAATGCACTTTTAGT
	G
Cebador anidado	CAAGACTAAGAAGAAAATGAGGGACCATGTATGAGAAAAGG

Cebadores usados para paseo genómico para promotor ShZIS (SEQ ID N°: 2)

Nombre de cebador	Secuencia 5' - 3'
Ciclo 1	
Exón 1 de ShZIS	CATTGATGAAGGGGACTGTGGC
Cebador anidado	TGCATCTTACTCTACATGATCTC
Ciclo 2	
Cebador promotor 1	CGAGAATTTGGGATTGTATATCACTGATGTGACAAGATCAAG
Cebador anidado	GTAGAGAGTAGTTTTAATGTTGTCAATAATTCGGAGACAAACC
Ciclo 3	
Cebador promotor 2	CAAAGCATATATAGTATCATATAGAATCTCGTGAT
	C
Cebador anidado	GTGATAAGTTTTGCTAGTTGTTGGCCATTACGTGGAC

Cebadores usados para paseo genómico para promotor ShTPS9 (SEQ ID N°: 3)

Nombre de cebador	Secuencia 5' - 3'
Ciclo 1	
Exón de cebador 1 ShTPS9	CGTAAATGGATATGTATCTCCTTGCTTC
Cebador anidado	GCTTCACTAACTTCAACCTTAAGAGAG

Cebadores usados para paseo genómico para promotor largo ShTPS9 (SEQ ID N°: 4)

Nombre de cebador	Secuencia 5' - 3'
Ciclo 1	
Exón de cebador 1 ShTPS9	CGTAAATGGATATGTATCTCCTTGCTTC
Cebador anidado	GCTTCACTAACTTCAACCTTAAGAGAG
Ciclo 2	
Cebador promotor 1	GAAAAGGATGGTTAATTGTGTAACAATATCTGAACTTTATTTTATAT C
Cebador anidado	GTTAAGTCATTCAATTTATGACTTTGTATCCATCAAATCACTCAAC

5 [0098] Las secuencias del promotor obtenidas se establecen a continuación.

Secuencias de promotor específico de los tricomas

[0099]

10

SEQ ID N.º 1: promotor ShzFPS de 2254 pares de bases
 SEQ ID N.º 2: promotor *ShZIS* de 3451 pares de bases
 SEQ ID N.º 3: promotor *ShTPS9* de 530 pares de bases
 SEQ ID N.º 4: promotor largo *ShTPS9* de 1875 pares de bases

15

Constructos de transformación

[0100] Se colocaron las secuencias finales del promotor ShzFPS y ShTPS9 (SEQ ID N°: 1 y 4, respectivamente) delante del gen marcador GUS-A en el vector pKG1662. El promotor y el gen marcador fueron posteriormente trasladados al sitio de clonación múltiple del vector binario pBIN-plus (Van Engelen et al., 1995, Transgenic Res, 288). Estos constructos se incorporaron en *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 y se usaron para transformar tomate *S. lycopersicum* var. MoneyMaker, según el método descrito por Koornneef et al. (1986. Transformation of tomato. En: Nevins D.J. y R.A. Jones, eds. Tomato Biotechnology. Nueva York, NY, EE.UU., Alan R. Liss, Inc. pp 169-178.). Se transformaron y regeneraron plantas bajo selección kanamicina y se cultivaron regenerantes primarios (T₀) para sembrar.

25

Análisis de expresión de transformantes

[0101] Se realizaron análisis de actividad de β-glucuronidasa (GUS) cuantitativos y cualitativos en plantas T₀.

30

[0102] Se efectuaron análisis cualitativos de actividad de promotor usando ensayos GUS histológicos. Se incubaron varias partes de planta durante toda la noche a 37°C en presencia de oxígeno atmosférico con sustrato Xgluc (5-bromo-4-cloro-3-indolilo β-D-glucuronida sal de ciclohexilamina) en el tampón de fosfato (1 mg/ml, K₂HPO₄, 40 mM, KH₂PO₄, 10 mM, pH 7,2, 0,2 % Triton X-100). Las muestras se limpiaron por lavado repetido con etanol. Se usaron plantas no transgénicas como controles negativos. Tricomas de plantas transgénicas con ShzFPSp:GUS y ShTPS9p:GUS mostraron tricomas azules brillantes mientras que los tejidos sin tricoma de estas plantas transgénicas y los tricomas de las plantas de control no transgénicas no estaban manchados (figuras 1 y 2).

35

[0103] Se efectuó un análisis cuantitativo de actividad de promotor en tricomas de plantas de tomate transgénicas usando Q-PCR para determinar la expresión de GUS en comparación con la de un gen específico de los tricomas bien conocido, es decir MKS1 (Uniprot E0YCS4_SOLLIC; Sol Genomics Network entrada Solyc01g108780.2) de *S. lycopersicum*. Para aislar tricomas, se cortaron peciolo de hoja y piezas de 4 cm de tallo de plantas transgénicas y no transgénicas de *S. lycopersicum* y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Se recogieron tricomas de las piezas de tallo congeladas mediante el método de vortex y se mantuvieron en nitrógeno líquido o almacenadas a -80° C hasta análisis posteriores. Se tomaron tres réplicas biológicas independientes para cada muestra. Posteriormente, se aisló ARN total con Qiagen RNeasy® Plant Mini Kit según las instrucciones del fabricante. En resumen, se trituraron 50 mg de tricomas en el nitrógeno líquido y el polvo fino se transfirió a tubos de Eppendorf pre congelados. Se interrumpieron los tricomas, se limpió el lisado celular de grandes detritos y se purificó y se eludió el ARN total vinculado a una columna. Los tampones suministrados se usaron en los volúmenes descritos. Se consiguió un rendimiento medio de 250 ng/μl de ARN total. Síntesis de ADNc: primero se trató el ARN total con el equipo de Promega RQ1 RNase-Free DNase para eliminar cualquier ADN genómico restante según el fabricante. Posteriormente, de 500 ng de ARN total se

50

sintetizó ADNc monocatenario cebado por un cebador oligodT anclado que utiliza el equipo de transcripción Superscript™ II Reverse de Invitrogen. El ADNc se diluyó tres veces antes de otras reacciones.

Para determinar y comparar la actividad de los promotores ShzFPS y ShTPS9 (SEQ ID N°: 1 y 4, respectivamente) con la actividad de un promotor específico de los tricomas bien conocido en el tomate (MKS1), realizamos un análisis qPCR. Se utilizó el equipo de Roche Applied Science LightCycler® 480 DNA SYBR Green I Master para la amplificación de qPCR de ADNc monocatenario. Las reacciones se compusieron esencialmente después del protocolo del fabricante con 2 µl de ADNc como materiales de entrada en un volumen final de 15 µl. Las reacciones se realizaron por triple. Los cebadores (como se enumeran en la tabla 2) se usaron en una concentración final de 0,5 pmol/µl y se evaluaron previamente para características de amplificación de producto lineal y único. Un equipo LightCycler® 480 se utilizó para las reacciones de amplificación. El perfil de amplificación fue: 5 min 95°C; 10s 95°C, 20s 58°C, 30s 72°C; 32 ciclos. Se registraron señales de fluorescencia verde SYBR y se calcularon valores Cp con el software de LightCycler® 480. Se utilizó un ajuste automático para corrección de fondo y corte. El método delta delta Ct se utilizó para calcular la concentración de actividades de promotor promedio independientes en comparación con la expresión del gen endógeno de MKS1 de *S. lycopersicum* (gen conocido específico de los tricomas). Los datos de qPCR de diferentes plantas de tomate transformadas independiente (expresión pShTPS9:GUS o pShzFPS:GUS) indicaron que se pueden encontrar niveles altos de ARNm para GUS en tricomas, indicando que los promotores de nuestra invención son altamente activos y específicos de los tricomas (figuras 3 y 4). Además, la actividad de promotor fue de órdenes de magnitud superiores a la de un promotor específico de los tricomas de tomate previamente descrito MKS1 descrito en bibliografía por Fridman et al. (2005; *supra*), Ben-Israel et al. (Plant Physiol. 2009, vol. 151 (4):1952-1964) y Yu et al. (Plant Physiol. 2010, vol. 154(1): 67-77.) (figura 3 y 4). Además, se mostró claramente que los promotores ShTPS9 y ShzFPS tienen actividad específica de los tricomas en las especies vegetales diferente de la de las especies donde ellos fueron identificados/aislados originalmente, es decir *S. habrochaites*. Esto indica que estos promotores son, además de ser altamente activos, de uso general en tricomas de otras especies vegetales.

Tabla 2: Secuencias de cebador qPCR:

MKS1: hacia adelante	5' CCAAATATCGATGCAACCACC
MKS1: inverso	5' AAATCCTCAATTGGGCTCAG
GUS1: hacia adelante	5' CTGATAGCGCGTGACAAAAA
GUS1: inverso	5' GGCACAGCACATCAAAGAGA
GUS2: hacia adelante	5' CCCTTACGCTGAAGAGATGC
GUS2: inverso	5' TTTTGTACGCGCTATCAG

Transformación y expresión específica de los tricomas de ShZIS

[0104] Una secuencia del promotor *ShZIS* (SEQ ID N°: 2) se coloca delante del gen marcador GUS-A en el vector pKG1662. El promotor y el gen marcador se trasladan posteriormente al sitio de clonación múltiple del vector binario pBIN-plus (van Engelen et al., 1995, Transgenic Res, 288). Este constructo se incorpora en *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 y se usa para transformar tomate *S. lycopersicum* var. MoneyMaker, según el método descrito por Koornneef et al. (1986. Transformation of tomato. En: Nevins D.J. y R.A. Jones, eds. Tomato Biotechnology. Nueva York, NY, EE.UU., Alan R. Liss, Inc. pp. 169-178.). Se transforman y se regeneran plantas bajo selección kanamicina y se cultivan regenerantes primarios (T0) para sembrar.

[0105] Se realiza un análisis de expresión de GUS y muestra una expresión altamente específica de los tricomas en *S. lycopersicum*. La expresión de GUS, y por lo tanto la actividad del promotor *ShZIS*, es significativamente superior a la de los promotores específicos de los tricomas conocidos descritos en la bibliografía (por ejemplo *ShMKS1*). Además, muestra que el promotor *ShZIS* es activo en tricomas de otras especies vegetales de las que se había aislado.

Producción de metabolito aumentada a través de ingeniería metabólica utilizando los promotores de esta invención.

[0106] Se muestra alta actividad de los promotores *ShzPFS*, *ShZIS* y *ShTPS9* utilizando ingeniería de vía metabólica. Se transforman plantas de tomate con el CDS de *ShzPFS* (secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:5) y *ShZIS* (secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 6) conducido por dos promotores conocidos *SIMTS1* y *ShMKS1*, respectivamente, (WO2009/082208 y Fridman et al., 2005, *supra*, respectivamente) y los promotores de SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, o SEQ ID N°: 4. Para valorar la actividad del promotor, se determinan niveles de transcripción de *ShzPFS* y *ShZIS* utilizando Q-PCR. Además, zingibereno, el producto final metabólico producido por la actividad de *ShzPFS* y *ShZIS*, se determina por GC-MS en estos conjuntos de plantas transgénicas. Ambos ensayos indican que la actividad de los promotores *ShzPFS*, *ShZIS* y *ShTPS9* es más fuerte que la de los promotores específicos de los tricomas previamente descritos.

Listado de secuencias

[0107]

- 5 <110> Keygene N.V.
<120> Promotores específicos de los tricomas
<130> P31429PC00
- 10 <150> US61/731,739
<151> 2012-11-30
- 15 <150> NL2009915
<151> 2012-11-30
<160> 32
<170> Versión de PatentIn 3.5
- 20 <210> 1
<211> 2254
- <212> ADN
<213> Solanum habrochaites
- 25 <400> 1

ES 2 651 714 T3

tggccattac	gtggactaat	ttttttacaa	taaatgatca	ctttatTTTT	aacaagtatg	60
attaataatt	aattgaaatt	agtgagtttg	aaatttgact	tttgtttagc	ctatgagcaa	120
acctttaaag	ttaattcaaa	attaaaagtt	attgatTTTT	aatcatgttt	atgaatcaaa	180
tgtgatcaaa	aggtcaaaat	caactgtctc	caaataaatt	tttttaaact	cgagatgatt	240
tgaaatTTTT	ttcaaccaat	agttatatTT	tccaatgtca	tattattaaa	aacttgaggc	300
taattccatc	ctggaattta	tgactatagt	tatagttatc	ttagactctt	agctgcgtta	360
tagtcagact	tgataattat	taaaaagtgt	gtgactctga	tttttcacat	atgacgattt	420
gagaaattga	taatctagaa	agctatatca	tgaaaaattc	taagaatgat	tgaagataat	480
aagaatattt	tgaaatatcg	caaccctacc	acaagttttt	accaacctat	tttcttttat	540
atagatatga	gctatatgac	acatggaaat	acaattataa	agcagtagtt	agagggtgaat	600
taatattgaa	ttttaaaggg	aataatcaat	ggatgatatc	ttttttactt	ttttttcttt	660
tatcactaaa	agtgcatcca	ttgtagacta	aaacacatta	aatagagttt	tatatccttt	720
tctcatacat	ggtccctcat	tttcttctta	gtcttgtatt	ataagtcacc	tctttttaaa	780
aataattgga	tcataatata	tgttatTTTT	taaaatttat	gcataaaaata	tcatatTTTT	840
ctcattatat	ttttattgat	taattaataa	tcttaaaata	tatttatTTTT	gactgatctt	900
gaaaatcaat	aactaattaa	ataagggcat	agaaataaaa	ttatcttatt	tcttggtaca	960
agtacaaata	caaaaagtga	cttataatat	gggacggggg	gagtaattaa	gtgaaagggt	1020
attcgttctt	tattggtatt	atcagttatt	taggagataa	ctgatttagc	aatttttagt	1080
ctttatTTTt	tttatacaca	gtttataaaa	catacttaca	tttttgaact	tggtgatggc	1140
gtagcccagg	ggtgttaaatt	gggcgggttg	ggttgaaatt	ggaaatatta	ctatgggtga	1200

ES 2 651 714 T3

atagaaattg	ggttggggtt	gacccgccca	aatttacttt	gggctcaaat	gagctaaaat	1260
atgggttggg	tcttgacccg	ctcaatttga	cccgcttaat	cttagttatt	taacatattg	1320
atatttaatt	tttataatca	caatttgaat	ctccgttcaa	gaattttttt	tttataataa	1380
aagtaacaaa	tggatagata	aatcataaaa	aaaaagcaac	aaatcgataa	taattcatac	1440
tgtaaataata	ggaacatatc	ttaataactaa	gttataaaaac	aggttgaaat	tagtaattga	1500
attgggctca	attgagaatt	ctcttcaaat	aggttaagct	tgaatgggtt	gaggttgaac	1560
ccaactcaaa	ttatcttgag	ctcaatcctt	aaaattctga	gcgtattggg	catgttacca	1620
tgtttggggtt	catttttaac	gcccctagcg	tagtcgaaag	aagtcaatcc	atgaggtttg	1680
taaaacaaat	gcgaataatt	tactctacca	ttgagcttgt	tagtcatatg	gtgtagcaaa	1740
atggtagatt	atcgaaaaaa	tatcttaatt	atgcttcata	gttataattt	gttaattaca	1800
attagtagct	acatgttata	tggaggagag	tggcgagcga	gattgggaga	ggaaagagag	1860
aagtgagtga	gacaaggtag	agagtgggag	agaggcgaac	tgcatatgca	tatttgtcaa	1920
aataattgta	tatatgtaac	tggatatacat	acgtattcgt	atatctgggtg	agtgaggaga	1980
gaaaagagag	aagcgagcga	gattggaaga	ggaaagagag	agccgagcga	gagaggacaa	2040
taatttatgt	aattcgcac	tcatttgtat	aattaatttt	gttcgaaatg	cggttcaata	2100
taatttttta	accataagca	taaacaaccc	tatatagaac	tattgatcaa	tatagaacta	2160
ttgatctatt	gatcaaaaga	gtcatacat	aattctattt	aaacaccacc	tccttgtttt	2220
cacttcacaa	taaaataaat	ttgagtaata	aagc			2254

<210> 2

<211> 3451

5 <212> ADN

<213> Solanum habrochaites

<400> 2

ES 2 651 714 T3

ctctctctaa agaagttgaa gataccttct tccagtaagt gggactggag ggggagattt	60
gttgaatcca tcccattttt tttgggtcaac tttagctact caattggtac aagcaattgt	120
taaaaaggaa tagtaattgg agttgaaaag aaaagatttg gtagttggca aattggtaag	180
atttgcaacc atttttgact ttgctatgtt tacatatgtc attagtgaca taggtatggt	240
tttatccttc tataaatagc gcactcttgc tcattttagtag aacacaccaa gttagagaga	300
aaaacaattt tgagagcaaa gtgaggtatt ccatagacta tataagaaa tagtctgtga	360
agaaaaatag agtgtgagcg atatttttagt aagacggaaa ccaaaagagt gttgttcctt	420
ttgagtgtgt agtagtcact ttgagtattg tattcgtgac tacacagtgt aaaattcctt	480
actatagtaa tatcaattgc tcctcttagt ccgcggtttt ttcccttatt cagaagggtt	540
tccacgtaaa attcttgggtg tcattatttt cccattttat ttccattact tttaccatat	600

ES 2 651 714 T3

atacttttgt gcttgtccgc gttttcccaa caagatgggtg tttaaataga attatgggat 660
 gactcctttg atcaatagtt ctatataggg ttgttcatgc ttatgggtaa aaaatcatat 720
 tgaatcgc atcgaatcaa aattgataat acaaatgaga tgcgaagctt gcatgagttc 780
 caaaaaatat aaataacggt aaaatggtaa agttacatca ttttttaatg caactgcaaa 840
 gtaaaaaatat aacatataaa atgagacaga ggaagtatgt aaaatcaata atgaatatgt 900
 attactccct ctatttcata ataacttaag ctttgaagtg tttcacaccc tttaaaaaaa 960
 gtaggttagg acataaatga acataatfff tcatttttgt ccttattaat tattgtcaaa 1020
 aataactaaa cattaattat aataactaat tccaatacta acttaatggg taaaattaga 1080
 agaaatffff taaaatagtc ttgaaaatff aaaacataag ttaattgaaa aatggaaaga 1140
 aaaaaaagct caaatcttgt tattatgtaa tggagggagt attagacaga gaaattatta 1200
 attrctccct ccgtcccata ttataagtca cttttttcat ttgtacttgc aacaagaaat 1260
 aagataatff tatttctatg ccctttgtta tagatfffca aaattagtca aagtaaatat 1320
 attttcaaaa ytaattaatt aatcaataag gatataatga gcaaaatag gtatttagta 1380
 taaatffata aatacatata ttatgatcaa tatttagaga aggtgaccta taatatgaag 1440
 gaagaaatga ggaccatata tgagaaagga tataaaactct atttaatgtg tttagtgtac 1500
 aatgaatgca ctttagtgat aaagaaaaaa gttaaaaaaa tatcatccat gattattccc 1560
 tttaaaattc gatattagtt cacctctaac tacttacaat aattgtatff ccatgtgtca 1620
 tatagctcat atttatataa agaaaatagg ttggtaaaac tttgtggtag gtttgagata 1680
 tttcaaaaata ttcttataat ttttcaatta ttcttccaat tttttcatga tatagctffc 1740
 tagatcatca attttcttaa atcgtcatat gtgaaaattg gagtcacaca ctttttaata 1800
 gttatcaagt ttgactatag cgcagctaag agtctaagat aactataaca ataatacata 1860
 attacaggat ggaattagcc tcaagtttgt aataacatga cattcgaaaa tataaccatt 1920
 ggataaaaaa aatttcaaat catctcgagt ttataaaaat tatttgagag acagttgatt 1980
 ttgacctfff gatcacgtgt gattcataaa catgatcaaa aatcaacaat ttttaatfff 2040
 taattgactt taaaggtttg ctaataggct aaacggaagt caaatffcaa actcactatt 2100
 tcaattaatt attaatacata ctatgttaaa aatagtccac gtaatggcca acaactagca 2160
 aaacttatca cgagattcta tatgatacta tatatgctff gttttttcga tattcattff 2220
 atttaaagtt tgatattffat attaaaatta aaatagatff taaatffgta ttaagaaaat 2280
 tcattataaa aggttgaaac attttctaac aaaaagatat gatgtccact tgaatcaaag 2340
 agtaataatg ctcatatact ttttctgctt tgaaataaga tatgcgataa tgattgacta 2400
 ataaaaatta aagactagtc atttataggg caaaacgtgc atttttacat ttaattacac 2460

ES 2 651 714 T3

atcaagktta taccaaagtg agatattata aggaaaaatc tttgtggcca aaatTTTTGG 2520
 acagaacgat atTTTattta tgTTatttta atTTtaatac atTTtaacta caaaatggaa 2580
 aaaataacag tttattataa aataaaaaaa tattttagtt ttttttattt ttttagtcaa 2640
 tttttctagc catttagctc tttccatatt ataataaaa gagaaaagta tttaaaatat 2700
 ctctaaattt ggtgtgaatt aataggtttg tctccgaatt attgacaaca ttaaaactac 2760
 tctctacttg acaaattgaa cttaaacata tatacccttg atcttgtcac atcagtgata 2820
 tacaatccca aattctcgtc aactttaggg gtattttgaa cacttctttt gacattttat 2880
 taagagtctc acgttcctac aagagtttga gactacttga tatgccatgt ggcagactgg 2940
 agtgtatttt aagttcagtt agtcaactaa acaatTTTT tagagtaaat tttaggTTta 3000
 acaaacataa aatcatata tgtatgTtaa taattatagt tggTataatt gcgcttcata 3060
 gcaaactTTa tgTTtgctat gactattaat ttgtatattt tgatatacat atacaaaaga 3120
 atgaattgta taatctctat ttgtataaag cgagaacgag agaagacaaa tgaaaactgg 3180
 tagcgagaaa tggagagtga cgaaagacaa ctgtTtaatt tgaatcaatg atttgctatt 3240
 ttatacattt tttccttatt tTtaagacta tcaataattg agtgacgaaa ttaataattt 3300
 gcattaaatt taattaaaa tattttcaac atttctctcc gctaaatatt tatttataac 3360
 gaggaacaaa aatcaaagac aaacacaaaa taggagaaat ttcttcattt ttgacccctc 3420
 cactcccaaa aacaacacac aatattcaag g 3451

<210> 3
 <211> 530
 <212> ADN
 <213> Solanum habrochaites

5

<400> 3

ttatttcact aattaaattt attcttaaatt atTTtatatat atTTattttg ctatgctaatt 60
 ttattttttt tataataaaa ttagttgagt gatttgatgg atacaaagtc ataaattgaa 120
 tgacttaact aaataaatta ttaaagttga atgatattat tgataaaaag acataaattg 180
 aataattttt ttgatataaa ataaagttca gatattgTta cacaattaac catccttttc 240
 aattttaata aataaactcc tctTtaatat cgTtctaatg aaaatttctt ccaaacaaca 300
 taaataataa gttcatcatt tatcgactaa tTcataaata ttatttgagt aatatctatg 360
 caatttttta caatgtttat attatgtcat tTaaaagata aggacagatg ccggtaagca 420
 ttacaataag tggtagtaac tacattataa ataggcccat ccaattagca taacttaaac 480
 ccacaaatta agcttgaaaa aaaaagagca aaccttagaa caaacaagca 530

10

<210> 4
 <211> 1875

<212> ADN

<213> Solanum habrochaites

<400> 4

5

ES 2 651 714 T3

tttaaatttt	atatttatat	taaacatttt	attaatatat	atatatatat	agctataaac	60
tcaataatta	cgatgactta	ctataaattc	gattttaagt	ttgaactcaa	aaattcttaa	120
aactctaatt	ctacttgtgt	attcatctag	cctcttatga	cacgtaaaaa	aaaatacaat	180
aaataaattg	caataactca	aattatttat	atgtgacata	aagaatcgtg	tggctctaaa	240
atthttattc	tctgcggtcc	aattaaagtt	ttgataatcc	accaaattga	agacttaaaa	300
tgccttattg	agggtgccaaa	tactaatgaa	gaagaaaaca	aaacaaaata	aaaacaccta	360
ctcataaatt	ataatataac	tgtatctcat	tgctaatatg	acatttaata	ggagagtatg	420
aaaatcgata	attaggatat	attgttaata	tataatcaaa	cgthttattt	cttcctagtg	480
gtagagtaag	gttctaactc	agagccccta	tccccttacc	attactgtht	agtattatgc	540
aagttatttt	tttactttga	ttatctctaa	tatttttact	gtcgttattt	ttgtthtttt	600
aatataattt	ttgtcatatt	ttttgctgth	acaatacttt	caaatcatgt	tttgaagaat	660
gatttcttga	tccgaggatc	tatagtaaac	attctthcta	tcaaataaag	atacatataa	720
cttataaggt	ctgcatacat	aatactatcc	ttctcaaacc	ccacttatat	gaaatgatac	780
cagatgactg	agtcaatatc	tcaaaaggtc	actcaagtht	aagaatatat	ctagtaaagt	840
tattaaactt	tctthtactat	caataaaaatc	acttaactta	gatacgtgga	tcaataaaaat	900
cactcaactc	aatttatcat	taaaaaaatt	atcatagata	aataatttht	tatgccatgt	960
aaatatgaac	tccataaatt	aataaaaatta	aaaaaaatcc	atcaagactt	thttatgaat	1020
aaacttaata	atthtattagg	atattattat	ataattctaa	tgtattatta	cgagcttht	1080
taagaaaaag	ttaggggtatt	gtatggtaaa	taattggggg	tacatgattt	ttatcatata	1140
aaaatatata	gacattggct	taataactct	aactctgcaa	atattactct	gttacgatca	1200
ttaaattata	aaaataaatt	gacgtcttat	aattatttht	cgthtgcaatc	attaagccct	1260
atgacaatat	cagtatatag	taattggtaa	tgtaaacattc	attctgatac	caattthtaag	1320
tgcataataa	tattatatta	atatttattt	cactaattaa	atthtattctt	aaatatttat	1380
atatatttat	thtgctatgc	taatttattt	thtttataat	aaaattagtt	gagtgatttg	1440
atggatacaa	agtcataaat	tgaatgactt	aactaaataa	attattaaag	ttgaatgata	1500
ttattgataa	aaagacataa	attgaataat	thttthgata	taaaataaag	ttcagatatt	1560
gthtacacaat	taaccatcct	thtcaattth	aataaataaa	ctcctctthta	atatacgttct	1620
aatgaaaatt	tcttccaaac	aacataaata	ataagthcat	catttatcga	ctaattcata	1680
aatattattt	gagtaatatc	tatgcaattt	thtacaatgt	ttatattatg	tcattthaaa	1740
gataaggaca	gatgccggta	agcattacaa	taagtggtag	taactacatt	ataaataggc	1800
ccatccaatt	agcataactt	aaaccacaa	attaagcttg	aaaaaaaaaa	gagcaaacct	1860
tagaacaac	aagca					1875

ES 2 651 714 T3

<210> 5
<211> 258
<212> PRT
<213> Solanum habrochaites

5

<400> 5

ES 2 651 714 T3

Ala Arg Gly Leu Asn Lys Ile Ser Cys Ser Leu Ser Leu Gln Thr Glu
1 5 10 15

Lys Leu Cys Tyr Glu Asp Asn Asp Asn Asp Leu Asp Glu Glu Leu Met
20 25 30

Pro Lys His Ile Ala Leu Ile Met Asp Gly Asn Arg Arg Trp Ala Lys
35 40 45

Asp Lys Gly Leu Asp Val Ser Glu Gly His Lys His Leu Phe Pro Lys
50 55 60

Leu Lys Glu Ile Cys Asp Ile Ser Ser Lys Leu Gly Ile Gln Val Ile
65 70 75 80

Thr Ala Phe Ala Phe Ser Thr Glu Asn Trp Lys Arg Ala Lys Gly Glu
85 90 95

Val Asp Phe Leu Met Gln Met Phe Glu Glu Leu Tyr Asp Glu Phe Ser
100 105 110

Arg Ser Gly Val Arg Val Ser Ile Ile Gly Cys Lys Thr Asp Leu Pro
115 120 125

Met Thr Leu Gln Lys Cys Ile Ala Leu Thr Glu Glu Thr Thr Lys Gly
130 135 140

Asn Lys Gly Leu His Leu Val Ile Ala Leu Asn Tyr Gly Gly Tyr Tyr
145 150 155 160

Asp Ile Leu Gln Ala Thr Lys Ser Ile Val Asn Lys Ala Met Asn Gly
165 170 175

Leu Leu Asp Val Glu Asn Ile Asn Lys Asn Leu Phe Asp Gln Glu Leu
180 185 190

Glu Ser Lys Cys Pro Asn Pro Asp Leu Leu Ile Arg Thr Gly Gly Val
195 200 205

ES 2 651 714 T3

Gln Arg Val Ser Asn Phe Leu Leu Trp Gln Leu Ala Tyr Thr Glu Phe
210 215 220

Tyr Phe Thr Lys Thr Leu Phe Pro Asp Phe Gly Glu Glu Asp Leu Lys
225 230 235 240

Glu Ala Ile Ile Asn Phe Gln Gln Arg His Arg Arg Phe Gly Gly His
245 250 255

Thr Tyr

<210> 6

<211> 741

5 <212> PRT

<213> Solanum habrochaites

<400> 6

ES 2 651 714 T3

Cys Ser His Ser Thr Pro Ser Ser Met Asn Gly Phe Glu Asp Ala Arg
 1 5 10 15

Asp Arg Ile Arg Glu Ser Phe Gly Lys Val Glu Leu Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Tyr Asp Thr Ala Trp Val Ala Met Val Pro Ser Lys His Ser Leu Asn
 35 40 45

Glu Pro Cys Phe Pro Gln Cys Leu Asp Trp Ile Ile Glu Asn Gln Arg
 50 55 60

Glu Asp Gly Ser Trp Gly Leu Asn Pro Ser His Pro Leu Leu Leu Lys
 65 70 75 80

Asp Ser Leu Ser Ser Thr Leu Ala Cys Leu Leu Ala Leu Thr Lys Trp
 85 90 95

Arg Val Gly Asp Glu Gln Ile Lys Arg Gly Leu Gly Phe Ile Glu Thr
 100 105 110

Gln Ser Trp Ala Ile Asp Asn Lys Asp Gln Ile Ser Pro Leu Gly Phe
 115 120 125

Glu Ile Ile Phe Pro Ser Met Ile Lys Ser Ala Glu Lys Leu Asn Leu
 130 135 140

Asn Leu Ala Ile Asn Lys Arg Asp Ser Thr Ile Lys Arg Ala Leu Gln
 145 150 155 160

ES 2 651 714 T3

Asn Glu Phe Thr Arg Asn Ile Glu Tyr Met Ser Glu Gly Phe Gly Glu
 165 170 175
 Leu Cys Asp Trp Lys Glu Ile Ile Lys Leu His Gln Arg Gln Asn Gly
 180 185 190
 Ser Leu Phe Asp Ser Pro Ala Thr Thr Ala Ala Ala Leu Ile Tyr His
 195 200 205
 Gln His Asp Lys Lys Cys Tyr Glu Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Gln Gln
 210 215 220
 His Lys Asn Trp Val Pro Thr Met Tyr Pro Thr Lys Ile His Ser Leu
 225 230 235 240
 Leu Cys Leu Val Asp Thr Leu Gln Asn Leu Gly Val His Arg His Phe
 245 250 255
 Lys Ser Glu Ile Lys Lys Ala Leu Asp Glu Ile Tyr Arg Leu Trp Gln
 260 265 270
 Gln Lys Asn Glu Glu Ile Phe Ser Asn Val Thr His Cys Ala Met Ala
 275 280 285
 Phe Arg Leu Leu Arg Ile Ser Tyr Tyr Asp Val Ser Ser Asp Glu Leu
 290 295 300
 Ala Glu Phe Val Asp Glu Glu His Phe Phe Ala Thr Ser Gly Lys Tyr
 305 310 315 320
 Thr Ser His Val Glu Ile Leu Glu Leu His Lys Ala Ser Gln Leu Ala
 325 330 335
 Ile Asp His Glu Lys Asp Asp Ile Leu Asp Lys Ile Asn Asn Trp Thr
 340 345 350
 Arg Thr Phe Met Glu Gln Lys Leu Leu Asn Asn Gly Phe Ile Asp Arg
 355 360 365
 Met Ser Lys Lys Glu Val Glu Leu Ala Leu Arg Asn Phe Tyr Ile Ile
 370 375 380
 Ser Asp Leu Ala Glu Asn Arg Arg Tyr Ile Lys Ser Tyr Glu Glu Asn
 385 390 395 400
 Asn Phe Lys Ile Leu Lys Ala Ala Tyr Arg Ser Pro Asn Ile Asn Asn
 405 410 415

ES 2 651 714 T3

Lys Asp Leu Phe Ile Phe Ser Ile Arg Asp Phe Glu Leu Cys Gln Ala
 420 425 430
 Gln His Gln Glu Glu Leu Gln Gln Leu Lys Arg Trp Phe Glu Asp Cys
 435 440 445
 Arg Leu Asp Gln Leu Gly Leu Ser Glu Gln Phe Ile Ser Ala Ser Tyr
 450 455 460
 Leu Cys Ala Ile Pro Ile Val Pro Gly Pro Glu Leu Ser Asp Ala Arg
 465 470 475 480
 Leu Val Tyr Ala Lys Tyr Val Met Leu Leu Thr Ile Val Asp Asp His
 485 490 495
 Phe Glu Ser Phe Ala Ser Thr Asp Glu Cys Leu Asn Ile Ile Glu Leu
 500 505 510
 Val Glu Arg Trp Asp Asp Tyr Ala Ser Val Gly Tyr Lys Ser Glu Arg
 515 520 525
 Val Lys Val Leu Phe Ser Met Phe Tyr Lys Ser Ile Glu Glu Ile Ala
 530 535 540
 Thr Ile Ala Glu Ile Lys Gln Gly Arg Ser Val Lys Asn His Leu Ile
 545 550 555 560
 Asn Leu Trp Leu Lys Val Met Lys Leu Met Leu Met Glu Arg Val Glu
 565 570 575
 Trp Cys Ser Gly Lys Thr Ile Pro Arg Ile Glu Glu Tyr Leu Tyr Val
 580 585 590
 Ser Ser Ile Thr Phe Gly Ser Arg Leu Ile Pro Leu Thr Thr Gln Tyr
 595 600 605
 Phe Ile Gly Ile Lys Ile Ser Lys Asp Leu Leu Glu Ser Asp Glu Ile
 610 615 620
 Tyr Gly Leu Cys Asn Phe Thr Gly Ile Val Leu Arg Leu Leu Asn Asp
 625 630 635 640
 Leu Gln Asp Ser Lys Arg Glu Gln Lys Glu Gly Ser Ile Asn Leu Val
 645 650 655
 Thr Leu Leu Met Lys Ser Ile Ser Glu Glu Glu Ala Ile Met Lys Met

ES 2 651 714 T3

660

665

670

Lys Glu Ile Leu Glu Met Lys Arg Arg Glu Leu Phe Lys Met Val Leu
675 680 685

Val Gln Lys Lys Gly Ser Gln Leu Pro Gln Leu Cys Lys Glu Ile Phe
690 695 700

Trp Arg Thr Cys Lys Trp Ala His Phe Thr Tyr Ser Gln Thr Asp Arg
705 710 715 720

Tyr Arg Phe Pro Glu Glu Met Glu Asn His Ile Asp Glu Val Phe Tyr
725 730 735

Lys Pro Leu Asn His
740

<210> 7

<211> 45

<212> PRT

5 <213> Solanum habrochaites

<400> 7

Met Ser Ser Leu Val Leu Gln Cys Trp Lys Leu Ser Ser Pro Ser Leu
1 5 10 15

Ile Leu Gln Gln Asn Thr Ser Ile Ser Met Gly Ala Phe Lys Gly Ile
20 25 30

His Lys Leu Gln Ile Pro Asn Ser Pro Leu Thr Val Ser
35 40 45

10

<210> 8

<211> 36

<212> PRT

<213> Solanum habrochaites

15

<400> 8

Met Ile Val Gly Tyr Arg Ser Thr Ile Ile Thr Leu Ser His Pro Lys
1 5 10 15

Leu Gly Asn Gly Lys Thr Ile Ser Ser Asn Ala Ile Phe Arg Arg Ser
20 25 30

Cys Arg Val Arg
35

20

<210> 9

<211> 22

<212> ADN

ES 2 651 714 T3

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador adaptador 1
5
<400> 9
gtaatacgac tcactatagg gc 22

<210> 10
10 <211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> Cebador adaptador anidado 2

<400> 10
actatagggc acgctggg 19

<210> 11
20 <211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Intrón de cebador 1 de ShzFPS

<400> 11
30 ggtacgtat ataaggtatg acaaaaact ac 32
c
<210> 12
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
35
<220>
<223> Ciclo 1 de cebador anidado ShzFPS

<400> 12
40 ctaaagtaat taattcccat aagtaattaa c 31

<210> 13
<211> 30
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ciclo 2 de cebador promotor 1 ShzFPS

<400> 13
50 gattgacttc ttcgactac gctaggggcg 30

<210> 14
<211> 30
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ciclo 2 de cebador anidado ShzFPS
60
<400> 14
cccaaactg gtaacatgcc caatagctc 30

<210> 15
65 <211> 44
<212> ADN

ES 2 651 714 T3

<213> secuencia Artificial

<220>
<223> Ciclo 3 de cebador promotor 2 ShzFPS

5 <400> 15
ctctatttaa tgtgttttag tctacaatga atgcactttt agtg 44

10 <210> 16
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Ciclo 3 de cebador anidado ShzFPS

<400> 16
caagactaag aagaaaatga gggacatgt atgagaaaag g 41

20 <210> 17
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Exón 1 de cebador de ShZIS

<400> 17
cattgatgaa ggggtactgt ggc 23

30 <210> 18
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Ciclo 1 de cebador anidado ShZIS

<400> 18
tgcactttac tctacatgat ctc 23

40 <210> 19
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Ciclo 2 de cebador promotor 1 ShZIS

50 <400> 19
cgagaatttg ggattgtata tctactgatgt gacaagatca ag 42

55 <210> 20
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Ciclo 2 de cebador anidado ShZIS

<400> 20
gtagagagta gtttaatgt tgtcaataat tcggagacaa acc 43

65 <210> 21
<211> 44
<212> ADN

ES 2 651 714 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>

5 <223> Ciclo 3 de cebador promotor 2 ShZIS
 <400> 21
 caaagcatat atagtatcat atagaatctc gtgataagtt ttgc 44

10 <210> 22
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Ciclo 3 de cebador anidado ShZIS
 <400> 22
 gtgataagtt ttgctagtgt ttggccatta cgtggac 37

20 <210> 23
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Exón 1 de cebador de ShTPS9
 <400> 23
 cgtaaagga tatgtatctc cttgcttc 28

30 <210> 24
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Ciclo 1 de cebador anidado ShTPS9
 <400> 24
 gcttcactaa ctcaacctt aagagag 27

40 <210> 25
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Ciclo 2 de cebador promotor 1 ShTPS9
 <400> 25
 gaaaaggatg gtaattgtg taacaatc tgaactttat tttatc 48

50 <210> 26
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Ciclo 2 de cebador anidado ShTPS9
 <400> 26
 gtaagtcat tcaatttatg actttgtatc catcaaatca ctcaac 46

60 <210> 27
 <211> 21
 <212> ADN

65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador qPCR MKS11 hacia adelante
 5 <400> 27
 ccaaatatcg atgcaaccac c 21
 <210> 28
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador qPCR MKS1 inverso
 <400> 28
 aaatcctcaa ttgggctcag 20
 <210> 29
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador qPCR GUS1 hacia adelante
 <400> 29
 ctgatagcgc gtgacaaaaa 20
 30 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador qPCR GUS1 inverso
 <400> 30
 40 ggcacagcac atcaaagaga 20
 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador qPCR GUS2 hacia adelante
 50 <400> 31
 cccttacgct gaagagatgc 20
 <210> 32
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Cebador qPCR GUS2 inverso
 <400> 32
 ttttgcac gcgctatcag 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Planta o célula vegetal o tejido vegetal u órgano vegetal transgénico que comprende un gen quimérico integrado en su genoma, **caracterizado por el hecho de que** dicho gen quimérico comprende un promotor específico de los tricomas operativamente enlazado a una secuencia de ácido nucleico homóloga o heteróloga, dicha secuencia de ácido nucleico homóloga o heteróloga está opcionalmente además operativamente enlazada a una secuencia homóloga o heteróloga UTR 3', donde el promotor se selecciona del grupo de:
- 10 (a) la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N°: 4 o SEQ ID N°: 3; y
 (b) una secuencia de ácido nucleico que comprende al menos una identidad de secuencia del 70 % con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N°: 4 o SEQ ID N°: 3.
- 15 2. Planta, célula vegetal, tejido vegetal u órgano vegetal según la reivindicación 1, donde el promotor es específicamente activo en los tricomas glandulares.
3. Planta, célula vegetal, tejido vegetal u órgano vegetal según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el promotor tiene actividad constitutiva.
- 20 4. Planta, célula vegetal, tejido vegetal u órgano vegetal según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, donde la actividad del promotor no se reduce significativamente cuando la planta, célula vegetal, tejido vegetal u órgano vegetal se expone a uno o más estreses bióticos y/o abióticos.
- 25 5. Planta, célula vegetal, tejido vegetal u órgano vegetal transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, donde la planta pertenece a la familia *Solanaceae*.
- 30 6. Secuencia de ácido nucleico aislada con actividad de promotor específico de los tricomas cuando se introduce en células vegetales, donde dicha secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada de:
- (a) la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N°: 4 o SEQ ID N°: 3; y
 (b) una secuencia de ácido nucleico que comprende al menos una identidad de secuencia del 70 % con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N°: 4 a lo largo de toda su longitud o una secuencia de ácido nucleico que comprende al menos una identidad de secuencia del 95 % con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N°: 3.
- 35 7. Gen quimérico que comprende una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 6.
8. Gen quimérico según la reivindicación 7, donde dicha secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 6 está operativamente enlazada a una secuencia de ácido nucleico homóloga o heteróloga UTR 3'.
- 40 9. Vector que comprende una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 6 o un gen quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 7 o 8.
- 45 10. Planta o célula vegetal transgénica que comprende el gen quimérico según las reivindicaciones 7-8 o el vector según la reivindicación 9.
- 50 11. Método para crear una planta o célula vegetal transgénica, que incluye las etapas de:
- (a) generar un gen quimérico según las reivindicaciones 7-8 o un vector según la reivindicación 9;
 (b) transformar una planta o célula vegetal con dicho gen quimérico o vector; y, opcionalmente,
 (c) regenerar plantas transgénicas.
12. Planta o célula vegetal transgénica obtenible u obtenida por el método según la reivindicación 11.
- 55 13. Planta o célula vegetal transgénica según la reivindicación 12, que es un planta o célula vegetal de *Solanum lycopersicum*.

Figura 1

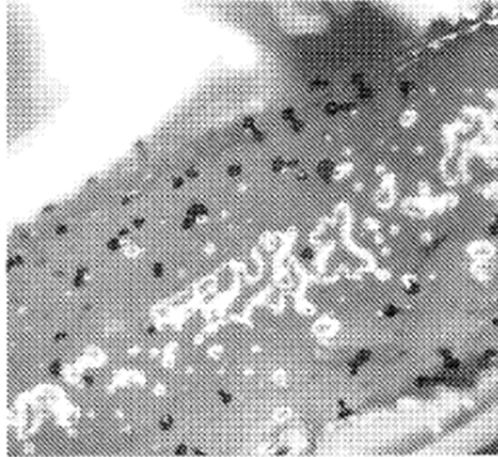


Figura 2

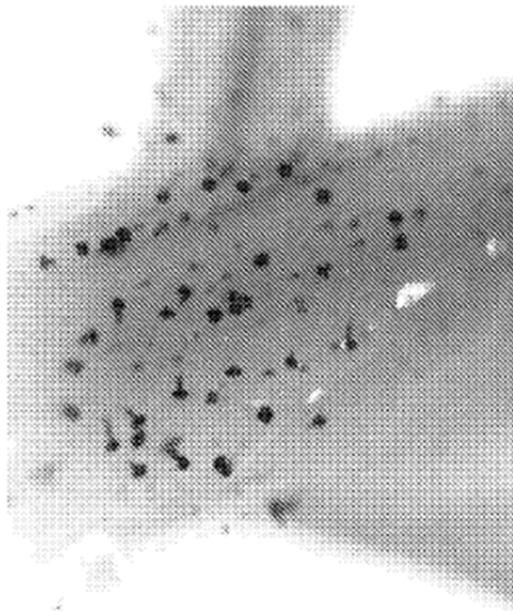


Figura 3

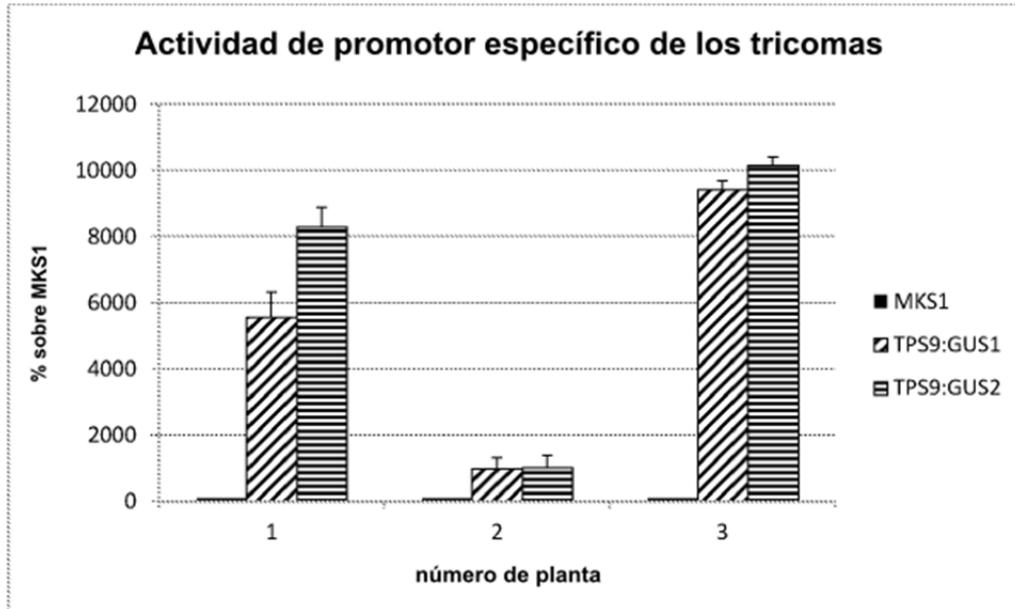


Figura 4

