



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 275 278**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **96928602 .0**
(86) Fecha de presentación : **30.08.1996**
(87) Número de publicación de la solicitud: **0859850**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **26.08.1998**

(54) Título: **Promotores de glutatión-S-transferasa de plantas.**

(30) Prioridad: **22.09.1995 GB 9519406**
22.09.1995 GB 9519404

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2007

(73) Titular/es: **Syngenta Limited**
European Regional Centre Priestley Road
Surrey Research Park
Guildford, Surrey GU2 7YH, GB

(72) Inventor/es: **Jepson, Ian;**
Greenland, Andrew, James;
Bevan, Michael y
Sheppard, Hilary

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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 de glutatión-S-transferasa de plantas.

La presente invención se refiere a un promotor y a una construcción que comprende el mismo.

En particular, la presente invención se refiere a una secuencia promotora de genes inducible químicamente, y en particular, pero no exclusivamente, a una secuencia promotora de genes inducible químicamente basada en elementos reguladores *cis* procedentes del gen 27 de la glutatión S-transferasa del maíz (GST-27). La presente invención se refiere también a construcciones de genes, sistemas de expresión, plantas y combinaciones promotor/inductor que comprenden la secuencia promotora de genes químicamente inducible.

Los avances recientes en técnicas de biología molecular han dado como resultado una mejor comprensión de los promotores de plantas. Se han identificado elementos reguladores *cis* y se han utilizado para localizar actividad de genes informadores para tipos de células específicas diferenciadas y a etapas definidas del desarrollo de las plantas (Drews *et al.*, 1992; Guerrero *et al.*, 1990). Si bien existe tecnología actual para regular la actividad de genes *trans* de una manera espacial o temporal, el control externo de los genes introducidos por aplicación de un producto químico inductor no está bien establecido en las plantas.

La capacidad para regular genes de una manera inducible está bien establecida en bacterias, hongos, insectos y cultivos de células animales. Para que los sistemas de regulación inducibles sean eficaces debería existir un nivel de expresión cero o bajo en ausencia de inductor, expresión alta después de tratamiento con inductor y ausencia de efecto del inductor sobre otras funciones celulares.

Si bien se han aislado numerosos genes inducibles a partir de plantas (Kuhlemeier *et al.*, 1987), no es de uso común un sistema de regulación inducible bien definido. Se ha descrito cierto número de genes que son activados por el ataque patógeno o por estímulos ambientales, con inclusión de niveles de luz, oxígeno y temperatura. Aunque algunos de éstos están bien caracterizados al nivel molecular, no pueden utilizarse para un sistema de genes inducible debido a la activación ilegítima por señales ambientales.

La implicación de estímulos químicos, que incluyen reguladores de crecimiento de las plantas, en la activación de la transcripción génica está bien documentada en las plantas. La aplicación de estos compuestos puede controlarse mejor, en comparación con los estímulos ambientales, si bien los mismos nos pueden considerarse para sistemas de genes inducibles debido a efectos pleiotrópicos indeseables.

Varios estudios recientes han demostrado que el control de los genes *trans* en plantas puede conseguirse por aplicación de productos químicos exógenos. Estos incluyen activación por ácido salicílico (Williams *et al.*, 1992), tetraciclina (Weinmann *et al.*, 1994), glucocorticoides (Schena *et al.*, 1991) e iones cobre (Mett *et al.*, 1993). Aunque estos sistemas satisfacen los requisitos previos descritos anteriormente, y por consiguiente tienen utilidad para aplicaciones de investigación, su uso estará limitado dado que los productos químicos descritos no son compatibles con la práctica agrícola actual.

Un grupo potencialmente atractivo de productos químicos que pueden tener utilidad en la regulación de la expresión génica en plantas transgénicas son los agentes fitoprotectores herbicidas. Estos compuestos se utilizan actualmente en agricultura y funcionan para elevar selectivamente el metabolismo de ciertos herbicidas, fundamentalmente por inducción de las enzimas destoxificantes, glutatión S-transferasa (Hatzios, 1991) y las oxidasas de función mixta dependientes del citocromo p450 (Fonne-Pfister y Kreuz, 1990). Las glutatión S-transferasas (GSTs) son enzimas multifuncionales que catalizan la conjugación del grupo tiol del glutatión con los centros electrófilos de compuestos lipófilos conduciendo a su destoxificación (Mannervik y Danielson, 1988). Las GSTs son ubicuas y su papel en el metabolismo xenobiótico en los mamíferos y las plantas (Lamoureux y Rusness, 1989) está bien establecido.

El sistema mejor caracterizado de las GSTs de plantas se encuentra en el maíz, donde las mismas representan el 1-2% de la proteína soluble (Timmerman, 1989). Se han descrito cuatro isoformas de GST en el maíz, GST I (Mozer *et al.*, 1983; Weigand *et al.*, 1986), GST II (Mozer *et al.*, 1983; Holt *et al.*, 1995), GST III (Moore *et al.*, 1986) y GST IV (Irzyk y Feurst, 1993). GST-27 es un componente de GST II y GST IV que exhibe inducibilidad dependiente de fitoprotectores.

En la Publicación de Patente Internacional No. WO93/01294 de los autores de la presente invención, cuya doctrina se incorpora por la presente por referencia, se demostraba que la región promotora controladora de GST-27 puede utilizarse para conseguir la expresión de genes *trans* dependientes de fitoprotectores. Estos estudios revelaban que un promotor de GST-27 de 3,8 kb, además de dirigir la expresión de genes *trans* inducibles por fitoprotectores, confería también un nivel constitutivo de expresión en tejidos de las raíces.

La presente invención procura proporcionar, por el uso de un análisis de promotores detallado, un promotor de GST delecionado que mantiene todavía las ventajas de la inducibilidad química. En relación con esto, los autores de la presente invención han identificado, mediante el uso de delecciones y mapeado de elementos reguladores *cis*, secuencias implicadas en la sensibilidad a los fitoprotectores. El uso de estas secuencias puede utilizarse para mejorar

la eficiencia del cambio de genes. Por ejemplo, una vez que ha sido identificado un elemento *cis* implicado en la expresión inducible, es posible mejorar la inducibilidad por ejemplo por multimerización del elemento.

Existen ejemplos (cambio inducible de cobre, Mett *et al.*, 1993) en los cuales se han desarrollado sistemas promotores inducibles para plantas en los cuales el elemento regulador *cis* que confiere inducibilidad se ha fusionado a un promotor mínimo para generar un promotor quimérico sensible al tratamiento químico. A este respecto, la presente invención trata de proporcionar una secuencia quimérica promotora de genes inducible químicamente que comprende una secuencia promotora génica químicamente inducible de la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención es por consiguiente utilizar los elementos *cis* para identificar los factores de transcripción implicados en la regulación inducible. Los factores de transcripción pueden manipularse luego para mejorar la inducibilidad, por ejemplo un factor quimérico puede modificarse por ingeniería genética con adición de activadores fuertes, tales como la región VP16 del virus del herpes simplex.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un promotor de gen químicamente inducible constituido por una secuencia seleccionada del grupo que se compone de (i) la región de los pares de bases 1 a 570 inmediatamente aguas arriba del punto de comienzo de la transcripción de la secuencia promotora de genes de la subunidad de 27 kD de la glutatión S-transferasa, (ii) la región de los pares de bases 1 a 378 situada inmediatamente aguas arriba del punto de comienzo de la transcripción de la secuencia promotora de genes de la subunidad de 27 kD de la glutatión S-transferasa y (iii) la región de los pares de bases 267 a 332 inmediatamente aguas arriba del punto de comienzo de la transcripción de la secuencia promotora de genes de la subunidad de 27 kD de la glutatión S-transferasa, en la cual dicho promotor tiene al menos 98% de homología con el promotor de la subunidad de 27 kD de la glutatión S-transferasa del maíz.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención se proporciona un promotor de genes químicamente inducibles constituido por la secuencia de la región de los pares de bases 275 a 290 inmediatamente aguas arriba del punto de comienzo de la transcripción de la secuencia promotora de genes de la subunidad de 27 kD de la glutatión S-transferasa del maíz.

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención se proporciona un elemento promotor de genes químicamente inducible constituido por una secuencia seleccionada del grupo constituido por (i) la región de los pares de bases 267 a 279 situada inmediatamente aguas arriba del punto de comienzo de la transcripción de la secuencia promotora de genes de la subunidad de 27 kD de la glutatión S-transferasa del maíz, (ii) la región de los pares de bases 278 a 288 situada inmediatamente aguas arriba del punto de comienzo de la transcripción de la secuencia promotora de genes de la subunidad de 27 kD de la glutatión S-transferasa del maíz, (iii) la región de los pares de bases 286 a 296 situada inmediatamente aguas arriba del punto de comienzo de la transcripción de la secuencia promotora de genes de la subunidad de 27 kD de la glutatión S-transferasa del maíz y (iv) la región de los pares de bases 320 a 332 inmediatamente aguas arriba del punto de comienzo de la transcripción de la secuencia promotora de genes de la subunidad de 27 kD de la glutatión S-transferasa del maíz.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención se proporciona un multímero constituido por los promotores de genes o elementos promotores de genes de la presente invención.

De acuerdo con un quinto aspecto de la presente invención se proporciona una construcción génica constituida por un promotor de genes o elemento promotor de genes de la presente invención, enlazada operativamente a un gen o una serie de genes por la cual la expresión del gen o de la serie de genes puede controlarse por aplicación de un inductor exógeno eficaz.

De acuerdo con un sexto aspecto de la presente invención, se proporciona un sistema de expresión para una planta, estando constituido el sistema de expresión por un gen o una serie de genes fusionados a un promotor de genes o elemento promotor de genes de la presente invención, en el cual el sistema de expresión es capaz de ser expresado en la planta y en el cual la expresión del gen o serie de genes puede controlarse por aplicación de un inductor exógeno eficaz.

De acuerdo con un séptimo aspecto de la presente invención se proporciona una planta transgénica que comprende una construcción génica o un sistema de expresión de acuerdo con la presente invención en donde la construcción o el sistema de expresión está integrado, con preferencia integrado de manera estable, en el DNA genómico de la planta.

De acuerdo con un octavo aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso de expresión en una planta de una construcción o un sistema de expresión de acuerdo con la presente invención en donde el sistema de expresión o la construcción está integrado, con preferencia integrado de manera estable en el DNA genómico del material de la planta y en donde la expresión del gen o la serie de genes puede controlarse por aplicación de un inductor exógeno eficaz.

De acuerdo con un noveno aspecto de la presente invención se proporciona el uso de un elemento promotor de genes de la presente invención para identificar factores de transcripción implicados en regulación inducible.

ES 2 275 278 T3

El promotor o elemento químicamente inducible está situado con preferencia inmediatamente aguas arriba del punto de comienzo de la transcripción de la secuencia del promotor génico de la subunidad de 27 kD de la glutatión-S-transferasa, isoforma II o aguas arriba de la subunidad de 27 kD de la glutatión S-transferasa, isoforma IV.

5 Con preferencia, la secuencia o elemento promotor(a) químicamente inducible está situado inmediatamente aguas arriba de punto de comienzo de la transcripción de la subunidad de 27 kD de la glutatión-S-transferasa del maíz.

Preferiblemente, la secuencia que codifica el promotor génico para la subunidad de 27 kD de la glutatión-S-transferasa del maíz, isoforma II, es como se muestra en la Figura 1.

10 Preferiblemente, el sistema de expresión comprende una construcción génica de acuerdo con la presente invención.

Una realización preferida de la presente invención es una secuencia promotora de genes químicamente inducible que está basada en elementos reguladores *cis* del gen de la glutatión-S-transferasa 27 del maíz, isoforma II (GST-27-II), como se muestra en la Figura 1, o que tiene homología sustancial con la de la Figura 1 o una variante de la misma, en donde la secuencia promotora está enlazada operativamente o fusionada a una serie de genes por lo que la expresión del gen o la serie de genes puede controlarse por aplicación de un inductor exógeno.

20 Una realización todavía más preferida de la presente invención es una secuencia promotora de genes químicamente inducible que está basada en elementos reguladores *cis* del gen de la glutatión-S-transferasa 27 del maíz, isoforma II (GST-17-II), como se muestra en la Figura 1, o que tiene homología sustancial con la de la Figura 1 o una variante de la misma, y que está integrada, preferiblemente integrada de manera estable, dentro del DNA genómico de un material vegetal, y en donde la expresión de un gen o serie de genes puede controlarse por aplicación de un inductor exógeno eficaz.

25 El término “material vegetal” incluye una semilla en germinación, una planta de semillero, una plántula o una planta, o tejidos o células de las mismas (v.g. en la raíz, las hojas y el tallo).

30 El término “homología sustancial” abarca homología con respecto a al menos los ácidos nucleicos/residuos de ácido nucleico esenciales de la secuencia o elemento promotor(a) con tal que la secuencia o elemento homólogo actúe como un promotor químicamente inducible. Con preferencia, existe al menos aproximadamente 70% de homología, de modo más preferible al menos aproximadamente 80% de homología, y de modo aún más preferible, existe al menos aproximadamente 90% de homología con la secuencia de un elemento o secuencia promotor(a) químicamente inducible de la presente invención.

35 El término “una variante de la misma” con referencia a la presente invención significa cualquier sustitución de, variación de, modificación de, reemplazamiento de, delección de o adición de uno o más ácidos nucleicos de o a la secuencia promotora con tal que la secuencia resultante actúe como un promotor químicamente inducible. El término incluye también secuencias que pueden hibridarse sustancialmente a la secuencia promotora.

40 El término “construcción” - que es sinónimo con términos tales como “casete”, “híbrido” y “conjugado” - incluye un gen o una serie de genes unidos directa o indirectamente a la secuencia o elemento promotor. Ocurre lo mismo para el término “fusionado” en relación con la presente invención que incluye unión directa o indirecta.

45 El término “sistema de expresión” significa que el sistema arriba definido puede expresarse en un organismo, tejido, célula o medio apropiado. A este respecto, el sistema de expresión de la presente invención puede comprender componentes adicionales que aseguran el aumento de la expresión del gen o serie de genes por el uso del promotor o elemento génico químicamente inducible. Se incluyen también en este término factores de transcripción que son capaces de fijarse a la secuencia o elemento promotor químicamente inducible.

50 El término “transgénico” en relación con la presente invención - particularmente en relación con las plantas de semillero y plantas en germinación de la presente invención - no incluye un promotor de tipo salvaje en su entorno natural en combinación con su gen o serie de genes asociados en su entorno natural. Así, el término incluye brotes o plantas que incorporan un gen o una serie de genes que pueden ser naturales o no naturales para el brote o planta en cuestión enlazado(s) operativamente a la secuencia o elemento promotor de genes químicamente inducible de la presente invención.

55 Así pues, cuando el cambio génico de la presente invención está unido a un gen exógeno o extraño e introducido en una planta por transformación, proporciona un medio para la regulación externa de la expresión de dicho gen extraño. El método empleado para transformación de las células vegetales no es especialmente afín a esta invención y puede emplearse cualquier método adecuado para la planta diana. Se obtienen plantas transgénicas por regeneración a partir de las células transformadas. Se conocen numerosos procedimientos de transformación por la bibliografía, tales como agroinfección utilizando *Agrobacterium tumefaciens* o su plásmido Ti, electroporación, microinyección o células vegetales y protoplastos, transformación con microproyectiles, para mencionar sólo unos cuantos. Puede hacerse referencia a la bibliografía para detalles completos de los métodos conocidos.

La especie de planta en la cual se inserta la secuencia químicamente inducible no es tampoco particularmente afín a la invención. Pueden transformarse plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas. Esta invención puede aplicarse a cual-

quier planta para la cual están disponibles técnicas de transformación o puedan llegar a estarlo. La presente invención puede utilizarse por tanto para controlar la expresión génica en una diversidad de plantas modificadas genéticamente, con inclusión de cosechas de campo tales como canola, girasol, tabaco, remolacha azucarera, y algodón; cereales tales como trigo, cebada, arroz, maíz y sorgo; frutos tales como tomates, mangos, melocotones, manzanas, peras, fresas, bananas y melones; y hortalizas tales como zanahoria, lechuga, col, patatas y cebolla. El cambio es adecuado también para uso en una diversidad de tejidos, con inclusión de raíces, hojas, tallos y tejidos reproductores.

Una de las principales ventajas de la presente invención como resultado de la identificación de elementos más pequeños que pueden utilizarse para conseguir inducibilidad es que los fragmentos menores son más convenientes para desarrollo de vectores.

Otra ventaja de la definición de un elemento de núcleo es que el mismo puede multimerizarse para mejorar la sensibilidad a los fitoprotectores.

Una ventaja adicional de la utilización de un elemento de núcleo es que el mismo permite la generación de promotores quiméricos inducibles por fitoprotectores. Esto puede incluir promotores específicos o de desarrollo de tejidos, que podrían manipularse luego para llegar a ser mejorados por fitoprotectores.

Otra ventaja es que un elemento de núcleo de este tipo puede optimizarse por una estrategia de mutación.

La definición de un elemento de núcleo permite el aislamiento del factor de transcripción correspondiente por escrutinio South-Western. Este elemento podría manipularse luego por mutación o sobre-expresión para conseguir una expresión mejorada dependiente de fitoprotectores.

El promotor puede ser inducido por ciertos compuestos químicos tales como los indicados anteriormente en la Solicitud de Patente Internacional No. WO90/08826 de los mismos autores de la presente invención, cuya descripción se incorpora por la presente por referencia, conocidos como “fitoprotectores herbicidas”, que pueden aplicarse, por ejemplo, como pulverización, a la plana en crecimiento.

Los ejemplos siguientes describen la identificación de elementos reguladores *cis* inducibles por fitoprotectores herbicidas dentro del promotor GST-27. Estos han sido identificados por una combinación de delección de promotores, toma de huella *in vivo*, ensayos de desplazamiento de la movilidad por electroforesis, ensayos de genes informadores estables y transitorios. Esto ha definido fragmentos específicos y un elemento de núcleo específico que tienen numerosas utilidades.

Se describirán a continuación diversas características y realizaciones preferidas de la presente invención, únicamente a modo de ejemplo no limitante con referencia a las Figuras que se acompañan, en las cuales:

la Figura 1 es una secuencia de nucleótidos de la secuencia promotora génica de la subunidad de 27 kD de la glutatión-S-transferasa, isoforma II;

la Figura 2 es un mapa circular del plásmido pZM/RMS-3;

la Figura 3 es un mapa circular del plásmido pZM/RMS-3-S;

la Figura 4 es un gráfico que muestra la inducibilidad de pZM/RMS-3 y pZM/RMS-3-S en el maíz;

la Figura 5 es un gráfico que muestra el efecto del tratamiento con fitoprotectores sobre el maíz transformado de manera estable con RMS-3-S;

la Figura 6 muestra los plásmidos pPUG1, pPUG3, pPUG4, pPUG5, pPUG6 y pPUG7;

la Figura 7 muestra la inducibilidad de los plásmidos pPUG3 a pPUG7, representados en la Figura 6;

la Figura 8 muestra una huella *in vivo* de la cadena inferior del promotor GST-27;

la Figura 9 muestra que la huella de GST-27 del maíz es complementaria a un elemento sensible al etileno de GST-1 de la clavellina;

la Figura 10 muestra sondas de retardo para una huella de G290;

la Figura 11 muestra una autorradiografía de EMSA utilizando las sondas WT290 y MUT290;

la Figura 12 muestra una autorradiografía de un ensayo de competición de EMSA;

la Figura 13 muestra los resultados de un ensayo de transformación transitoria de mutaciones de pPUG5;

la Figura 14 muestra secuencias parciales de sondas de retardo para el promotor GST-27 y ERE₁;

ES 2 275 278 T3

la Figura 15 muestra el retardo utilizando las sondas WT y MUT de G275;

la Figura 16 muestra el retardo utilizando las sondas WT y MUT de G326, G284 y el ERE;

- 5 la Figura 17 muestra los resultados de un ensayo de competencia en el cual sondas WT frías compitieron con WT290 caliente.

Aislamiento de promotores

- 10 El aislamiento y la caracterización de la región promotora de GST-27 se describe en la Publicación de Patente Internacional No. WO93/01294. Como resumen, una sonda de hibridación de 205 pb, correspondiente a la región 3' no traducida de cDNA de GST-27, se amplificó utilizando PCR. El producto PCR se marcó con ³²P cebado aleatoriamente y se utilizó para escrutar 5 x 10⁶ recombinantes de una genoteca genómica de maíz (*Zea mays* cv. W22) en 1EMBL3 (Clontech). Se realizaron purificaciones de calvas como ha sido descrito por Sambrook *et al.*, 1989. Se aisló el DNA de 1EMBL3 de clones genómicos y se utilizó para mapeado por digestión de restricción y análisis de transferencia Southern. Se construyeron una gama de subclones en vectores plasmídicos que incluían pG1E7 (fragmento *EcoRI* de 3,9 kb en pBS (Stratagene)), pG1S15 (fragmento *SacI* de 2,1 kb en pBluescript KS (Stratagene)) y pG1X3 (*XhoI* de 2,2 kb en pBluescript KS). El plásmido pG1E7 se depositó en fecha 14 de junio de 1991 en las National Collections of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB) bajo el número de acceso NCIMB 40426. La secuencia de nucleótidos del promotor GST-II-27 se muestra en la Figura 1.

- 20 La secuencia de DNA de los subclones genómicos se determinó por el método de terminación de cadenas didesoxi utilizando la versión sequenase 2.0 (USB) (Sanger *et al.*, 1977). Se prepararon iniciadores de secuenciación oligonucleotídicos utilizando un sintetizador de DNA ABI Modelo 380B. Los datos de las secuencias de DNA se analizaron por el uso las series PC/Gene e IG del paquete de biología molecular Intelligenetics.

Deleciones de ensayo del promotor GST-27 en plantas transgénicas de maíz

- 30 Se adoptaron métodos estándar de DNA recombinante en la construcción de vectores plasmídicos (Sambrook *et al.*, 1989). Una construcción de gen informador que contenía una región flanqueante 5' *EcoRI-NdeI* de 3,8 kb de GST-27 procedente de pG1E7 se hizo roma en los extremos y se ligó al sitio *SmaI* del vector pTAK de *Agrobacterium* Ti (Jefferson *et al.*, 1987). el sitio *NdeI*, que se encuentra en el codón de comienzo de la traducción predicho de GST-27 se destruyó después de hacer roma los extremos. Esto formó un punto conveniente para fusión con el gen *UidA* de *E. coli* codificante de b-glucuronidasa (GUS) en pTAK. Un fragmento *EcoRI* que contenía 3,8 kb del gen informador GUS promotor de GST y el terminador nos se aisló y se subclonó en el fragmento pIJ109 de *EcoRI*, un vector basado en pUC19 que contenía la casete marcadora seleccionable de PAT (promotor 35S de CaMV, intrón A de H I, fosfinotricin-acetil-transferasa (PAK), y el terminador nos) para formar la casete de transformación de maíz pZMRMS3 (véase la Figura 2). Se generó una construcción de delección pZMRMS3S que contenía 0,9 kb del promotor GST-27, por eliminación de un fragmento de 1,9 kb (*EcoRI-EagI*) (véase la Figura 3).

- 40 Se utilizaron pZMRMS3 y pZMRMS3S para generar plantas de maíz transgénicas fértiles por bombardeo de suspensiones de células embrionarias (Fromm *et al.*, 1990).

- 45 Se seleccionaron plantas que llevaban el gen *trans* utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se preparó DNA genómico para análisis PCR de plantas transgénicas. La PCR se realizó utilizando las condiciones descritas por Jepson *et al.* (1991). Las plantas transformadas con pZMRMS3 y pZMRMS3S se analizaron con los iniciadores GSTPCR 5'-CTCCCGTC-GACCAAATACACTGGT-3' específico para la región 3' del promotor GST-27 y GUS 115 5'-GGATTCCGGCATAGTTAAAGAAATCAT-3', específico para la porción 5' del gen GUS.

- 50 Para determinar si ambos fragmentos de 0,9 kb y 3,8 kb retenían expresión inducible en maíz transgénico, se realizaron ensayos de la enzima GUS sobre material de hojas en presencia o ausencia de fitoprotector. Se preparó tejido inducido por plantas maduras de invernadero (ciclo de 16 h luz/8 h oscuridad) por aplicación mediante pintura o pulverización de las hojas de R-29148 de concentración 10 g/l formulado en 81,5 g/l de ciclohexanona, 3,3 g/l de NPE 1800 Synperonic, y 1,5 g/l de Tween 85. Se realizaron ensayos fluorométricos para la actividad de GUS con el sustrato 4-metilumbeliferil-D-glucurónido (Sigma) como ha sido descrito por Jefferson *et al.*, 1987. Las incubaciones se realizaron durante 2 horas a 37°C antes de interrumpirlas con carbonato de sodio 0,2M, y se midieron por fluorescencia con un fluorómetro Perkin-Elmer LS-35. La concentración de proteínas en los homogeneizados de tejidos se determinó por el ensayo de proteínas Bio-Rad siguiendo el procedimiento sugerido por el fabricante. Las Figuras 4 y 5 demuestran que tanto pZMRMS3 como pZMRMS3S retienen inducibilidad.

- 60 *Delección fina del promotor GST-27*

- 65 El análisis de delección preliminar generado en plantas de maíz transgénicas sugiere que el o los elementos que confieren inducibilidad deben estar comprendidos dentro de los 900 pb situados inmediatamente aguas arriba del punto de comienzo de la transcripción (TSP). Se produjeron una serie de construcciones de delección fina por fusión de fragmentos de 200 pb delecionados de la región de 900 pb del gen marcador GUS. Se identificó un sitio *PstI* adyacente al punto de comienzo de la transcripción del promotor GST-27. Se diseñó un iniciador de PCR AI2 correspondiente a esta región (5'-TGCCTGCTGCAGCTGCTACTTAT-3'). Se utilizó el iniciador AI2 en com-

binación con cuatro iniciadores (AI3, AI4, AI5 y AI6) flanqueados todos ellos con un sitio *Hind* III. Se utilizaron AI3 (5'GTCAAAGCTTCGCAAGTCGCACCCCA-CTA3'), IA4 (5'CTGAAAGCTTCGGTGCACCGAAT3'), AI5 (5'GCGGCAAGCT-TAATATGTGATGATGATA3') y PI6 (5'TTACAAGCTTCGCAAGTATCGGTA-GGCAT3') en experimentos PCR con AI3 para generar fragmentos de 217 pb, 378 pb, 570 pb y 760 pb, respectivamente. Los productos PCR producidos se cortaron con *Pst* I y *Hind* III y los fragmentos se clonaron en pZMRMS3 cortado con *Pst* I y *Hind* III. Los vectores resultantes pUG4, pUG5, pPUG6 y pPUG7 se muestran en la Figura 6.

Se realizaron ensayos de transformación transitoria con los vectores pPUG en células de suspensión de BMS (Black Mexican Sweet) que se dejaron crecer en presencia o ausencia de fitoprotector (Dichlormid, 40 ppm). El DNA se suministró utilizando transformación con triquitas de carburo de silicio (Wang *et al.*, 1994). La actividad promotora se registró por recuento de unidades formadoras de color. La Figura 7 revela que todas las construcciones de pPUG eran inducibles, excepto una que contenía solamente 217 pb (designada pPUG7) del promotor. Una construcción que contenía 378 pb (designada pPUG6) confería todavía inducibilidad. Este dato sugiere que el o los elementos inducibles se encuentran entre las posiciones -217 y -378 pb aguas arriba del punto de comienzo de la transcripción.

Mapeado de elementos inducibles dentro del promotor GST-27 utilizando huella *in vivo*

La huella *in vivo* (véase el método más adelante) se utilizó para detectar interacciones de proteínas con el promotor y localizar así el elemento que confiere inducibilidad. Se utilizó sulfato de dimetilo (DMS) para modificar residuos guanina *in vivo* por metilación de la posición N7. Si está asociada una proteína estrechamente con el DNA, esta reacción será inhibida y por tanto los factores de fijación de DNA pueden mapearse a las bases implicadas. Después de tratamiento con DMS, el DNA se amplifica y se secuencian. Los puntos de contacto se identifican en las autorradiografías genómicas como residuos G que son menos intensos cuando se comparan con la pista del DNA no inducido.

Se diseñaron iniciadores de tal modo que el área comprendida entre -217 y -378 pudiera analizarse utilizando este método. Se trató una planta de maíz con fitoprotector para inducir la expresión de GST-27. Se realizó el análisis de la huella *in vivo* antes del tratamiento (0 horas) y al cabo de 6, 24 y 48 horas después del tratamiento. Los resultados se muestran en la Figura 8. Puede verse que una proteína se fija a un residuo G en la posición -290 a las 24 horas después del tratamiento de la planta con fitoprotector (ausencia de banda visible) pero no al cabo de 0, 6 ó 48 horas (banda visible). Las posiciones -275, -283 y -284 tienen también bandas más tenues a las 24 horas. Este resultado es reproducible. En resumen, se han identificado dos elementos supuestos que parecen fijar factores de proteínas de una manera dependiente de fitoprotectores.

Estos elementos comparten homología unos con otros. Además de ello, es interesante observar que las regiones homólogas son complementarias para un elemento sensible a etileno en el gen GST1 de la clavellina (Itzhaki *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 19, 8925-8929, 1994) como se muestra en la Figura 9.

Protocolo para la huella *in vivo* de hojas de maíz

(Modificado por Hammond-Kosack y Bevan, Plant Mol. Biol. Reporter, Vol. 11, No. 3, septiembre de 1993).

1. Se aplicaron tratamientos *in vivo* con DMS durante 1 minuto y se relajaron luego lentamente. Después de 5 minutos, se retiró el medio y el tejido se lavó varias veces en medios MS. El tejido se secó con papel secante y se guardó a -70°C hasta que se recogieron todos los momentos (0, 6, 24 y 48 horas).

2. Preparación de DNA cromosómico

El tejido tratado con DMS congelado se trituró a un polvo fino utilizando un mortero con mano y nitrógeno líquido. Se añadieron 30 ml de tampón de extracción caliente (65°C) (Tris HCl 100 mM de pH 8,0, EDTA 50 mM de pH 8,0, NaCl 500 mM, SDS al 1,25%, NaOH 8,3 mM, 0,38 g/100 ml de bisulfito de Na), se mezcló y se incubó durante 15 minutos a 65°C. Se añadieron 6,16 ml de KAc 5M, y después de ello se incubó la muestra en hielo durante 20 minutos. Después de centrifugación a 3,5 K durante 5 minutos, se filtró el sobrenadante a través de Miracloth y se añadieron 0,7 volúmenes de propan-2-ol. El material resultante se centrifugó a 4 K durante 10 minutos, se lavó 2 veces el pélet en etanol al 70% y se resuspendió luego en 0,84 ml de T5E y 0,36 ml de NH4Ac 10 mM. Esta solución se centrifugó durante 5 minutos a 13 K. El sobrenadante se precipitó con 0,73 ml de propan-2-ol.

El pélet se precipitó una vez más antes de disolverlo en 100 ml de T10E. El DNA se digirió con *Hind* III.

3. PCR mediada por ligación (LMPCR)

Las muestras de DNA se amplificaron utilizando LMPCR. Se diseñaron tres iniciadores anidados para amplificar ambas cadenas del promotor GST-27 entre los pares de bases 0 y 350 aguas arriba del TSP. El primer iniciador de cada cadena se reasoció y se dejó luego que tuviera lugar la extensión hasta el extremo de la molécula. Se reasoció al extremo de cada molécula extendida un enlazador de secuencia conocida. Se llevó a cabo luego la PCR normal utilizando un iniciador específico para el enlazador y el segundo de los iniciadores anidados. Cuando se amplificaron, las moléculas de DNA se marcaron utilizando el tercer iniciador que incorporaba un marcador en el extremo. Las muestras se extrajeron con fenol-cloroformo, se precipitaron con propan-2-ol y se resuspendieron en tampón de carga de secuenciación. Para visualizar la huella, las muestras se pasaron en un gel de secuenciación al 6%.

ES 2 275 278 T3

Ensayos de desplazamiento de la movilidad electroforética (EMSA)

Este método se utilizó para ensayar la hipótesis de que las áreas de huella *in vivo* podrían fijarse a proteínas nucleares específicas *in vitro*. Los fragmentos radiomarcados cortos (sondas) de un promotor migrarán a través de un gel de electroforesis a una velocidad determinada por su tamaño y su carga. Si una sonda tiene una proteína asociada con ella, se retardará la migración. En una autorradiografía, esto se visualizará como una banda que no está presente en ausencia de proteína. Los ensayos de competencia con sondas frías determinan si la fijación es específica.

Se prepararon extractos nucleares de proteína a partir de hojas de maíz inducidas y no inducidas. Se prepararon dos sondas cortas (25 pb) (véase la Figura 10) para incubación con la proteína:

1. WT290 - que cubre el área de la huella -290 y -283/284
2. MUT290 - como 1, pero incluyendo una mutación de 5 pb alrededor de -290.

Los resultados se muestran en la Figura 11. La sonda WT fija una proteína (banda visible en las pistas 3 y 5). La mutación en MUT290 anula la fijación (banda más débil en las pistas 4 y 6). El patrón es idéntico tanto si el extracto de proteína nuclear procede de hojas inducidas como si procede de hojas no inducidas. Por consiguiente, la proteína de fijación debe estar presente siempre. *In vivo*, esta proteína debe modificarse de tal manera que la fijación ocurra sólo cuando se induce el gen. La Fig. 12 representa los resultados de ensayos de competencia. La sonda WT290 fría compete con éxito con la sonda WT290 radiomarcada para fijar la proteína, dando como resultado la pérdida de la banda (pistas 6, 7, 8 y 14, 15, 16). Por consiguiente, la fijación observada es específica.

Además de la región 290, se ha demostrado también que la región -275 (véase la Figura 14), está implicada de la fijación de factores de transcripción. La Fig. 15 muestra los resultados de un EMSA en el cual la sonda 275 se fija mientras que el elemento 275 mutado no logra fijar factores de transcripción. En un experimento subsiguiente se ha demostrado que las regiones 284 y 326 (véase la Figura 14) están implicadas con la fijación de proteína a partir de extractos nucleares no inducidos e inducidos (véase la Figura 16). Los ensayos de competencia (véase la Figura 17) con las regiones 275, 284, 290 y 326 muestran que la fijación observada en el estudio EMSA es específica. Las diversas sondas mutadas y salvajes utilizadas en el estudio EMSA se enumeran a continuación:

Nombre de la sonda	Secuencia
290WTN	5 AGCTT GC TATTCAGAAT GC A3 3 A CG ATAAAGTCTTC AG TTCGA 5
290MUTN5	5 AGCTT GC TATGGCCTAAT GC A3 3 A CG ATACCTGATTA CG TTCGA 5
284WTN	5 AGCTT GC GAATCCGAAAT GC A3 3 A CG CTTAGGCTTTA CG TTCGA 5
284MUTN6	5 AGCTT GC GACGAATCAAT GC A3 3 A CG CTGVTTAGTTA CG TTCGA 5
275WTN	5 AGCTT GC AATTCATAAA GC A3 3 A CG TTAAAGTATTT CG TTCGA 5
275MUTN5	5 AGCTT GC AATGGACGAAA GC A3 3 A CG TTACCTGCTTT CG A 5
326WTN	5 AGCTT GC GGTCCTAAAA GC A3 3 A CG CCAAGGATTTT CG TTCGA 5
326MUTN6	5 AGCTT GC GCGGAAGCAAAGC A3 3 A CG CCGCTTCGTTT CG TTCGA 5
ERE-WT	5 AGCTT GC TATTCAAAAT GC A3 3 A CG ATAAAGTTTTA CG TTCGA 5
ERE-MUT	5 AGCTT GC TATGGTCCAAT GC A3 3 A CG ATACCAGGTTA CG TTCGA 5

Estos datos, tomados junto con los datos de la huella *in vivo* indican que esta región del promotor GST-27 está implicada en la fijación químicamente dependiente de factores de transcripción que conducen a la activación génica.

Protocolo para los ensayos de desplazamiento de la movilidad electroforética (EMSAs)

(Modificado por Watson y Thompson, Meth. Enzymol. Vol. 118, pp. 57-75, 1986 y Holdsworth y Laties, Planta, Vol. 179, pp. 17-23, 1989).

1. Preparación de extracto de proteína nuclear de hojas de maíz

Se aplicó una solución al 1% del fitoprotector R-29148 a las superficies superior e inferior de hojas de maíz de 3 semanas. Se recogieron 15 g de material al cabo de 0 y 24 horas. El tejido se trituro para dar un polvo fino utilizando un mortero con mano y nitrógeno líquido. El tejido se dividió en 2; se añadieron a cada muestra 70 ml de tampón de extracto (sacarosa 0,25M, NaCl 10 mM, MES-NaOH 10 mM de pH 6,0, EDTA 5 mM, espermina 0,15 mM, espermidina 0,5 mM, PMSF 0,2 mM, NaF 10 mM, b-Me 20 mM, BSA al 0,1%, 0,6% de non-idet P40). El material homogeneizado se filtró a través de tres capas de Miracloth a un tubo de Corex. Se añadió un cojín de Percoll al 25% al fondo del tubo. Se centrifugó éste a 3 K en un rotor de cubetas oscilantes a 4°C durante 30 minutos. Se recogieron los núcleos del fondo del tubo y se resuspendieron en tampón de extracto (que no incluía BSA). La muestra se centrifugó a 5 K durante 5 minutos a 4°C. Los núcleos se resuspendieron en 100 ml de tampón de diálisis (KCl 40 mM, HEPES-NaOH 24,7 mM de pH 7,9, 5 mg/ml de leupeptina, EDTA 5 mM, 5 mg/ml de antipafina, DTT 1 mM, glicerol al 25%, NaF 10 mM). Se añadió 1/10 de su volumen de sulfato de amonio y la muestra se incubó en hielo durante 30 minutos, después de lo cual se centrifugó a 13 K durante 20 minutos. Se añadieron 1,5 volúmenes de sulfato de amonio al sobrenadante, que se incubó en hielo durante 60 minutos y se centrifugó luego a 13 K durante 20 minutos. La muestra se resuspendió en 100 ml de tampón de diálisis y se dializó en el tampón durante 2 x 2 horas. La concentración de proteína en la muestra final se midió utilizando el ensayo de Bradford.

2. EMSA

Se incubó 1 mg de extracto de proteína durante 20 minutos a la temperatura ambiente con 20.000 cpm (c. 0,5 ng) de sonda (marcada por llenado en los términos rebajados en 3' con dNTPs marcados utilizando Klenow), 1 mg de poli-d(I-C), DTT 5 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 100 mM en 10 ml de tampón de fijación (HEPES 250 mM de pH 7,6, EDTA 10 mM, glicerol al 50%). Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 6%, y se corrieron en tampón 0,25 X TBE.

Ensayos de expresión transitoria

Para probar que las áreas de huella indican las posiciones de elementos inducibles se realizaron ensayos transitorios. Por mutación de los fragmentos inducibles supuestos para prevenir la fijación de factores de proteína con acción *trans*, debería perderse la inducibilidad. Se demostró previamente que una construcción (pPUG5) que contenía 570 pb del promotor fusionado a GUS retenía inducibilidad. Se mutó ésta, utilizando PCR anclada, en las áreas de las que se había tomado la huella. Se prepararon 3 construcciones, cada una de las cuales contenía una mutación de 10 pb:

1. MUT290 que contenía una mutación de 10 pb alrededor de G-290
2. MUT284 que contenía una mutación de 10 pb alrededor de G-284
3. MUT326 que contenía una mutación de 10 pb alrededor de G-326

La construcción MUT326 se preparó dado que se observó una huella convincente a las 48 horas, que implicaba G-325/326. Las construcciones se transformaron en células de suspensión BMS utilizando la denominada técnica de las triquitas de fibras de silicio como se describe en la Patente US No. 5.302.523 de los mismos autores. Los resultados se muestran en la Tabla 1 (Figura 13). Las construcciones mutadas eran todavía inducibles. La multiplicidad de inducción para todas las construcciones era comparable a la de WTpPUG5.

Después de este resultado, se realizó una búsqueda de homología en el fragmento de 570 pb en pPUG5 para identificar cualquier duplicación de los elementos supuestos. Si están presentes elementos múltiples, puede no ser visible el efecto de la mutación de uno de ellos. No se encontraron duplicaciones directas. Sin embargo, se observó que había una alta homología (67%) dentro del fragmento. A partir de los datos se cree que había ocurrido un suceso de duplicación e inversión que implicaba 150 pb. Adicionalmente, dado que la región -290 y -275 cuya huella se había tomado muestran homología significativa, se repitió el experimento de ensayo transitorio en el promotor de fondo pPUG6 (378 pb), con las tres mutaciones en el mismo vector.

Vectores de transformación de plantas

Mutagénesis mediada por PCR del promotor GST-27

Se requirieron cuatro iniciadores para la mutagénesis mediada por PCR, enumerándose a continuación los iniciadores utilizados:

ES 2 275 278 T3

Iniciadores utilizados para crear 3XMUT en pPUG6:

R1 = 5' CTGAAAGCTTCGGTGCACCGAAT 3' (pAI4)

R2 = 3' TATTCATCGTCGACGTCGTCCGT 5' (pAI2)

M=5'CCTAAAATTATTTTAAAAATTTTGGTTCTCATATGGACTACGAATCAA

TGGACGAAATCCAAATAGACCG 3'

rev = 3' GGATTTTAATAAAATTTTAAAACCAAGAGT 5'

Los iniciadores R1 y R2 flanquean el promotor a ambos lados de la región que debe mutarse y contienen sitios de restricción con enzimas adecuadas para clonación. Los extremos 5' y 3' del iniciador M son idénticos al promotor mientras que la sección media contiene la secuencia alterada. El iniciador rev es idéntico al extremo 5' de tipo salvaje del iniciador M.

En el paso 1, se realizaron dos PCRs en un volumen de 25 μ l con 20 ng de plásmido molde de tipo salvaje, tampón 10X PCR, 2,5 μ l de dNTPs 2 mM, 2 μ l de iniciador R1 o M 20 mM, 2 μ l de iniciador rev o R2 20 mM y 0,25 μ l de Amplitaq (Perkin Elmer). El programa utilizado fue 94°C durante 2,5 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto. Las reacciones se llevaron a cabo cada una 4 veces para generar suficiente producto para el paso 2. Los fragmentos R1/rev y M/R2 resultantes se purificaron y cuantificaron.

En el paso 2, los fragmentos R1/rev y M/R2, que comparten una región de secuencia de solapamiento, se reasociaron. Se mezclaron 250 ng de cada fragmento en un volumen de 25 μ l con tampón 10X PCR, 2,5 μ l de dNTPs 2 mM y 0,25 μ l de Amplitaq. La reasociación seguida por extensión del producto reasociado se realizaron utilizando el programa de 94°C durante 2,5 minutos seguido por 9 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 40°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto.

En el paso 3, los heterodímeros extendidos, que comprendían la secuencia promotora total que contenía la mutación, se amplificaron por la adición de los iniciadores R1 y R2. Se añadieron a la misma reacción procedente del paso 2, 2,5 μ l de tampón 10X PCR, 2,5 μ l de dNTPs 2 mM, 2 ml de R1 20 mM, 2 ml de R2 20 mM, 15,75 μ l de agua y 0,25 μ l de Amplitaq. La PCR se llevó a cabo utilizando el mismo programa que el usado en el paso 1. El fragmento resultante se purificó y se clonó en el vector pGEM-T (Promega) y se secuenció para asegurar que se habían mutado las bases correctas. 3XMUTBin/6 contenía mutaciones de 5 pb para los residuos G de huella-290, G-283/284 y G-275 y sus nucleótidos flanqueantes.

Se adoptó una estrategia similar para generar 4 mutaciones en el fondo de pPUG6 utilizando los iniciadores indicados a continuación.

Iniciadores utilizados para crear 4X MUT en pPUG6:

R1 = 5' CTGAAAGCTTCGGTGCACCGAAT 3' (pAI4)

R2 = 3' TATTCATCGTCGACGTCGTCCGT 5' (pAI2)

M = 5' GTCTATTCAGGTTCCGGGAAGCAAATTAT 3'

rev = 3' CAGATAAGTCCAAG 5'

Se realizó una mutagénesis ulterior mediada por PCR utilizando p3XMUT/PUG6 como DNA molde a fin de mutar los residuos G de huella G-325/236 y cuatro nucleótidos flanqueantes. El 4XMUTBin/6 contenía mutaciones de 5 pb para los residuos G de huella G-290, G-283/284, G-275 y G-325/236 y sus nucleótidos flanqueantes.

Los fragmentos mutados se introdujeron en el promotor GST-27 por corte de los vectores pGEM-T con HindIII y PstI y se clonaron en pPUG6 que se había linealizado con las mismas enzimas. De este modo, el promotor de tipo salvaje en pPUG6 se retiró y se reemplazó con la versión 3XMUT o 4XMUT, creando así el plásmido p3XMUT/PUG6 o p4XMUT/PUG6. Éste se clonó en pBin400 utilizando la misma estrategia que se ha descrito arriba para el plásmido pPUG6 de tipo salvaje, a fin de formar 3XMUT/Bin6 o 4XMUT/Bin6.

Construcción de vectores

Se transformaron plantas de tabaco con cinco construcciones, todas las cuales estaban basadas en el vector binario pBin400 (Spychalla y Bevan, 1993). Se prepararon tres delecciones 5' del promotor GST-27 fusionado al gen informador GUS, que contenían 570, 378 y 217 pb del promotor aguas arriba del TSP. Estas fusiones promotor truncado:GUS estaban presentes en las construcciones pPUG5 (570 pb), pPUG6 (378 pb) y pPUG7 (217 pb). Los promotores truncados fusionados a GUS se cortaron en un fragmento HindIII, EcoRI a partir de estos tres plásmidos y se clonaron directamente en pBin400, que se había linealizado con las mismas enzimas. Las construcciones resultantes se designaron pBin/5, pBin/6 y pBin/7. Se transformaron también 3XMUT/Bin6 y 4XMUT/Bin6.

Transformación de Agrobacterium

Se dispuso un cultivo nocturno de *A. tumefaciens* (cepa T37SE) en 10 ml de caldo YEP (1% (p/v)) de Bactopeptona [Difco], 1% (p/v) extracto de levadura [Difco], 0,5% NaCl) con 50 µg/ml de sulfato de kanamicina y se dejó crecer a 30°C. Se utilizaron cuatro ml de este cultivo para inocular 100 ml de caldo YEP, que contenía 50 µg/ml de sulfato de kanamicina, que se dejó crecer durante 4-5 horas. Las células se redujeron a un sedimento a 2500 rpm durante 10 minutos (centrífuga Sorvall RC3C, rotor H6000A), se resuspendieron en 2 ml de caldo YEP y se enfriaron en hielo durante 5 minutos en partes alícuotas de 200 µl. Se añadieron a las células diez microlitros de DNA de pBin a 0,1-0,2 µg/ml. Las células se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido durante aproximadamente 15 segundos seguido por un choque térmico a 37°C durante 5 minutos. Se añadió luego 1 ml de YEP y las células se dejaron crecer a 30°C durante 1-2 horas. Una parte alícuota de 100 ml de cada transformación se extendió sobre placas YEP (YEP con 1,5% (p/v) de agar) que contenía 50 µg/ml de sulfato de kanamicina para seleccionar respecto a *Agrobacterium* y 50 µg/ml de hidrocloreuro de espectinomicina para seleccionar respecto al vector binario. Las placas se inspeccionaron en cuanto a crecimiento después de 48 horas de incubación a 30°C. Las colonias simples se aplicaron en bandas sobre placas T Minimal (350 ml de agar agua [1,5% (p/v) agar], 20 ml de sales 20X, 20 ml de tampón T 20X, 20% glucosa), que contenían los antibióticos seleccionantes, y se dejaron crecer durante 3 días a 30°C. Se utilizaron colonias bacterianas de estas placas para inocular cultivos líquidos para la preparación de DNA.

Preparaciones de DNA plasmídico a partir de Agrobacterium tumefaciens

Se inocularon 10 ml de caldo YEP, que contenía antibiótico para seleccionar respecto al vector binario y el *Agrobacterium*, con una sola colonia de *A. tumefaciens* y se dejaron crecer durante una noche a 30°C. Se recogieron las células por centrifugación a 2500 rpm durante 20 minutos (centrífuga Sorvall RC3C, rotor H6000A), se resuspendieron luego en 200 ml de solución I enfriada en hielo (Horsch *et al.*, 1985) y se dejaron en reposo durante 30 minutos a la temperatura ambiente, después de lo cual se agitaron enérgicamente. Se añadieron 200 ml de solución II, se mezclaron por agitación suave mediante sacudidas y se incubaron a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Se llenaron luego 150 ml de solución III enfriada en hielo y la mezcla se incubó en hielo durante 5 minutos. La muestra se centrifugó durante 5 minutos a 13.000 rpm (microcentrífuga de sobremesa MSE Microcentaur). Se extrajo el sobrenadante con un volumen igual de fenol/cloroformo y se precipitó luego con IPA. Se resuspendió el pélet en 50 ml de T10E1. Se digirió el RNA por adición de 1 ml de RNasa A de concentración 1 mg/ml, seguido por incubación a 37°C durante 30 minutos. Se utilizaron 10 microlitros de éste DNA en las digestiones con enzimas de restricción y se confirmó la identidad del plásmido binario por electroforesis en gel de agarosa.

Transformación de tabaco

Se transformó tabaco utilizando el método desarrollado por Horsch *et al.* (1985). El *Agrobacterium* que contenía la construcción del vector binario se dejó crecer en caldo YEP, que contenía los antibióticos apropiados, a 30°C durante 24 horas antes de la transformación. Se redujeron las células a un sedimento por centrifugación a 3000 rpm durante 20 minutos a la temperatura ambiente (centrífuga Sorvall RC3C, rotor H6000A) y se resuspendieron en 10 ml de YEP de nuevo aporte. Se cortaron discos foliares a partir de hojas de *Nicotiana tabacum* var. Samsun utilizando un taladracorchos (7 mm) y se transfirieron a una cápsula Petri de 14 cm. Se añadió *Agrobacterium* a la cápsula Petri que se dejó a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Se prepararon placas alimentadoras antes del comienzo del experimento. Fue necesario un medio 1 NBM (4,6 g de sales MS [Flow Laboratories], 30 g de sacarosa, 0,1 mg de EtOH NAA [Sigma], 0,1 mg de BAP [Sigma], 8 g de agar (Difco), 100X B5 VITS, pH 5,9) para 40 placas. Se extendió uniformemente 1 ml de un cultivo de suspensión de células de tabaco sobre la superficie de las placas, y se cubrió luego con un disco de filtro estéril de 9 cm Whatman No. 1. Los discos foliares se transformaron en las placas alimentadoras, con la epidermis inferior hacia arriba. Después de 2 días de co-cultivo con *Agrobacterium*, los discos se transfirieron a placas NMB que contenían 100 µg/ml de sulfato de kanamicina y 500 µg/ml de sal de sodio de carbenicilina, a fin de eliminar el *Agrobacterium* y seleccionar respecto a transformantes. Los discos foliares se transfirieron cada dos semanas a placas NMB recientes que contenían los antibióticos. Después de aproximadamente 4 semanas, eran visibles pequeños brotes en los discos foliares. Se transfirieron éstos a medio MS (4,6 g de sales MS, 30 g de sacarosa, 8 g de agar, pH 5,9) que contenía 200 µg/ml de sal de sodio de carbenicilina y 100 µg/ml de sulfato de kanamicina.

Los transformantes enraizaron después de aproximadamente 14 días mientras que las plantas no transformadas se decoloraron y murieron. Cuando las plantas transformadas estuvieron establecidas, se transfirieron a suelo y se dejaron crecer en el invernadero.

Otras modificaciones de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance de la invención.

Referencias

- Hatzios** KK: An overview of the mechanisms of action herbicide safeners. *Z Naturforsch* 46c: 819-827 (1991).
- Holt** DC, **Lay** V, **Clarke** ED, **Dinsmore** A, **Jepson** I, **Bright** SWJ, **Greenland** AJ: Characterisation of the safener-induced glutathione S-transferase isoform II from maize. *Planta* (1995) 196:295-302.
- Irzyk** GP, **Fuerst** EP: Purification and characterization of a glutathione S-transferase from benoxacor-treated maize (*Zea mays*). *Plant Physiol* 102: 803-810 (1993).
- Jepson** I, **Bray** J, **Jenkins** G, **Schuch** W, **Edwards** K: A rapid procedure for the construction of PCR cDNA libraries from small amounts of plant tissue. *Plant Mol Biol Rep* 9 (2): 131-138 (1991).
- Lamoureux** GL, **Rusness** DG: The role of glutathione and glutathione S-transferases in pesticide metabolism, selectivity, and mode of action in plants and insects. In Dolphin D, Poulson R, Avramovic O (eds), Coenzymes and cofactors, Vol 3: Glutathione: chemical, biochemical and medical aspects, pan B pp 153-196. John Wiley and sons, New York (1989).
- Mannervik** B, **Danielson** UH: Glutathione transferases - structure and catalytic activity. *Crit Rev Biochem* 21: 283-337 (1988).
- Mozer** TJ, **Tiemeier** DC, **Jaworski** EG: Purification and characterization of corn glutathione S-transferase. *Biochemistry* 22: 1068-1072 (1983).
- Moore** RE, **Davies** MS, **O'Connell** KM, **Harding** EI, **Wiegand** RC, **Tiemeier** DC: Cloning and expression of cDNA encoding a maize glutathione S-transferase in *E. coli*. *Nucl Acids Res* 14: 7227-7235 (1986).
- Sanger** F, **Milkin** S, **Coulson** AR: DNA sequencing with chaira-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467 (1977).
- Timmerman** KP: Molecular characterization of corn glutathione S-transferase isozymes involved in herbicide detoxication: *Physiologia Plantarum* 77: 465-471 (1989).
- Wiegand** RC, **Shah** DM, **Mozer** TJ, **Harding** EI, **Diaz-Collier** J, **Saundres** C, **Jaworski** EG, **Tiemeier** DC: Messenger RNA encoding a glutathione S-transferase responsible for herbicide tolerance in maize is induced in response to safener treatment: *Plant Mol Biol* 7: 235-243 (1986).
- Kuhlemeier et al** *Ann Rev Plant Physiol.* 38 221-257 (1987)
- Drews**,G.N., **Beals**, T.P., **Bui**, A.Q., and **Goldberg**, R.B. (1992). Regional and cell specific expresion patterns during petal development. *Plant Cell* 1383-1404.
- Guerrero**, Felix D., **Crossland**. Lyle. **Smutzer**, Gregory S., **Hamilton**, Douglas A., and **Mascarenhas**, Joseph P. (1990). Promoter sequences from a maize pollen-specific transcription in tobacco. *Mol Gen Genet* (1990) 224: 161-168.
- Fonne-Pfister**, Raymonde., and **Kreuz**, Klaus. (1990). Ring-methyl hydroxylation of chlortoluron by an inducible cytochrome P450-dependent enzyme from maize. *Agrochemistry*, Vol. 29, No. 9, pp. 2793-2796, 1990.
- Schena**, Mark., **Lloyd**, Alan M., and **Davis**, Ronald W. (1991). A steroid-inducible gene expression system for plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 88. pp. 10421-10425, December 1991. Genetics.
- Williams**, Shericca., **Friedrich**, Leslie., **Dincher**, Sandra., **Carozzi**, Nadine., **Kessmann**, Helmut., **Ward**, Eric., and **Ryals**, John. (1992). Chemical regulation of bacillus thuringiensis a-endotoxin expression in transgenic plants. *Bio/Technology* Vol. 10. May 1992.
- Mett**, Vadim L., **Lochhead**, Lessa P., and **Reynolds**, Paul H.S. (1993). Copper-controllable gene expression system for whole plants. *Proc. Natt. Acad. Sci. USA*. Vol. 90, pp. 4567-4571, May 1993. Plant Biology.
- Weinmann**, Pamela, **Gossen**, Manfred., **Hillen**, Wolfgang., **Bujard**, Hermann., and **Gatz**, Chrisiane. (1994). A chimeric transactivator allows tetracycline-responsive gene expression in whole plants. *The Plant Journal* (1994) 5 (4), 559-569.

ES 2 275 278 T3

Jefferson, R.A., Bevan, M., and Kavanagh, T. The use of the *Escherichia coli* beta-glucuronidase gene as a gene fusion marker for studies of gene expression in higher plants - construction of promoter cloning vector plasmid ptki and detection of enzyme activity by fluorometric assay (conference paper). 060617 DBA Accession No: 87-04965.

5 **Horsch, R.B. et al. (1985).** A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231.

10 **Spychalla, J.P. and Bevan, M.W.(1993).** Agrobacterium-mediated transformation of potato stem and tuber tissue, regeneration and PCR screening for transformation. *Plant Tissue Culture Mantial*. B11:1-18.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un promotor génico químicamente inducible constituido por una secuencia seleccionada del grupo constituido por:
 - (i) la región de los pares de bases 1 a 570 inmediatamente aguas arriba del punto de comienzo de la transcripción de la secuencia promotora génica de la subunidad de 27 kD de la glutatión-S-transferasa;
 - (ii) la región de los pares de bases 1 a 378 situada inmediatamente aguas arriba del punto de comienzo de la transcripción de la secuencia promotora génica de la subunidad de 27 kD de la glutatión-S-transferasa; y
 - (iii) la región de los pares de bases 277 a 332 situada inmediatamente aguas arriba del punto de comienzo de la transcripción de la secuencia promotora génica de la subunidad de 27 kD de la glutatión-S-transferasa;en el cual dicho promotor tiene al menos 90% de homología con el promotor de la subunidad de 27 kD de la glutatión-S-transferasa del maíz.
2. Un promotor génico químicamente inducible constituido por la secuencia de la región de los pares de bases 275 a 290 inmediatamente aguas arriba del punto de comienzo de la transcripción de la secuencia del promotor génico de la subunidad de 27 kD de la glutatión-S-transferasa del maíz.
3. Un elemento promotor génico químicamente inducible constituido por una secuencia seleccionada del grupo constituido por:
 - (i) la región de los pares de bases 267 a 279 situada inmediatamente aguas arriba del punto de comienzo de la transcripción de la secuencia promotora de genes de la subunidad de 27 kD de la glutatión S-transferasa del maíz;
 - (ii) la región de los pares de bases 278 a 288 situada inmediatamente aguas arriba del punto de comienzo de la transcripción de la secuencia promotora de genes de la subunidad de 27 kD de la glutatión S-transferasa del maíz;
 - (iii) la región de los pares de bases 286 a 296 situada inmediatamente aguas arriba del punto de comienzo de la transcripción de la secuencia promotora de genes de la subunidad de 27 kD de la glutatión S-transferasa del maíz; y
 - (iv) la región de los pares de bases 320 a 332 inmediatamente aguas arriba del punto de comienzo de la transcripción de la secuencia promotora de genes de la subunidad de 27 kD de la glutatión S-transferasa del maíz.
4. Un promotor génico químicamente inducible de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el promotor génico está situado inmediatamente aguas arriba del punto de comienzo de la transcripción de la secuencia del promotor génico de la subunidad de 27 kD de la glutatión-S-transferasa del maíz.
5. Un promotor génico o elemento de promotor génico químicamente inducible de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual la secuencia del promotor génico de la subunidad de 27 kD de la glutatión-S-transferasa, isoforma II, es como se muestra en la Figura 1.
6. Un multímero constituido por los promotores génicos o los elementos promotores génicos de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5.
7. Una construcción génica constituida por un promotor génico o elemento de promotor génico, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 enlazada operativamente a un gen o una serie de genes, por los cuales la expresión del gen o la serie de genes puede controlarse por aplicación de un inductor exógeno eficaz.
8. Un sistema de expresión para una planta, estando constituido el sistema de expresión por un gen o una serie de genes fusionados a un promotor génico o elemento de promotor génico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual el sistema de expresión es susceptible de ser expresado en la planta y en el cual la expresión del gen o la serie de genes puede controlarse por aplicación de un inductor exógeno eficaz.
9. Una planta transgénica que comprende una construcción génica de acuerdo con la reivindicación 7 o un sistema de expresión de acuerdo con la reivindicación 8, en la cual la construcción o el sistema de expresión está integrado, preferiblemente integrado de manera estable, en el DNA genómico de la planta.
10. Un proceso de expresión de una construcción de acuerdo con la reivindicación 7 en una planta, o un sistema de expresión de acuerdo con la reivindicación 8, en el cual el sistema de expresión o la construcción está integrado,

ES 2 275 278 T3

preferiblemente integrado de manera estable, dentro del DNA genómico del material de la planta y por el cual la expresión del gen o la serie de genes puede controlarse por aplicación de un inductor exógeno eficaz.

- 5 11. Uso de un elemento promotor génico constituido por el elemento del promotor génico de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 5, para identificar factores de transcripción implicados en regulación inducible.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig.1.

gaattccaaatatatgatgatgtgtgtcctagtgcagaagaactaaatatatactagcgaaaaaaaccttc
 ctagtcatgtaagtgtatggcatatagaaaaataaacatctcaagactccaaactagtcatagtctttaa
 gtccaaacttcaaacacttcatagccaaagatcatggatttttttttgcctaaagacaaaactagaat
 gagaaaagaactaaactcatcatacatatagtagtgcatcacaataaaatgacacatatatgatACTAT
 ATCACACAGGCCCTTCAGTTTCTAGAACAAAGTGCAGATCGAtgtgtgggtatgcatgtcttaatatcttact
 aggttgatatatgcatggggttcattcagaatcagtttcacacagtttatcgaccttctgtttacaaaac
 atggatttcattgctctgtactggctacatgcgttaaggatcaacttgtctaacttaggtgcatcctcctt
 gtcaagcaaaccttaacaaatttgataaaaaaaatgcagcttttatatgtgaacccataacttaatatgga
 caggaaactgatgtgcaaacacAAACTAAATAGGAAGGaaacacaagtccaaatgtataaatttg
 tcaacca tagtgcaaaagaaccaaataatactgcagagaaaacttcctagtcatgtaaagtgtATGGACATAT
 AGAAATAAAACATCTCAAGACTCCCAATAACAGGCTCAAGCTAAGCTAGTCATGGCTTTAAACCTTCATGAT
 GCAAACTAGTCACAACTTTAAACATTTTCATGCCAACAAAGATCATGGATGGTGTTTTTCCTAGGGAA
 AAGCTAGAAATGAGAAAGACCTAACTCAGCATACATATCAGGATAGTATCGTATAGACACGTATATGATA
 CTATATCACGCAGCCGTTCAATTCTAGAACAAATGCAGATTGATCTGTGAATATGCATGTCTCATATTT
 TACTAGGTGGATGGACTGAATCCCGTGAAACAAACAATTTATTCAACAAGtttctgcatgaatatcatc
 tcaaatccaataaatacactctcggttgataaaaaaaatgcaaccaacagtttaaccagaagtgaatagaaac
 tatltgaatcagatcactccggttatcacatcaaaaataattgtgtgcttgatctataaaagcagtaggaac
 attgtttaccatcaatttcaagtacacagtaacaagaacagtcagctagaaattgagcatgtgagtATT
 GTTGATACCTCGTTGAGCTCTCTGCCGGGCTTTCTGCTCGGcagcaagagccagctcaggatccacc
 ccgaaagcttgggctaggtgtgtctatcggcgaaaaacacgcgcggttacgccaagaacagcgcggtccat

[illegible]

Fig.1(Cont ii).

AAAAACAACAACTCTTCTGAAAGTGTCGGTGTAAGCCGAGAAATCCTTTTCATTTCCGGTGACG
 GAGCCCCCTTGCTGGCTGCTCAGTGCACTCCGTTCCGCTGCCCTGCACTACAAGCGACGGCCGACGAC
 TCGCAAGTATCGGTAGGCATTTTAAACTGAACCAAACTCTAAACCCGAAATAGACCAAAATTGTTGGTTT
 ATTCCGGGTTTTTGGGTTCCGATTCCGTTTCTAAATATGCTATATTTTAGGGTATAGGTTCCGGTTCAGTT
 TCTAACCTTTTAAACCTGAATAGACGAATAACCCGAAATATAAAATCTCTTAATATGTGATGATATTA
 TTATATGATTTATGAACCTTATTAAACCGAAATAATGATACCATCCTAACGATAGTATATATCTATGTA
 TGCTATTTTATAGTCACCTTGTTGTAATAATAGTACTTCCAAATTAATTCAGTGATATATTTTAACA
 AAAGATACCTAGCCCTCTACTATTTGAGTATATTCGGTGCAACCGAATAGACCGAAATTTGTAAGTC
 TATTCAGGTTCCGTTCCCTAAATTAATTTTAAATAATTTTGGTTCTCATATTTTCAGAAATCCGAAATTTTCATA
 AATCCAAATAGACCGAACCAAAATTaCGCTAATAGACCGAATACTAGCGTACTC9CAAGTCGCACCCAC
 TAGCCCTGCTGCGTAAAGCGAGGACGTCACGCGTTCTCCCTCCGTCGACCAATAACACTTGGTCTTC
 TAGCACCTTCTCTCCCAAGaCTCCAATCCCCCAACCAAGAACCGCCa9CTctAACGTCACT
 CTGATTTCTCTCTCTCTATTTGCTAGCTGCTTTATTAAGTAGCAGCTGCAGCAGGCAAGGAGCTGCA
 CACACCCATCCCAATTCCAGCTGCTGATCTTGATCCTGCAACCCGAGCCGTACACAAGAGCTAGTCGGTAG
 AACTTGCAGGAGCGGagCAGAACTAAGTGCAGAGAACAGGACATATG

TSP

Fig.2.

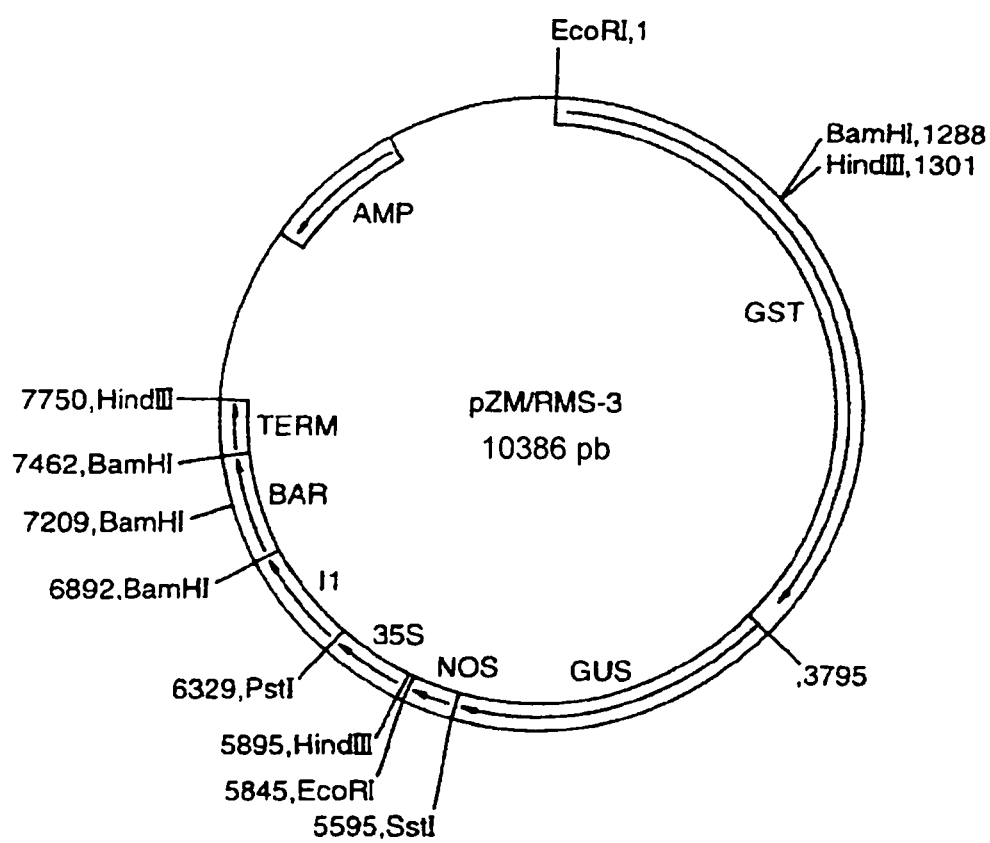
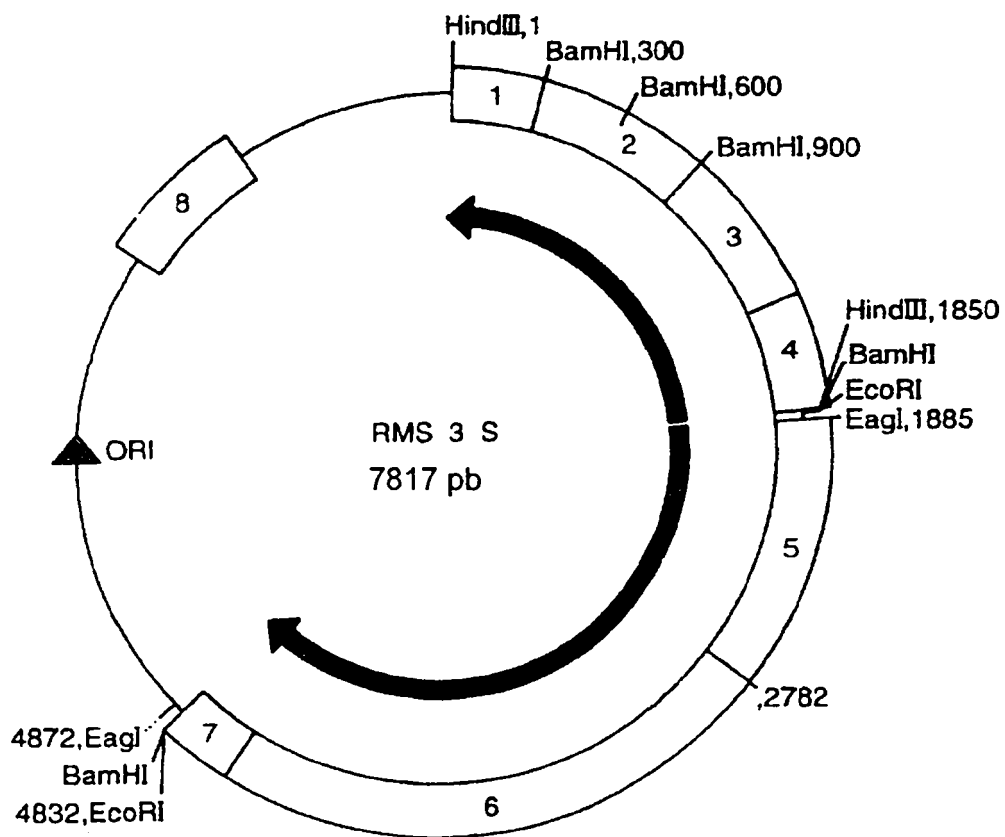


Fig.3.



CLAVE PARA LOS GENES

1 = TERMINADOR nos

2 = GEN BAR

3 = INTRÓN Adh 1

4 = 35S de CaMV

5 = PROMOTOR GST

6 = GEN GUS

7 = TERMINADOR nos

8 = RESISTENCIA A LA AMPICILINA

Fig.4.

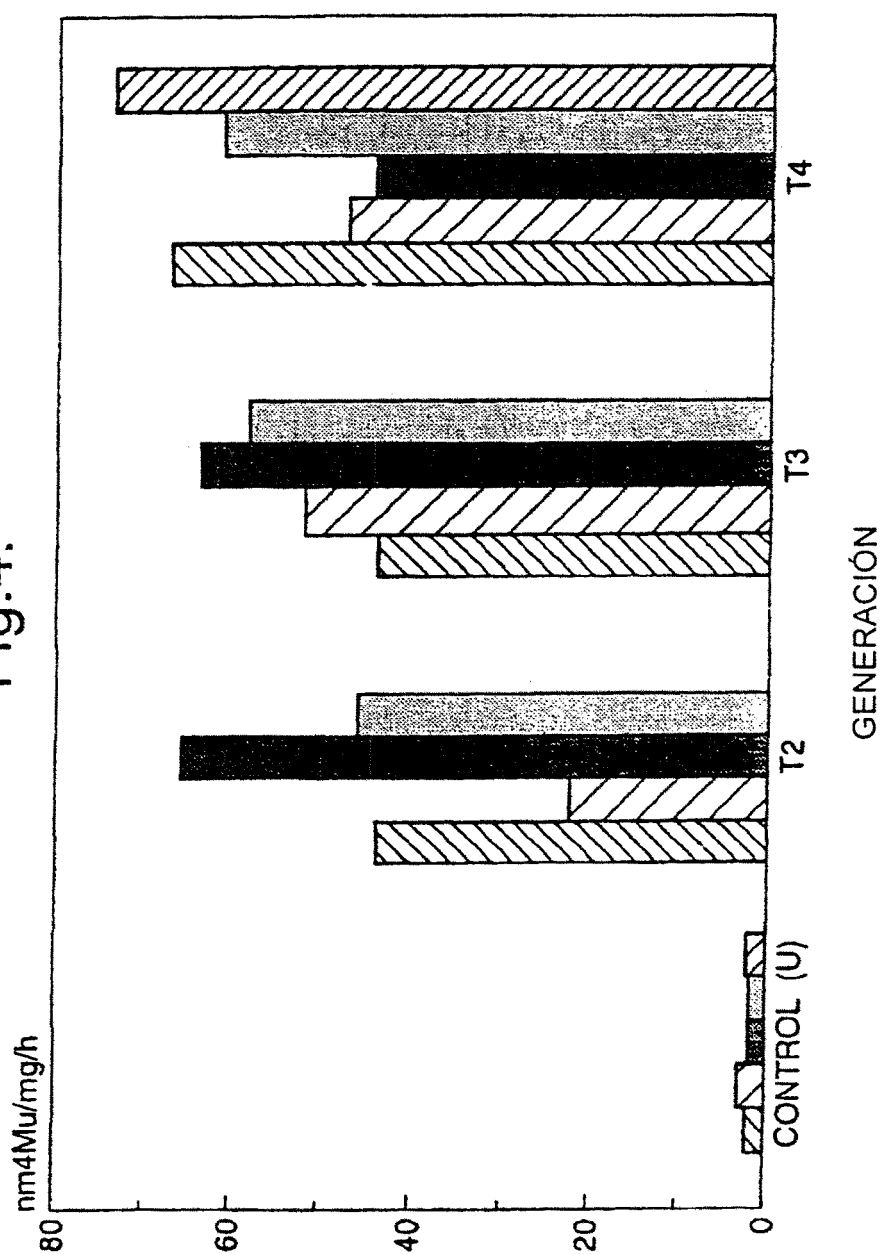


Fig.5.

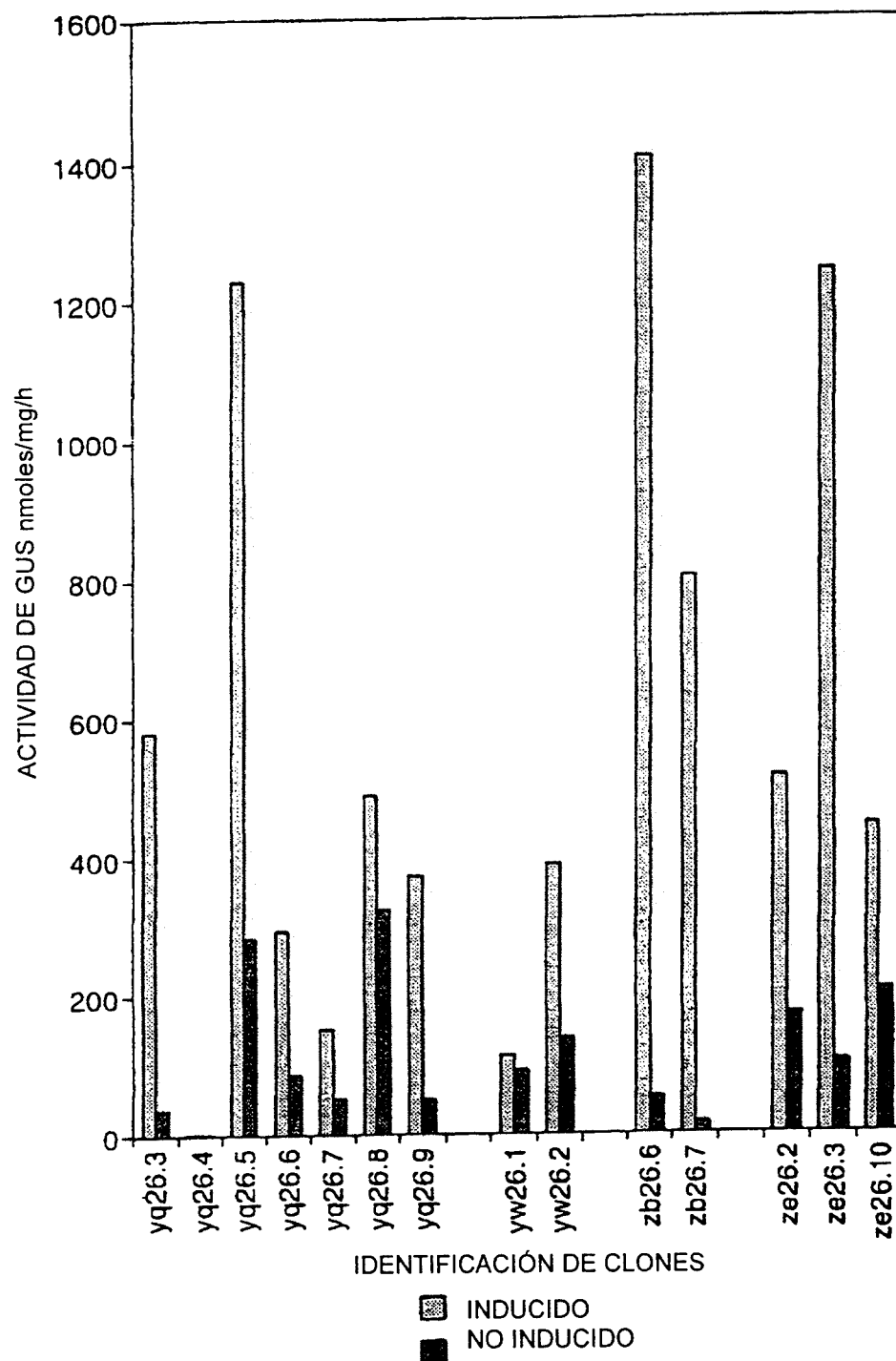


Fig.6.

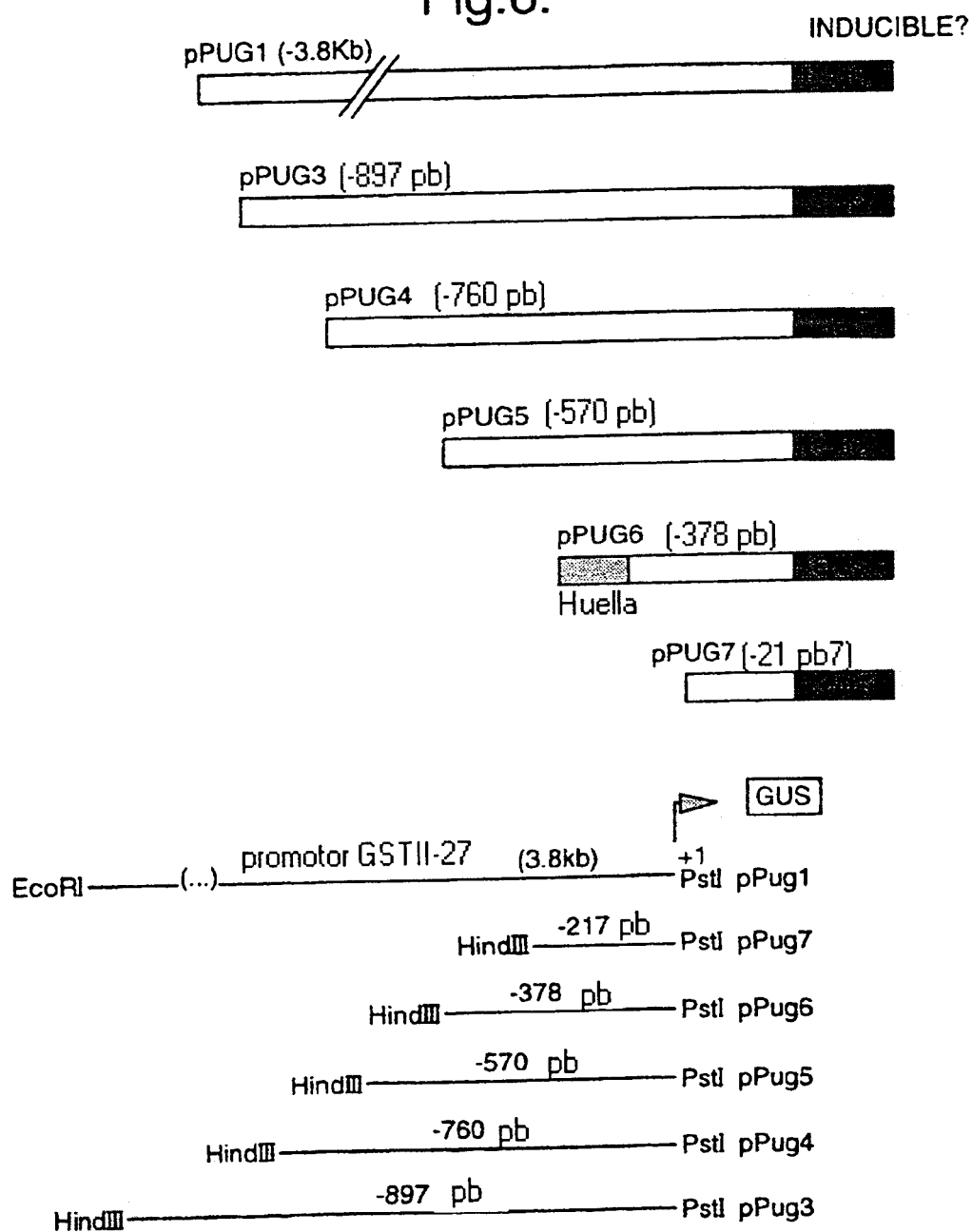


Fig.7.

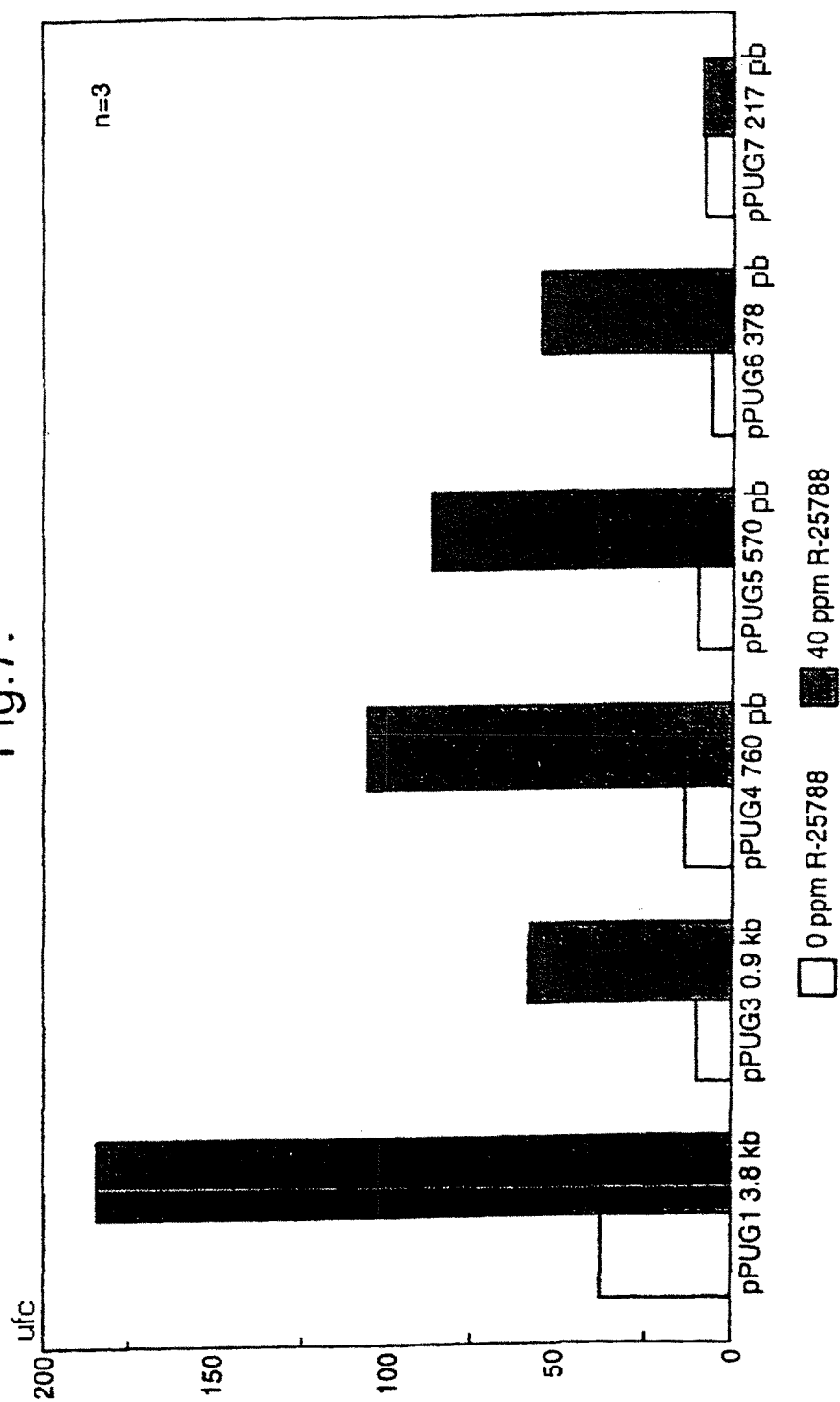
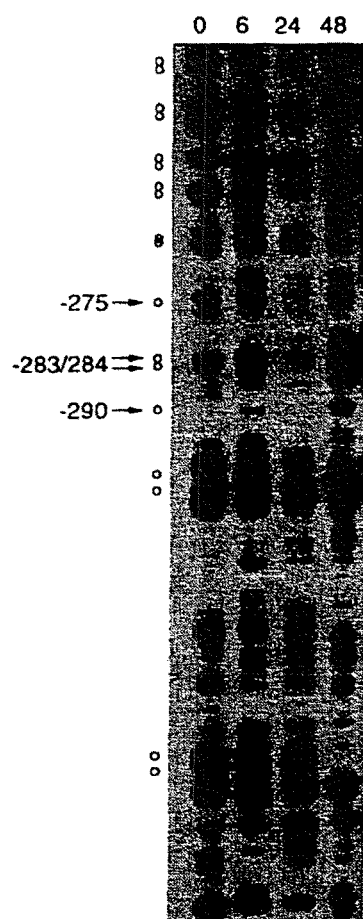


Fig.8.



HUELLA DE GST-27

-290 -284/283 -275

↓ ↓↓ ↓

3' CAAGGATTTTAAATAAAATTTTAAAAA CCAAGAGTATAAAGTCTTAGGCTTTAAAGTATTTAGGTTTATCTGCTTGG 5'

Fig.9.

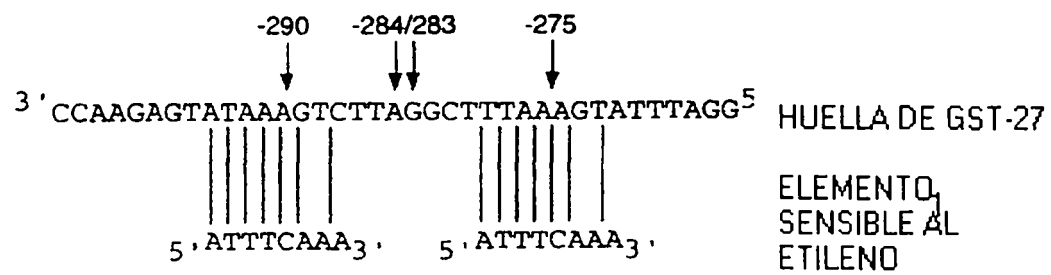


Fig.10.

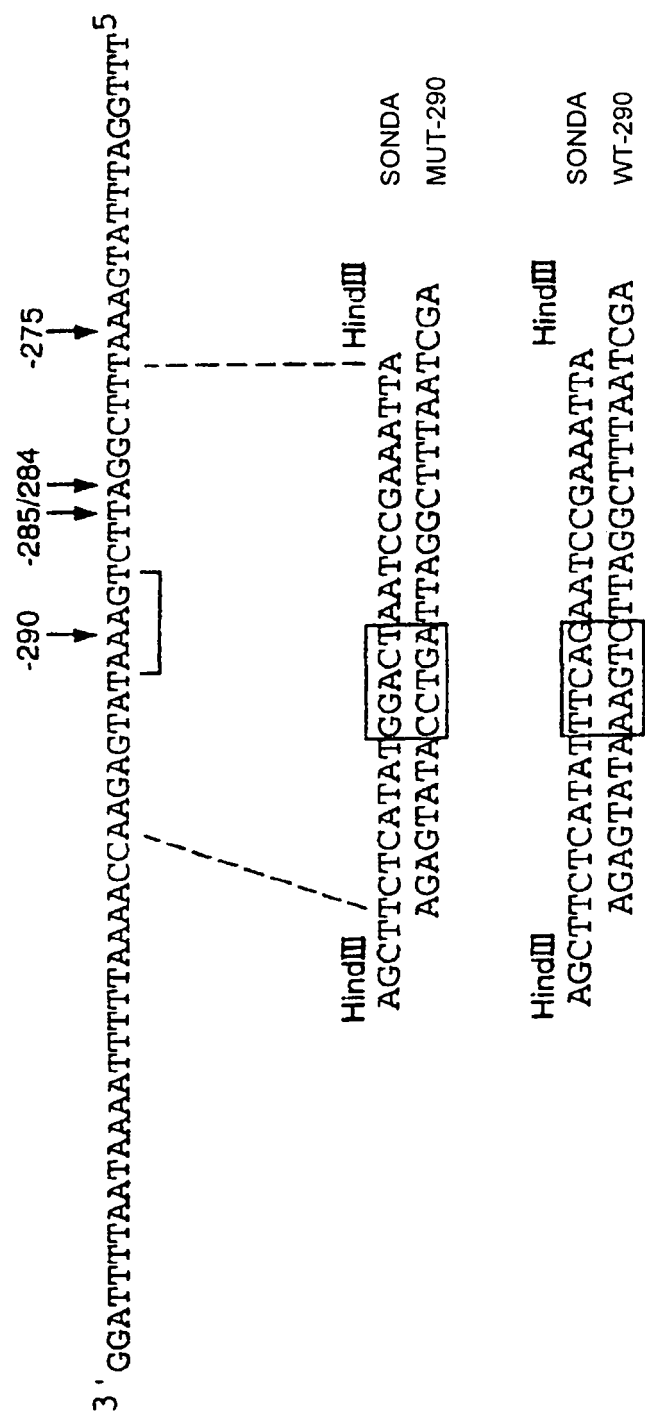


Fig.11.

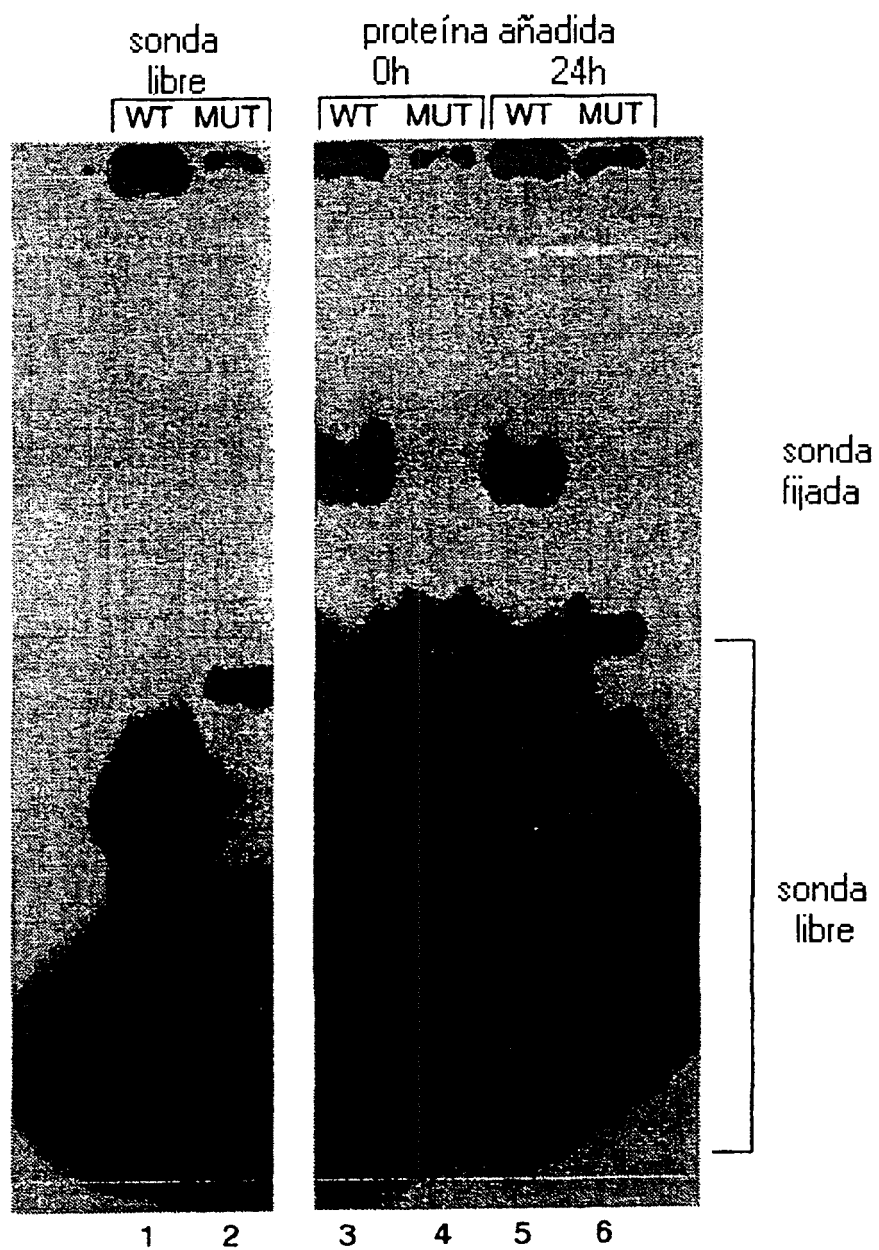


Fig.12.

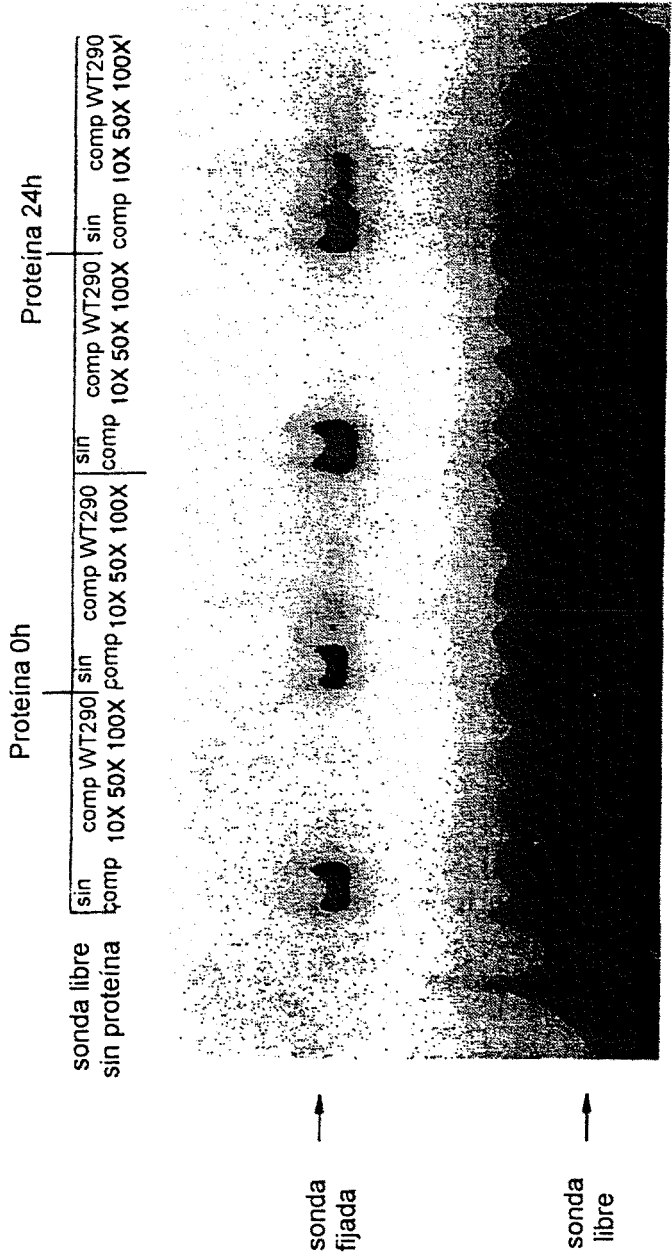


Fig.13.

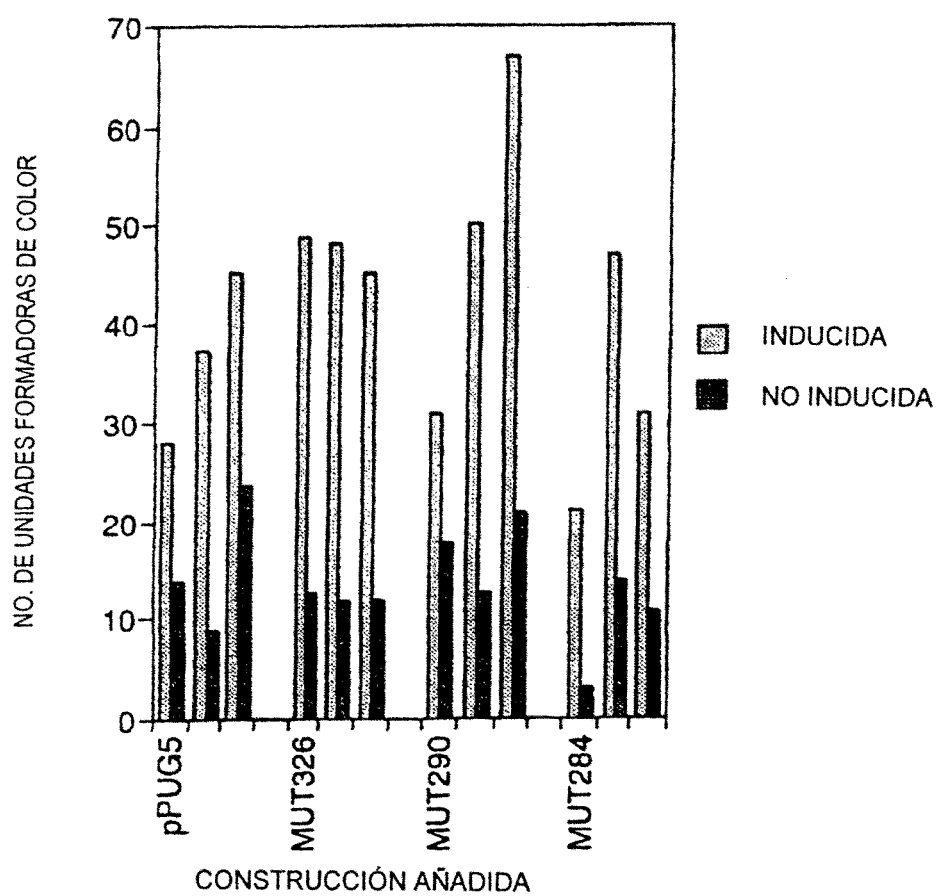


Fig.14.

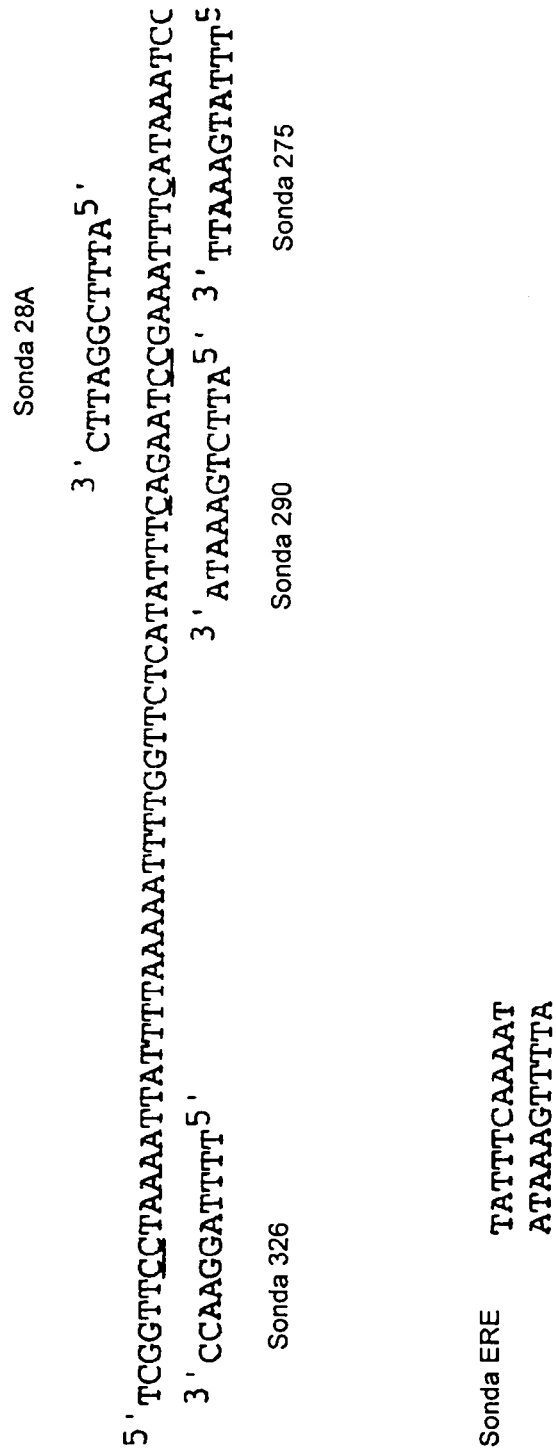
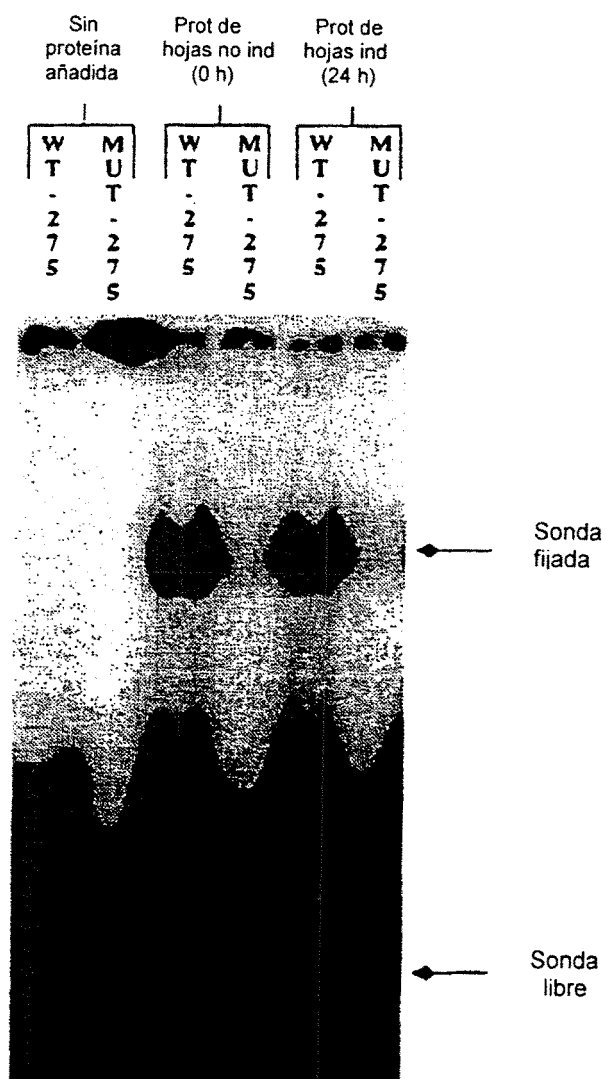


Fig.15.



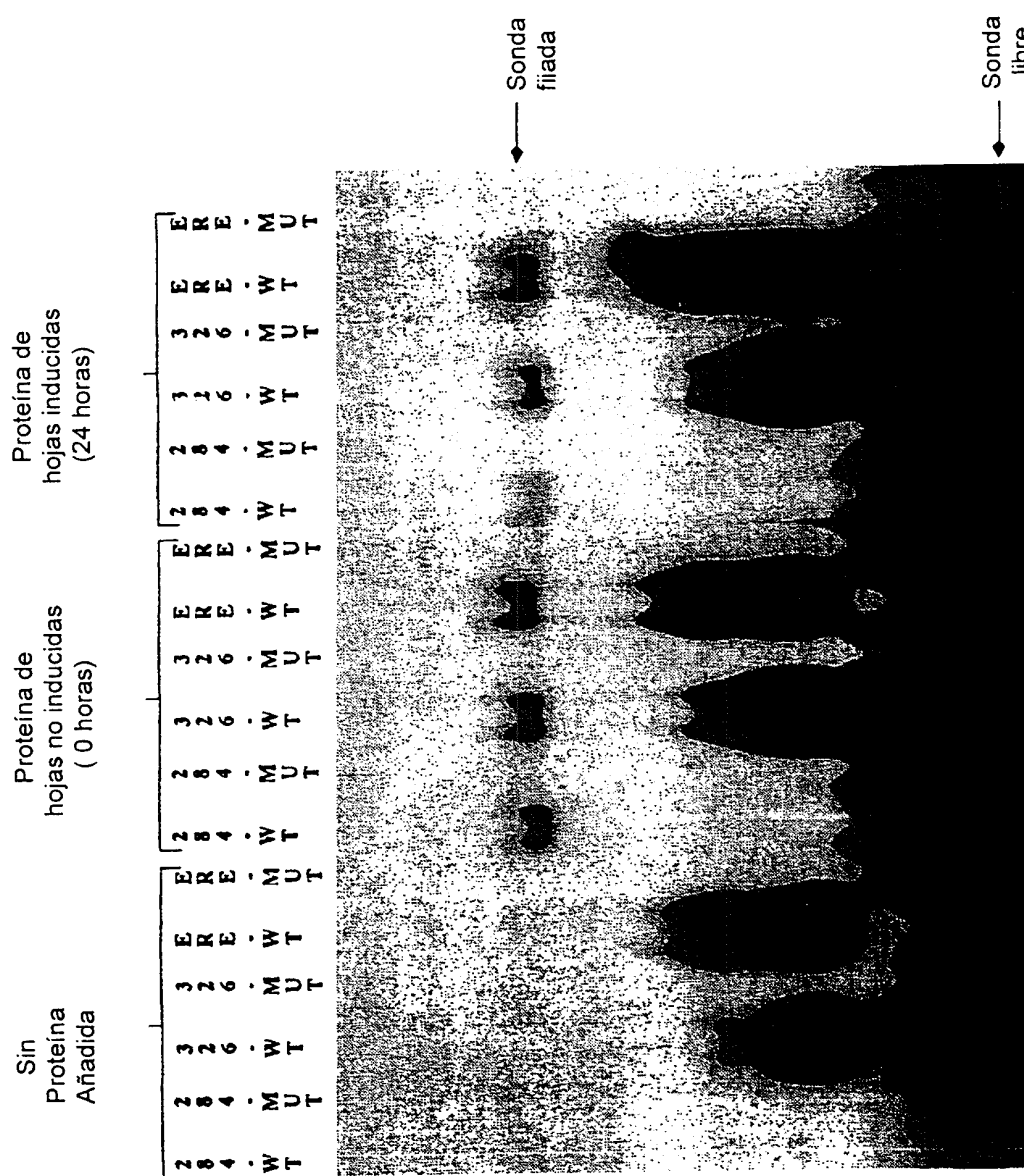


Fig.17.

