



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 328 578**

51 Int. Cl.:

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04798141 .0**

96 Fecha de presentación : **02.11.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1680506**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.07.2006**

54 Título: **Genes y promotores de MEG1 específicos del endospermo.**

30 Prioridad: **03.11.2003 EP 03292739**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2009

73 Titular/es: **Biogemma**
1, rue Edouard Colonne
75001 Paris, FR

72 Inventor/es: **Perez, Pascual;**
Gutierrez-Marcos, José y
Dickinson, Hugh

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

Genes y promotores de MEG1 específicos del endospermo.

5 La presente invención se refiere al control de la expresión de los genes durante el desarrollo del endospermo. En particular se refiere a moléculas de ácido nucleico que permiten la expresión que es tanto específica del endospermo como temprana durante el desarrollo del endospermo, así como a moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de la capa de células de transferencia del endospermo basal (BETL).

10 El endospermo, una formación característica de las semillas de Angiospermas, es un tejido nutritivo para el embrión. El endospermo de maíz se origina a partir de series de divisiones nucleares libres, seguidas de la celularización y posterior formación de un rango de dominios celulares funcionales. Este tejido es complejo en su estructura y desarrollo, en particular en los cereales.

15 El endospermo es el órgano de almacenamiento principal de las semillas de maíz; nutre al embrión mientras la semilla se desarrolla y proporciona nutrientes a la plántula en germinación. Por lo tanto, la captación de asimilados por el endospermo en crecimiento es un proceso fundamental en el desarrollo de la semilla.

20 El área central del endospermo consiste en células grandes con vacuolas, que almacenan las reservas de almidón y proteínas, en tanto que la región que rodea al embrión se distingue por células más bien pequeñas, ocupadas en su mayor parte por citoplasma.

25 El área de la capa de transferencia del endospermo basal (BETL, por sus siglas en inglés) está muy especializada para facilitar la absorción de solutos durante el desarrollo del grano. Estas células de transferencia del endospermo basal tienen estructuras internas especializadas adaptadas para absorber los solutos desde el tejido peduncular materno y translocar estos productos al endospermo en desarrollo y al embrión. Generalmente, los genes de BETL se expresan entre 8 y 20 días después de la polinización (DDP).

30 La solicitud de patente internacional WO 99/50427 informa sobre genes de la capa de células de transferencia del endospermo basal y sus secuencias reguladoras.

Sin embargo, todavía existe la necesidad de secuencias reguladoras específicas para el endospermo.

35 Los autores de la presente invención han aislado en la actualidad nuevas secuencias de nucleótidos promotoras que permiten la expresión de las secuencias codificadoras a las cuales pueden estar unidas, que es específica para el endospermo en las semillas de Angiospermas y que interviene particularmente en la etapa temprana del desarrollo del endospermo. Estas nuevas secuencias de nucleótidos promotoras son útiles como una alternativa a los pocos promotores descritos en la bibliografía.

40 Dichas secuencias promotoras son particularmente útiles para dirigir o regular la expresión de genes de interés.

45 De manera interesante, las secuencias de nucleótidos que tienen actividad promotora de acuerdo con la invención tienen un patrón de expresión de origen parental materno de modo que los genes bajo el control transcripcional de estos promotores se expresan preferentemente a través del alelo materno durante el desarrollo temprano del endospermo.

Ventajosamente, estas secuencias de nucleótidos que tienen actividad promotora son activas tan pronto como 4 DDP, cuando se heredan por vía materna.

50 Sorprendentemente, los autores encontraron que las proteínas codificadas por los genes relacionados con estas secuencias promotoras participan en el mecanismo de resistencia a los patógenos y/o el desarrollo del endospermo.

55 La presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que tiene actividad promotora específica para el endospermo que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en:

(a) una secuencia como la descrita en cualquiera de las SEC. ID N°: 1 a 3 (promotor MEG1-1 (pMEG1-1), promotor MEG1-2 (pMEG1-2) y promotor MEG1-3 (pMEG1-3), respectivamente);

60 (b) una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia como la definida en (a), donde dicha secuencia tiene actividad promotora específica para el endospermo;

(c) una secuencia que comprende una secuencia de nucleótidos que está conservada en al menos dos de SEC. ID N°: 1 a 3.

65 Como se usa aquí, el término secuencia "conservada" se refiere a un tramo de nucleótidos que muestra 100% de identidad entre al menos dos secuencias de referencia. Preferentemente dicha secuencia conservada se encuentra en las tres secuencias SEC. ID N°: 1 a 3. Un alineamiento de secuencias de SEC. ID N°: 1 a 3 se muestra en la figura 14.

Preferentemente, la secuencia como la definida en la alternativa (c) comprende 5' ATATAGATAGATATAGCAAA TTCACCAAATAATATAG3' (SEC. ID N°: 57). Más preferentemente dicha secuencia consiste en la SEC. ID N°: 57.

Particularmente, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención permite la expresión (actividad promotora) que es tanto específica para el endospermo, más particularmente para la BETL, como temprana durante el desarrollo del endospermo.

“Actividad promotora específica para el endospermo” significa, como se usa en la presente invención, que el promotor se expresa predominantemente en el endospermo y preferentemente se expresa exclusivamente en el endospermo.

“Temprana durante el desarrollo del endospermo” significa que la expresión del promotor se produce desde los primeros días después de la polinización, preferentemente tan pronto como cuatro días después de la polinización.

Las diversas secuencias de nucleótidos de la invención pueden ser, o no, de origen artificial. Pueden ser secuencias de ADN obtenidas mediante cribado de bancos de secuencias por medio de sondas producidas basándose en las SEC. ID N°: 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15. Dichos bancos se pueden preparar mediante técnicas convencionales de biología molecular, conocidas por los expertos.

Las secuencias de nucleótidos de acuerdo con la invención también se pueden preparar mediante síntesis química, o por métodos mixtos que incluyen la modificación química o enzimática de las secuencias obtenidas mediante cribado de bancos. De acuerdo con una realización de la invención, una molécula de ácido nucleico que tiene tal actividad promotora consiste en la SEC. ID N°: 1 (pMEG1-1), SEC. ID N°: 2 (pMEG1-2) o SEC. ID N°: 3 (pMeg1-3).

Con relación a estas secuencias promotoras, un “fragmento” indica una secuencia, particularmente una secuencia de ADN, que tiene una longitud reducida con respecto a dicha secuencia de referencia.

Tal fragmento, obtenible mediante la invención, tiene actividad promotora específica para el endospermo, preferentemente específica para la BETL, y contiene al menos 15, 25, 35, 37, 50, 75, 91, 95, 100, 121, 122, 127, 150, 200, 220, 240, 250, 270, 300, 350, 360 ó 365 nucleótidos consecutivos de la secuencia de ADN de referencia.

Un fragmento preferido contiene la región definida por los nucleótidos 1 a 121 de la SEC. ID N°: 1, que corresponde a la secuencia que se muestra en SEC. ID N°: 4, o contiene la región definida por los nucleótidos 1 a 127 de la SEC. ID N°: 1, que corresponde a la secuencia que se muestra en SEC. ID N°: 59.

También son fragmentos preferidos las regiones definidas por los nucleótidos 26 a 120 de la SEC. ID N°: 4 y 29 a 119 de la SEC. ID N°: 4.

También se puede obtener un fragmento, obtenible mediante la invención, por fusión de al menos dos regiones consecutivas de una secuencia de ADN de referencia. Un ejemplo de fragmento de fusión obtenible mediante la invención puede comprender la región definida por los nucleótidos 1-121 de la SEC. ID N°: 1, que es necesaria para la activación de pMEG1-1 por ZmMRP1 y la región definida por los nucleótidos 244-370 de la SEC. ID N°: 1, que contiene una caja TATA.

Además es posible hacer una fusión de la región definida por los nucleótidos 1-121 de la SEC. ID N°: 1 (región promotora de Meg1) con cualquier región promotora mínima (como un promotor -46 CaMV 35S) para producir un promotor que sea propenso a ser activado por ZmMRP1 y por lo tanto que sea específico de BETL, usándose la región promotora mínima para reemplazar la región definida por los nucleótidos 244-370 de la secuencia promotora MEG1-1 (SEC. ID N°: 1) en el fragmento de fusión definido antes.

También se puede obtener un resultado como ese usando los fragmentos 26 a 120 ó 29 a 119 de la SEC. ID N°: 4.

Una molécula de ácido nucleico se “hibrida” a otra molécula de ácido nucleico, como ADNc, ADN genómico o ARN, cuando una forma de una sola hebra de la molécula de ácido nucleico se puede aparear a la otra molécula de ácido nucleico en las condiciones adecuadas de temperatura y fuerza iónica de la solución (consulte Sambrook *et al.*, 1989).

Tal secuencia hibridante tiene actividad promotora específica para el endospermo de acuerdo con la invención, preferentemente específica para la BETL, y contiene al menos 15, 25, 35, 37, 50, 75, 100, 121, 122, 127, 150, 200, 220, 240, 250, 270, 300, 350, 360 ó 365 nucleótidos. Preferentemente, dicha secuencia hibridante puede contener no más de 100 ó 200 nucleótidos.

La invención también abarca modificaciones de las secuencias de ADN como las descritas en las SEC. ID N°: 1 a 3 (pMEG1-1, pMEG1-2, pMEG1-3), o de motivos de secuencias de éstas mediante, por ejemplo, reemplazos de nucleótidos que no afectan a la estructura general o de motivos de unión de la molécula de ácido nucleico que tiene actividad promotora específica para el endospermo de modo que siga siendo capaz de conducir la expresión de un gen específica para el endospermo, y más particularmente, la expresión de un gen específica para la BETL.

ES 2 328 578 T3

“Secuencia de ácidos nucleicos homóloga”, o “secuencia de ADN homóloga”, significa cualquier secuencia de ácidos nucleicos que difiera de cualquiera de las SEC. ID N°: 1 a 3 por sustitución, delección y/o inserción de uno o más nucleótidos en posiciones tales que esas secuencias de ácidos nucleicos homólogas mantengan la propiedad de especificidad de promotoras de las secuencias SEC. ID N°: 1 a 3.

Preferentemente tal secuencia de ácidos nucleicos homóloga es al menos 90% idéntica a una de las secuencias SEC. ID N°: 1 a 3, más preferentemente al menos 91, 95, 98, 99,9% idéntica. También preferentemente, el grado de identidad se define por comparación con la secuencia de referencia completa, SEC. ID N°: 1, SEC. ID N°: 2 o SEC. ID N°: 3.

La homología se determina generalmente usando un programa informático de análisis de secuencias (por ejemplo, el paquete informático de análisis de secuencias de Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Se alinean secuencias de nucleótidos similares para obtener el máximo grado de homología (es decir identidad). Con este fin, puede ser necesario introducir artificialmente huecos en la secuencia. Una vez que se ha logrado el alineamiento óptimo, se establece el grado de homología (es decir de identidad) registrando todas las posiciones para las cuales los nucleótidos de las dos secuencias comparadas son idénticos con respecto al número total de posiciones.

De manera preferencial tal secuencia de ácidos nucleicos homóloga se hibrida específicamente a una secuencia que es complementaria de una de las secuencias SEC. ID N°: 1 a 3 en condiciones rigurosas. Los parámetros que definen las condiciones rigurosas dependen de la temperatura a la cual se separa el 50% de las hebras apareadas (T_m).

Para las secuencias que comprenden más de 30 bases, T_m se define mediante la ecuación: $T_m = 81,5 + 0,41 (\%G+C) + 16,6 \text{ Log (concentración en cationes)} - 0,63 (\% \text{ de formamida}) - (600/\text{número de bases})$ (Sambrook *et al.*, 1989).

Para las secuencias más cortas de 30 bases, T_m se define mediante la ecuación: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$.

En condiciones rigurosas adecuadas, en las cuales las secuencias no específicas (inespecíficas) no se hibridan, la temperatura de hibridación es aproximadamente entre 5 y 30°C, preferentemente entre 5 y 10°C por debajo de T_m y los tampones de hibridación utilizados son preferentemente soluciones de mayor fuerza iónica como por ejemplo una solución 6*SSC.

Además, es posible derivar elementos reguladores esenciales de los promotores estipulados aquí. Por consiguiente, esos elementos de la secuencia promotora responsables tanto de su función como promotora y, de manera más importante, de su especificidad por el endospermo, particularmente su especificidad por la BETL, se pueden aislar e incorporar en moléculas de ácido nucleico las cuales, si bien no están comprendidas por las definiciones (a) a (c) anteriores, de todos modos, actúan de manera equivalente.

La presente invención también estipula una molécula de ácido nucleico recombinante o aislada que comprende, o consiste en, uno o más elementos reguladores derivados de cualquiera de las secuencias (a) a (c) y que es capaz de conducir la expresión específicamente en el endospermo y preferentemente en una etapa temprana del desarrollo del endospermo.

La molécula de ácido nucleico que tiene actividad promotora específica para el endospermo tiene preferentemente un patrón de expresión de origen parental materno. Como se usa aquí, la expresión “patrón de expresión de origen parental materno” se refiere a la expresión de un gen sellado maternalmente. El sellado (imprinting) es un mecanismo epigenético mediante el cual se silencia un alelo particular de acuerdo con su origen parental. Esto significa que los genes sometidos a sellado genómico tienen expresión monoalélica, en vez de la expresión bialélica que es habitual en los genes autosómicos, que se basa en el sexo del padre transmisor.

El aislamiento de los promotores que son regulados por sellado proporciona un nivel adicional de control en comparación con los promotores normales no sellados. En consecuencia, el nivel de expresión del gen de interés puede ser controlado de manera ventajosa a través de la dirección del cruzamiento genético entre una planta que transporta un transgén sellado y la otra planta a la que le falta el transgén.

Preferentemente, la molécula de ácido nucleico que tiene actividad promotora específica para el endospermo que tiene un patrón de expresión de origen parental materno consiste en la SEC. ID N°: 1.

La SEC. ID N°: 62 también es una molécula de ácido nucleico que tiene actividad promotora específica para el endospermo que tiene un patrón de expresión de origen parental materno y es una parte de la invención como cualquiera de las SEC. ID N°: 1 a 3.

Las moléculas de ácido nucleico que tienen actividad promotora específica para el endospermo de acuerdo con la invención se pueden aislar de diversas especies de plantas, particularmente de plantas Angiospermas, Monocotiledóneas o Dicotiledóneas y son preferentemente moléculas de ácido nucleico aisladas de una planta seleccionada del grupo que consiste en maíz, teosintes, arroz, sorgo, trigo, cebada, centeno, guisantes y caña de azúcar. Aún más preferentemente, la planta es maíz.

Es posible para los expertos Aguilar con ayuda de las secuencias promotoras de la invención, genes correspondientes de otras especies (genes “ortólogos”).

5 Esto se puede hacer mediante técnicas convencionales conocidas en el área, por ejemplo, usando la secuencia promotora descrita en cualquiera de las SEC. ID N°: 1 a 3 como una zona de hibridación o por diseño de cebadores de PCR adecuados.

10 Es preferible comenzar con secuencias de ADN codificadoras o secuencias de proteínas a través de las preguntas TBLASTN. El método utilizado para designar promotores Meg1 de arroz, por ejemplo, es utilizar la secuencia de proteínas de ZmMeg1-1, preferentemente la región más conservada identificada mediante un alineamiento de todas las proteínas Meg, hacer un TBLASTN con esta secuencia frente a la EST de arroz, después usar estas EST para encontrar la secuencia genómica o directamente usar TBLASTN frente a la secuencia genómica del arroz. El mismo método se usa para aislar promotores Meg1 de trigo.

15 Es posible entonces aislar la región promotora correspondiente mediante técnicas convencionales y determinar su patrón de expresión mediante técnicas conocidas (por ejemplo, análisis del gen reportero).

20 Otro objetivo de la presente invención es una construcción nucleotídica, a la que se hace referencia como casete de expresión, que comprende una molécula de ácido nucleico que tiene actividad promotora específica para el endospermo según se definió antes, unida operativamente al menos a un gen de interés.

“Unida operativamente” se refiere al enlace funcional entre la molécula de ácido nucleico que tiene actividad promotora de acuerdo con invención del gen de interés.

25 El gen de interés puede ser de origen heterólogo.

El gen de interés por estar colocado en orientación sentido o antisentido.

30 De acuerdo con una realización, el gen de interés se puede seleccionar del grupo que consiste en una secuencia que codifica un péptido o una proteína, una secuencia de ARN complementario, una secuencia de ARN mensajero, una secuencia de ARN tanto mensajero como complementario y/o un ribosoma.

Preferentemente, el gen de interés es una secuencia que codifica una proteína o un péptido.

35 Dicho gen de interés puede por ejemplo codificar una proteína que intervenga en el desarrollo del embrión y/o del endospermo, la determinación del tamaño y/o la calidad de la semilla (por ejemplo MRP1 o Ferretin (Lobreaux S. *et al.* 1992)), la multiplicación celular (las proteínas que regulan la división celular incluyen genes de citoquinas o auxinas, por ejemplo ipt (Zhang *et al.* 1995), el flujo de nutrientes o la transferencia de nutrientes (transportadores (Bolchi A. *et al.* 1999)) y las proteínas que intervienen en el metabolismo de los ácidos grasos. El gen de interés también puede codificar una enzima que intervenga en el metabolismo de los azúcares como la invertasa (por ejemplo incW2 (Talierto EW *et al.* 1999)), las sacarosa sintasas (por ejemplo Sh1), la sacarosa fosfato sintasa, la sacarosa sintetasa, la UDP-glucosa pirofosforilasa, la ADP-glucosa pirofosforilasa (Thomas W. Greene *et al.* 1998), la enzima de ramificación del almidón (Ming Gao *et al.* 1997) la almidón sintasa (Mary E. Knight *et al.* 1998). El gen de interés también puede codificar una hexoquinasa como la descrita por Jang *et al.* (1997) para mejorar el llenado del grano.

45 El gen de interés puede además codificar una proteína que intervenga en la transferencia de aminoácidos, como una metionina permeasa o una lisina permeasa, a un transportado de azufre, etc. También puede codificar una proteína tóxica como Bamasa, una proteína que active o inhiba otros genes, como reguladores transcripcionales incluidos los activadores modificados para actuar como activadores dominantes o represores de la transcripción (por ejemplo fusiones al dominio engrailed (Poole *et al.*, 1985) o co-represores por ejemplo), o una proteína que mejore la resistencia a los patógenos (por ejemplo BAP2, MRP1).

50

Preferentemente, dicho gen de interés codifica una proteína seleccionada entre:

55 - una proteína cuya expresión específica en el endospermo, y particularmente en la BETL, hace posible aumentar la captación de nutrientes y de ese modo el tamaño y/o la calidad de la semilla; los ejemplos de tal proteína incluye una invertasa a como Incw2 o como Ivr1 (EP 0 442 592), una sacarosa sintasas como Sh1 (WO 02/067662) o todos los transportadores de azúcares y nitrógeno o una proteína MRP1, etc.;

60 - una proteína que mejore la resistencia a los patógenos; los ejemplos de tal proteína incluyen una proteína BAP (proteína antifúngica de la capa basal, por sus siglas en inglés) (Serna *et al.*, 2001), o péptidos antifúngicos, o una proteína MRP1 o una proteína que codifique una oxalato oxidasa (WO 92/15685) o una proteína que codifique una quitinasa (WO 92/01792 o US 5,446,138) una proteína que codifique glucanasa (WO 93/02197), etc.

65 Una proteína que “mejore la resistencia a los patógenos” o “una proteína que mejora la resistencia a los patógenos” significa una proteína que, cuando se expresa en una planta o una parte de la planta, le confiere resistencia o mejora la resistencia a los patógenos de dicha planta, o a su parte. Dicha planta transformada tiene una mejor resistencia a los patógenos que la planta sin transformar (tipo silvestre).

Dicho gen de interés también se puede asociar con otros elementos reguladores como secuencias de terminación de la transcripción (terminadores). A modo de ejemplo de tales frecuencias, es posible citar el exterminador poliA 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), descrito en el artículo de Franck *et al.* (1980) y el terminador NOS correspondiente a la región en la región 3' no codificadora del gen de la nopalina sintasa del plásmido Ti de la cepa nopalina de *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker *et al.* 1992).

Preferentemente, el terminador utilizado es el 3'CaMV.

De acuerdo con la invención, el casete de expresión, que comprende una molécula de ácido nucleico que tiene actividad promotora específica para el endospermo según se definió antes, operativamente unida al menos a un gen de interés puede además comprender uno o varios genes marcadores de selección para las plantas, útiles para transformación y selección.

En la presente invención, las expresiones “marcador seleccionable”, “gen seleccionable”, “gen marcador seleccionable”, “gen marcador de selección” y “gen marcador” se usan indistintamente.

Estos marcadores seleccionables incluyen, pero no exclusivamente, genes de resistencia a los antibióticos, genes de resistencia a los herbicidas o genes marcadores visibles. Se conocen otros marcadores fenotípicos en el área y se pueden usar en esta invención.

Se conocen en el área varios agentes selectivos y genes de resistencia. (Consulte por ejemplo, Hauptmann *et al.*, 1988; Dekeyser *et al.*, 1988; Eichholtz *et al.*, 1987; y Meijer *et al.*, 1991).

Particularmente el marcador seleccionable utilizado puede ser el gen bar que confiere resistencia al bialafos (White *et al.*, 1990), el gen de resistencia a la sulfonamida herbicida Asulam, sul (descrito en WO 98/49316) que codifica una dihidropterato sintasa tipo I (DHPS), el gen nptII que confiere resistencia a un grupo de antibióticos incluida la kanamicina, G418, paromomicina y neomicina (Bevan *et al.*, 1983), el gen hph que confiere resistencia a la higromicina (Gritz *et al.*, 1983), el gen EPSPS que confiere tolerancia al glifosato (US 5,188,642), el gen HPPD que confiere resistencia a los isoxazoles (WO 96/38567), el gen que codifica la enzima GUS, la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés), cuya expresión, confiere a las células transformadas una característica física reconocible, el gen de la cloranfenicol transferasa, cuya expresión, destoxifica el cloranfenicol.

De manera ventajosa, el gen marcador seleccionable se inserta entre un promotor y un terminador en un 2º casete de expresión. Dicho segundo casete de expresión está integrado en el mismo vector que el casete de expresión que contiene el gen de interés bajo el control transcripcional de un promotor de acuerdo con la invención.

De acuerdo con esta ventajosa realización, el gen marcador es controlado preferentemente por un promotor que permita la expresión en células, permitiendo de ese modo la selección de células o tejidos que contengan al marcador en cualquier etapa del desarrollo de la planta. Los promotores preferidos son los promotores del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium*, el promotor derivado del gen que codifica la subunidad 35S de la proteína de recubrimiento del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), la secuencia promotora actina del arroz. No obstante, se puede usar cualquier otro segundo promotor adecuado.

Se puede usar cualquier terminador. Los terminadores preferidos son el terminador 3'CaMV y el terminador Nos según se decidió previamente.

De manera ventajosa, el casete de expresión que contiene el gen marcador seleccionable está comprendido entre dos elementos Ds (transposones) para su eliminación en una etapa posterior mediante interacción con la transposasa Ac. Este sistema de eliminación se describe en Yoder *et al.* (1993).

Para el paso de transformación, se puede usar dos vectores, el primero que comprenda el casete de expresión que contiene el gen de interés y el segundo que comprenda el casete de expresión que contiene el gen marcador seleccionable. Siendo transformada la misma célula huésped con estos dos vectores (co-transformación).

Los casetes de expresión de acuerdo con la invención pueden además contener secuencias de péptidos de tránsito. Existen varios ejemplos en el área de péptidos de tránsito que se pueden usar para suministrar una proteína diana en un organelo plástido como el péptido de tránsito de la subunidad pequeña (SSU) de la ribulosa bifosfato carboxilasa.

Otros elementos como los intrones y las secuencias potenciadoras también pueden estar presentes en la secuencia nucleica de interés para mejorar la expresión del gen de interés.

Entre los intrones útiles, se puede colocar el primer intrón de maíz adh1S entre la frecuencia promotora y la secuencia codificadora. Este intrón cuando está incluido en un constructo génico aumenta la expresión de la proteína deseada en las células de maíz (Callis *et al.*, 1987). También se puede usar el 1º intrón del gen shrunken 1 del maíz (Maas *et al.*, 1991), el 1º intrón del gen de la catalasa de la catalasa de judía (CAT-1) (Ohta *et al.*, 1990), el 2º intrón del gen ST-LS1 de papa (Vancannet *et al.* 1990), el intrón DSV del virus yellow dwarf virus del tabaco (Morris *et al.*, 1992), el intrón actina-1 (act-1) del arroz (McElroy *et al.*, 1990) y el intrón 1 de trifosfato isomerasa (TPI) (Snowdon *et al.*, 1996). Preferentemente, el intrón usado en la presente invención es el intrón Hsp70 o el intrón Sh1.

Los casetes de expresión pueden además contener secuencias líder 5'. Tales secuencias líderes pueden potenciar la traducción. Dichas secuencias líder 5' son bien conocidas en el área e incluyen, pero no exclusivamente, líderes picornavirus, por ejemplo, el líder de EMCV (región no codificadora 5' de Encephalomyocarditis) (Elroy-Stein, Fuerst, y Moss B., 1989); líderes polivirus, por ejemplo, el líder de TEV (virus del grabado del tabaco) (Allison *et al.*, 1986); el líder de la proteína de unión a la cadena pesada de la inmunoglobulina humana (BiP) (Macejack y Sarnow, 1991); el líder no traducido del ARNm de la proteína de recubrimiento del virus del mosaico de la alfalfa (AMV RNA 4) (Jobling y Gehrke, 1987); el líder del virus del mosaico del tabaco (TMV) (Gallie *et al.*, 1989); y el líder del virus del moteado clorótico del maíz (MCMV) (Lommel *et al.*, 1991). Consulte también, Della-Cioppa *et al.* (1987). Se pueden utilizar otros métodos conocidos para mejorar la traducción, por ejemplo intrones y similares.

Cualquier casete de expresión de acuerdo con la invención, puede además comprender un gen que codifica una proteína MRP1, preferentemente la proteína ZmMRP1.

La proteína ZmMRP1 se describe en Gomez *et al* (2002). La secuencia de ácidos nucleicos y la secuencia de aminoácidos de ZmMRP1 se muestran en la SEC. ID N°: 51 y 52, respectivamente. Sin embargo, se puede usar cualquier proteína homóloga a MRP1, y particularmente a ZmMRP1, que tenga el mismo patrón de expresión.

Se puede usar dicha proteína MRP1 de distintas maneras:

- MRP1 como una proteína antifúngica (resistencia a los patógenos) unida operativamente a la secuencia promotora de MEG1 SEC. ID N°: 1 a 3, o a uno de sus fragmentos:

Un primer casete de expresión que comprende una proteína MRP1 o uno de sus fragmentos, preferentemente la proteína ZmMRP1, unido operativamente a un promotor MEG1, preferentemente el promotor ZmMEG1-1, y a un terminador y un segundo casete de expresión que comprende un gen marcador insertado entre un promotor y un terminador; estos dos casetes de expresión se insertan en el mismo vector para transformación o estos dos casetes de expresión se insertan en dos vectores diferentes siendo cotransformados como se describió previamente.

- MRP1 como un transactivador para el promotor MEG1:

Un primer casete de expresión que comprende un gen de interés, unido operativamente a un promotor MEG1, preferentemente un promotor ZmMEG1-1, y a un terminador; un segundo casete de expresión que comprende una proteína MRP1, preferentemente la proteína ZmMRP1, insertado entre un promotor y un terminador; un tercer casete de expresión que comprende un gen marcador insertado entre un promotor y un terminador; estos tres casetes de expresión se insertan en el mismo vector para transformación o estos tres casetes de expresión se insertan en tres vectores diferentes siendo cotransformados como se describió previamente.

Este segundo modo de uso es un sistema binario de expresión, es decir se cruzan dos plantas, la primera con un gen de interés unido operativamente al promotor MEG1 (preferentemente ZmMEG1-1) y la otra con, por ejemplo, un promotor de hoja unido a MRP1. El resultado es que en el híbrido la expresión del gen de interés no sólo está presente en la BETL sino también en la hoja.

Al preparar los casetes de expresión, las diversas secuencias o fragmentos de ADN se pueden manipular, de modo proporcionar secuencias o fragmentos de ADN en la orientación adecuada, según corresponda, en el marco de lectura apropiado. Con este fin, se pueden emplear adaptadores o ligadores para unir fragmentos de ADN y/o pueden ser necesarias otras manipulaciones para proporcionar sitios de restricción convenientes, eliminar ADN superfluo, eliminar sitios de restricción o similares. Con este propósito, se pueden emplear mutagénesis *in vitro*, reparación del cebador, restricción, apareamiento, unión, PCR, o similares, cuando puedan estar involucradas inserciones, deleciones o sustituciones, por ejemplo transiciones y transversiones, de nucleótidos. Estas técnicas son bien conocidas por los técnicos con experiencia en el tema.

Otro objetivo de la invención es cualquier vector de nucleótidos al que se hace referencia como vector de expresión, como un plásmido, que pueda ser utilizado para transformar células huésped, caracterizado por contener al menos un casete de expresión según se definió antes. La construcción de vectores de expresión para la transformación es parte de la práctica de los expertos que utilizan las técnicas estándar siguientes.

La decisión sobre si usar un vector, o cuál vector usar, es orientada por el método de transformación seleccionado y por la célula huésped seleccionada.

Cuando se usa un método de introducción de un ácido nucleico desnudo, entonces el director puede ser las mínimas secuencias de ácidos nucleicos necesarias para conferir el fenotipo deseado, sin necesidad de otras secuencias.

Los posibles vectores incluyen los vectores del plásmido Ti, vectores lanzadera diseñados simplemente para producir al máximo grandes cantidades de copias, vectores episómicos que contienen las secuencias mínimas necesarias para completar la replicación una vez que se produce la transformación, vectores transposones, que incluyen la posibilidad de formas de ARN de las secuencias génicas. Los expertos tienen comúnmente experiencia en la selección de los vectores y los métodos para construirlos y se describen en la bibliografía técnica general (Mullis, KB (1987), *Methods in Enzymology*).

Para otros métodos de transformación que requieren un vector, la selección de un vector apropiado es relativamente simple, puesto que las limitaciones son mínimas. Las características mínimas aparentes del vector son que la secuencia de ácidos nucleicos se introduzca en un estado relativamente intacto. Por lo tanto, cualquier vector que produzca una planta que tenga la secuencia de ADN introducida debería ser suficiente. Asimismo, cualquier vector que introduzca un ARN considerablemente intacto que pueda ser convertido posteriormente en una secuencia de ADN mantenida establemente debería ser aceptable.

Sin embargo, todas las otras secuencias del vector unidas que confieran resistencia a la degradación del fragmento de ácido nucleico que se va introducir, que asiste en el proceso de la integración genómica o proporciona un medio para seleccionar fácilmente aquellas células o plantas que están en realidad, de hecho, transformadas, son ventajosas y disminuyen en gran medida la dificultad de selección de plantas transgénicas utilizables.

El vector puede existir, por ejemplo, en forma de un fago, un plásmido o un cósmido. La construcción de tales vectores de expresión para transformación es bien conocida en el área y usa técnicas estándar. Se debe hacer mención a los métodos descritos en Sambrook *et al.* (1989).

Otro objetivo de la invención es una célula huésped, que contenga al menos un vector de expresión como el descrito antes.

La decisión sobre si usar una célula huésped, o cuál célula huésped usar, es orientada por el método de transformación.

La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Se puede usar cualquiera de una gran cantidad de células huésped disponibles y bien conocidas en la práctica de esta invención. La selección de un huésped particular depende de una serie de factores reconocidos en el área. Éstos incluyen, por ejemplo, compatibilidad con el vector de expresión elegido, bioseguridad y costos. Los huéspedes útiles incluyen bacterias como *E. coli sp.* o *Agrobacterium*. También se puede usar una célula huésped de una planta, notablemente una célula de una planta Angiosperma, Monocotiledónea como una célula de la planta Dicotiledónea, particularmente una célula de un cereal o una planta oleaginosa, seleccionada en particular del grupo que consiste en maíz, trigo, cebada, arroz, colza y girasol, preferentemente maíz.

Más particularmente, la célula huésped utilizada para llevar a cabo la invención es *Agrobacterium tumefaciens*, de acuerdo con el método descrito en el artículo de An *et al.*, 1986, o *Agrobacterium rhizogenes*, de acuerdo con el método descrito en el artículo de Jouanin *et al.*, 1987.

La invención también se refiere a una planta transgénica o a una parte de una planta transgénica, en particular fruto, semilla, grano o polen, que comprenda dichas célula o generada a partir de dicha célula. Cuando la planta contiene endógenamente un promotor de MEG1 o gen de acuerdo con la invención, se comprenderá que la planta transgénica de acuerdo con la invención comprende otro gen "exógeno" MEG1 o promotor de MEG1, por ejemplo integrado mediante transgénesis.

Una planta entera se puede regenerar a partir de una única célula de una planta transformada. Por lo tanto, en otro aspecto la presente invención estipula plantas transgénicas (o partes de éstas) que incluyen secuencias de ácido nucleico de conformidad con la invención. La regeneración puede proceder por métodos conocidos.

Las semillas que crecen, por fertilización, a partir de esta planta también contienen ese transgén en sus genomas.

De manera ventajosa, la planta transgénica obtenida puede producir granos con un endospermo más grande en comparación con una planta no transformada, particularmente granos con almidón, contenido de aceite o contenido de proteínas que están modificados en comparación con una planta no transformada.

Una planta o parte de una planta de acuerdo con la invención podría ser una planta o una parte de ésta de diversas especies, particularmente una Angiosperma, Monocotiledónea al igual que Dicotiledónea, preferentemente un cereal o una planta oleaginosa, seleccionada en particular del grupo que consiste en maíz, arroz, trigo, cebada, colza y girasol, preferentemente maíz.

Como se usa aquí, la expresión "planta oleaginosa" indica una planta que es capaz de producir aceite y preferentemente que se cultiva para la producción de aceite. Las plantas híbridas obtenidas por cruzamiento de plantas de acuerdo con la invención también forman parte de la invención.

Otro objetivo de la invención es un método para obtener una planta con cualidades agronómicas mejoradas y/o mejor resistencia a los patógenos, que comprende los pasos de:

(a) transformar al menos una célula de una planta mediante al menos un vector como el definido previamente;

(b) cultivar la(s) célula(s) así transformada(s) para generar una planta que contenga en su genoma al menos un cassette de expresión de acuerdo con la invención, mediante lo cual dicha planta tendrá cualidades agronómicas mejoradas y/o mejor resistencia a los patógenos.

De acuerdo con la invención, “cualidades agronómicas mejoradas” significa cualidades agronómicas mejoradas y/o cualidades nutricionales mejoradas, particularmente rendimiento, cualidades alimenticias o industriales de una planta o una de sus partes. El tamaño de la semilla, el rendimiento, la cantidad de semillas y la composición de las semillas se consideran elementos que confieren cualidades agronómicas mejoradas a una planta en comparación con una planta no transformada (silvestre).

De acuerdo con la invención, “mejor resistencia a los patógenos” significa que la planta transformada tiene una mejor resistencia a los patógenos que la planta no transformada (silvestre).

La transformación de células vegetales se puede lograr por cualquiera de las técnicas conocidas por los expertos.

Es posible citar en particular los métodos de transferencia directa de genes como la microinyección directa en embrioides de plantas (Neuhaus et coll. 1997), la infiltración al vacío (Bechtold *et al.* 1993) o la electroporación (Chupeau et coll., 1989) o la precipitación directa por medio de PEG (Schocher et coll., 1986) o el bombardeo mediante pistola de partículas recubiertas con el ADN plasmídico de interés (Fromm M *et al.*, 1990).

También es posible infectar la planta con una cepa bacteriana, en particular *Agrobacterium*. De acuerdo con una realización del método de la invención, las células vegetales se transforman mediante un vector de acuerdo con la invención, siendo dicha célula huésped capaz de infectar dichas células vegetales al permitir la integración, en el genoma de las últimas, de las secuencias de nucleótidos de interés inicialmente contenidas en el genoma del vector mencionado antes. De manera ventajosa, la célula huésped utilizada mencionada antes es *Agrobacterium tumefaciens*, en particular de acuerdo con el método descrito en el artículo de An *et al.*, (1986), o *Agrobacterium rhizogene*, en particular de acuerdo con el método descrito en el artículo de Guerche *et al.* (1987).

Por ejemplo, la transformación de células vegetales se puede obtener mediante la transferencia de la región T del plásmido circular extracromosómico inductor de tumores de *Agrobacterium tumefaciens*, usando un sistema binario (Watson *et al.*, 25 1994). Para hacer esto, se construyen dos vectores. En uno de esos vectores se eliminó la región T por delección, excepto los márgenes derecho e izquierdo, siendo insertado un gen marcador entre ellos para permitir la selección en las células de la planta. La otra pareja del sistema binario es un plásmido Ti auxiliar, un plásmido modificado que ya no tiene ninguna región T pero aún contiene los genes de virulencia *vir* necesarios para la transformación de la célula vegetal.

De acuerdo con un modo preferido, es posible usar el método descrito por Ishida *et al.* (1996) para la transformación de Monocotiledóneas.

De acuerdo con otro protocolo, la transformación se logra de acuerdo con el método descrito por Finer *et al.* (1992) usando la pistola de partículas de tungsteno u oro.

Selección

El material de la planta modificada genéticamente se puede seleccionar o cribar en busca de transformantes (aquellos que incorporaron o integraron la o las construcciones de nucleótidos introducidas). Dichas metodologías de selección y cribado son bien conocidas por los expertos. El método de selección y de cribado se elige dependiendo del gen marcador utilizado.

Se puede entonces regenerar un transformante aislado en una planta.

Regeneración

Normalmente, la regeneración está involucrada en la obtención de una planta entera a partir del proceso de transformación. El término “regeneración” como se usa aquí, significa cultivar una célula de una planta entera, un grupo de células de una planta, una parte de la planta o un trozo de la planta (por ejemplo, de una parte de un protoplasto, un callo o un tejido).

Los métodos de regeneración de plantas enteras a partir de células de las plantas son bien conocidos en el área y el método de obtención de plantas transformadas y regeneradas no es fundamental para esta invención.

En general, las células de plantas transformadas se cultivan en un medio apropiado, que puede contener agentes selectivos como antibióticos, donde se usan marcadores seleccionables para facilitar la identificación de las células de plantas transformadas. Una vez que se forma el callo, se puede promover la formación de brotes empleando hormonas vegetales apropiadas de conformidad con los métodos conocidos y los brotes se pueden transferir a los medios de enraizado para la regeneración de las plantas. Las plantas se pueden usar después para establecer generaciones repetitivas, ya sea a partir de semillas o usando técnicas de propagación vegetativa.

La invención se refiere además al uso de al menos un casete de expresión como el definido previamente, para obtener una planta transgénica que tenga cualidades agronómicas mejoradas y/o mejor resistencia a los patógenos.

ES 2 328 578 T3

La cualidad agronómica de una planta se mejora actuando en particular sobre el tamaño del embrión o del endospermo y/o sobre su desarrollo.

Esto es porque se puede buscar una acción específica temprana sobre el desarrollo de los tejidos del embrión y del endospermo: de acuerdo con el tamaño relativo de uno u otro es posible obtener semillas o frutos con mayor contenido de almidón (endospermo más grande) y/o aceite (embrión más grande), a través del uso respectivamente de genes estimuladores (hormona del ciclo celular por ejemplo) o genes inhibidores (proteína tóxica o inhibidor de la transcripción por ejemplo). Una reducción en el tamaño de la BETL crearía un tipo miniatura de semilla que podría tener una relación endospermo/embrión menor. El efecto más probable de aumentar la actividad/el tamaño de la BETL sería aumentar el tamaño del endospermo. Esto puede también traducirse en un embrión más grande.

A modo de ejemplo, el uso de genes que codifican hormonas (citoquininas, auxinas) bajo el control de los promotores descritos de acuerdo con la invención, podría hacer posible la modificación del proceso de celularización y por consiguiente el desarrollo del endospermo.

También se puede buscar un efecto sobre la acumulación de nutrientes en el embrión y el endospermo, usando por ejemplo, como genes de interés, genes que codifican transportadores de nutrientes (azúcares en particular), o genes que codifican inhibidores de esos transportadores, conduciendo a la acumulación diferencial de nutrientes en el endospermo o el embrión.

La invención también se refiere al uso de las plantas transgénicas obtenidas de acuerdo con la invención, o a partes de estas plantas, en particular semillas, granos y frutos para preparar productos derivados, en particular productos alimenticios.

La invención se refiere a semillas obtenidas a partir de una planta transformada con una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención (SEC. ID N°: 1-4, 5, 7, 9, 11, 13, 15 y 58).

Los productos obtenidos, ya sean semillas con un mayor contenido de aceite, harinas de semillas o granos con un mayor contenido de almidón, proteínas o aceite, también están incluidos en el alcance de la invención.

La invención también estipula cualquier composición para alimentos para animales o humanos preparada a partir de dichos productos obtenidos.

La invención estipula además una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína de la capa de células de transferencia del endospermo basal (BETL) de una planta, que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

(a) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos como la descrita en las SEC. ID N°: 6, 8, 10, 53, 12, 14 ó 16 (ZmMEG1-1, ZmMEG1-2, ZmMEG1-3 (primer y segundo ORF (marco de lectura abierto, por sus siglas en inglés)), ZmMEG1-4, ZmMEG1-5 y ZmMEG1-6, respectivamente)

(b) una secuencia de nucleótidos como la que se describe en las SEC. ID N°: 5, 7, 9, 11, 13, 15 ó 58 (ADNc de ZmMEG1-1, ZmMEG1-2, ZmMEG1-3, ZmMEG1-4, ZmMEG1-5 y ZmMEG1-6, y la secuencia genómica de ZmMEG1-1, respectivamente);

Preferentemente, la proteína codificada por la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención es específica de BETL.

“Específica de BETL” significa, como se usa en la presente invención, que la proteína se expresa predominantemente en la BETL, y más particularmente, exclusivamente en la BETL.

Preferentemente, la secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEC. ID N°: 6.

También preferentemente, la secuencia que codifica un fragmento de una proteína de BETL de acuerdo con la invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia PCKDNKCYCCIGGRTH (SEC. ID N°: 54). Se encontró que este fragmento estaba conservado entre todas las proteínas MEG1 de maíz (ZmMEG1-1, ZmMEG1-2, ZmMEG1-3 (primer y segundo ORF), ZmMEG1-4, ZmMEG1-5 y ZmMEG1-6) pero también en proteínas relacionadas de cebada y trigo.

Preferentemente, las moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención consisten en cualquiera de las SEC. ID N°: 5, 7, 9, 11, 13 ó 15, más preferentemente consisten en la SEC. ID N°: 5. Además dichas moléculas de ácido nucleico pueden comprender la secuencia genómica de Zm MEG 1-1 que se muestra en la SEC. ID N°: 58.

Como se usa aquí “variantes” significa que la secuencia difiere en una o más posiciones en comparación con estas secuencias SEC. ID N°: 6, 8, 10, 53, 12, 14 ó 16 con tal que ellas codifiquen una proteína expresada en la BETL.

Dichas moléculas comprenden aquellas que son variantes de la proteína de la BETL de acuerdo con la invención y difieren, por ejemplo, por delecciones, inserciones, sustituciones, adiciones y/o recombinaciones o cualquier otra modificación de aminoácidos y/o nucleótidos conocida en el área ya sea sola o en combinación, de las secuencias de aminoácidos descritas antes o su(s) secuencia(s) de nucleótidos subyacente(s). Los métodos para introducir tales modificaciones en las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención son bien conocidas por los expertos. La invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas antes debido a la degeneración del código genético.

La invención se refiere además a una proteína codificada por dichas moléculas de ácido nucleico. Más específicamente, la invención estipula una proteína de la capa de células de transferencia del endospermo basal (BETL) codificada por una molécula de ácido nucleico como la definida antes. Preferentemente, una proteína de acuerdo con la invención puede comprender, o consistir en, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC. ID N°: 6, 8, 10, 53, 12, 14 y 16. Aún más preferentemente dicha proteína comprende, o consiste en, la SEC. ID N°: 6. Además, una proteína de BETL preferida comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC. ID N°: 54.

Las proteínas codificadas por las diversas variantes de las moléculas de ácido nucleico descritas antes comparten características comunes específicas, como actividad biológica, peso molecular, conformación, etc., así como propiedades físicas, tales como movilidad electroforética, comportamiento cromatográfico, coeficientes de sedimentación, pH óptimo, temperatura óptima, estabilidad, solubilidad, propiedades espectroscópicas, etc.

Las condiciones rigurosas de hibridación se definen según se describieron antes.

Un “fragmento” de una proteína o de una molécula de ácido nucleico de BETL significa una secuencia, secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, que tiene una longitud reducida con respecto a la secuencia de nucleótidos o la secuencia de aminoácidos de referencia.

Un fragmento preferido de la proteína de BETL de acuerdo con la invención comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos PCKDNKCYCCIGGRTH (SEC. ID N°: 54).

Todos esos fragmentos y variantes de la proteína de la invención se pueden obtener con las enseñanzas de la presente invención, siempre que las propiedades biológicas características esenciales no sean afectadas en su tipo, es decir que las nuevas moléculas de ácido nucleico de la invención incluyan todas las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas o péptidos que tienen al menos una parte de la conformación estructural primaria de uno o más epítomos capaces de reaccionar con anticuerpos para las proteínas de BETL que pueden ser codificadas por una molécula de ácido nucleico como la establecida antes.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína de la capa de células de transferencia del endospermo basal (BETL) de acuerdo con la invención se pueden aislar de diversas especies de plantas, particularmente de plantas Angiospermas, Monocotiledóneas al igual que Dicotiledóneas y son preferentemente moléculas de ácido nucleico aisladas de una planta seleccionada del grupo que consiste en maíz, teosintes, trigo, cebada, centeno, guisante, arroz, sorgo y caña de azúcar. Preferentemente dicha planta es maíz.

Otro objetivo de la presente invención es una construcción de nucleótidos, denominada casete de expresión, que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de la capa de células de transferencia del endospermo basal (BETL) de acuerdo con la invención, unida operativamente a elementos reguladores que permiten la expresión en células huésped procariotas y/o eucariotas. Los elementos reguladores son particularmente secuencias reguladoras 5' y 3'.

“Unida operativamente” se refiere al enlace funcional entre las secuencias reguladoras 5' y 3' y la secuencia de ácido nucleico controlada.

Las secuencias reguladoras 5' son particularmente promotores.

Se puede usar cualquier promotor adecuado. Puede ser por ejemplo un promotor específico de un tejido como un promotor específico de la raíz, un promotor específico de la hoja, un promotor específico de la semilla, etc. Se describen varios promotores específicos de tejidos en la bibliografía y se puede usar cualquiera de ellos. Preferentemente, el promotor es un promotor inducible por un patógeno. Dichos promotores incluyen las proteínas relacionadas con la patogenicidad, que son inducidas a continuación de una infección por un patógeno, por ej., proteínas PR, proteínas SAR, beta-1,3 glucanasa, quitinasa, etc.

Los ejemplos de promotores útiles para la transformación de plantas incluyen el promotor 35S o el promotor 19S (Kay *et al.*, 1987), el promotor pCRV (Depigny-This *et al.*, 1992), el promotor ubiquitina 1 del maíz (Christensen *et al.*, 1996), las secuencias reguladoras del T-ADN de *Agrobacterium tumefaciens*, inclusive manopina sintasa, nopalina sintasa, octopina sintasa, los promotores regulados durante el desarrollo de la semilla como el promotor HMWG (glutenina de alto peso molecular, por sus siglas en inglés) de trigo (Anderson O.D. *et al.*, 1989, Roberts *et al.*, 1989), los promotores del maíz ceroso, la zeína o el color bronce del maíz, un promotor que sea inducible por patógenos. El promotor puede ser un promotor como el que se describe en cualquiera de las SEC. ID N°: 1 a 3.

ES 2 328 578 T3

Preferentemente, el promotor usado es un promotor inducible por un patógeno o alternativamente un promotor constitutivo usado para controlar el nivel deseado de enfermedad (resistencia a los patógenos) en la planta.

La secuencia reguladora 3' es particularmente un terminador.

Entre los terminadores útiles para la transformación de plantas dentro del marco de la presente invención, los que se pueden usar son terminador poliA 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), descrito en el artículo de Franck *et al.* (1980), el terminador NOS correspondiente a la región en la región 3' no codificadora del gen de la nopalina sintasa del plásmido Ti de la cepa de nopalina de *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker *et al.* 1992), el terminador histona (EP 0 633 317) y el terminador tml.

Preferentemente el terminador es el terminador 3'Nos o el terminador 3'CaMV.

Cualquier otro elemento, como los descritos previamente (intrón, secuencia potenciadora, péptido de tránsito,...) puede estar comprendido en el casete de expresión.

De acuerdo con la invención, el casete de expresión, que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de la capa de células de transferencia del endospermo basal (BETL) como la definida antes, unida operativamente a elementos reguladores, puede además comprender uno o varios genes marcadores de selección para plantas, útiles para la transformación y la selección.

Los genes marcadores seleccionables útiles fueron descritos previamente.

Otro objetivo de la invención es cualquier vector de nucleótidos denominado vector de expresión, como un plásmido, que pueda ser utilizado para transformar células huésped, caracterizado por contener al menos un casete de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de la capa de células de transferencia del endospermo basal (BETL), como la definida antes.

Los ejemplos de vectores de expresión útiles fueron descritos antes.

Otro objetivo de la invención es una célula huésped, que contenga al menos un vector de expresión como el descrito antes.

Los ejemplos de células huésped útiles fueron descritos antes.

La invención también se refiere a una planta transgénica, o a una parte de una planta transgénica (hojas, célula de la planta, tejido de la planta, grano, fruto, semilla,...) que comprende una célula como la descrita, particularmente que comprende una molécula de ácido nucleico establemente integrada en el genoma que codifica una proteína de la capa de células de transferencia del endospermo basal (BETL), unida operativamente a elementos reguladores que permiten la transcripción y/o la expresión de la molécula de ácido nucleico en las células de la planta.

Una planta o parte de una planta (célula de la planta, tejido de la planta, grano, semilla, hojas...) de acuerdo con la invención podría ser una planta o una parte de ésta de diversas especies, particularmente una Angiosperma, Monocotiledónea al igual que Dicotiledónea, preferentemente un cereal o una planta oleaginosa, seleccionada en particular del grupo que consiste en maíz, arroz, trigo, cebada, colza y girasol, preferentemente maíz.

Aún en otro aspecto, la invención también se refiere a partes cosechables y a material de propagación de las plantas transgénicas de acuerdo con la invención las cuales o bien contienen células de la planta transgénica que expresan una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención o bien contienen células que tienen un nivel reducido de la proteína descrita. Las partes cosechables pueden ser en principio cualquier parte útil de una planta, por ejemplo, hojas, tallos, fruto, semillas, raíces, etc. El material de propagación incluye, por ejemplo, semillas, frutos, gajos, plántulas, tubérculos, portainjertos, etc.

La invención se refiere además a una proteína de la capa de células de transferencia del endospermo basal (BETL) o a uno de sus fragmentos inmunológica o biológicamente activo que puede ser codificado por una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

La invención también se refiere a un anticuerpo que reconoce específicamente una proteína de la BETL de acuerdo con la invención o un fragmento, como SEC. ID N°: 54, o uno de sus epítomos.

Estos anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales o anticuerpos sintéticos así como fragmentos de anticuerpos, como por ejemplo los fragmentos Fab, Fv o scFv, etc. Las técnicas para producir dichos anticuerpos son métodos clásicos bien conocidos por los expertos.

Otro objetivo de la invención es un método para mejorar la resistencia a los patógenos de la planta, que comprende los pasos que consisten en:

a) transformar al menos una célula de la planta mediante al menos un vector como el definido previamente;

b) cultivar la(s) célula(s) así transformada(s) para generar una planta que contenga en su genoma al menos un casete de expresión de acuerdo con la invención, mediante lo cual se obtiene una planta con mejor resistencia a los patógenos.

5 Los patógenos de la invención incluyen, pero no exclusivamente, virus o viroides, bacterias, insectos, nemátodos, hongos y similares. Por ejemplo, la especie *Fusarium* (particularmente *Fusarium moniliforme*, *Fusarium graminearum*), *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phoma*, gusano de la raíz del maíz, *Aphis gossypii*, etc. Para el maíz, esto incluiría especialmente mohos patógenos de la mazorca, como *Fusarium moniliforme*.

10 La actividad biológica de las proteínas de la BETL de acuerdo con la invención puede ser determinada por cualquier método conocido en el área. Los ensayos para medir por ejemplo la actividad antimicrobiana y las vías de desarrollo y las respuestas de defensa que son influidas por la proteína de BETL son bien conocidos en el área.

15 Los ensayos para medir la actividad antipatogénica (actividad de resistencia a los patógenos) son en general conocidos en el área, como los métodos para cuantificar la resistencia a una enfermedad en una planta luego de una infección con un patógeno. Tales técnicas incluyen particularmente, la medición en el tiempo, el diámetro promedio de la lesión, la biomasa del patógeno y el porcentaje general de los tejidos descompuestos de la planta.

20 Las composiciones antimicrobianas y antipatogénicas también están incluidas en el alcance de la invención. Las composiciones de la presente invención pueden estar en una forma adecuada para la aplicación directa a la planta que la necesite o como un concentrado de una composición primaria, que requiere la dilución con una cantidad adecuada de agua u otro diluyente antes de la aplicación.

25 Además, las composiciones se pueden usar en formulaciones utilizadas por sus actividades antimicrobianas y antipatogénicas (resistencia a los patógenos). Las proteínas de la invención se pueden formular con un vehículo aceptable en una o más composiciones pesticidas, por ejemplo, una suspensión, una solución, una emulsión, un polvo para espolvorear, gránulos dispersables, un polvo humectable y un concentrado emulsionable, un aerosol, gránulos impregnados, un adyudante, una pasta para recubrir y también encapsulaciones en, por ejemplo, sustancias poliméricas.

30 Las metodologías para la transformación, selección y regeneración son bien conocidas por los expertos y fueron descritas previamente.

Otro objetivo de la invención es un método para mejorar la cualidad agronómica de una planta, que comprende los pasos que consisten en:

35 a) transformar al menos una célula de la planta mediante al menos un vector como el definido previamente;

40 b) cultivar la(s) célula(s) así transformada(s) para generar una planta que contenga en su genoma al menos un casete de expresión de acuerdo con la invención, mediante lo cual se obtiene una planta con una cualidad agronómica mejorada.

Más particularmente, dicha planta presenta un mayor tamaño de semilla como cualidad agronómica mejorada.

45 La sobreexpresión de la proteína de MEG1 en una planta produce un aumento del tamaño de la semilla. Cuando se sobreexpresa la proteína de MEG1, se puede usar cualquier promotor en el casete de expresión.

Preferentemente el promotor se elige entre un promotor específico de BETL como cualquiera de los promotores de acuerdo con la presente invención, o el promotor BETL2 (WO 99/50427).

50 Por otra parte, la presente invención se refiere a un conjunto que comprende al menos una de las moléculas de ácido nucleico, sondas, secuencias conservadas, vectores, proteínas, composiciones o anticuerpos mencionados previamente de la invención. El conjunto, o sus componentes, de acuerdo con la invención se pueden usar en una célula de una planta y en los cultivos tisulares de la planta, por ejemplo para detectar los niveles de expresión del transgén. El conjunto y su aplicación son particularmente útiles para la detección sistemática de efectos antipatogénicos en cultivos fúngicos.
55 Se espera que el conjunto y sus componentes sean muy útiles para cultivar nuevas variedades, por ejemplo, de plantas que tengan mejores propiedades como valor nutricional o resistencia a enfermedades (resistencia a los patógenos).

La presente invención se comprenderá mejor a la vista de las figuras adjuntas y los ejemplos siguientes.

60 Las figuras 1 y 2 representan el análisis (AMD, Allelic Message Display) de *ZmMEG1-1*.

La figura 1 es una autorradiografía de un gel de AMD que muestra un patrón de expresión materno para *ZmMEG1-1* (flechas). 1, F2 autopolinizada; 2, Mo17 autopolinizada; 3, F2 x Mo17; 4, Mo17 x F2; 5, A69Y autopolinizada; 6, F2 autopolinizada; 7, F2 x A69Y; 8, A69Y x F2.

65 La figura 2 describe un análisis RT-PCR (transferencia inversa-reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés) específico de los alelos, de *ZmMEG1-1* en el endospermo. En la parte superior, *ZmMEG1-1* el alelo materno es monoalélico a los 4 DDP (banda única) y bialélico a los 12 DDP (banda doble). En la parte inferior, expresión

monoalélica de Meg1 en cruzamientos interploides a los 4 DDP. Las líneas endogámicas parentales utilizadas fueron F2, A69Y (69) y W23 tetraploide (4x).

La figura 3 representa el alineamiento de aminoácidos de proteínas putativas con un dominio ZmMEG1-1. Las flechas indican la posición de las cisteínas conservadas y un círculo indica la posición de las tirosinas conservadas putativamente involucradas en el anclaje a la pared celular.

Las figuras 4 y 7 representan la caracterización de la proteína de ZmMEG1-1, y el análisis de la expresión de *ZmMEG1-1* y cinco ADNc relacionadas.

La figura 4: el análisis RT-PCR se llevó a cabo con diferentes muestras de ARN aislado de varios tejidos y amplificado con cebadores (primers) específicos para los genes (ver oligonucleótidos en tabla 1). La coloración clara y oscura de los recuadros indica señal alta e intermedia respectivamente, y un recuadro blanco indica ausencia de señal.

La figura 5 describe el análisis de la hibridación *in situ* de *ZmMEG1-1* en semillas en desarrollo. A la izquierda, 4 DDP; a la derecha 12 DDP.

La figura 6 muestra la inmunolocalización de la proteína de ZmMEG1-1. A la izquierda, región BETL 12 DDP; a la derecha, localización de la pared celular de ZmMEG1-1 en células de BETL.

La figura 7 es un análisis Western de proteínas aisladas de endospermos 10 DDP después del fraccionamiento subcelular.

1, fracción citoplasmática I; 2, fracción citoplasmática II; 3, fracción de la pared celular I; 4, fracción de la pared celular II. Las flechas indican la presencia de diferentes proteínas ZmMEG1-1. Em, embrión; En, endospermo; ESR, región que rodea el embrión; PC, pedúnculo.

La figura 8 indica que *ZmMEG1-1* integra una familia de genes pequeños cuyos alelos parentales se metilan diferencialmente en el análisis de metilación de *ZmMEG1-1* en el endospermo en el embrión (1-4) y el endospermo (5-8) a los 6 DDP.

1, W22 auto; 2, A69Y auto; 3, W22 x A69Y; 4, A69Y x W22; 5, W22 auto; 6, A69Y auto; 7, W22 x A69Y; 8, A69Y x W22. Las flechas indican la presencia de fragmentos genómicos metilados diferencialmente en el endospermo detectados con una sonda específica del gen de *ZmMEG1-1*.

La figura 9 representa el resultado de un alineamiento de secuencias de ZmMeg1-1 y ZmMeg1-2 con proteínas BAP.

La figura 10 representa el análisis de la región promotora de *ZmMEG1-1*. A la izquierda, una secuencia promotora mínima de *ZmMEG1-1* está conservada en varios promotores *ZmMEG1-1* de la línea endogámica F2. A la derecha, estos promotores muestran una gran conservación de la cuarta región también presente en otros genes específicos de BETL (denominados cajas I a IV). Cajas blancas, motivos TATA putativos; cajas I a IV son las secuencias conservadas en las regiones promotoras de varios genes específicos de BETL conocidos.

La figura 11 representa la expresión diferencial de pZmMEG1-1:GUS en endospermo de maíz cuando se hereda por vía materna y paterna. (A-J) cortes sagitales de granos teñidos para determinar el reportero GUS, donde (A, C, E, G e I) son semillas de un cruzamiento A188::pZmMEG1-1:GUS x A188; (B, D, F, H y J) son semillas de cruzamiento recíproco A188 x A188::pZmMEG1-1:GUS. Note la presencia de la señal de GUS en (A) y (C) en etapas tempranas del desarrollo del endospermo pero que está ausente cuando se transmite por vía paterna (B y D). (A y B) 4 DDP; (C y D) 6 DDP; (E y F) 10 DDP; (G y H) 15 DDP; (I y J) 20 DDP.

La figura 12 es un análisis de la región promotora mínima de *ZmMEG1-1*. A la izquierda, representación esquemática de los constructos de delección del promotor empleados en un experimento de co-bombardío con un constructo p35S:MRP1. A la derecha, resultados obtenidos del ensayo de co-bombardío. Los signos de más indican la presencia de tinción de GUS (transactivación); los signos de menos indican la ausencia de tinción de GUS (falta de transactivación).

La figura 13 es una representación diagramática de una estrategia de cruzamiento que permite obtener cosechas con mayor valor.

La figura 14 describe el alineamiento de secuencias de pares de MEG1 (SEC. ID N°: 1 = promotor MEG 1-1), MEG2 (SEC. ID N°: 2 = promotor MEG 1-2) y MEG3 (SEC. ID N°: 3 = promotor MEG 1-3) realizado con CLUSTAL W (1,74). Los nucleótidos que se muestran en negrita corresponden a la SEC. ID N°: 57. Los nucleótidos subrayados corresponden a regiones conservadas en los genes específicos de BETL (meg1, betl's y DD1s), y los nucleótidos sombreados corresponden a regiones conservadas en los genes anteriores y las ESR. Los nucleótidos en recuadros corresponden a cajas TATA.

Ejemplos

La invención se describirá a continuación mediante los ejemplos siguientes, que no deben considerarse de ningún modo como limitantes del alcance de la invención.

Se pueden usar varios oligonucleótidos y cebadores para amplificar o aislar secuencias o fragmentos de secuencias de acuerdo con la presente invención. Los oligonucleótidos y cebadores descritos no son limitantes. Los expertos saben como diseñar un oligonucleótido, o un oligonucleótido específico, basado en una secuencia.

Ejemplo 1

Material de la planta y condiciones de cultivo

Se cultivaron en invernadero líneas endogámicas diploides W22, F2, B73 y Mo17, y tetraploide W23 (COOP Maize Stock Centre) de maíz (*Zea mays* L.) en el régimen siguiente: 16 h de duración del día (complementado con lámparas de haluro metálico a 250 mmols, cuando fue necesario) a 22-28°C durante el día y a 16-20°C durante la noche. Los niveles de humedad se fijaron a aproximadamente 40-50% durante el día y a 60-70% durante la noche. Todas las líneas se autopolinizaron y se cruzaron recíprocamente, y los granos se cosecharon 6-24 días después de la polinización (DDP). Los embriones y los endospermos se aislaron y se juntaron, después se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C,

Ejemplo 2

Identificación y caracterización de la familia de genes ZmMeg1

Se llevó a cabo un cribado genómico diseñado para identificar transcritos de endospermo que tengan patrones de expresión de origen parental mediante allelic message display (AMD) (Gutiérrez-Marcos *et al.*, 2003).

Allelic message display (AMD):

El ARN total del endospermo se extrajo de líneas endogámicas autopolinizadas y cruzadas recíprocamente y se usó para AMD-PCR de acuerdo con el protocolo de Hagiwara *et al.* (1997).

Se usó ARN transcrito inverso como fuente de material para RCP (HIEROGLYPH kit; Genomix-Beckman), marcando con [alfa 33P]-dATP. Se usó una combinación de 240 cebadores para llevar a cabo las reacciones de PCR y los productos se analizaron en un sistema de secuenciación de ADN semiautomático Genomix LR. Luego de la exposición a la película (Biomax MR, Kodak), las bandas candidatas se extrajeron del gel y se amplificaron usando PCR.

Esto dio como resultado la presencia de varios fragmentos que presentaban expresión monoalélica materna, uno de los cuales fue denominado gen 1 del *Zea mays* expresado maternalmente (*Zea Mays maternally expressed-gene 1*, *ZmMEG1*), (Figura 1).

Identificación de ADNc de ZmMEG1 y análisis de la expresión

2.1) Aislamiento de ADNc de Meg1 y secuencias relacionadas

Se obtuvieron ADNc completos después de cribar una genoteca de ADNc de endospermo de maíz 7 DDP (Hueros *et al.*, 1999b). Entre las 500.000 placas cribadas, se identificaron y secuenciaron cinco clones de ADNc. Esto identificó el ADNc completo, ZmMEG1-1, más otros tres similares, pero no idénticos, ADNc que denominamos ZmMEG1-2, -3 y -4. Después de cribar la base de datos del genoma de maíz, se identificaron otras dos EST que presentaban una similitud parcial con el extremo C-terminal de la secuencia de la proteína MEG1-1 traducida que se denominaron ZmMEG1-5 y -6.

2.2) Mapeo

La familia de genes de *ZmMEG1* se mapeó hasta el brazo corto del cromosoma 7 del maíz, entre los marcadores csu13 y bngl1200, mediante análisis de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) usando una población de líneas F2 inmortalizadas.

2.3) Análisis Southern

La diversidad de la familia de *ZmMEG1* se reveló en la línea endogámica F2 mediante el análisis Southern y el cribado BAC, este análisis indicó que la familia de genes de *ZmMEG1* comprende entre dos y cuatro agrupaciones de genes con unas pocas copias presentes en todas las agrupaciones.

ES 2 328 578 T3

Para la inmunotransferencia Southern, se digirió el ADN con la enzima de restricción XhoI, la solución de hibridación fue 5 x SSPE/5 x Denhardt/0,5% SDS, y para las transferencias se usaron sondas con la región de codificación de Meg1-1 completa (SEC. ID N°: 5).

El análisis Southern en condiciones muy rigurosas (hibridación a 65°C y lavado durante 10 minutos a 65°C con 0,1 x SSPE/0,5% SDS) reveló que la familia de genes de ZmMEG1 comprende entre 5-8 copias presentes en la mayoría de las líneas endogámicas de maíz, teosintes y otros gramíneas(arroz, sorgo y caña de azúcar).

El análisis Southern en condiciones poco rigurosas (hibridación a 50°C y lavado durante 10 minutos a 65°C CON 2 x SSPE/0,5% SDS) también reveló bandas en trigo y cebada.

2.4) Patrón de expresión

Se evaluó el patrón de expresión de ZmMEG1-1 y los otros ADNc semejantes a ZmMEG1 (ZmMEG1-2, ZmMEG1-3, ZmMEG1-4, ZmMEG1-5 y ZmMEG1-6) por transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) usando los pares de oligonucleótidos específicos de los genes que se muestran en la tabla 1 a continuación.

TABLA 1

Lista de oligonucleótidos utilizados para el análisis RT-PCR

Nombre del gen	Oligonucleótido hacia adelante	Oligonucleótido inverso	Tamaño de PCR
MEG1-1	TGCTGCTCATGCGCATGGGGC	TTAGAAGCAKGCATGWCTACACTS	165
	TG, SEC. ID N°: 23	AGCC, SEC. ID N°: 24	
MEG1-2	ATGCACATGGGAAGGGTCATG	TTAGAAGCAKGCATGWCTACACTS	193
	TC, SEC. ID N°: 25	AGCC, SEC. ID N°: 26	
MEG1-3	GCATAGCAGGAGTGGAGGGC,	GAAGCAGGCATGACTACACTC,	292
	SEC. ID N°: 27	SEC. ID N°: 28	
MEG1-4	TGGCCAATGTGCGCTCCGAG,	TTAGAAGCAKGCATGWCTACACTS	320
	SEC. ID N°: 29	AGCC, SEC. ID N°: 30	
MEG1-5	ATGGCTGGCTATGGTGTGA	GTGCAGTTTGCAGGTAAGCCC,	150
	TG, SEC. ID N°: 31	SEC. ID N°: 32	
MEG1-6	TGTACGCCTGACTTGGCTAGC	TTAGAAGCAKGCATGWCTACA	181
	AACC, SEC. ID N°: 33	CTSAGCC, SEC. ID N°: 34	
GST	GCAACGTACCGTACCTTTCC	ACGCTGCATTCAATTACCGGG	
	GA, SEC. ID N°: 35	AAG, SEC. ID N°: 36	
GUS	GGGCCAACAGTTCCTGATTAA	CCCCGTTGACTGCCTCTTCG,	
	CC, SEC. ID N°: 55	SEC. ID N°: 56	

El patrón de expresión se muestra en la figura 4.

Los alelos específicos de ZmMeg1-1 mostraron 99,9% de identidad en varias líneas endogámica (A188, B73, Mo17, F2, W22 y W23 tetraploide) y fueron detectados usando secuencias polimórficas amplificadas y cortadas (Neff *et al.*, 1998).

Para distinguir entre alelos de *ZmMeg1-1*, el análisis RT-PCR se llevó a cabo empleando cebadores de MEG1 (5'-TGCTGCTCATGCGCATGGGGCTG-3', SEC. ID N°: 17) y MEG1Hpal (5'-TTGTATATAAAAACAGTGATGT TAA-3' SEC. ID N°: 18) para producir un fragmento de ADN que luego de la digestión con Hpal generó fragmentos de 177 bp para F2 y 198 bp para A69Y o W23.

El gen de la *glutación sintasa 1* se usó como control para una expresión de origen parental bialélica.

El transcrito de *ZmMEG1-1* fue el único presente en las muestras de endospermo entre 4 y 20 DDP lo que indica que su expresión es específica del endospermo. *ZmMEG1-2* y *ZmMEG1-4* también mostraron un patrón de expresión similar, mientras que *ZmMEG1-3* se expresó en el endospermo así como en muestras de antera y polen. En contraposición, se encontró que *ZmMEG1-5* y *ZmMEG1-6* se expresaban en la mayoría de los tejidos analizados.

Ejemplo 3

Patrón de expresión de origen parental de ZmMEG1-1

3.1) *ZmMeg1-1* tiene un patrón de expresión de origen parental materno

Para confirmar el patrón de expresión de origen parental materno de *ZmMEG1-1*, se detectó un polimorfismo 3'UTR del gen, entre F2 Y A69Y, y W23 otras líneas endogámicas, que nos permitió diseñar oligonucleótidos para RT-PCR específica de los alelos.

Los resultados revelaron una expresión exclusiva del alelo materno de *ZmMEG1-1* en etapas tempranas del desarrollo del endospermo (4 DDP) (Figura 2). Sorprendentemente, se encontró que en etapas posteriores del desarrollo del endospermo (12 DDP) la expresión de *ZmMEG1-1* se tornaba bialélica (Figura 2).

Para investigar los efectos de la alteración de la relación genómica materna a paterna en el endospermo en la expresión de *ZmMEG1-1*, se realizaron cruzamientos recíprocos entre líneas endogámicas diploides y tetraploides. La RT-PCR específica de los alelos mostró que el patrón de expresión de *ZmMEG1-1* permanecía inalterado (Figura 2).

3.2) *Los alelos de ZmMeg1-1* se metilan diferencialmente en el endospermo

Puesto que *ZmMEG1-1* está sujeto a un patrón de expresión de origen parental en el endospermo se puede predecir que podrían ocurrir cambios en la metilación entre los diferentes alelos parentales.

Los inventores analizaron esta hipótesis mediante el examen del estado de metilación de los alelos parentales de *ZmMEG1-1* usando digestión con una enzima de restricción sensible a la metilación y análisis Southern con una sonda específica del gen, en el ADN genómico obtenido de las muestras de embrión y endospermo.

Las diferencias en el estado de metilación de los alelos parentales de *ZmMEG1-1* fueran aparentes sólo en el endospermo; los alelos maternos de *ZmMEG1-1* aparecieron desmetilados mientras que los alelos paternos estaban metilados (Figura 8).

Estos resultados sugieren con mucha fuerza una correlación entre el estado de metilación de un alelo dado de *ZmMEG1-1* en el endospermo y un patrón de expresión de origen parental.

Ejemplo 4

Caracterización de la proteína de ZmMeg1-1

4.1) *ZmMeg1-1* codifica una proteína de la pared de células de transferencia del endospermo basal

El ADNc de *ZmMEG1-1* completo contenía un marco de lectura abierto de 88 aminoácidos (Figura 3), que codifica una proteína prevista de 9.794 Da con un pI de 7,5. El polipéptido ZmMEG1-1 contiene una región N-terminal hidrófoba con características de un péptido señal de 27 aminoácidos (von Heijne, 1986). Análisis posteriores identificaron un sitio de escisión putativo entre His-26 y Glu-27, produciendo por lo tanto un polipéptido que contenía 61 aminoácidos, con una masa molecular prevista de 6.730 Da y pI 6,2.

Una característica interesante del polipéptido ZmMEG1 es la presencia de un dominio rico en cisteína muy conservado en la porción C-terminal, también presente en los análogos de *ZmMEG1* (*ZmMEG1-2*, -3, -4, -5 y -6) (Figura 3). Esta región conservada contiene seis cisteínas y dos tirosinas, y se asemeja a otros dominios cisteína encontrados en varias proteínas de plantas con la localización de la pared celular de la hipótesis (de Oliveira *et al.*, 1990; Domingo *et al.*, 1999).

La hibridación *in situ* de *ZmMEG1-1* se llevó a cabo en cortes de grano en diversas etapas del desarrollo del endospermo con sondas específicas de los genes de acuerdo con un método publicado (Jackson, 1991), con modificaciones DB menores (Costa *et al.*, 2003). (Figura 5).

No se detectó ninguna señal con la sonda sentido, sin embargo, la sonda antisentido sólo dio señal en las células de transferencia desde 4 DDP y mostró la máxima expresión alrededor de 6-10 DDP (Figura 5), indicando claramente que *ZmMEG1-1* se expresa exclusivamente en la región de transferencia basal del endospermo.

4.2) Localización de la proteína de *ZmMEG1-1*

Para determinar la localización de la proteína de *ZmMEG1-1* en el endospermo de maíz, se produjo un antisuero policlonal usando un péptido sintético diseñado para el extremo N-terminal del polipéptido *ZmMEG1-1* procesado putativamente.

Immunolocalización

Se produjo un antisuero policlonal en conejo contra un péptido sintético (NAPAEELGILREKRAQC, SEC. ID N°: 19) y se purificó por afinidad con un péptido inmovilizado usando un sistema en gel de acoplamiento Sulpholink (Pierce, Reino Unido). Los granos de maíz se fijaron en paraformaldehído al 4% en tampón de fosfato de sodio 0,1 M de pH 7,2, durante 12-24 h dependiendo del volumen de tejido. Las muestras se deshidrataron en una serie de etanol y se incrustaron en cera. Se desparafinaron los cortes y se bloquearon en BSA al 1% en PBS (fosfato de sodio 10 mM, NaCl 150 mM pH 7,4) durante 30 min a temperatura ambiente y se incubaron durante toda la noche con antisuero anti-MEG1 o suero pre-inmune (ambos diluidos 1:500). La inmunorreacción se detectó usando un anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina (Sigma; diluido 1:1000) y NBT/BCIP como sustrato.

La inmunolocalización se llevó a cabo usando el antisuero purificado, que detectó a la proteína de *ZmMEG1-1* adyacente a los crecimientos hacia adentro de la pared celular de las células de transferencia del endospermo basal (Figura 6).

Para obtener una evidencia bioquímica de la localización de la proteína respecto a la pared celular, se fraccionaron extractos de proteínas de endospermos 10 DDP según describen Serna *et al.* (2001) y se analizaron por inmunotransferencia (Figura 7).

Fraccionamiento subcelular de proteínas

El fraccionamiento de componentes subcelulares de los endospermos (endogámica F2) se realizó según describen Serna *et al.* (2001). Las proteínas se fraccionaron mediante electroforesis SDS-PAGE de acuerdo con (Laemmli, 1970), y se electrotransfirieron a una membrana del fluoruro de polivinilidino (PVDF). Las proteínas se detectaron usando un método de quimioluminiscencia potenciada (ECL, Amersham, UK).

Varias proteínas con masas moleculares previstas que variaron entre 6 y 50 kDa estuvieron presentes en las fracciones citoplasmáticas, dos de las cuales correspondieron a ca. 9-10 kDa y ca. 6-7 kDa. De manera interesante, las proteínas de ca. 6-7 kDa dieron las señales de mayor intensidad en la preparación de pared celular, proporcionando de esta forma evidencia de la localización en la pared celular del polipéptido *ZmMEG1-1* putativo escindido (Figura 7). Se observaron otras 3 proteínas con masas moleculares entre 2,5 y 3,5 kDa en la fracción de pared celular.

4.31 Rol de *ZmMEG1-1*

Las familias BETL y BAP constituyen las familias más grandes de proteínas específicas de la capa de transferencia basal encontradas hasta la fecha. Estas proteínas pequeñas son secretadas en la región del pedúnculo o están localizadas en la pared celular y se sugiere con insistencia que intervienen en el ataque antifúngico y la defensa contra los patógenos (Hueros *et al.*, 1995; Serna *et al.*, 2001).

Como saben los expertos (Hueros *et al.* 2002), los genes específicos de BETL aislados hasta la fecha comparten algunas características estructurales que sugieren con fuerza que tienen un rol en la defensa contra la entrada de patógenos en la semilla en desarrollo. Ellos codifican péptidos pequeños secretados ricos en cisteína que se acumulan sólo transitoriamente durante el desarrollo del endospermo.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de *ZmMeg1-1* reveló un motivo rico en cisteína en la región C-terminal que comprende seis residuos de cisteína y dos residuos de tirosina: C-(X)4-CYCC-(X)8-Y-(X)4-C-(X)3-C (SEC. ID N°: 20), que se conservó en las otras proteínas análogas a *ZmMEG1* (*ZmMEG1-2*, *ZmMEG1-3*, *ZmMEG1-4*, *ZmMEG1-5* y *ZmMEG1-6*) (Figura 3) y mostró una gran similitud con muchos dominios ricos en cisteína identificados en otras proteínas de plantas (Hueros *et al.*, 1995; Domingo *et al.*, 1999; Hueros *et al.*, 1999b; Serna *et al.*, 2001) (Schopfer *et al.*, 1999). Se cree que los dominios ricos en cisteína son necesarios para el mantenimiento de las conformaciones particulares de las proteínas, lo que resulta en la exposición de residuos de cadenas laterales interdigitadas (Berg y Shi, 1996), como los residuos de tirosina encontrados en *ZmMEG1*. De manera importante, se ha informado que la exposición de los residuos de tirosina facilita la unión de proteínas sintéticas a la pared celular (analizado en Cassab, 1998).

Puesto que la localización de la proteína de ZmMEG1-1 es proximal respecto a la interfase materno-filial, se espera que pueda tener una función semejante a la de defensin, como se informa para *BETL1,3* (Hueros *et al.*, 1995; Hueros *et al.*, 1999a) y las proteínas *ZmES* (Cordts *et al.*, 2001).

Además la modificación del nivel de la proteína de MEG1 modifica el tamaño de la semilla ya que la disminución del nivel de la proteína de MEG1 induce una reducción del tamaño de la semilla (consulte a continuación).

Se realizó un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de MEG1-1 y MEG1-2 con la de las proteínas BAP y el resultado se muestra en la figura 9.

Se hicieron dos constructos *Meg1* (casetes de expresión) para determinar el efecto de la sobreexpresión del gen *Meg1* en el maíz:

Transformación del maíz:

Se transformaron callos embriogénicos tipo II con el constructo y se regeneraron como describen Bonello *et al.*, 2000.

Los constructos siguientes se obtuvieron por métodos clásicos de biología molecular.

Constructo A: p35S-intrón HSP70-Meg1 genómico-3'CaMV

Se generaron 34 transformantes de maíz, algunas plantas mostraron una mejor resistencia los patógenos.

Constructo B: p35S-intrón HSP70-Meg1 ADNc-3'CaMV

Se generaron 36 transformantes de maíz, algunas plantas mostraron una mejor resistencia los patógenos.

Constructo C: p35S Meg1- ARNAi-3'OCS

Se hizo un constructo *Meg1* (casete de expresión) para determinar el efecto del descenso regulado de *Meg1*.

Se obtuvo el vector pGUSART, subclonando un fragmento EcoRV (789 a 1820) del gen GUS en pART7 (Gleave A.P (1992) Plant Mol. Biol. 20: 1.203-1.207).

Se amplificó un fragmento de la secuencia de ADNc de *Meg1-1* (151 a 380) por PCR usando dos oligonucleótidos:

meg1ARNi.FOR (ClaI-EcoRI) 5'-ATCGATGAATTCGCTCAAGGGTTTCTTCCATG-3' (SEC. ID N°: 63)

meg1ARAI.REV (BamHI-XhoI) 5'-GGATCCTCGAGCCTCTAGTATCGGTCTGAC-3' (SEC. ID N°: 64)

El producto de PCR se subclonó en pGEM-T easy y se secuenció. Después de la digestión con BamHI y ClaI, y EcoRI y XhoI los fragmentos se subclonaron en pGUSART para generar un constructo 3'-5' y 5'-3' flanqueando la porción eliminada del gen GUS capaz de producir una formación doble.

Se generaron 24 transformantes de maíz, algunas plantas mostraron menor resistencia a los patógenos.

En particular, 4 de las 24 plantas *Meg1 ARNi* presentaron una segregación en el tamaño de la semilla en la mazorca. Se encontró que los granos que heredaron el transgén ARNi eran más pequeños que los granos segregantes de tipo silvestre (no se muestra la figura). Por lo tanto la inhibición de la expresión de *Meg1* reduce el tamaño de la semilla.

Ejemplo 5

Aislamiento del promotor ZmMEG1-1 y caracterización de la secuencia

5.1) Aislamiento del ADN genómico de Meg1

Se usó una sonda *Meg1.1* para cribar una genoteca F2 BAC (O'Sullivan *et al.*, 2001), lo que dio como resultado seis fragmentos genómicos de *ZmMeg1-1* que se subclonaron en pBluescript KSII (Stratagene, Reino Unido) y se secuenciaron. El análisis de la secuencia reveló la existencia de al menos cuatro copias diferentes de ZmMEG1-1 en la línea endogámica F2, todas las cuales mostraron sutiles diferencias en sus regiones promotoras, aunque las regiones del exón y el intrón estaban muy conservadas. Se encontró que una región mínima del promotor (ca. 370 bp) estaba conservada en otros promotores que pertenecían a genes específicos de las células de transferencia del endospermo basal conocidos (Hueros *et al.*, 1999b; Sevilla-Lecoq *et al.*, 2003) (Figura 10).

5.2) Preparación de un constructo reportero

Se aisló una región promotora mínima de *ZmMEG1-1* por PCR usando dos oligonucleótidos específicos (5'-ACACCTCAAATAGATATGGATATAG-3', SEC. ID N°: 60, y 5'-GTCGCAAGAAATGTTAAGGAAGTCC-5', SEC. ID No; 61) y se subclonó en el vector pGEM-T easy (Promega, Madison, EE.UU.).

Después de la digestión con EcoRI y ClaI, el fragmento de 371 bp se fusionó a la secuencia que codifica la β -glucuronidasa (GUS) y el terminador nopalina sintasa (NOS) del vector pSLJ4K1 (Jones *et al.*, 1992) para generar el vector de fusión transcripcional denominado pZmMEG1-1-GUS.

5.3) Transformación del maíz y análisis de la expresión

Para analizar si la región promotora mínima de *ZmMEG1-1* era capaz de conferir expresión al gen específico de las células de transferencia transformamos establemente plantas de maíz con el constructo de fusión transcripcional pZmMEG1-1-GUS.

Transformación del maíz:

Se transformaron callos embriogénicos tipo II con el constructo y se regeneraron como describen Bonello *et al.*, 2000.

Se generaron cinco líneas transgénicas independientes (0757-1C, 0757-2E, 0757-2F, 0757-2D, 0757-2L) y se seleccionaron basándose en la expresión de altos niveles de β -glucuronidasa, detectados mediante tinción histoquímica de los granos. Se genotipificaron plantas en busca de fusiones transcripcionales de β -glucuronidasa (GUS) por PCR usando oligonucleótidos específicos de GUS (SEC. ID N°: 55 y 56). El análisis histoquímico de las líneas transgénicas se realizó de acuerdo con (Jefferson *et al.*, 1987; Costa *et al.*, 2003). En resumen, se deshidrataron con etanol al 70% cinco granos fijados antes del análisis y se obtuvieron imágenes digitalmente.

La tinción de GUS sólo se observó alguna vez en el tejido del endospermo y no se observó en ningún otro tejido de plantas analizado.

A estas líneas se les hizo posteriormente cruzamiento retrógrado con polen de una línea endogámica estándar A188 durante cuatro generaciones consecutivas para confirmar el patrón de expresión estable en el endospermo.

Dos de las líneas transgénicas independientes (0757-2E y 0757-2D) se seleccionaron al azar y se cruzaron recíprocamente con plantas silvestres A188 para determinar cambios en los patrones de expresión del transgén basándose en su modo parental de herencia.

Para cada línea, se aislaron alrededor de 200-280 granos en diferentes etapas del desarrollo de cuatro plantas y se tiñeron histoquímicamente para determinar GUS. Para cada tiempo de muestreo analizado, se aislaron alrededor de 50-70 granos de cuatro plantas y se tiñeron histoquímicamente para determinar GUS, como se mencionó antes.

De manera interesante, encontramos expresión temporal diferencial de GUS cuando se transmitía por vía materna o paterna.

Cuando las plantas pZmMEG1-1-GUS eran o bien autopolinizadas o cruzadas como plantas femeninas, la tinción de GUS estaba presente en las células de transferencia desde 4 DDP, cuando el endospermo se torna completamente celular, y permanecía hasta 20 DDP. Se alcanzaba un nivel máximo de tinción de GUS a los 10-12 DDP.

Sin embargo, cuando las plantas pZmMEG1-1-GUS se cruzaban como plantas masculinas (es decir transmitido paternalmente a través del polen), sólo se detectó actividad histoquímica de GUS alguna vez después de 10 DDP, cuando estuvo en su valor más alto, y una declinación en la expresión hacia 20 DDP. La demora aparente en la expresión del transgén heredado por vía paterna se confirmó a nivel transcripcional mediante el análisis Northern (no se muestran los datos).

Considerados en conjunto, los datos demuestran que una región mínima del promotor MEG1-1 puede conferir una expresión específica temporal de las células de transferencia diferente del gen reportero *uidA* dependiendo del origen parental.

Por lo tanto, la expresión de pZmMEG1:GUS en las células de BETL depende de su herencia parental.

Ejemplo 6

6.5 Transactivación del promotor *ZmMEG1-1* por *ZmMRP1*

Recientemente se encontró que un factor de transcripción específico de las células de transferencia, *ZmMRP1*, es capaz de transactivar la expresión de varios promotores de BETL (Gomez *et al.*, 2002).

Para investigar si ZmMRP1 también era capaz de transactivar a *ZmMEG1-1*, se co-bombardearon hojas de maíz etiolado con el constructo pZmMEG1-1-GUS y una versión potenciada con 35S de la proteína ZmMRP1 (fusión traduccional p35S-MRP1).

Los datos mostraron que *pZmMEG1-GUS* era transactivado significativamente por ZmMRP1 (Figura 11), lo que indica que ZmMRP1 es suficiente para la activación de ZmMEG1-1 en tejidos de hojas y es probablemente suficiente para activar la expresión de *ZmMEG1-1* en células de transferencia del endospermo.

Se obtienen los mismos resultados con el promotor de MEG1 de acuerdo con la SEC. ID N°: 62.

Ejemplo 7

Análisis de delección del promotor

Para definir la región esencial para la transactivación por ZmMRP1, generamos una serie de delecciones de la región del promotor *ZmMEG1-1* conservada y las fusionamos al gen reportero *uidA*.

El análisis de delección seriada se realizó mediante amplificación por PCR de las diferentes regiones del promotor *ZmMEG1-1*, usando pares de oligonucleótidos múltiples (consulte la tabla 2 a continuación) y después subclonando en el vector pGEM-T easy (Promega, Madison, EE.UU.).

TABLA 2

Lista de oligonucleótidos utilizados en el análisis de delección

Nombre del constructo	Oligonucleótido hacia adelante	Oligonucleótido inverso
pMEG1- GUS	ACACCTCAAATAGATATGGATATA, SEC. ID N°: 37	GTTATCTATTCTATTCTATCATATCTATC, SEC. ID N°: 38
pMEG1- 31/30GUS	GATATAGATATATAGAAGAGATAT AGATGG, SEC. ID N°: 39	GTTATCTATTCTATTCTATCATATCTATC, SEC. ID N°: 40
pMEG1- 32/30GUS	AGATAGATATGATAGAATAGATA GATAAC, SEC. ID N°: 41	GTTATCTATTCTATTCTATCATATCTATC, SEC. ID N°: 42
pMEG1- 33/30GUS	ATTTTGTCTAAAGAGACTAAATCA CTGC, SEC. ID N°: 43	GTTATCTATTCTATTCTATCATATCTATC, SEC. ID N°: 44
pMEG1- 30/31GUS	ACACCTCAAATAGATATGGATATA SEC. ID N°: 45	CCAATTCACTGGGTTATCTATTCTAT TCTATCATATCT, SEC. ID N°: 46
pMEG1- 30/32GUS	ACACCTCAAATAGATATGGATATA SEC. ID N°: 47	CCAATTCACTGGCCATCTATATCTTC TATATATCTATA, SEC. ID N°: 48
pMEG1- 30/33GUS	ACACCTCAAATAGATATGGATATA SEC. ID N°: 49	CCAATTCACTGGCCCTTGTATATATC TATATCTATACC, SEC. ID N°: 50

Los constructos se digirieron con *EcoRI* y *BstXI* y los fragmentos se subclonaron en el constructo pZmMEG1-1-GUS pre-digerido con *EcoRI* y *BstXI*. Siguiendo este método las cajas TATA putativas identificadas en el promotor *ZmMEG1-1* permanecieron intactas.

La región de codificación de *ZmMRP-1* se aisló por PCR usando oligonucleótidos MRP.FOR (5'GGATCCAT GAATCCCAACTTCAACAGTG3' SEC. ID N° 21) y MRP.REV (5'GAATTCTTATCGGTTATATATCTGGCTCTC C3', SEC. ID N°: 22). Los fragmentos de PCR se subclonaron en pGEM-T easy (Promega, Madison, EE.UU.), digeridos con *BamHI/EcoRI* y el fragmento de 327 bp se subclonó en el plásmido descrito por Pang *et al.* (1996) para generar p35S:HSP70::MRP1. Se aisló el ADN del plásmido mediante el conjunto QIAprep midi (Qiagen, Germany) y con él se recubrieron partículas de tungsteno (M10) de acuerdo con (Klein *et al.*, 1992).

Para la transformación pasajera, se esterilizó la superficie de semillas de maíz Hi-II y se germinaron en la oscuridad. Se cortaron de hojas etioladas (2 cm de ancho) en trozos de 1-2 cm de largo y se co-bombardearon con delección del promotor *ZmMEG1-1* y constructos de ZmMRP1 usando un dispositivo BioRad Biolistic PDS-1000/He. Se recubrieron partículas de oro con (0,6 nm, de BioRad, Reino Unido) con la mezcla de plásmido de ADN que incluía 2,5 g

de derivado del plásmido p35S:MRP1 y 2,5 g de delección del promotor *ZmMEG1-1*. Los tejidos se colocaron a 6 cm de la pantalla de detención del microtransportador el cual estaba ubicado 5 cm por debajo del disco de ruptura de 6,2 Mpa.

Después del bombardeo, las muestras se incubaron durante 24 h a 26°C en la oscuridad en medio sólido (Murashige y Skoog, 1962) que contenía 100 mg/l de mioinositol, 2 g/l de glutamina, 30 g/l de sacarosa y vitaminas de Murashige y Skoog (Sigma, UK).

Se llevaron adelante un mínimo de tres experimentos independientes para cada delección del promotor hecha.

La detección histoquímica de la expresión de GUS se llevó a cabo mediante tinción de los discos de hojas de acuerdo con (Jefferson, 1989), con modificaciones. Los trozos de hojas se tiñeron en un medio que contenía 0,5 mg/ml de Xglucuronido (Clontech, Palo Alto, CA), tampón de fosfato 0,5 mM de pH 7,0, tritón X-100 al 0,1% y metanol al 20% (v/v).

Se encontró que la eliminación de la porción más distal del promotor (región de -370 a -240) inhabilitaba la transactivación de *pZmMEG1 GUS* por *ZmMRP1*.

Para determinar si esta región mínima -370 a -250 del promotor (Figura 12) era suficiente para permitir la transactivación por *ZmMRP1*, ya fuera sólo o en combinación con otras regiones dentro del promotor *ZmMEG1-1* conservado, se llevaron a cabo delecciones en la orientación inversa.

A partir de este análisis, se consideró que la región mínima -370 a -250 del promotor en combinación con la región de la caja TATA putativa (-127 a 1) era suficiente para conferir transactivación al promotor *ZmMEG1-1* por *ZmMRP1*.

Considerados en conjunto, estos resultados demuestran con claridad que *ZmMRP1* activa la expresión de *ZmMEG1-1* mediante transactivación del dominio conservado de -370 a -250 que también está presente en promotores de muchos genes específicos de BETL.

Los mismos resultados se obtienen con la región de -345 a -251 (95 nucleótidos de longitud) que corresponde a los nucleótidos +26 a +120 de la SEC. ID N°: 4 y con el fragmento desde el nucleótido +29 a +119 de la SEC. ID N°: 4 (91 nucleótidos de longitud).

Ejemplo 8

Expresión en el área de BETL de los genes de interés

La SEC. ID N°: 1 y la SEC. ID N°: 62 tienen 90% de identidad y 6,7% de huecos después del alineamiento basado en la SEC. ID N°: 1. Esta diferencia corresponde a las delecciones, inserciones y reemplazos de bases que no afectan la funcionalidad de la secuencia de modo que se obtienen los mismos resultados con la SEC. ID N°: 1 y la SEC. ID N°: 62.

Un promotor de MEG1 de acuerdo con la invención es útil para expresar desde una etapa temprana del desarrollo de BETL proteínas o ARN que producen cambios deseables en el desarrollo o la calidad de la semilla. Dichas proteínas o ARN pueden, por ejemplo, aumentar el tamaño de la capa BETL y/o aumentar su capacidad para importar nutrientes a la semilla en desarrollo. Alternativamente dichas proteínas o ARN pueden mejorar la resistencia a los patógenos y de ese modo proteger mejor la semilla en desarrollo de la transferencia de patógenos desde los tejidos maternos originando semillas (y plantas de progenie) de mayor calidad y vigor.

Como un ejemplo de la primera utilidad el promotor de Meg1 (*ZmMEG1-1*) está unido a la invertasa *incW2* de la pared celular y como un ejemplo de la segunda utilidad el promotor de Meg1 (*ZmMEG1-1*) está unido a la proteína antifúngica *BAP2*.

8.1) *Sobreexpresión de IncW2 en la BETL*

IncW2 se expresa naturalmente en la BETL. Su importancia en la determinación del tamaño de semilla se demostró mediante el análisis de los mutantes de *IncW2* que presentaron un fenotipo de grano en miniatura (Cheng *et al* (1996) Plant Cell Jun; 8(6): 971-983)).

El promotor *Meg1-1* se fusiona a la región de codificación de *IncW2* y se clona en un vector binario para la transformación de maíz mediada por agrobacterias. El análisis de las plantas transformadas indica que algunas plantas sobreexpresan a *IncW2* y esta expresión es más temprana que la normal en el desarrollo de la semilla. Estas plantas poseen semillas que son más grandes que las semillas segregantes que carecen del transgén que tienen niveles normales de *IncW2*.

Los mismos resultados se obtienen con un constructo que comprende el promotor de MEG1 definido en la SEC. ID N°: 62.

8.2) Sobreexpresión de BAP2 en la BETL

BAP2 se expresa naturalmente en la BETL. Su importancia en la resistencia de la semilla en desarrollo al ataque de hongos fue insistentemente sugerida en estudios en los que la proteína aislada demostró una actividad antifúngica significativa *in vitro* (Serna *et al* (2001)).

El promotor Meg1-1 se fusiona a la región de codificación de BAP2 y se clona en un vector binario para la transformación de maíz mediada por agrobacterias. El análisis de las plantas transformadas indica que algunas plantas sobreexpresan a BAP2 y esta expresión es más temprana que la normal en el desarrollo de la semilla. Estas plantas poseen semillas que tienen una mejor resistencia a los patógenos en comparación con las semillas segregantes que carecen del transgén que tienen niveles normales de BAP2.

Los mismos resultados se obtienen con un constructo que comprende el promotor de MEG1 definido en la SEC. ID N°: 62.

Ejemplo 9

Uso del promotor de Meg1 para mejorar el valor de la cosecha

El promotor Meg1-1 es activo antes en la BETL si se hereda de la planta femenina en lugar de de la masculina. La sobreexpresión temprana de las proteínas en la capa BETL que produce un fenotipo del grano deseable puede en algunos casos interrumpir el desarrollo normal del grano de modo que la germinación del grano se reduce. Por ejemplo, la sobreexpresión temprana del transactivador MRP1 (Gómez *et al* (2002)) en la BETL da lugar a semillas con una capa BETL hipertrofiada. Puesto que la capa BETL es importante para el flujo de nutrientes al endospermo en desarrollo, esta hipertrofia da lugar a la producción de un endospermo más grande y a una semilla más grande. Sin embargo en herencias o cultivos esta hipertrofia produce un endospermo más grande a expensas del desarrollo del embrión. Por lo tanto, aunque la semilla resultante tenga una relación mayor entre el endospermo y el embrión, y por consiguiente un valor mayor, el transgén MPRP1 no es utilizable debido a la pobre germinación de la semilla.

La sobreexpresión de un promotor sellado, particularmente como ZmMEG 1-1, vence este problema.

Se transformaron plantas de maíz con un constructo que comprendía en la orientación sentido el promotor de MEG1 (definido en la SEC. ID N°: 62), el ADNc de ZmMRP1 y el terminador AtSac66 (Jenkins *et al.* 1999).

Plantas homocigotas pMEG1:MRP1 se usan como dadoras de polen en cruzamientos con plantas silvestres (la germinación pobre de estas plantas es aceptable en la etapa de multiplicación). Toda la progenie híbrida de este cruzamiento tendrá granos normales puesto que la expresión paterna tardía de MRP1 tiene poco efecto sobre el tamaño de BETL. La progenie híbrida de este cruzamiento tendrá 50% de granos con endospermo de mayor tamaño, suficiente para mejorar significativamente el valor de la cosecha (Figura 13).

Se obtienen los mismos resultados con un constructo que comprende el promotor de MEG1 definido en la SEC. ID N°: 1 (pMEG1-1).

Bibliografía

An *et al.* (1986), *Plant Physiology*, 81: 86-91

Anderson O.D. *et al.* (1989), *Theor Appl Genet*, 77: 689-700

Allison *et al.* (1986); the MDMV leader (Maize Dwarf Mozaic Virus), *Virology*, 154: 9-20

Berg, J.B., and Shi, Y. (1996). The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science* 271, 1081-1085.

Bevan *et al.* (1983), *Nature*, 304: 184-187

Bolchi, A., Petrucco, S., Tenca, P.L., Foroni, C. and Ottonello, S. (1999)

Coordinate modulation of maize sulfate permease and ATP sulfurylase mRNAs in response to variations in sulfur nutritional status: stereospecific down-regulation by L-cysteine. *Plant Mol. Biol.* 39 (3), 527-537.

Bonello, J.F., Opsahl-Ferstad, H.G., Perez, P., Dumas, C., and Rogowsky, P.M. (2000). Esr genes show different levels of expression in the same region of maize endosperm. *Gene* 246,219-227.

Callis *et al.* (1987), *Genes Dev.*, 1: 1183

Cassab, G.I., Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology, 49: 281-309 1998

- Cheng W.H., Taliencio E.W. and Chourey P.S. (1996).** The Miniature1 Seed Locus of Maize Encodes a Cell Wall Invertase Required for Normal Development of Endosperm and Maternal Cells in the Pedicel. *Plant Cell.*, 8(6): 971-983.
- 5 **Christensen et al. (1996),** *Transgenic. Res.*, 5: 213
- Chupeau, MC et al 1989.** *Biotechnology* vol.7: pp. 503-508
- 10 **Cordts, S., Bantín, J., Wittich, P.E., Kranz, E., Lorz, H., and Dresselhaus, T. (2001).** ZmES gene encode peptides with structural homology to defensins and are specifically expressed in the female gametophyte. *Plant Journal* 25, 103-114.
- 15 **Costa, L.M., Gutierrez-Marcos, J.F., Greenland, A.J., Brutnell, T.P., and Dickinson, H.G. (2003).** The glo1-1 (glo1-1) mutation disrupts nuclear and cell division in the developing maize seed causing aberrations in endosperm cell fate and tissue differentiation. *Development* (in press).
- Dekeyser et al. (1988),** *Plant Physiology*, 90: 217-223
- Della-Cioppa et al. (1987),** *Plant Physiology*, 84: 965-968
- 20 **de Oliveira, D.E., Seurinck, J., Inze, D., Van Montagu, M., and Botterman, J. (1990).** Differential expression of five Arabidopsis genes encoding glycine-rich proteins. *Plant Cell* 2,427-436.
- Depicker et al. (1992),** *Mol. Gen. Genet.*, 235(2-3): 389-396
- 25 **Depigny-This et al. (1992),** *Plant Molecular Biology*, 20: 467-479
- Domingo, C, Sauri, A., Mansilla, E., Conejero, V., and Vera, P. (1999).** Identification of a novel peptide motif that mediates cross-linking of proteins to cell walls. *Plant J* 20, 563-570.
- 30 **Eichholtz et al. (1987),** *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 13: 67-76
- Elroy-Stein, O., Fuerest, T.R., and Moss B. (1989),** *PNAS USA*, 86: 6126-6130
- 35 **Finer J. (1992)** *Plant Cell Report* 11: 323-328.
- Franck et al. (1980),** *Cell*, 21(1): 285-94
- Gallie, D.R. et al. (1989),** *Molecular Biology of RNA*, pages 237-256
- 40 **Gleave A.P (1992).** *Plant Mol. Biol.* 20: 1203-1207
- Gomez et al. (2002),** “Establishment of Cereal Endosperm Expression Domains: Identification and properties of a Maize transfer cell-specific transcriptional factor, ZmMRP-1”. *Plant Cell*, 14, 599-610
- 45 **Gritz et al. (1983),** *Gene*, 25: 179-188
- Guerche et al. (1987),** *Mol. Gen. Genet.*, 206: 382
- 50 **Gutierrez-Marcos, J.F., Pennington, P.D., Costa, L.M., and Dickinson, H.G. (2003).** Imprinting in the endosperm: a possible role in preventing wide hybridization. *Phil. Trans. R. Soc. London B.* (in press).
- Hagiwara, Y., Hirai, M., Nishiyama, K., Kanazawa, I., Ueda, T., Sakaki, Y., and Ito, T. (1997).** Screening for imprinted genes by allelic message display: identification of a paternally expressed gene impact on mouse chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9249-9254.
- 55 **Hauptmann et al. (1988),** *Plant Physiology*, 86: 602-606
- Hueros, G., Varotto, S., Salamini, F., and Thompson, R.D. (1995).** Molecular characterization of BET1, a gene expressed in the endosperm transfer cells of maize. *Plant Cell* 7, 747-757.
- 60 **Hueros, G., Royo, J., Maitz, M., Salamini, F., and Thompson, R.D. (1999a).** Evidence for factors regulating transfer cell-specific expression in maize endosperm. *Plant Mol Biol* 41, 403-414.
- 65 **Hueros, G., Gomez, E., Cheikh, N., Edwards, J., Weldon, M., Salamini, F., and Thompson, R.D. (1999b).** Identification of a promoter sequence from the BETL1 gene cluster able to confer transfer-cell-specific expression in transgenic maize. *Plant Physiol* 121, 1143-1152.

Ishida et al., (1996), *Nature biotechnology*, 14, 745-750

Jackson, D. (1991). *In situ* hybridisation in plants. In *Molecular plant biology: a practical approach*, D.J. Bowles, S.J. Gurr, and M. McPherson, eds (Oxford: Oxford University Press), pp. 163-174.

Jang et al., (1997) *Plant Cell*, 9, 5-19

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W. (1987). GUS fusions: betaglucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6, 3901-3907.

Jefferson, R.A. (1989). The GUS reporter gene system. *Nature* 342, 837-838.

Jenkins et al., (1999). Dehiscence-related expression of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding a polygalactonase in transgenic plants of *Brassica napus*. *Plant Cell and Environment* 22, 159-167.

Jobling, S.A., and Gehrke, L. (1987), *Nature*, 325: 622-625

Jones, J.D., Shlumukov, L., Carland, F., English, J., Scofield, S.R., Bishop, G.J., and Harrison, K. (1992). Effective vectors for transformation, expresstion of heterologous genes, and assaying transposon excision in transgenic plants. *Transgenic Res* 1, 285-297.

Jouanin et al. (1987), *Plant Science*, 53: 53-63

Kay et al. (1987), *Science*, 236: 1299-1302

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lobreaux S. Massenet O. and J. F. Briat (1992). Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets. *Plant Molecular Biology* 19: 563-575.

Lommel, S.A. et al. (1991), *Virology*, 81: 382-385

Maas et al. (1991), *Plant Molecular Biology*, 16: 199

Macejack, D.G., and P. Sarnow (1991), *Nature*, 353: 90-94

Mary E. Knight et al. (1998), Molecular cloning of starch synthase I from maize (W64) endosperm and expression in *Escherichia coli*. *The Plant Journal* 14(5), 613-622.

McElroy et al. (1990), *Plant Cell*, 2: 163-171

Meijer et al. (1991), *Plant Molecular Biology*, 16: 807-820

Ming Gao et al. (1997), Independent genetic control of maize starch-branching enzymes IIa and IIb, *Plant Physiol* 114: 69-78.

Morris et al. (1992), *Virology*, 187: 633

Mullis, KB (1987), *Methods in Enzymology* 155: 335

Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15, 473.

Neff, M.M., Neff, J.D., Chory, J., and Pepper, A.E. (1998). dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *Plant J* 14, 387-392.

Ohta et al. (1990), *Plant Cell Physiology*, 31: 805

O'Sullivan, D.M., Ripoli, P.J., Rodgers, M., and Edwards, K.J. (2001). A maize bacterial artificial chromosome (BAC) library from the European flint inbred line F2. *TAG* 103, 425-432.

Pang, S.Z., DeBoer, D.L., Wan, Y., Ye, G., Layton, J.G., Neher, M.K., Armstrong, C.L., Fry, J.E., Hinchee, M.A., and Fromm, M.E. (1996). An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants. *Plant Physiol* 112, 25 893-900.

Poole et al., (1985), *Cell*, 40: 37-43

Roberts et al. (1989), *Plant cell*, 1: 569-578

Rogowsky, P.M. (2003). Analysis of ZmAE3 upstream sequences in maize endosperm and androgenic embryos. *Sex. Plant Reprod.* 16, 1-8.

Sambrook et al. (1989), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press p. 9.54-9.62

Serna et al. (2001) Maize endosperm secretes a novel antifungal protein into adjacent maternal tissue *Plant Journal* 25,687-698.

Sevilla-Lecoq, S., Deguerry, F., Matthysrochon, E., Perez, P., Dumas, C, and Snowdon et al. (1996), *Plant Molecular Biology*, 31: 689

Taliercio EW, Kim J-Y, Mahe A., Shanker S., Choi J., Cheng W-H, Prioul J-L and P, S. Chourey, (1999). Isolation, Characterization and Expression Analyses of two Cell Wall Invertase In maize. *J. Plant Physiol.* Vol. 155 pp. 197-204.

Thomas W. Greene and L. Curtis Hannah (1998), Maize endosperm ADP-Glucose Pyrophosphorylase SHRUNKEN2 and BRITTLE2 subunit interactions. *The Plant Cell*, Vol. 1295-1306.

Vancanneyt et al. (1990), *Molecular and General Genetics*, 220: 245-250

von **Heijne, G.** (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage site. *Nucleic Acids Res* 14, 4683-4690.

Watson et al. (1994) Ed. De Boeck Université, pp 273-292.

White, J., Chang S-YP, Bibb, MJ. and Bibb, MJ. (1990) *Nucl. Acid. Res.* 18, 1062.

Yoder et al., (1993) *Biotechnology*, 12, 263-292.

Zhang et al. (1995). Isolation and Characterization of an ipt gene from the Ti plasmid Bo542. *Planta*, 196: 84-94.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que tiene actividad promotora específica para el endospermo y que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en:

- a) una secuencia como la descrita en cualquiera de las SEC. ID N°: 1 a 3 o la SEC. ID N°: 62;
- b) una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia como la definida en (a), donde dicha secuencia tiene actividad promotora específica para el endospermo;
- c) una secuencia que comprende la SEC. ID N° 57 que está conservada en las SEC. ID N°: 1 a 3 o la SEC. ID N°: 62.

2. La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha secuencia comprende un fragmento que contiene la SEC. ID N°: 4, la SEC. ID N°: 59, los nucleótidos 26-120 de la SEC. ID N°: 4 o los nucleótidos 29-119 de la SEC. ID N°: 4.

3. La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, que fue aislada de una planta seleccionada del grupo que consiste en maíz, teosintes, arroz, sorgo, trigo, cebada, centeno, guisante y caña de azúcar.

4. Un casete de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que tiene actividad promotora específica para el endospermo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, unido operativamente a al menos un gen de interés.

5. El casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 4, donde dicho gen de interés se selecciona del grupo que consiste en una secuencia que codifica un péptido o una proteína, una secuencia de ARN complementario, una secuencia de ARN mensajero y un ribosoma.

6. El casete de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, en el cual el gen de interés codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en una proteína que interviene en el desarrollo del embrión y/o del endospermo, en la determinación del tamaño y/o la calidad de la semilla, en la multiplicación de células, o en el metabolismo de azúcares o ácidos grasos, en la transferencia de nutrientes, de una proteína tóxica, una proteína que inhibe la transcripción y una proteína que mejora la resistencia a los patógenos.

7. El casete de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que comprende además un gen marcador de selección para plantas.

8. El casete de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, que comprende además un gen que codifica una proteína MRP1.

9. Un vector de expresión que contiene al menos un casete de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8.

10. Una célula huésped que contiene al menos un vector de acuerdo con la reivindicación 9.

11. Una planta transgénica, o una parte de una planta transgénica que comprende una célula de acuerdo con la reivindicación 10.

12. La planta o parte de una planta de acuerdo con la reivindicación 11, donde dicha planta o parte de la planta es un cereal o una planta oleaginosa.

13. La planta o parte de una planta de acuerdo con la reivindicación 12, que es del grupo que consiste en maíz, arroz, trigo, cebada, colza y girasol.

14. Una planta transgénica híbrida obtenida por cruzamiento de plantas según se definió en cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12.

15. Un método para obtener una planta que tenga cualidades agronómicas mejoradas y/o mejor resistencia a los patógenos, que comprende los pasos que consisten en:

- a) transformar al menos una célula de la planta mediante al menos un vector de acuerdo con la reivindicación 9;
- b) cultivar la(s) célula(s) así transformada(s) para generar una planta que contenga en su genoma al menos un casete de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, mediante lo cual se obtiene una planta que tiene cualidades agronómicas mejoradas y/o mejor resistencia a los patógenos.

16. El uso de al menos un casete de expresión como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, para obtener una planta transgénica que tenga cualidades agronómicas mejoradas y/o mejor resistencia los patógenos.

17. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína de la capa de células de transferencia del endospermo basal (BETL) de una planta, que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

a) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos como la descrita en cualquiera de las SEC. ID N°: 6, 8, 10, 53, 12, 14 y 16;

b) una secuencia de nucleótidos como la que se describe en cualquiera de las SEC. ID N°: 5, 7, 9, 11, 13, 15 y 58;

18. La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 17, que fue aislada de una planta seleccionada del grupo que consiste en maíz, teosintes, arroz, trigo, cebada, centeno, guisante, sorgo y caña de azúcar.

19. Un casete de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 18 unido operativamente a elementos reguladores que permiten la expresión en células huésped procariotas y/o eucariotas.

20. El casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 19 que comprende además un gen marcador de selección para plantas.

21. Un vector de expresión que contiene al menos un casete de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 20.

22. Una célula huésped que contiene al menos un vector de acuerdo con la reivindicación 21.

23. Una planta transgénica, o una parte de una planta transgénica, que comprende integrada establemente en su genoma una molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 18, unida operativamente a elementos reguladores que permiten la transcripción y/o la expresión de la molécula de ácido nucleico en las células de la planta.

24. La planta o parte de una planta de acuerdo con la reivindicación 23, donde dicha planta o parte de la planta es un cereal o una planta oleaginosa.

25. La planta o parte de una planta de acuerdo con la reivindicación 24, donde dicha planta se selecciona del grupo que consiste en maíz, arroz, trigo, cebada, colza y girasol.

26. Una proteína de la capa de células de transferencia del endospermo basal (BETL) de una planta codificada por una molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 18.

27. Una proteína de la capa de células de transferencia del endospermo basal (BETL) de una planta que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC. ID N°: 54.

28. Un método para mejorar la resistencia a los patógenos de la planta, que comprende los pasos que consisten en:

a) transformar al menos una célula de la planta mediante al menos un vector de acuerdo con la reivindicación 21;

b) cultivar la(s) célula(s) así transformada(s) para generar una planta que contenga en su genoma al menos un casete de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 20, mediante lo cual se obtiene una planta con mejor resistencia a los patógenos.

29. Un método para mejorar la calidad agronómica de una planta, que comprende los pasos que consisten en:

a) transformar al menos una célula de la planta mediante al menos un vector de acuerdo con la reivindicación 21;

b) cultivar la(s) célula(s) así transformada(s) para generar una planta que contenga en su genoma al menos un casete de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 20, mediante lo cual se obtiene una planta con mejor calidad agronómica.

30. Un método de la reivindicación 29, donde dicha planta tiene una semilla de mayor tamaño.

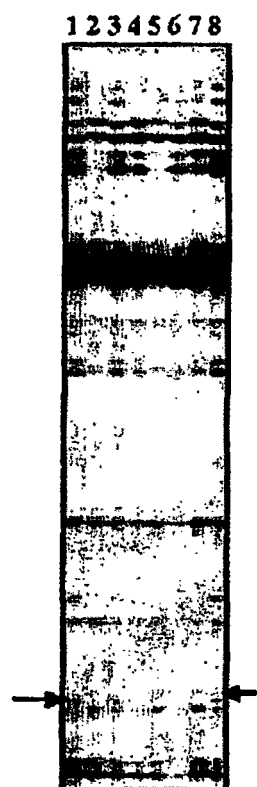


FIG.1

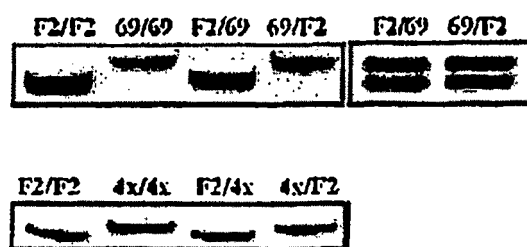


FIG.2

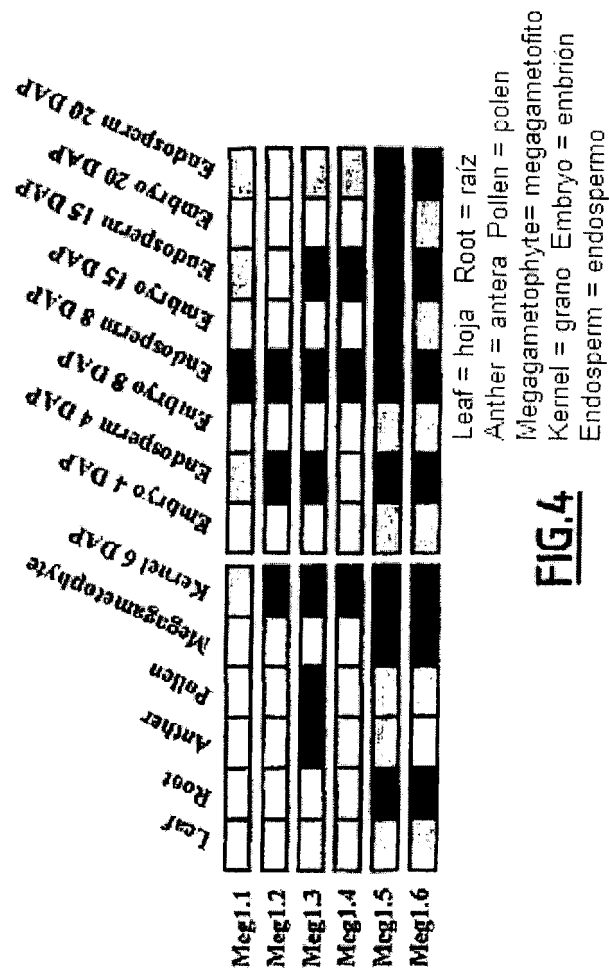
```

Meg1.3  -----ALUFTSLL-----
Meg1.2  -----ALUFTSLL-----
Meg1.4  -----ALUFTSLL-----
Meg1.6  -----DUSUSTP-----
Meg1.1  -----ALUFTSLL-----
Meg1.5  HGYCGRPEPLPPDABSTLYIEGLPANCYHUSHIRP FUCFBEURLVMKESRNP GGDPEHVLCTUO JDNW

```

[illegible]

FIG. 3



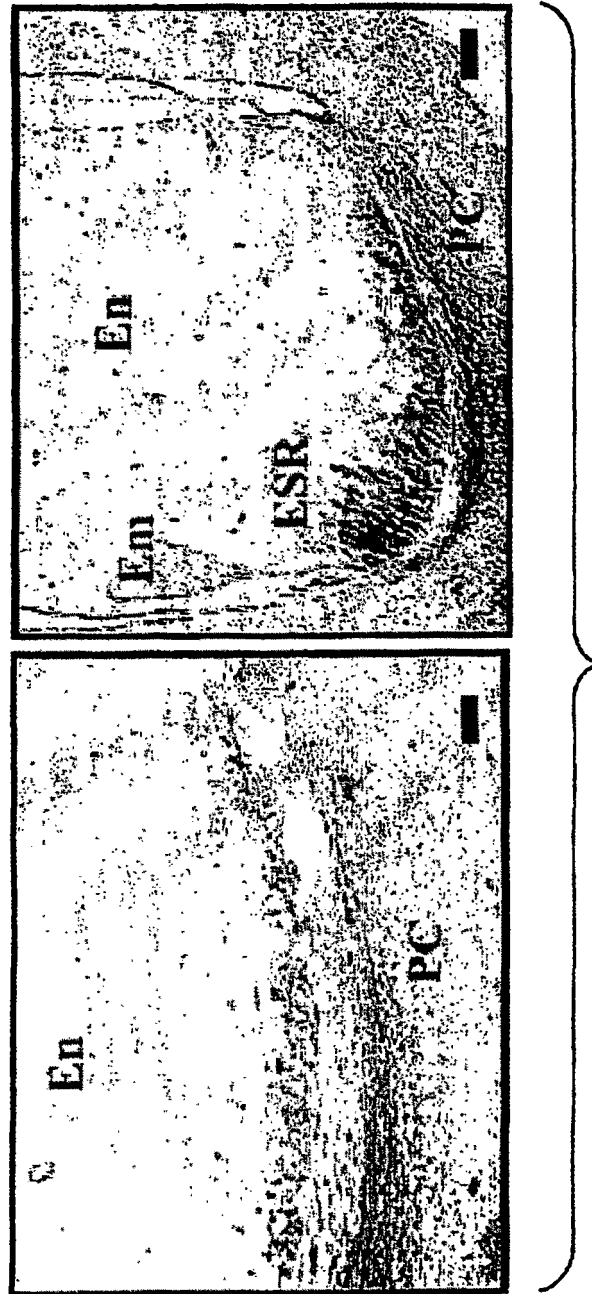


FIG. 5



FIG.6

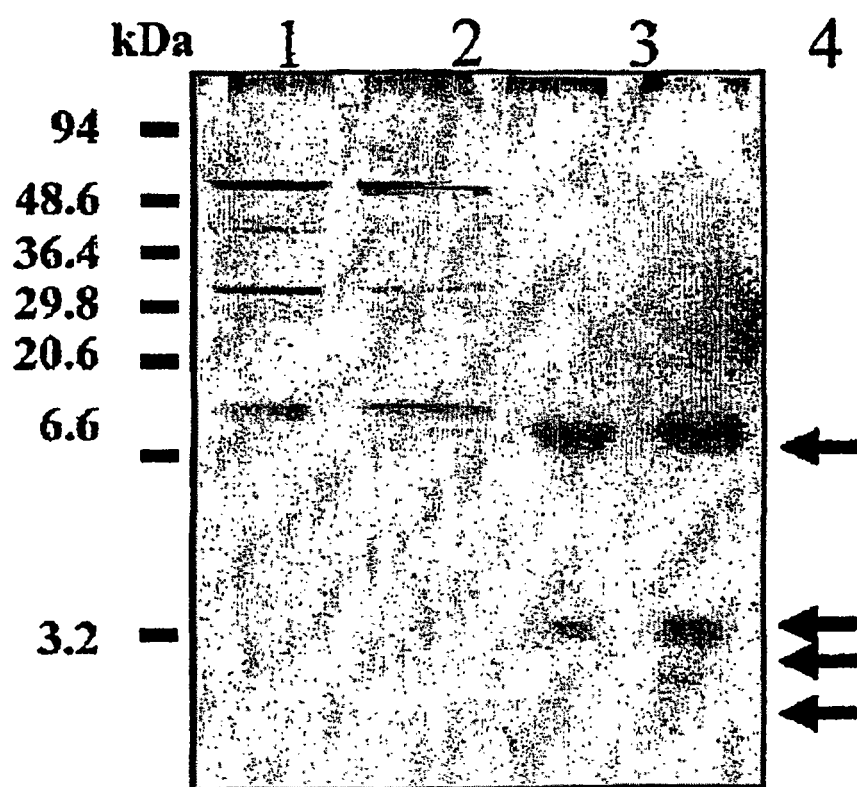


FIG.7



ZmBAP21a pep

ZmBAP21b pep

ZmBAP2 pep

ZmBAP2-6 pep

ZmBAP2-8 pep

ZmMeg1-1 pep

ZmMeg1-2 pep

Consensus

1

50

(1)

MAKFFNYTIIQGLLMLSMVLAASCAHAIISGETEHSVENTGSPTVMVTM

(1)

-----MLSMVLLASCVIHAHIIISGEIEDVENTRS?---TMM

(1)

--NAKCSSFQGLFWLMLSMVLAASCAHAIISGETEHSVENTGSPTVMVTM

(1)

MAKFFNYTIVQGLLMLSMVLAASCAHAIISGETEHSVENTGSPTVMVTM

(1)

MARCLKSCSVEGLMLSMVLAASCAHAIISGETEHSVENTGSPTVMVTM

(1)

----MEYKRVVLAIFSLMLLGYFAAHNGHVT--DDNVVSAEAEGLI

(1)

----MEYKRVVLAIFSLMLLGYFAAHNGHVT--DDNVVSAEAEGLI

(1)

V GLMLSMVLLASCVIHAHIIIS T D SN SPT TM

51

97

(51)

GANKRIEDNKNLICYLKA--LEYCCARTQCYDDIKKOLEHCRG--

(34)

GANKRIEDNKNLICYLKA--LEYCCERTKQCMDDIKKOLEHCRG--

(49)

A SGNLIVSRNDDGPCYLDGLNEVCRAKNCCKSLVLTVAASQPSS

(51)

GANKRIEDNKNLICYLKA--LEYCCERTKQCMDDIKKOLEHCRG--

(47)

GEASMIIGDEKDAICYLKA--ALYCCKRNIQCYQDIACCLRRQRKNV

(47)

REKRAQCAQGFPCCKDNKC--YCCIGGRHDCYTNACQSSHACF---

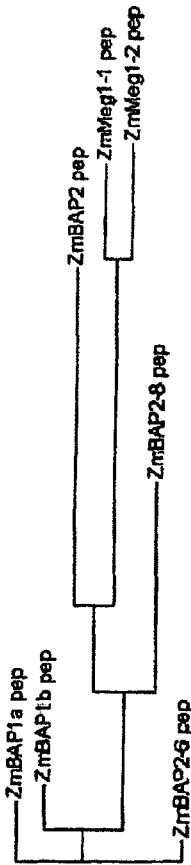
(47)

QGMGARCVVGEPPCKDNKC--YCCIGGRHDCYTNACQSSHACF---

(51)

GANKRIEDNKNLICYLKA EYCC RT QCY DI CL C

FIG.9



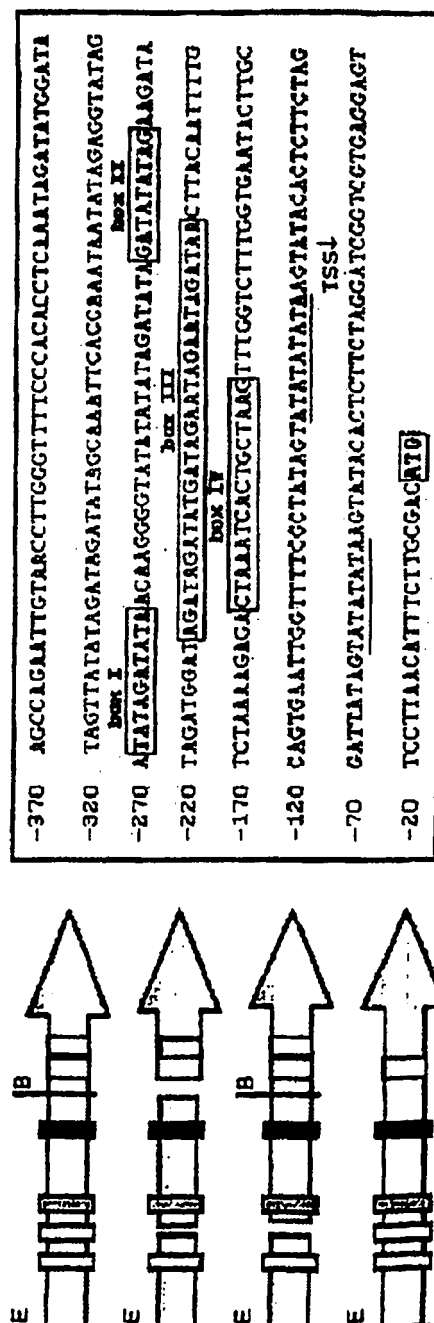


FIG. 10

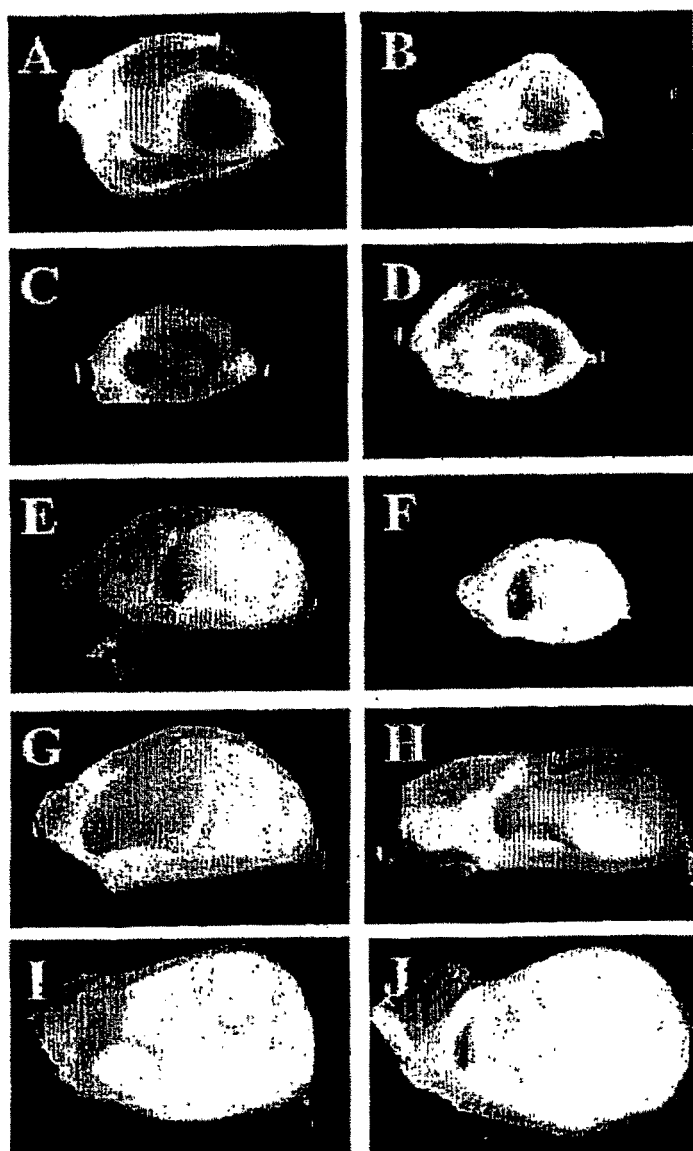


FIG.11

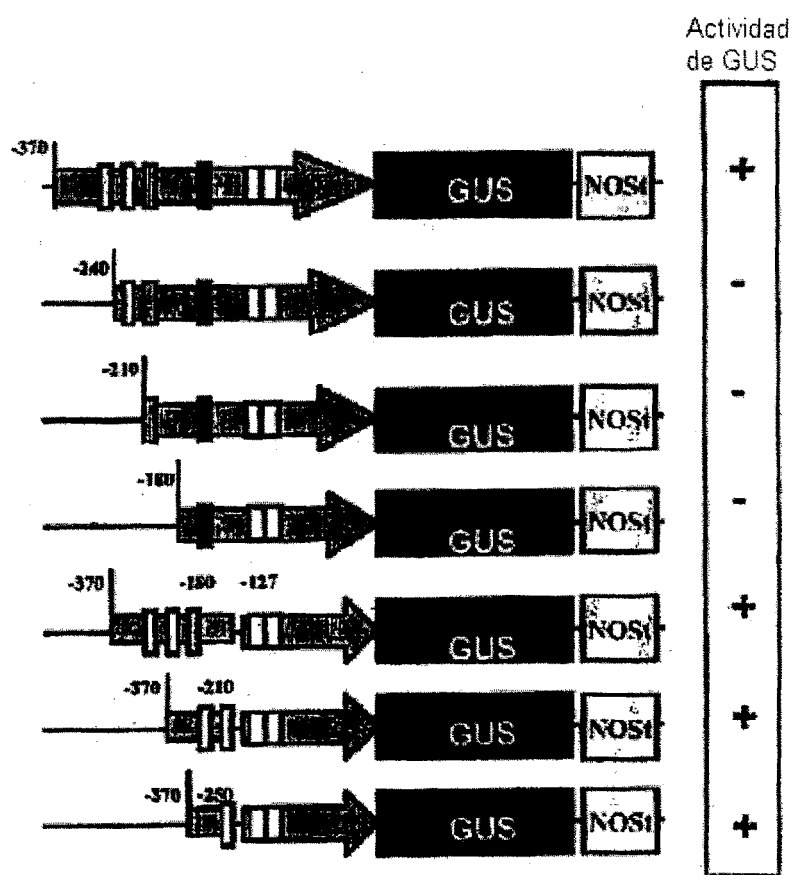


FIG.12

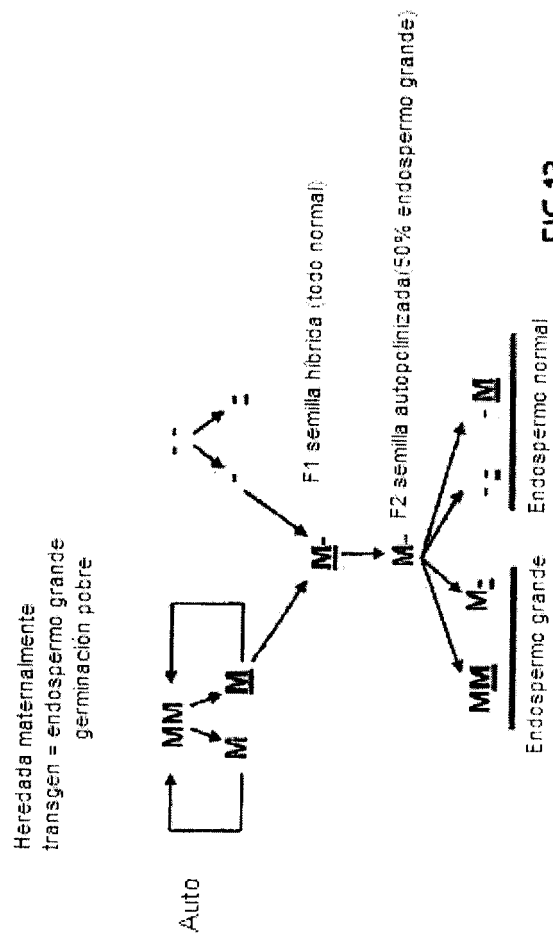


FIG.13

ES 2 328 578 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Biogemma
5 <120> Promotores y genes de MEG1 específicos del endospermo
<130> BGM 27 - WO
<150> EP 03292739.4
<151> 2003-11-03
10 <160> 64

<170> PatentIn versión 3.2
15 <210> 1
<211> 370
<212> ADN
20 <213> *Zea mays*

<220>
<221> característica_misc
25 <223> promotor Meg1-1

<400> 1

30 agccagaatt gtaaccttgg gttttccac acctcaaata gatatggata tagttatata 60
gatagatata gcaaattcac caaataatat agaggtatag atatagatat aacaaggggt 120
35 atatatatag atatagatat atagaagata tagatggata gatagatatg atagaataga 180
atagataact tacaattttg tctaaaagag actaaatcac tgctaagttt ggtctttggt 240
gaatacttgc cagtgaattg gttttcgcta tagtatatat ataagtatac actcttctag 300
40 gattatagta tatataagta tacactcttc taggatcggt cgtgaggagt tccttaacat 360
ttctttgcgac 370

45 <210> 2
<211> 415
<212> ADN
50 <213> *Zea mays*

<220>
<221> característica_misc
55 <223> promotor Meg1-2

60

65

ES 2 328 578 T3

<400> 2

	atgagctctc gacacaggta ggtagtagta gagccagaat tgtaaccttg ggttttccca	60
5	cacctcaaat agatatagat atagggatat agatagatat agcaaattca ccaaataata	120
	taggggtata gatatagata taagaagggg tatagatata gatatagata tatagaagat	180
	atagatagat agatagatat gatagaatag ataacttaca attttgtcta aaagaaacta	240
10	aatcactgct aagtttggag tagcatatct ttggtgaata cttgctagtg aattggtttc	300
	cgctatagta tatatatata agtatacact cttctaggat tatagtatat atatatatat	360
15	aagtatacac tcttctagga tcaatcgtga ggagttcatt aaattgtctt gcgac	415

<210> 3

<211> 376

20 <212> ADN

<213> *Zea mays*

<220>

25 <221> característica_misc

<223> promotor Meg1-3

<400> 3

	tcgaggtcga cggatcgcg aagcctcaaa tagatataga tatagggata tagatagata	60
	tagcaaattc accaaataat ataggggtat agatatagat ataagaaggg gtatagatat	120
35	agatatagat atatagaaga tatagataga tagatagata tgatagaata gataacttac	180
	aattttgtct aaaagaaact aaatcactgc taagtttggg gtagcatatc ttggtgaat	240
	acttgctagt gaattggttt ccgctatagt atatatatat aagtatacac tcttctagga	300
40	ttatagtata tatatatata taagtataca ctcttctagg atcaatcgtg aggagttcat	360
	aaaattgtct tgcgac	376

45 <210> 4

<211> 121

<212> ADN

<213> *Zea mays*

50

<220>

<221> característica_misc

55 <223> nucleótidos 1 a 121 del promotor Meg1-1

<400> 4

	agccagaatt gtaaccttgg gttttccac acctcaaata gatattggata tagttatata	60
60	gatagatata gcaaattcac caaataatat agaggtatag atatagatat aacaaggggt	120
	a	121

65 <210> 5

<211> 414

<212> ADN

ES 2 328 578 T3

<213> *Zea mays*

<220>

5 <221> característica_misc

<223> MEG1-1 ADNc

<400> 5

10 cgtgaggagt tccttaacat ttcttgcgac atggagtaca aaaagagggt ggatgcgcta 60

gtgtttttct ctttacttct cctaggatac tttgctgctc atgcgcatgg ggctgaagaa 120

15 ggaattttgc gagaaaaaag agcacaatgc gctcaagggt ttcttccatg caaagataac 180

aagtgcact gttgcattgg gggccgaact catgattgct actatacgat ggctcagtgt 240

20 agtcatgcat gcttctaatac aaaaattaag atcactgttt ttatatacaa tgtaatggta 300

ggcaatgcta ttaataatac ataagggaat tttagttttg gtattagaat ttttctgatt 360

gacgaaattt agtcagaccg atactagagg cttaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 414

25 <210> 6

<211> 75

<212> PRT (tiempo de repetición de pulsos, por sus siglas en inglés)

30 <213> *Zea mays*

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

35 <223> MEG1-1

<400> 6

40 Met Glu Tyr Lys Lys Arg Val Asp Ala Leu Val Phe Phe Ser Leu Leu

1 5 10 15

Leu Leu Gly Tyr Phe Ala Ala His Ala His Gly Ala Glu Glu Gly Ile

20 25 30

Leu Arg Glu Lys Arg Ala Gln Cys Ala Gln Gly Phe Leu Pro Cys Lys

35 40 45

50 Asp Asn Lys Cys Tyr Cys Cys Ile Gly Gly Arg Thr His Asp Cys Tyr

50 55 60

55 Tyr Thr Met Ala Gln Cys Ser His Ala Cys Phe

65 70 75

60 <210> 7

<211> 383

<212> ADN

<213> *Zea mays*

65 <220>

<221> característica_misc

ES 2 328 578 T3

<223> Meg1-2 ADNc

<400> 7

```

5      tcggcacgag gctacatgga gtacagaaag aggggtggatg cgctagtgtt tttctcgtaa      60
      cttctcctcg gatactttgc tgctcatgca catgggaagg gtcatgtcac agatgatgtc      120
10     ggtgttttcta ctccagctaa agaaggaatt atgcaaggaa acggagcacg atgcgttgta      180
      ggggtttcctc catgcaaaga taacaagtgc tactgctgca ttggggggcg aactcatgct      240
      cgctactcta cgatggctga gtgtagacat gcctgcttct aaacacaaat taagatcgct      300
15     gttattatat acattgtaat ggtaggtaat gctattaata atatatggga atttttagttt      360
      tggtaaaaaa aaaaaaaaaa aaa                                     383

```

20 <210> 8

<211> 88

<212> PRT

25 <213> *Zea mays*

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

30 <223> MEG1-2

<400> 8

```

35      Met Glu Tyr Arg Lys Arg Val Asp Ala Leu Val Phe Phe Ser Leu Leu
      1          5          10          15

      Leu Leu Gly Tyr Phe Ala Ala His Ala His Gly Lys Gly His Val Thr
40      20          25          30

      Asp Asp Val Gly Val Ser Thr Pro Ala Lys Glu Gly Ile Met Gln Gly
45      35          40          45

      Asn Gly Ala Arg Cys Val Val Gly Phe Pro Pro Cys Lys Asp Asn Lys
50      50          55          60

      Cys Tyr Cys Cys Ile Gly Gly Arg Thr His Ala Arg Tyr Ser Thr Met
55      65          70          75          80

      Ala Glu Cys Arg His Ala Cys Phe
85

```

<210> 9

60 <211> 786

<212> ADN

<213> *Zea mays*

65 <220>

<221> característica_misc

<223> MEG1-3 ADNc

ES 2 328 578 T3

<400> 9

```

5      ggacagagga ggagttcctt aaattttctt ggcacatgga gtacagaaag aggggtggatg      60
      cgctagtgtt tttctcgta ctctctctca gatactttgc tgctcatgca catgggaagg      120
      gtaagtgcta ctgctgcatt gggggcgatg tagggtttcc tccatgcaaa gataacaagt      180
10     gctactgctg cattgggggg cgaactcatg ctcgctactc tacgctggct gagtgtagtc      240
      atgcctgctt ctaaacaaaa attaagatca ctgttattat atacattgta atggtaggta      300
      atgctattaa taatatatgg gaattttagt tttggtatta tacttttttc caattcacga      360
15     aataccttct aaaacctggc gtgacaggtg gcatagcagg agtggagggc agcgacggct      420
      gcacagcgct gcatgcagtg gcttgcattt gtagctcttc gttggcgatg cgtgtgcgac      480
20     caagagctct cggcacagac aggtcatgtc acagatgatg tcggagtttc tactocagct      540
      aaagaaggaa ttatgcaagg aaacggagca cgatgcgatg tagggtttcc tccatgcaaa      600
      gataacaagt gctactgctg cattgggggg cgaactcatg ctcgctactc tacgctggct      660
25     gagtgtagtc atgcctgctt ctaaacaaaa attaagatca ctggtattat atacattgta      720
      atgggtaggt aatgctatta ataatatatg ggaatttaag ttttggattt aaaaaaaaaa      780
30     aaaaaa                                     786

```

<210> 10

35 <211> 72

<212> PRT (tiempo de repetición de pulso(s), por sus siglas en inglés)

<213> *Zea mays*

40 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<223> MEG1-3, primer marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés)

45 <400> 10

```

50     Met Glu Tyr Arg Lys Arg Val Asp Ala Leu Val Phe Phe Ser Leu Leu
      1          5          10          15

      Leu Leu Arg Tyr Phe Ala Ala His Ala His Gly Lys Gly Lys Cys Tyr
      20          25          30

55     Cys Cys Ile Gly Gly Asp Val Gly Phe Pro Pro Cys Lys Asp Asn Lys
      35          40          45

60     Cys Tyr Cys Cys Ile Gly Gly Arg Thr His Ala Arg Tyr Ser Thr Leu
      50          55          60

65     Ala Glu Cys Ser His Ala Cys Phe
      65          70

```

ES 2 328 578 T3

<210> 11

<211> 667

<212> ADN

5 <213> *Zea mays*

<220>

<221> característica_misc

10 <223> MEG1-4 ADNc

<400> 11

15	aagaccacca cccttgccga atccggcacc catgccatgc ccacttccac cgccaaggcc	60
	atcgccgcgcg ccaagaccac cacccttgcc gaatccggca cccatgccat gtccacttcc	120
20	accaccaagg ccccgccgcg caccagcacc gtagccacta ccgcccga gaccaccacc	180
	gcctttgccc aatccaccac ccatgccatg cccaattcca ccacctttgc catggcctcc	240
	acccatgccca tggccaatgt cgcctccgag tccgccacct ttgccatata caccaccaag	300
25	gccaccgcct tttcttaaat tgtcttgcca catggagtac agaaagaggg tggatgcgct	360
	agtgtttttc tcgttacttc tcctcgata ctttgctgct catgcacatg gaaaggctaa	420
30	agaaggaatt atgcaaggaa acggagcacg atgcgttggt gggtttcctc catgcaaaga	480
	taacaagtgc tactgttgca ttggggggcg aactcatgct cgctactcta cgatggctga	540
35	gtgtagtcat gcctgcttct aaacaaaaat taagatcgat gttattatat aaattgtaat	600
	ggtaggtaat gctattaata atatatggga attttagttt tggtaattaa aaaaaaaaaa	660
40	aaaaaaa	667

<210> 12

<211> 76

45 <212> PRT

<213> *Zea mays*

<220>

50 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<223> MEG1-4

55

60

65

ES 2 328 578 T3

<400> 12

```

5      Met Glu Tyr Arg Lys Arg Val Asp Ala Leu Val Phe Phe Ser Leu Leu
      1          5          10          15

10     Leu Leu Gly Tyr Phe Ala Ala His Ala His Gly Lys Ala Lys Glu Gly
      20          25          30

15     Ile Met Gln Gly Asn Gly Ala Arg Cys Val Val Gly Phe Pro Pro Cys
      35          40          45

20     Lys Asp Asn Lys Cys Tyr Cys Cys Ile Gly Gly Arg Thr His Ala Arg
      50          55          60
      Tyr Ser Thr Met Ala Glu Cys Ser His Ala Cys Phe
      65          70          75

```

<210> 13

25 <211> 621

<212> ADN

<213> *Zea mays*

30 <220>

<221> característica_misc

<223> MEG1-5 ADNc

35 <400> 13

```

      tgcagggatg gctggctatg gtgttgatgg tcagcgtatg atgggtggtg ttggtatgga      60
40     cagcagaggg atgggatatg gtggcagacc tgagccacct cttccgcctg atgcatcaag      120
      cactctatat attgagggct tacctgcaaa ctgcacacga cgggagggtt cacatatatt      180
45     tcgcccattt gttggttttc gtgaagttcg tcttgtcaac aaggagtcca gacatcctgg      240
      tggagatcca catgtgttgt gtttcgtcga ttttgacaac cctgctcagg ctacaattgc      300
      tctggaagca ttacaaggtc atgtcacgga tgatgtcaat gtttctgctc cagctgaaga      360
50     aggaattttg cgagaaaaaa gagcacaatg cgctcaaggg tttcttccat gcaaagataa      420
      caagtgttac tgttgcattg ggggccgaac tcatgattgc tactatacga tggctcagtg      480
55     tagtcatgca tgcttctaata caaaaattaa gatcactgtt tttatataca atgtaatggt      540
      aggcaatgct attaataata cataaggga tttatatttg gtattagaat ttttctgatt      600
60     gacgaaaaaa aaaaaaaaaa a      621

```

<210> 14

65 <211> 142

<212> PRT

<213> *Zea mays*

ES 2 328 578 T3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<223> MEG1-5

5

<400> 14

10 Met Gly Tyr Gly Gly Arg Pro Glu Pro Pro Leu Pro Pro Asp Ala Ser
1 5 10 15

15 Ser Thr Leu Tyr Ile Glu Gly Leu Pro Ala Asn Cys Thr Arg Arg Glu
20 25 30

20 Val Ser His Ile Phe Arg Pro Phe Val Gly Phe Arg Glu Val Arg Leu
35 40 45

Val Asn Lys Glu Ser Arg His Pro Gly Gly Asp Pro His Val Leu Cys
50 55 60

25 Phe Val Asp Phe Asp Asn Pro Ala Gln Ala Thr Ile Ala Leu Glu Ala
65 70 75 80

30 Leu Gln Gly His Val Thr Asp Asp Val Asn Val Ser Ala Pro Ala Glu
85 90 95

35 Glu Gly Ile Leu Arg Glu Lys Arg Ala Gln Cys Ala Gln Gly Phe Leu
100 105 110

Pro Cys Lys Asp Asn Lys Cys Tyr Cys Cys Ile Gly Gly Arg Thr His
115 120 125

40 Asp Cys Tyr Tyr Thr Met Ala Gln Cys Ser His Ala Cys Phe
130 135 140

45

<210> 15

<211> 974

<212> ADN

50

<213> *Zea mays*

<220>

<221> característica_misc

55

<223> MEG1-6 ADNc

60

65

ES 2 328 578 T3

<400> 15

```

    tgcggaccca tgcgttgtg caacgcgtgc gggatccgta ccggaagaag agacgggagc      60
5   catgggcctc gagtccagca gcaaggccgc caccgccggc ggcagcgagc accagcagca      120
    gcagcgggaag aagaaggcca cccgcgcgcg cggccgcttc ctccaagcgg gagagggaga      180
10  gggagcggga gcgggagcgg aacaaggagg cggacgaggt caccgtggag ctccgcgcgg      240
    tgggggttcgg caaggaggtg gtgctgaagc agcggcggcg gatgcggcgg aggcgcgcgc      300
    tgggcgagga ggagcgcgcg gccatcctgc tcatggcgct ctctccggc gtcgtgtacg      360
15  cctgacttgg ctagcaaccg cgccggcccc cgagacgcgc cgccaaagg cggcgaaagg      420
    agaggagggc ccgattcgct ggacgtgcgg catgatctga gcccagaca gatccgtccg      480
20  tctggatcta tgctaagttt tcccgctaa gtagtagctc gtcggttcga acaaggcgag      540
    ttaataatcc gtgtccgcgc taggctagca gctctgttcc tctctcccc tccgttgc      600
    tgctgtgttc ttgccaccgc ctctctagt tgtaatcctg ccgctagtag tgtgctagta      660
25  gtagctgtcc tgctgtaacc ttctcttgca atgtaaggag agattatatg gttaaaaaca      720
    cagatgatgt cagtgtttct actccagcta aagaaggaaat tatgcaagga aacggagcat      780
30  ggtgcgttgt agggtttcct ccatgcaaag ataacaagtg ctactgctgc attggggggc      840
    gaactcatgc tcgctactct acgatggctg agtgtagaca tgctgtcttc taaacaaaaa      900
    ttaagatcgc tgttattata tacattgtaa tggtaggtaa tgctattaat aatatatggg      960
35  aattttagtt ttgg      974

```

<210> 16

40 <211> 61

<212> PRT

<213> *Zea mays*

45 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<223> MEG1-6

50 <400> 16

```

Met Val Lys Asn Thr Asp Asp Val Ser Val Ser Thr Pro Ala Lys Glu
1          5          10          15

```

```

55 Gly Ile Met Gln Gly Asn Gly Ala Trp Cys Val Val Gly Phe Pro Pro
    20          25          30

```

```

60 Cys Lys Asp Asn Lys Cys Tyr Cys Cys Ile Gly Gly Arg Thr His Ala
    35          40          45

```

```

65 Arg Tyr Ser Thr Met Ala Glu Cys Arg His Ala Cys Phe
    50          55          60

```

<210> 17

ES 2 328 578 T3

<211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> oligonucleótido
 10 <400> 17
 tgctgctcat gcgcatgggg ctg 23
 <210> 18
 15 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 18
 25 **ttgtatatataa aaacagtgat gttaa** 25
 <210> 19
 <211> 16
 30 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> Péptido sintético
 <400> 19
 40 **Asn Ala Pro Ala Glu Glu Gly Ile Leu Arg Glu Lys Arg Ala Gln Cys**
 1 5 10 15
 <210> 20
 <211> 27
 45 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Péptido rico en cisteína
 <220>
 55 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)... (27)
 <223> Xaa = aminoácido
 60 <400> 20
 Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Tyr Cys Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 65 **Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys**
 20 25

ES 2 328 578 T3

	<210> 21		
	<211> 28		
	<212> ADN		
5	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> oligonucleótido		
10	<400> 21		
	ggatccatga atcccaactt caacagtg	28	
15	<210> 22		
	<211> 31		
	<212> ADN		
20	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> oligonucleótido		
25	<400> 22		
	gaattcttat cggttatata tctggctctc c	31	
30	<210> 23		
	<211> 23		
	<212> ADN		
35	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> oligonucleótido		
40	<400> 23		
	tgctgctcat gcgcatgggg ctg	23	
45	<210> 24		
	<211> 28		
	<212> ADN		
50	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> oligonucleótido		
55	<400> 24		
	ttagaagcak gcatgwtac actsagcc	28	
60	<210> 25		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
65	<220>		
	<223> oligonucleótido		

ES 2 328 578 T3

	<400> 25		
	atgcacatgg gaagggcat gtc		23
5	<210> 26		
	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
10	<220>		
	<223> oligonucleótido		
15	<400> 26		
	ttagaagcak gcatgwctac actsagcc		28
20	<210> 27		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
25	<220>		
	<223> oligonucleótido		
30	<400> 27		
	gcatagcagg agtggagggc		20
	<210> 28		
35	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
40	<220>		
	<223> oligonucleótido		
	<400> 28		
45	gaagcaggca tgactacact c		21
	<210> 29		
50	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> oligonucleótido		
	<400> 29		
60	tggccaatgt cgcctccgag		20
	<210> 30		
65	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		

ES 2 328 578 T3

	<220>		
	<223> oligonucleótido		
5	<400> 30		
	ttagaagcak gcatgwctac actsagcc	28	
	<210> 31		
10	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> oligonucleótido		
	<400> 31		
20	atggctggct atggtgttga tg	22	
	<210> 32		
25	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
30	<220>		
	<223> oligonucleótido		
	<400> 32		
35	gtgcagtttg caggtaagcc c	21	
	<210> 33		
	<211> 25		
40	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
45	<223> oligonucleótido		
	<400> 33		
50	tgtacgcctg acttggctag caacc	25	
	<210> 34		
	<211> 28		
55	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
60	<223> oligonucleótido		
	<400> 34		
65	ttagaagcak gcatgwctac actsagcc	28	
	<210> 35		
	<211> 22		

ES 2 328 578 T3

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> oligonucleótido	
	<400> 35	
10	gcaacgtacc gtacctttcc ga	22
	<210> 36	
	<211> 24	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> oligonucleótido	
	<400> 36	
25	acgctgcatt caattaccgg gaag	24
	<210> 37	
	<211> 24	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> oligonucleótido	
	<400> 37	
40	acacctcaaa tagatatgga tata	24
	<210> 38	
	<211> 29	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	
	<220>	
50	<223> oligonucleótido	
	<400> 38	
	gttatctatt ctattctatc atatctatc	29
55	<210> 39	
	<211> 30	
	<212> ADN	
60	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
65		

ES 2 328 578 T3

	<400> 39		
	gatatagata tatagaagag atatagatgg		30
5	<210> 40		
	<211> 29		
	<212> ADN		
10	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> oligonucleótido		
15	<400> 40		
	gttatctatt ctattctatc atatctatc		29
20	<210> 41		
	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
25	<220>		
	<223> oligonucleótido		
30	<400> 41		
	agatagatat gatagaatag atagataac		29
35	<210> 42		
	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
40	<220>		
	<223> oligonucleótido		
45	<400> 42		
	gttatctatt ctattctatc atatctatc		29
	<210> 43		
50	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> oligonucleótido		
	<400> 43		
60	atcttctcta aagagactaa atcactgc		28
	<210> 44		
65	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		

ES 2 328 578 T3

	<220>		
	<223> oligonucleótido		
5	<400> 44		
	gttatctatt ctattctatc atatctatc	29	
	<210> 45		
10	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> oligonucleótido		
	<400> 45		
20	acacctcaaa tagatatgga tata	24	
	<210> 46		
25	<211> 38		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
30	<220>		
	<223> oligonucleótido		
	<400> 46		
35	ccaattcact gggttatcta ttctattcta tcatatct	38	
	<210> 47		
	<211> 24		
40	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
45	<223> oligonucleótido		
	<400> 47		
50	acacctcaaa tagatatgga tata	24	
	<210> 48		
	<211> 38		
55	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
60	<223> oligonucleótido		
	<400> 48		
65	ccaattcact ggccatctat atcttctata tatctata	38	
	<210> 49		

ES 2 328 578 T3

	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> oligonucleótido	
10	<400> 49	
	acacctcaaa tagatatgga tata	24
15	<210> 50	
	<211> 38	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
25	<400> 50	
	ccaattcact ggcccccttgt tataatctata tctataacc	38
30	<210> 51	
	<211> 1041	
35	<212> ADN	
	<213> <i>Zea mays</i>	
	<220>	
40	<221> característica_misc	
	<223> MRP1	
	<400> 51	
45	ctgtaacaac ttgtgtagta cttaaccctt cgcacctcat gaatcccaac ttcaacagtg	60
	tgtggagcgc tcccagagatc aatatgatga actcactcat cactagtcac atcgccaaca	120
50	acacctacac aaacaacaac cagcatgttg tggcaagtcg tagtgccatt gtgaaccaca	180
	ataacttttg gatgccaacg gaggtcgttc cacccttgga caacatggac atgatgcaag	240
55	gctatctaata ggctgatacg gatgccatga ggcttggtca gggacaacaa catatgcca	300
	atgttggtcc taatcaaagg aggcattgcg tgaagttttg gactacagat gagcacagga	360
60	atttccttcg tggctctagaa gtgtttggcc gtggtaaatg gaagaacatc tccaagtact	420
	tcgtccccac aaggacacca gtgcagatct ctagccatgc acagaagtat ttccgcaggc	480
65		

ES 2 328 578 T3

```

aggagtgcac cacagagaaa caacgcttta gcatcaacga tgttggcctc tacgacacac 540
agccatgggt gcggcagaac aactcctcta gcagctggga ggcgctcacc ttcactgctg 600
5 gccgtgcgta caataatata aactactgtg cctttaacag cctcccgtat gccagcagcc 660
aggcaagtaa caaccaggta gctacatgga ttacagacca gcaggcaact gcaagttctt 720
10 ctatagctcc tccagcgacg gaggagagcc agatatataa ccgataatat atataatggg 780
catcagcagc tgggagaggc tttcttcata tataatcaat aggtagatag atatggacaa 840
15 cgtccattga ctagtttaat ttctatctat atgttttgta tccaatgatg catgtaaaac 900
ctagttgggt gttaaaggtc attagtagca tactatatat gggctagaaa cagtttcatt 960
gaaatttgcc cctgagcaat acaatgaaat tttaaccaatg tgttatttat atattaatgt 1020
20 gtctaaaaaa aaaaaaaaaa a 1041

```

<210> 52

<211> 242

<212> PRT

<213> *Zea mays*

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<223> MRP1

<400> 52

```

Met Asn Pro Asn Phe Asn Ser Val Trp Ser Ala Pro Glu Ile Asn Met
1           5           10           15

```

```

Met Asn Ser Leu Ile Thr Ser His Ile Ala Asn Asn Thr Tyr Thr Asn
20           25           30

```

```

Asn Asn Gln His Val Val Ala Ser Arg Ser Ala Ile Val Asn His Asn
35           40           45

```

```

Asn Phe Gly Met Pro Thr Glu Val Val Pro Pro Val Asp Asn Met Asp
50           55           60

```

```

Met Met Gln Gly Tyr Leu Met Ala Asp Thr Asp Ala Met Arg Leu Val
65           70           75           80

```

```

Gln Gly Gln Gln His Met Pro Asn Val Val Pro Asn Gln Arg Arg His
85           90           95

```

```

Ala Val Lys Phe Trp Thr Thr Asp Glu His Arg Asn Phe Leu Arg Gly
100          105          110

```

ES 2 328 578 T3

Leu Glu Val Phe Gly Arg Gly Lys Trp Lys Asn Ile Ser Lys Tyr Phe
 115 120 125

5

Val Pro Thr Arg Thr Pro Val Gln Ile Ser Ser His Ala Gln Lys Tyr
 130 135 140

10

Phe Arg Arg Gln Glu Cys Thr Thr Glu Lys Gln Arg Phe Ser Ile Asn
 145 150 155 160

15

Asp Val Gly Leu Tyr Asp Thr Gln Pro Trp Val Arg Gln Asn Asn Ser
 165 170 175

20

Ser Ser Ser Trp Glu Ala Leu Thr Phe Thr Ala Gly Arg Ala Tyr Asn
 180 185 190

25

Asn Thr Asn Tyr Cys Ala Phe Asn Ser Leu Pro Tyr Ala Ser Ser Gln
 195 200 205

30

Ala Ser Asn Asn Gln Val Ala Thr Trp Ile Thr Asp Gln Gln Ala Thr
 210 215 220

35

Ala Ser Ser Ser Ile Ala Pro Pro Ala Thr Glu Glu Ser Gln Ile Tyr
 225 230 235 240

Asn Arg

<210> 53
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> *Zea mays*

45

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <223> MEG1-3, segundo marco de lectura abierto (ORF)

50

<400> 53

Met Gln Trp Leu Ala Phe Val Ala Pro Arg Trp Arg Cys Val Cys Asp
 1 5 10 15

55

Gln Glu Leu Ser Ala Gln Thr Gly His Val Thr Asp Asp Val Gly Val
 20 25 30

60

Ser Thr Pro Ala Lys Glu Gly Ile Met Gln Gly Asn Gly Ala Arg Cys
 35 40 45

65

Asp Val Gly Phe Pro Pro Cys Lys Asp Asn Lys Cys Tyr Cys Cys Ile

ES 2 328 578 T3

50

55

60

5 Gly Gly Arg Thr His Ala Arg Tyr Ser Thr Leu Ala Glu Cys Ser His
65 70 75 80

Ala Cys Phe

10

<210> 54

<211> 16

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

20

<400> 54

Pro Cys Lys Asp Asn Lys Cys Tyr Cys Cys Ile Gly Gly Arg Thr His
1 5 10 15

25

<210> 55

<211> 23

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido

35

<400> 55

gggccaacag ttcttgatta acc

23

40

<210> 56

<211> 20

<212> ADN

45 <213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido

50

<400> 56

ccccgttgac tgctcttcg

20

55

<210> 57

<211> 37

<212> ADN

<213> Artificial

60

<220>

<223> secuencia conservada de promotores MEG

65

<400> 57

atatagatag atatagcaaa ttcaccaaatt aatatag

37

ES 2 328 578 T3

<210> 58

<211> 1350

<212> ADN

5 <213> *Zea mays*

<220>

<221> característica_misc

10 <223> secuencia genómica de MEG1-1

<400> 58

```

15      ctagttcagt aataggtgtc gaggtgttct cagagttcca gtacttcgac gagttaggat      60
      aggctaggac atcccctagt cagctgcctg tgggtgggta atttacgttg gcttcgtttc      120
20      aattctgtgt actttgatth atattatgta aattactcta gtcttttata ttattttctta      180
      ctctttattg ttattcgaag cattgtgtta tgatgagtca tttatgtaat tgctatgtac      240
      gtgagttttg atcctagcac gtacatgggt cgcattcggt ttaccttcta aaacctgggg      300
25      tgacaggtgg catagcagga gtggagggca gcgacggctg cacagctctg cgtgcagtgg      360
      cttgcattgt ttgctcctcg ttggcgatgc gtgtgcgacc atgagctctc gacacaggta      420
30      ggtagtagta gagccagaat tgtaaccttg ggttttccca cacctcaa atagatatagat      480
      atagggatat agatagatat agcaaattca ccaaataata taggggtata gatatatagata      540
35      taagaagggg tatagatata gatatatata tatagaagat atagatatagat agatagatat      600
      gatagaatag ataacttaca attttgtcta aaagaaacta aatcactgct aagtttggag      660
      tagcatatct ttggtgaata cttgctagtg aattggtttc cgctatagta tatatatata      720
40      agtatacact cttctaggat tatagtatat atatatatat aagtatacac tcttctagga      780
      tcaatcgtga ggagttcatt aaattgtctt gcgacatgga gtacagaaag aggggtggatg      840
45      cgctagtgtt tttctcgtta cttctcctcg gatactttgc tgctcatgca catgggaagg      900
      gtaagtga aa actatacaga catgtgtgtg catgcttaga tagatctaga caatttagaa      960
50      gatgttatta tatgataccg tgtgtatcat ggcgaattgc taatgtatcg caatcccctg      1020
      tgttaaatta ctcaaataat ttcgaatgta attattctcg aggcatttgt tggtaataga      1080
      actcttatcc tataccttct actaggtcat gtcacagatg atgtcagtgt ttctactcca      1140
55      gctaaagaag gaattatgca aggaaacgga gcacgatgcg ttgtaggggt tctccatgc      1200
      aaagataaca agtgctactg ctgcattggg gggcgaaactc atgctcgcta ctctcgatgg      1260
60      ctgatgtaga catgcctgct tctaacaaaa taagacgttg tatatatcat gtatggagga      1320
      atttataata ttatggaatt agttgtatat      1350

```

65 <210> 59

<211> 127

ES 2 328 578 T3

<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> oligonucleótido

<220>
10 <221> característica_misc
<223> nucleótidos 1-127 del promotor MEG1-1

<400> 59
15
agccagaatt gtaaccttgg gttttccac acctcaaata gatattgata tagttatata 60
gatagatata gcaaattcac caaataatat agaggtatag atatagatat aacaaggggt 120
20 atatata 127

<210> 60
25 <211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> oligonucleótido

<400> 60
35
acacctcaaa tagatatgga tatag 25

40 <210> 61
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

45 <220>
<223> oligonucleótido

50 <400> 61
gtcgcaagaa atgttaagga actcc 25

55 <210> 62
<211> 500
<212> ADN
60 <213> *Zea mays*

65

ES 2 328 578 T3

	<400> 62	
	caggagtgga gggcagcgac ggctgcacag ctctgcgtgc agtggcttgc attgtttgct	60
5	cctcgttggc gatgcgtgtg cgaccatgag ctctcgacac aggtaggtag tagtagagcc	120
	agaattgtaa ccttggggtt tcccacacct caaatagata tagatatagg gatatagata	180
10	gatatagcaa attcaccaaa taatataggg gtatagatat agatataaga aggggtatag	240
	atatagatat agatatatag aagatataga tagatagata gatatgatag aatagataac	300
	ttacaatttt gtctaaaaga aactaaatca ctgctaagtt tggagtagca tatctttggt	360
15	gaatacttgc tagtgaattg gtttccgcta tagtatatat atataagtat acactcttct	420
	aggattatag tatatatata tatataagta tacactcttc taggatcaat cgtgaggagt	480
20	tcattaaatt gtcttgcgac	500
	<210> 63	
	<211> 32	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> oligonucleótido	
	<400> 63	
	atcgatgaat tcgctcaagg gtttcttcca tg	32
35	<210> 64	
	<211> 30	
	<212> ADN	
40	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
45	<400> 64	
	ggatcctcga gcctctagta tcggtctgac	30
50		
55		
60		
65		