



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 279 339**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04703795 .7**

86 Fecha de presentación : **21.01.2004**

87 Número de publicación de la solicitud: **1585820**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.10.2005**

54 Título: **Uso de la secuencia reguladora del gen GOS2 del arroz para la expresión génica en plantas o células de plantas dicotiledóneas.**

30 Prioridad: **21.01.2003 EP 03075207**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2007

73 Titular/es: **CropDesign N.V.**
Technologiepark 3
9052 Zwijnaarde-Gent, BE

72 Inventor/es: **Hatzfeld, Yves y**
Inze, Dirk

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 279 339 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de la secuencia reguladora del gen *GOS2* del arroz para la expresión génica en plantas o células de plantas dicotiledóneas.

La presente invención se refiere al campo de la biología molecular de las plantas. En particular, la presente invención describe el uso de una secuencia reguladora del gen *GOS2* del arroz para la regulación de la expresión génica en células vegetales de plantas no monocotiledóneas.

La ingeniería genética de las plantas tiene el potencial de permitir la producción de plantas que tienen todo tipo de rasgos deseables, tales como resistencia incrementada a patógenos, resistencia a herbicidas, rendimiento incrementado, tolerancia incrementada al estrés, etc. Esto se alcanza típicamente insertando trozos adecuados de DNA procedente de una fuente heteróloga, o de la misma fuente, en una planta. La expresión de secuencias de DNA heterólogas en un huésped vegetal depende de la presencia de un promotor enlazado operablemente que es funcional dentro del huésped vegetal.

Los promotores son elementos de DNA que regulan la transcripción en células procarióticas y eucarióticas y están situados en la región de flanco 5' o aguas arriba de un gen transcrito. La secuencia de un promotor varía en longitud y composición de los pares de bases de gen a gen. Muchos elementos de las secuencias reguladoras pueden estar presentes dentro de la secuencia de un promotor. Estos elementos de las secuencias reguladoras, que interactúan con proteínas que se unen a DNA (que son parte del complejo de iniciación de la transcripción), están generalmente intercalados en una secuencia promotora. Los elementos específicos, llamados cajas de DNA, contribuyen a las características definidas o a un patrón de activación definido para un promotor. Muchas de estas cajas son sitios de reconocimiento a los que pueden unirse factores de transcripción reguladores y son parte de un estrecho mecanismo de control del promotor. Se han descrito numerosas cajas de DNA de promotores vegetales, tales como cajas específicas para tejidos (Chaubet y otros, *Plant J.* 10 (3) 425-435, 1996), cajas de pirimidina (Gubler y Jacobsen, *Plant Cell* 4 (11) 1435-1441, 1992) que influyen en el nivel de expresión o cajas G (Dolferus y otros, *Plant Physiol.* 105 (4) 1075-1087, 1994), que reducen la actividad del promotor durante la exposición a frío o deshidratación.

La tecnología del DNA recombinante ha encontrado ahora una amplia aplicación en la investigación y en el desarrollo de productos. En la biología molecular, se usan frecuentemente tipos específicos de promotores para la expresión de ácidos nucleicos o proteínas heterólogos en organismos, en los que la expresión puede ser constitutiva (es decir, expresión continua a través de las células de un organismo) o limitada a partes definidas de un organismo (es decir, expresión preferida en tejidos o células) o limitada a ciertas fases de desarrollo o a ciertas condiciones ambientales o fisiológicas (es decir, expresión inducible).

Existe una necesidad en diversas aplicaciones industriales de elementos de control transcripcional capaces de conducir la expresión génica en plantas. Por lo tanto, para obtener una expresión génica deseada, que puede ajustarse precisamente dependiendo de las necesidades específicas, es deseable proporcionar una amplia serie de promotores de los que pueda elegirse uno. Los expertos en la técnica necesitan tener a su disposición una variedad de promotores con diferentes patrones de expresión o con diferentes características de control del tiempo de entre los que elegir. Para muchas aplicaciones industriales y agrónomas, cuando el objetivo es conferir una característica dada a lo largo del desarrollo de la planta y durante cualquier estado ambiental o físico de la planta, se necesitaría un promotor constitutivo. Un promotor constitutivo puede ser adecuado para conducir la expresión de genes marcadores seleccionables o puede usarse cuando el producto génico de un gen particular ha de aislarse y purificarse de la planta con propósitos comerciales.

Frecuentemente, también es deseable usar promotores que estén regulados de modo comparable entre sí y den como resultado un patrón de expresión similar a lo largo de una amplia gama de especies de huésped. Se han aislado hasta la fecha muy pocos promotores vegetales constitutivos que sean activos en una amplia gama de especies (Callis y otros, *J. Biol. Chem.* 265 12486-12493, 1990; Zhang y otros, *Plant Cell* 3 1155-1165, 1991; de Pater y otros, *Plant J.* 2 837-844, 1992; Mandel y otros *Plant Mol. Biol.* 29 995-1004, 1995; Baszczyński y otros, *Maydica* 42 189-201, 1997). Como resultado, el 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S; Odell y otros, *Nature* 313 653-660, 1985) es actualmente el promotor constitutivo más ampliamente usado en la ciencia de las plantas, e incluso en algunas especies fúngicas. La principal desventaja de tal promotor es sin embargo su origen viral. Las plantas transformadas con el promotor 35S de CaMV frecuentemente muestran varias características no deseables, tales como una silenciamiento eficaz de los transgenes o una recombinación incrementada, conduciendo a inestabilidad a lo largo del tiempo y durante generaciones subsiguientes (Kohli y otros, *Plant J.* 17 591-601, 1999; Al-Kaff y otros, *Nature Biotechnology* 18 995-999, 2000). Además, los elementos virales a menudo no son deseables en productos transgénicos, tanto por razones reguladoras como por razones de aceptación pública general.

cDNA de *GOS2* de arroz se aisló y caracterizó en un programa de rastreo para genes que se expresaban en muchos tejidos diferentes del arroz (de Pater y otros, *Plant J.* 2, 837-844, 1992). *GOS2* es un gen de una sola copia que codifica una isoforma de factor de iniciación de la traducción eIF1. El análisis de la expresión revelaba altos niveles de mRNA en vástagos verdes, vástagos etiolados y en raíces de plántulas. Un patrón de expresión similar se detectaba en plantas maduras, aunque la expresión era un poco inferior en las raíces. También se detectaban altos niveles de expresión en plantas o cultivos de suspensión celular de otra variedad de arroz. Un fragmento de promotor aislado era capaz de conducir la expresión de *GUS* en plántulas de arroz (hoja, tejidos radicales y coleóptilo) y en cultivos en suspensión

ES 2 279 339 T3

de células de arroz. El promotor también era activo en maíz, cebada y ballico (de Pater y otros, Plant J. 2, 837-844, 1992; Hensgens y otros, Plant Mol. Biol. 22, 1101-1127, 1993). Se ha mostrado que es activo en otras plantas monocotiledóneas, con niveles de expresión similares a los de 35S de CaMV. Barbour y otros (WO0020571) sugieren, pero no mostraban, el uso de un promotor de GOS2 procedente de maíz en plantas dicotiledóneas. Sin embargo, existe poca homología entre el promotor de GOS2 de maíz y el promotor de GOS2 de arroz que es el objeto de la presente invención.

Se ha encontrado ahora que una secuencia reguladora de *GOS2* procedente de arroz es activa en plantas no monocotiledóneas, y tiene un patrón y una intensidad de expresión similares al promotor 35S de CaMV. Por consiguiente, la presente invención trata del uso de una secuencia reguladora de *GOS2* para conducir la expresión constitutiva de ácidos nucleicos en plantas no monocotiledóneas. Por lo tanto, la presente invención proporciona una buena alternativa al promotor 35S de CaMV. La secuencia reguladora de la presente invención, cuando se enlaza a un gen útil y se transfiere a una planta o célula de planta no monocotiledónea, permite la expresión de ese gen útil. Además, puesto que la secuencia reguladora de la presente invención permite la expresión constitutiva, es posible usarla como una secuencia reguladora para conducir la expresión del gen útil transferido en todos los tejidos en cualquier fase de desarrollo. Por otra parte, como esta secuencia reguladora se origina de una planta monocotiledónea, es menos probable que sea tendente a la silenciación que la secuencia reguladora de monocotiledónea o el promotor 35S de CaMV, cuando se usa para expresar un gen útil transferido en plantas dicotiledóneas, tales como *Arabidopsis thaliana*.

Los expertos en la técnica sabrán que la invención descrita aquí está sometida a variaciones y modificaciones distintas a las descritas específicamente. Debe entenderse que la invención descrita aquí incluye todas estas variaciones y modificaciones. La invención también incluye todas estas etapas, características, composiciones y compuestos mencionados o indicados en esta memoria descriptiva, individualmente o colectivamente, y todas y cada una de las combinaciones de cualquiera o más de estas etapas o características.

A lo largo de esta memoria descriptiva, a no ser que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que la palabra “comprenden”, y variaciones tales como “comprende” y “que comprende”, implica la inclusión de un integrante o una etapa o un grupo de integrantes o etapas indicado pero no la exclusión de cualquier otro integrante o etapa o grupo de integrantes o etapas.

Según se usa aquí, el término “derivado de” se tomará para indicar que un integrante o grupo de integrantes se ha originado a partir de la especie especificada, pero no tiene necesariamente que haberse obtenido directamente de la fuente especificada. Este integrante puede modificarse substancialmente de su forma natural en composición y/o ambiente a través de manipulación humana deliberada.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona el uso de una secuencia de ácido nucleico reguladora aislada que comprende una secuencia reguladora como la representada por el N° ID SEC 1 o por un fragmento funcional o variante funcional de la misma, para conducir la expresión de una secuencia de ácido nucleico asociada en una planta o célula de planta no monocotiledónea.

El término “secuencia reguladora”, según se usa aquí, se refiere a secuencias de DNA que son necesarias para efectuar la expresión de secuencias a las que están ligadas. Las secuencias reguladoras pueden diferir dependiendo del organismo huésped pretendido y de la naturaleza de la secuencia que ha de expresarse. El término “secuencia reguladora” pretende incluir, como mínimo, todos los componentes necesarios para la expresión y opcionalmente componentes ventajosos adicionales. De acuerdo con una característica preferida, la secuencia de ácido nucleico reguladora aislada es una secuencia promotora. Según se usa aquí, un “promotor” significa una región de DNA aguas arriba del inicio de la transcripción y que está implicada en la unión a RNA polimerasa y otras proteínas para comenzar la transcripción. La referencia aquí a un “promotor” ha de tomarse en su contexto más amplio e incluye las secuencias reguladoras de la transcripción derivadas de un gen genómico eucariótico clásico, incluyendo la caja TATA que se requiere para una iniciación exacta de la transcripción, con o sin una secuencia de caja CCAAT y elementos reguladores adicionales (es decir, secuencias activadoras, potenciadores y silenciadores aguas arriba) que alteran la expresión génica en respuesta a estímulos de desarrollo y/o externos, o de una manera específica para un tejido. Por consiguiente, una velocidad de transcripción del promotor reprimible disminuye en respuesta a un agente represor. Una velocidad de transcripción del promotor inducible incrementa en respuesta a un agente inductor. Una velocidad de transcripción del promotor constitutivo no se regula específicamente, aunque puede variar bajo la influencia de condiciones metabólicas generales. El término “promotor” también incluye las secuencias reguladoras de la transcripción de un gen procarriótico clásico, en cuyo caso puede incluir una secuencia de caja -35 y/o secuencias reguladoras de la transcripción de caja -10. El término “promotor” también se usa para describir una molécula sintética o de fusión, o un derivado que confiere, activa o potencia la expresión de una molécula de ácido nucleico en una célula, un tejido o un órgano.

La presente invención también abarca así el uso de fragmentos o variantes del N° ID SEC 1, que pueden empalmarse mediante cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo mediante ligación *in vitro*, para crear secuencias reguladoras híbridas que comprenden mezclas de partes de elementos reguladores de diferentes fuentes, bien naturales o bien sintéticas. Por lo tanto, la invención también proporciona una secuencia de ácido nucleico reguladora híbrida que comprende la secuencia reguladora representada por el N° ID SEC 1 o un fragmento o una variante de la misma, funcionalmente combinada con una o más de otras secuencias reguladoras o fragmentos de las mismas.

Las secuencias reguladoras o los promotores pueden contener copias adicionales de uno o más elementos reguladores específicos, para potenciar adicionalmente la expresión y/o alterar la expresión espacial y/o la expresión temporal de una molécula de ácido nucleico a la que están conectados operablemente. Tales elementos reguladores pueden situarse adyacentes a una secuencia promotora heteróloga para conducir la expresión de una molécula de ácido nucleico en respuesta a, por ejemplo, cobre, glucocorticoides, dexametasona, tetraciclina, giberelina, cAMP, ácido abscísico, auxina, una lesión, etileno, jasmonato o ácido salicílico, o para conferir la expresión de una molécula de ácido nucleico a células, tejidos u órganos específicos tales como meristemos, hojas, raíces, embrión, flores, semillas o frutos. En el contexto de la presente invención, la secuencia reguladora es activa en plantas no monocotiledóneas y está representada por el N° ID SEC 1, un fragmento funcional o una variante funcional del mismo. Ha de entenderse que el término “funcional”, cuando se usa con respecto a un ácido nucleico o parte del mismo, tiene una actividad biológica esencialmente similar en comparación con el ácido nucleico presente en la naturaleza y es capaz de conducir la expresión en plantas no monocotiledóneas.

“Expresión” significa la producción de una proteína o secuencia de nucleótidos en la propia célula o en un sistema libre de células. Incluye la transcripción en un producto de RNA, la modificación postranscripcional y/o la traducción en un producto proteínico o un polipéptido a partir de un DNA que codifica ese producto, así como posibles modificaciones postraduccionales. Una secuencia codificante puede transcribirse en la dirección de sentido o antisentido.

El término “secuencia o secuencias de ácido nucleico”, “molécula o moléculas de ácido nucleico”, “polinucleótido o polinucleótidos”, “secuencia o secuencias de nucleótidos”, “secuencia o secuencias de DNA” o “gen o genes”, cuando se usa aquí, se refiere a nucleótidos, bien ribonucleótidos (RNA) o bien desoxirribonucleótidos (DNA) o una combinación de ambos, en una forma polímera de cualquier longitud. Estos términos incluyen por otra parte DNA y RNA de doble hebra y de una sola hebra. Estos términos también incluyen modificaciones de nucleótidos conocidas en la técnica, tales como metilación, ciclación, “protecciones”, sustitución de uno o más de los nucleótidos presentes en la naturaleza por un análogo tal como inosina, y modificaciones de la cadena principal polinucleotídica. El término “aislado” en la presente solicitud significa retirado de su ambiente original. Por ejemplo, un ácido nucleico presente en el estado natural en un organismo no está aislado, mientras que el mismo ácido nucleico separado de los ácidos nucleicos adyacentes en los que está presente naturalmente se considera que está “aislado”.

Una secuencia de ácido nucleico puede comprender secuencias codificantes o puede contener secuencias no codificantes. Una “secuencia codificante” o “marco abierto de lectura” u “ORF” se define como una secuencia de nucleótidos que puede transcribirse a mRNA y/o traducirse en un polipéptido cuando se pone bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas, es decir cuando la secuencia codificante u ORF está presente en una forma expresable. La secuencia codificante u ORF está unido por un codón de comienzo de la traducción 5’ y un codón de parada de la traducción 3’. Una secuencia codificante u ORF puede incluir, pero no está limitado a, RNA, mRNA, cDNA, secuencias de nucleótidos recombinantes, secuencias de nucleótidos fabricadas sintéticamente o DNA genómico. La secuencia codificante u ORF puede estar interrumpida por secuencias de ácido nucleico intermedias.

Las secuencias codificantes, o los genes que codifican esencialmente la misma proteína pero aislados de diferentes fuentes, pueden consistir en secuencias de ácido nucleico substancialmente divergentes. Recíprocamente, pueden diseñarse secuencias de ácido nucleico substancialmente divergentes para efectuar la expresión esencialmente de la misma proteína. Estas secuencias de ácido nucleico son el resultado de, por ejemplo, la existencia de diferentes alelos de un gen dado o de la degeneración del código genético o de diferencias en la utilización de los codones. Así, aminoácidos tales como metionina y triptófano son codificados por un solo codón mientras que otros aminoácidos, tales como arginina, leucina y serina, pueden traducirse a partir de hasta seis codones diferentes. La utilización preferidas de los codones de diversos organismos puede encontrarse en <http://www.kazusa.or.jp/codon>. Las variantes alélicas se definen adicionalmente por comprender polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) así como pequeños polimorfismos de inserción/delección (INDELs; el tamaño de los INDELs es habitualmente menor que 100 pb). Los SNPs e INDELs forman el grupo más grande de variantes de secuencia en cepas polimórficas presentes en la naturaleza de la mayoría de los organismos.

El término “asociado”, según se usa aquí, o “enlazado operablemente” se refiere a una yuxtaposición entre una secuencia reguladora y codificante, en donde los componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar en su manera pretendida. Una secuencia reguladora “enlazada operablemente” a una secuencia codificante está ligada de tal modo que la expresión de la secuencia codificante se alcanza bajo condiciones compatibles con las secuencias de control. En el caso de que la secuencia reguladora sea un promotor, será sabido por un experto que es preferible un ácido nucleico de doble hebra. El ácido nucleico asociado abarca ácidos nucleicos heterólogos. Ácidos nucleicos heterólogos se refiere a ácidos nucleicos derivados de una fuente genética separada, por ejemplo ácidos nucleicos que se originan desde dentro de la célula pero que no están naturalmente situados en la célula, o que están situados en un sitio cromosómico diferente de la célula. Los ácidos nucleicos heterólogos también pueden derivarse de otras especies y pueden introducirse como un transgén, por ejemplo, mediante transformación. Este transgén puede estar substancialmente modificado desde su forma natural en composición y/o ambiente genómico a través de manipulación humana deliberada. Además, la expresión de las secuencias de ácido nucleico naturales puede modificarse mediante la introducción en la planta de secuencias reguladoras de acuerdo con la invención de tal modo que las secuencias reguladoras están enlazadas operablemente al ácido nucleico natural. Ácido nucleico natural se refiere a ácido nucleico en su situación natural en el genoma de un organismo.

El término “fragmento de una secuencia” o “parte de una secuencia” significa una secuencia truncada de la secuencia original en cuestión. La secuencia de ácido nucleico truncada puede variar ampliamente en longitud, siendo el tamaño mínimo una secuencia de tamaño suficiente para proporcionar una secuencia con al menos una función y/o actividad comparable de la secuencia original en cuestión, mientras que el tamaño máximo no es crítico. En algunas aplicaciones, el tamaño máximo habitualmente no es substancialmente mayor que el requerido para proporcionar la actividad y/o la función o funciones deseadas de la secuencia original. Estos términos no son restrictivos al contenido del fragmento o segmento de DNA, que puede ser cualquier DNA, con cualquier funcionalidad. Por ejemplo, el fragmento o los segmentos de DNA pueden consistir en un promotor pero también pueden comprender muchos genes, con o sin elementos de control adicionales, puede contener solo secuencias espaciadoras. Un fragmento funcional de un promotor puede construirse sometiendo a delección parte del extremo 5' y/o 3', y/o sometiendo a delección partes internas y probando el fragmento restante con respecto a su capacidad para conducir la expresión de un gen informador. El nivel y el patrón de expresión de este constructo génico informador pueden compararse entonces con los del mismo gen informador bajo el control del promotor original a partir del cual se derivaba el fragmento.

Por otra parte, una variante de un fragmento de DNA abarca una secuencia que muestra homología con la secuencia mencionada y es capaz de promover la expresión de una secuencia de DNA asociada cuando se reintroduce en una planta y se hibrida a la secuencia mencionada o a una porción de la misma bajo condiciones restrictivas. El experto en la técnica apreciará que en este caso las reacciones bajo condiciones restrictivas para la hibridación se llevan a cabo típicamente a una temperatura de entre 60°C y 65°C en solución salina tamponada con citrato de intensidad 0,3 que contiene 0,1% de SDS, seguido por enjuague a la misma temperatura con solución salina tamponada con citrato de intensidad 0,3 que contiene 0,1% de SDS. Con el propósito de definir el nivel de restricción, puede hacerse referencia convenientemente a Sambrook y otros (2001) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, CSH, Nueva York o a *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989).

Una “planta no monocotiledónea” comprende todas las especies de plantas que pertenecen al reino Plantae según se define mediante ITIS [the Integrated Taxonomic Information System (<http://www.itis.usda.gov/index.html>)], incluyendo la clase de Magnoliopsida pero sin la clase de las Liliopsida (Liliatae, Monocotyledonae). Las clases Magnoliopsida y Liliopsida son parte de la división Magnoliophyta, que a su vez pertenece al subreino Tracheobionta. El ácido nucleico aislado de acuerdo con la presente invención puede usarse para conducir la expresión génica en cualquier planta no monocotiledónea, en particular es aplicable a una planta dicotiledónea incluyendo una legumbre para pasto o forrajera, una planta ornamental, un cultivo para consumo, un árbol o un arbusto. Especies de plantas preferidas incluyen algodón, patata, tomate, col, remolacha azucarera, soja, judía, girasol, guisantes.

Ventajosamente, la secuencia reguladora representada por el N° ID SEC 1 o un fragmento funcional o variante funcional de la misma es capaz de conducir la expresión de una secuencia de ácido nucleico asociada en una planta no monocotiledónea. Tal ácido nucleico asociado puede ser cualquier secuencia de DNA heteróloga derivada de cualquier organismo cuya secuencia ha de expresarse en una planta no monocotiledónea. La secuencia de DNA heteróloga puede obtenerse a partir de cualquier organismo, incluyendo plantas, especies de planta que pueden ser la misma especie de planta en la que ha de introducirse la secuencia, o puede ser diferente. Adicionalmente o alternativamente, la secuencia de ácido nucleico asociada puede ser un ácido nucleico endógeno enlazado operablemente a la secuencia reguladora de acuerdo con la invención.

Por lo tanto, la invención también proporciona el uso de un ácido nucleico regulador aislado como el definido anteriormente para conducir la expresión de un ácido nucleico asociado en una planta o célula de planta no monocotiledónea, en donde dicho ácido nucleico asociado es un ácido nucleico aislado o un ácido nucleico endógeno para la célula huésped en la que ha de introducirse dicha secuencia de ácido nucleico reguladora aislada.

El ácido nucleico recombinante abarca cualquier medio para la clonación de y/o la transferencia de un ácido nucleico a una célula huésped, incluyendo “vectores” o “secuencias vectoriales”, que pueden introducirse en un organismo mediante transformación o transfección, y que puede bien estar integrados en el genoma de la célula huésped o bien mantenerse en alguna forma extracromosómicamente. Las secuencias vectoriales comprenden generalmente un grupo de sitios únicos reconocidos por enzimas de restricción, el sitio de clonación múltiple (MCS), en los que pueden insertarse una o más secuencia o secuencias no vectoriales.

Por “secuencia no vectorial” o “inserto” se entiende de acuerdo con esto el segmento de DNA deseado que se quiere clonar en uno o más de los sitios del MCS, comprendido dentro de un vector. El inserto puede tener uno o más genes.

Los “vectores de expresión” forman un subgrupo de vectores que, en virtud de comprender las secuencias reguladoras apropiadas que permiten la creación de un formato expresable para la secuencia o las secuencias no vectoriales insertadas, permiten así la transcripción y/o la traducción de un ácido nucleico insertado en los mismos. Los vectores de expresión son conocidos en la técnica y permiten la expresión proteínica en organismos, incluyendo bacterias (por ejemplo, *Escherichia coli*), hongos (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*), células de insecto (por ejemplo, vectores de expresión baculovirales), células animales (por ejemplo, células COS o CHO) y células de planta (por ejemplo, vectores de expresión basados en el virus de la patata X, véase, por ejemplo, Vance y otros, 1998 - WO9844097). Los vectores de expresión pueden ser, por ejemplo, vectores de clonación, vectores binarios o vectores de integración.

ES 2 279 339 T3

Las secuencias reguladoras que aseguran la expresión en células procarióticas y/o eucarióticas, particularmente en plantas no monocotiledóneas, son bien conocidas para los expertos en la técnica. Una secuencia reguladora preferida es la secuencia reguladora listada en el N° ID SEC 1, un fragmento funcional o una variante funcional de la misma. Cuando se usan en células eucarióticas, los vectores también pueden comprender terminadores que contienen señales de poliadenilación que aseguran el procesamiento y la poliadenilación 3' de un transcrito primario y la terminación de la transcripción. En células vegetales, las señales de terminación empleadas habitualmente son del gen de nopalina sintasa o el terminador 35S de CaMV. Elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores transcripcionales así como traduccionales. Un potenciador traduccional de planta usado a menudo es la secuencia omega del CaMV. Se ha mostrado que la inclusión de un intrón incrementa los niveles de expresión en hasta 100 veces en ciertas plantas (Maiti y otros, Transgenic Research 6, 143-156, 1997; Ni, Plant Journal 7 (1995), 661-676).

Ventajosamente, vectores usados en la invención comprenden un marcador seleccionable y/o evaluable. Genes marcadores seleccionables útiles para la selección de células de planta, callos, tejidos vegetales y plantas transformados son bien conocidos por los expertos en la técnica. La resistencia a antimetabolitos es muy útil como una base para la selección: por ejemplo, el gen *dhfr* confiere resistencia al metotrexato (Reiss y otros, Plant Physiol. (Life Sci. Adv.) 13, 143-149, 1994); el gen *npt* confiere resistencia a los aminoglicósidos neomicina, kanamicina y paromomicina (Herrera-Estrella y otros, EMBO J. 2, 987-995, 1983); o el gen *hpt*, que confiere resistencia a la higromicina (Marsh, Gene 32, 481-485, 1984). Se han descrito genes marcadores seleccionables adicionales, tales como *trpB*, que permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano; *hisD*, que permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 8047, 1988); manosa-6-fosfato isomerasa, que permite que las células utilicen manosa (WO 94/20627) y orinitina descarboxilasa, que confiere resistencia al inhibidor de ornitina descarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina o DMFO (McConlogue, 1987, En: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.) o el gen de desaminasa de *Aspergillus terreus*, que confiere resistencia a la blasticidina S (Tamura, Biosci. Biotechnol. Biochem. 59, 2336-2338, 1995). Marcadores evaluables útiles también son conocidos por los expertos en la técnica y están disponibles comercialmente. Ventajosamente, el marcador es un gen que codifica luciferasa (Giacomin, Pl. Sci. 116 59-72, 1996; Srikantha, J. Bact. 178 121, 1996), proteína fluorescente verde (Gerdes, FEBS Lett. 389 44-47, 1996; Haseloff y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94 2122-2127, 1997) o β -glucuronidasa (Jefferson, EMBO J. 6 3901-3907, 1987). Los vectores pueden proporcionar además sitios cebadores, por ejemplo para PCR, sitios de iniciación y/o regulación de la transcripción y/o la traducción, sitios recombinantes, replicones, etc.

La presente invención incluye claramente cualquier ácido nucleico, vector o vector de expresión recombinante que comprenda la secuencia reguladora de acuerdo con la presente invención y/o una secuencia no vectorial como la definida anteriormente.

De acuerdo con otra modalidad, la invención se refiere a una célula de planta no monocotiledónea que comprende un ácido nucleico recombinante como el descrito anteriormente. El ácido nucleico recombinante puede integrarse establemente en el genoma de la célula de planta no monocotiledónea. La invención también proporciona un cultivo de células de planta, un callo, una planta o una parte de planta derivada de estas células de planta. Además, dentro del alcance de la presente invención, hay una parte recolectable, un órgano, un tejido o un material de propagación de una planta de acuerdo con la invención, que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia reguladora representada por el N° ID SEC: 1 o un fragmento o variante de la misma.

Por otra parte, se proporciona un método para la expresión de una secuencia de ácido nucleico en una célula de planta no monocotiledónea, método que comprende introducir en esta célula de planta una secuencia reguladora representada por el N° ID SEC 1 o un fragmento funcional o una variante funcional de la misma, en donde la secuencia reguladora es capaz de conducir la expresión de la secuencia de ácido nucleico que es una secuencia de ácido nucleico bien aislada o bien endógena.

Medios para introducir DNA recombinante en tejido o células de planta incluyen, pero no se limitan a, transformación usando CaCl₂ y variaciones de la misma (Hanahan, J. Mol. Biol. 166 (4) 557-580, 1983)), captación de DNA directa en protoplastos (Krens y otros, Nature 296 72-74, 1982; Paszkowski y otros, EMBO J. 3 2717-2722, 1984), captación mediada por PEG hacia protoplastos (Armstrong y otros, Plant Cell Reports 9 335-339, 1990), bombardeo de micropartículas, electroporación (Fromm y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82 5824-5826, 1985), microinyección de DNA (Crossway y otros, Mol. Gen. Gen. 202 179-185, 1986; Fromm y otros Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82 5824-5826, 1985), bombardeo con micropartículas de explantes de tejido o células (Christou y otros, Plant Physiol. 87 671-674, 1988), infiltración a vacío de tejido con ácido nucleico o, en el caso de plantas, transferencia medida por T-DNA desde *Agrobacterium* al tejido de planta según se describe esencialmente (An y otros, EMBO J. 4 277-284, 1985; Dodds, Plant genetic engineering, 1985; Herrera-Estrella y otros, EMBO J. 2 987-995, 1983; Herrera-Estrella y otros, Nature 303 209-213, 1983).

Para el bombardeo de células con micropartículas, una micropartícula se impulsa hacia una célula para producir una célula transformada. Cualquier metodología y aparato de transformación balística de células adecuados pueden usarse al realizar la presente invención. Un aparato y procedimientos ejemplares son analizados por Stomp y otros (patente de EE.UU. N° 5122466) y Sanford y Wolf (patente de EE.UU. N° 4945050). Cuando se usan procedimientos de transformación balísticos, el constructo génico puede incorporar un plásmido capaz de replicarse en la célula que ha de transformarse. Ejemplos de micropartículas adecuadas para el uso en tales sistemas incluyen esferas de oro de

1 a 5 μm . El constructo de DNA puede depositarse sobre la micropartícula mediante cualquier técnica adecuada, tal como mediante precipitación.

5 El ácido nucleico que se define anteriormente en la presente invención, o un constructo genético que lo comprende, puede introducirse en una célula usando cualquier método conocido para la transfección o transformación.

10 La invención se refiere además a un método para la producción de plantas, células de plantas o tejidos de plantas transgénicas no monocotiledóneas que comprende la introducción en una planta, una célula de planta o un tejido de planta no monocotiledónea de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención enlazada operablemente a una secuencia de ácido nucleico asociada, en donde la secuencia de ácido nucleico asociada es heteróloga para el primer ácido nucleico. De acuerdo con otra modalidad preferida, la invención se refiere a una célula de planta o planta transgénica no monocotiledónea como la descrita aquí anteriormente en donde el ácido nucleico de la invención está establemente integrado en el genoma de la célula de planta o la planta no monocotiledónea.

15 Durante la transformación de una célula con el constructo genético de la invención, una planta entera puede regenerarse a partir de la misma. Tejido de planta capaz de una propagación clonal subsiguiente, ya sea mediante organogénesis o criogénesis, puede transformarse con un constructo genético de la presente invención y una planta entera regenerarse a partir del mismo. El tejido particular elegido variará dependiendo de los sistemas de propagación clonal disponibles, y mejor estudiados, para las especies particulares que se transforman. Objetivos de tejidos ejemplares incluyen discos foliares, polen, embriones, cotiledones, hipocotilos, megagametocitos, tejido calloso, tejido merismático existente (por ejemplo, meristemo apical, yemas auxiliares y meristemas radicales) y tejido meristemático inducido (por ejemplo, meristemo del cotiledón y meristemo del hipocotilo). El término "organogénesis", según se usa aquí, significa un procedimiento por el que se desarrollan secuencialmente vástagos y raíces a partir de centros meristemáticos. El término "embriogénesis", según se usa aquí, significa un procedimiento por el que se desarrollan juntos vástagos y raíces de un modo no concertado (no secuencialmente), ya sea a partir de células somáticas o gametos.

20 Las plantas no monocotiledóneas transformadas generadas pueden propagarse mediante una variedad de medios, tales como mediante propagación clonal o técnicas de mejora genética clásicas. Por ejemplo, una planta transformada de primera generación (o T1) puede autopolinizarse para dar transformantes de segunda generación (o T2) homocigóticos y las plantas T2 propagarse adicionalmente a través de técnicas de mejora genética clásicas. Las plantas transformadas generadas contempladas aquí pueden tomar una variedad de formas. Por ejemplo, pueden ser quimeras de células transformadas y células no transformadas; transformantes clonales (por ejemplo, todas las células transformadas para contener el casete de expresión); injertos de tejidos transformados y no transformados (por ejemplo, en plantas, un patrón radical transformado injertado a un esqueje no transformado).

35 La invención no solo se refiere a una planta o un tejido de planta no monocotiledóneas transgénica que comprende células de planta como las descritas aquí sino que también se extiende a las partes recolectables de la planta transgénica, preferiblemente seleccionadas del grupo que consiste en semillas, hojas, flores, frutos, cultivos tallosos, raíces, tubérculos, rizomas y bulbos.

40 La invención también se refiere a la progenie derivada de cualquiera de estas plantas o partes de plantas transgénicas.

45 La presente invención también abarca el uso de una secuencia de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia reguladora como la representada por el N° ID SEC 1 o un fragmento funcional o variante funcional de la misma, caracterizada como anteriormente por conducir la expresión constitutiva de una secuencia asociada en una célula de planta o una planta no monocotiledónea. También se incluye el uso de un ácido nucleico regulador híbrido como el definido anteriormente para conducir la expresión de una secuencia de ácido nucleico asociada en una célula de planta o una planta no monocotiledónea.

50 Descripción de las figuras

55 Fig. 1: Patrón de expresión de GUS típico en una planta de *Arabidopsis thaliana* transformada con un constructo p2203 y una planta de control. La secuencia reguladora de GOS2 muestra una fuerte expresión constitutiva en tejidos de vástagos, incluyendo los petiolos, el sistema vascular, los tricomas y en las puntas radicales. La expresión en otros tejidos radicales es inferior, pero todavía fácilmente apreciable.

60 Fig. 2: Expresión de GUS bajo el control de la secuencia reguladora de GOS2 (líneas AT0476-09 y AT0476-11), comparada con la expresión de GUS bajo el control del promotor 35S (línea WS35S:GUS). Para cada línea, se probaron 5 réplicas. Las plantas mostradas tienen 2 cotiledones y 2 hojas verdaderas y se tiñeron durante 1 hora (cuadro a) o se tiñeron durante la noche (cuadro b).

65 Fig 3: Expresión de GUS bajo el control de la secuencia reguladora de GOS2 (líneas AT0476-09 y AT0476-11), comparada con la expresión de GUS bajo el control del promotor 35S (línea WS35S:GUS). Para cada línea, se probaron 5 réplicas. Las plantas mostradas están en la fase de 10 hojas y se tiñeron durante 1 hora (cuadro a) o se tiñeron durante la noche (cuadro b).

ES 2 279 339 T3

Fig 4: Expresión de GUS bajo el control de la secuencia reguladora de GOS2 (líneas AT0476-09 y AT0476-11), comparada con la expresión de GUS bajo el control del promotor 35S (línea WS35S:GUS). Para cada línea, se probaron 5 réplicas. Las plantas mostradas están en la fase adulta con una inflorescencia y se tiñeron durante 1 hora (cuadro a) o se tiñeron durante la noche (cuadro b).

5

Ejemplos

La presente invención se ilustrará ahora con los siguientes ejemplos.

10 *Manipulación de DNA*

Todos los procedimientos de DNA se realizaron de acuerdo con protocolos estándar (Maniatis T y otros (2001). Molecular Cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, CSH, Nueva York).

15 Ejemplo 1

Clonación de GUS con secuencia codificante intrónica

20 El gen de β -glucuronidasa de *E. coli*, interrumpido por el segundo intrón del gen ST-LS1 específico para tejido inducible por luz de patata, se amplió a partir del vector pTHW136 (con un casete idéntico al de pMOG553, MOGEN internacional n.v, Leiden, Países Bajos). El cDNA se amplificó mediante PCR con DNA polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen) y usando un cebador de sentido que incluye attB1 (Nº ID SEC 2) y un cebador de antisentido que incluye attB2 (Nº ID SEC 3).

25 Las condiciones para la PCR eran: 2 minutos de desnaturalización a 94°C (1 ciclo); 35 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de reasociación a 58°C y 2 minutos de amplificación a 68°C, y finalmente 1 ciclo de 5 minutos de elongación a 68°C. Un fragmento prominente con el tamaño esperado de 2 kb se aisló del gel y se purificó usando el Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Orange, California).

30 El fragmento de PCR purificado se usó en una reacción Gateway™ BP (Invitrogen) estándar con pDONR201 como un vector receptor. La identidad y la composición de los pares de bases del inserto se confirmaron mediante secuenciación. La integridad del plásmido resultante se verificó usando digestiones de restricción y se le dio la denominación p0604 (clon de entrada). pDONR201 se obtuvo a partir de Invitrogen.

35 p0604 es un “clon de entrada” Gateway™ y se usó como tal en una reacción Gateway™ LR estándar, con p0640 como “vector de destino”. El vector resultante era p02203, su integridad también se comprobó mediante análisis de digestión por restricción. El vector, que contenía como elementos funcionales dentro de la región de T-DNA un gen marcador seleccionable y un “casete Gateway” destinados para clonación LR de secuencias de interés, se usó para la transformación de *Arabidopsis thaliana*. La expresión de estas secuencias de interés, al recombinarse en p0640, se condujo mediante la secuencia reguladora que se lista en el Nº ID SEC 1.

40

Ejemplo 2

Transformación de plantas

45

Cultivo de las plantas parentales

Para las plantas parentales, aproximadamente 12 mg de semillas de *Arabidopsis thaliana* silvestre (ecotipo Columbia) se suspendieron en 27,5 ml de solución de agar al 0,2%. Las semillas se incubaron durante 2 a 3 días a una temperatura de 4°C y a continuación se sembraron. Las plantas se germinaron bajo condiciones estandarizadas: 22°C durante el día, 18°C por la noche, con una humedad relativa de 65-70%, 12 horas de fotoperíodo y subirrigación con agua durante 15 minutos cada 2 ó 3 días. Las plántulas se trasplantaron a continuación a macetas con un diámetro de 5,5 cm, que contenían una mezcla de arena y turba en una relación de 1 a 3. Las plantas se hicieron crecer a continuación bajo las mismas condiciones estándar que se mencionan anteriormente.

55

Condiciones de crecimiento y preparación de Agrobacterium

Cepa de *Agrobacterium* C58C1 RIF con plásmido auxiliar pMP90 y vector p2203 se inoculó en un tubo de plástico de 50 ml que contenía 1 ml de LB (caldo de Luria-Bertani) sin antibiótico. El cultivo se batió durante 8-9 h a 28°C. A continuación, se añadieron 10 ml de LB sin antibiótico al tubo de plástico y se batió durante la noche a 28°C. Después de esto, se midió la DO a 600 nm. A una densidad óptica de aproximadamente 2,0 se añadieron al cultivo 40 ml de sacarosa al 10% y Silwet L-77 (una mezcla de heptametiltrisiloxano modificado con poli(óxido de alquileño) al 84% y aliloxipolietilenglicol-metil-éter al 16%, OSI Specialties Inc) al 0,05%. El cultivo de *Agrobacterium* así obtenido se usó para transformar las plantas desarrolladas.

65

ES 2 279 339 T3

Inmersión de flores

5 Cuando cada flor parental tenía una inflorescencia de 7-10 cm de altura, las inflorescencias se sumergieron en cultivo de *Agrobacterium* y se sometieron a turbulencia suavemente durante 2-3 segundos. Para cada transformación, se usaron 2 plantas. Posteriormente, las plantas se devolvieron a las condiciones de crecimiento que se describen anteriormente.

Recolección de semillas

10 5 semanas después de que las flores se sumergieran en el cultivo de *Agrobacterium*, el riego de las plantas se detuvo. Las plantas se incubaron adicionalmente a 25°C con un fotoperíodo de 20 horas. Una hora más tarde, las semillas se recogieron y se pusieron en una secadora de semillas durante una semana. A continuación, las semillas se limpiaron, se recogieron en tubos de plástico de 15 ml y se almacenaron a 4°C hasta el procesamiento adicional.

Generación de semillas T1

15 Semillas T0 transgénicas se seleccionaron para su expresión de marcador y se germinaron. Las plantas se hicieron crecer como se describe anteriormente, hasta que se recogían semillas T1. A las diferentes líneas se les dio el nombre AT0476-xx, donde xx es un número.

Ejemplo 3

Comparación de la secuencia reguladora de GOS2 y el promotor 35S en Arabidopsis

25 El patrón de expresión del gen de β -glucuronidasa y la fuerza de la secuencia reguladora de GSO2 se compararon con las del promotor 35S en *Arabidopsis*.

Material vegetal usado

30 AT0476-11: casete GOS2-GUS y casete marcador rastreable (vector p2203) (semillas T1) AT0476-09: casete GOS2-GUS y casete marcador rastreable (vector p2203) (semillas T1) WS35S:GUS: casete 35S-GUS, sin selección de marcador, línea homocigótica de Versailles (semillas homocigóticas T2), fondo Wassilewskija (WS).

Procedimiento

35 Alrededor de 100 semillas, después de mantenerse a una temperatura de 4°C durante al menos 2 días, se sembraron en suelo y las plantas se cultivaron bajo condiciones estándar: 22°C durante el día, 18°C por la noche, 65-70% de humedad relativa, 12 horas de fotoperíodo, subirrigación con agua durante 15 minutos cada 2 ó 3 días.

40 Cuando las plantas tenían 2 cotiledones y 2 hojas verdaderas, la expresión del marcador en líneas AT0476 se verificó y las plantas con un patrón de expresión del marcador uniforme se retuvieron.

45 A continuación, 10 plantas de cada una de las líneas GOS2 o 35S se aislaron cuidadosamente del suelo y se marcaron para la identificación. 5 de las plantas se tiñeron con respecto a GUS durante 1 hora, las otras 5 plantas se tiñeron durante la noche. El tiempo de tinción corto era necesario para determinar cualitativamente la intensidad relativa de los promotores. Si la reacción de tinción se saturaba en menos de 1 hora, el tiempo de incubación había de reducirse. En el caso de que la tinción fuera azul muy débil después de 1 hora, el tiempo de incubación puede incrementarse hasta 2-3 horas. Finalmente, las plantas teñidas se fotografiaron. Para cada línea, otras 20 plantas se aislaron cuidadosamente del suelo y se transfirieron a pequeñas macetas individuales para el cultivo adicional. Cuando las plantas habían alcanzado la fase de 10 hojas, de nuevo se aislaron 10 plantas de cada línea, se marcaron y se tiñeron como se describe anteriormente. Las plantas teñidas se fotografiaron. En la época de floración, 10 plantas por línea con silicuas en diversas fases de maduración se aislaron y se procesaron como anteriormente.

Procedimiento de tinción de plantas con respecto a GUS

55 El material se cubrió con acetona enfriada con hielo al 90% y se incubó durante 30 minutos a 4°C. Después de 3 lavados de 5 minutos con tampón Tris [15,76 g de Trizma HCl (Sigma T3253) + 2,922 g de NaCl en 1 l de doble agua doblemente destilada, pH ajustado hasta 7,0 con NaOH], el material se sumergió en una solución de Tris/ferricianato/X-Gluc [0,8 ml de tampón de Tris + 0,2 ml de material de ferricianato (0,33 g de ferricianato potásico (Sigma P3667) en 10 ml de tampón de Tris)+ 0,2 ml de material de X-Gluc (26,1 mg de X-Gluc (Europa Bioproducts ML 113A) en 500 μ l de DMSO)]. La infiltración a vacío se aplicó durante de 15 a 30 minutos. A continuación, las muestras se incubaron durante un tiempo apropiado (hasta 16 horas) a 37°C para el desarrollo del color azul. Las muestras se lavaron 3 veces durante 5 minutos con tampón de Tris. La clorofila se extrajo en una serie de etanol al 50%, 70% y 90% (cada uno durante 30 minutos) con reposiciones de la solución al 90% si es necesario.

65

ES 2 279 339 T3

Resultados

La secuencia reguladora de GOS2 muestra una fuerte expresión constitutiva en tejidos de vástago, incluyendo los petiolos, el sistema vascular y los tricomas. Excepto para las puntas radicales, la expresión en tejidos radicales es inferior, pero todavía es fácilmente detectable (Fig. 1).

Para todas las plantas con el mismo tiempo de incubación durante la tinción (1 hora o durante la noche), el patrón de expresión de GUS era similar. La tinción de plantas GOS2 era tan fuerte como para plantas 35S, en todas las fases que se muestreaban (2 hojas + 2 cotiledones, fase de 10 hojas y fase de floración). La expresión de GOS2 parece igualmente fuerte e igualmente constitutiva que la expresión de 35S en *Arabidopsis* (Figs 2, 3 y 4).

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de una secuencia de ácido nucleico reguladora aislada que comprende una secuencia reguladora como la representada en el N° ID SEC 1 o un fragmento funcional o una variante funcional de la misma, para conducir la expresión de una secuencia de ácido nucleico asociada en una planta o célula de planta no monocotiledónea, variante funcional que es capaz de hibridarse al ácido nucleico del N° ID SEC: 1 bajo condiciones restrictivas.

10 2. Uso de una secuencia de ácido nucleico reguladora aislada de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de ácido nucleico asociada es una secuencia de ácido nucleico aislada o una secuencia de ácido nucleico endógena para la célula huésped en la que se introduce dicha secuencia de ácido nucleico reguladora aislada.

15 3. Una célula de planta no monocotiledónea que comprende o que tiene establemente integrado en su genoma un ácido nucleico recombinante como el representado en el N° ID SEC 1 o un fragmento funcional o una variante funcional del mismo, variante funcional que es capaz de hibridarse al ácido nucleico del N° ID SEC: 1 bajo condiciones restrictivas.

20 4. Una célula de planta no monocotiledónea de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha célula de planta no monocotiledónea se deriva de una legumbre de pasto o forrajera, una planta ornamental, un cultivo de consumo, un árbol o un arbusto, preferiblemente de algodón, patata, tomate, col, remolacha azucarera, soja, judías, girasol o guisantes.

25 5. Un cultivo de células de planta, un callo o una planta que consiste esencialmente o en parte en células de planta de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4.

30 6. Una parte recolectable, un órgano, un tejido o un material de propagación de una planta de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia reguladora como la representada en el N° ID SEC: 1 como un fragmento funcional o como una variante funcional de la misma, para conducir la expresión de una secuencia de ácido nucleico asociada en una planta o célula de planta no monocotiledónea, variante funcional que es capaz de hibridarse al ácido nucleico del N° ID SEC 1 bajo condiciones restrictivas.

35 7. Método para la expresión de una secuencia de ácido nucleico en una planta o célula de planta no monocotiledónea, comprendiendo dicho método introducir en dicha planta o célula de planta una secuencia reguladora representada por el N° ID SEC 1 o un fragmento funcional o una variante funcional de la misma, variante funcional que es capaz de hibridarse al ácido nucleico del N° ID SEC: 1 bajo condiciones restrictivas y en donde dicha secuencia reguladora es capaz de conducir la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico que es una secuencia de ácido nucleico bien aislada o bien endógena.

40 8. Método para la producción de una planta, una célula de planta o un tejido de planta transgénica no monocotiledónea que comprende la introducción en dicha planta, célula de planta o tejido de planta no monocotiledónea de una primera molécula de ácido nucleico enlazada operablemente a una secuencia de ácido nucleico heteróloga asociada, en donde dicho primer ácido nucleico es la secuencia reguladora representada por el N° ID SEC: 1 o un fragmento funcional o una variante funcional de la misma, variante funcional que es capaz de hibridarse al ácido nucleico del N° ID SEC: 1 bajo condiciones restrictivas, y en donde dicha primera molécula de ácido nucleico es capaz de conducir la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico heteróloga asociada.

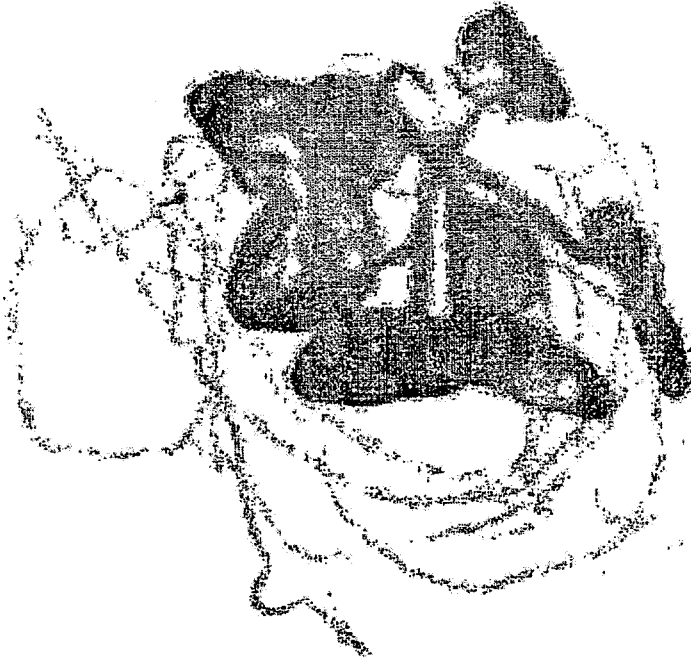
50

55

60

65

A



B

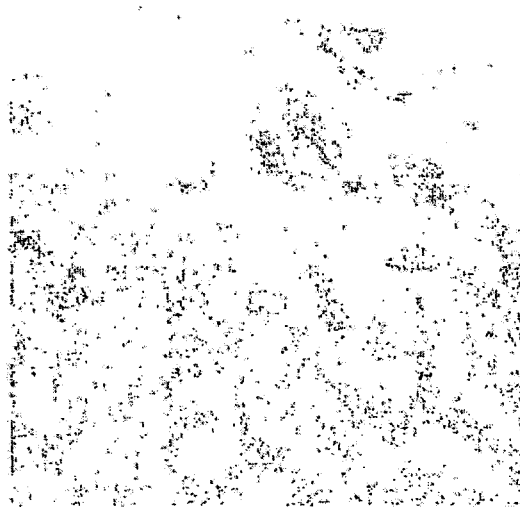


FIGURA 1

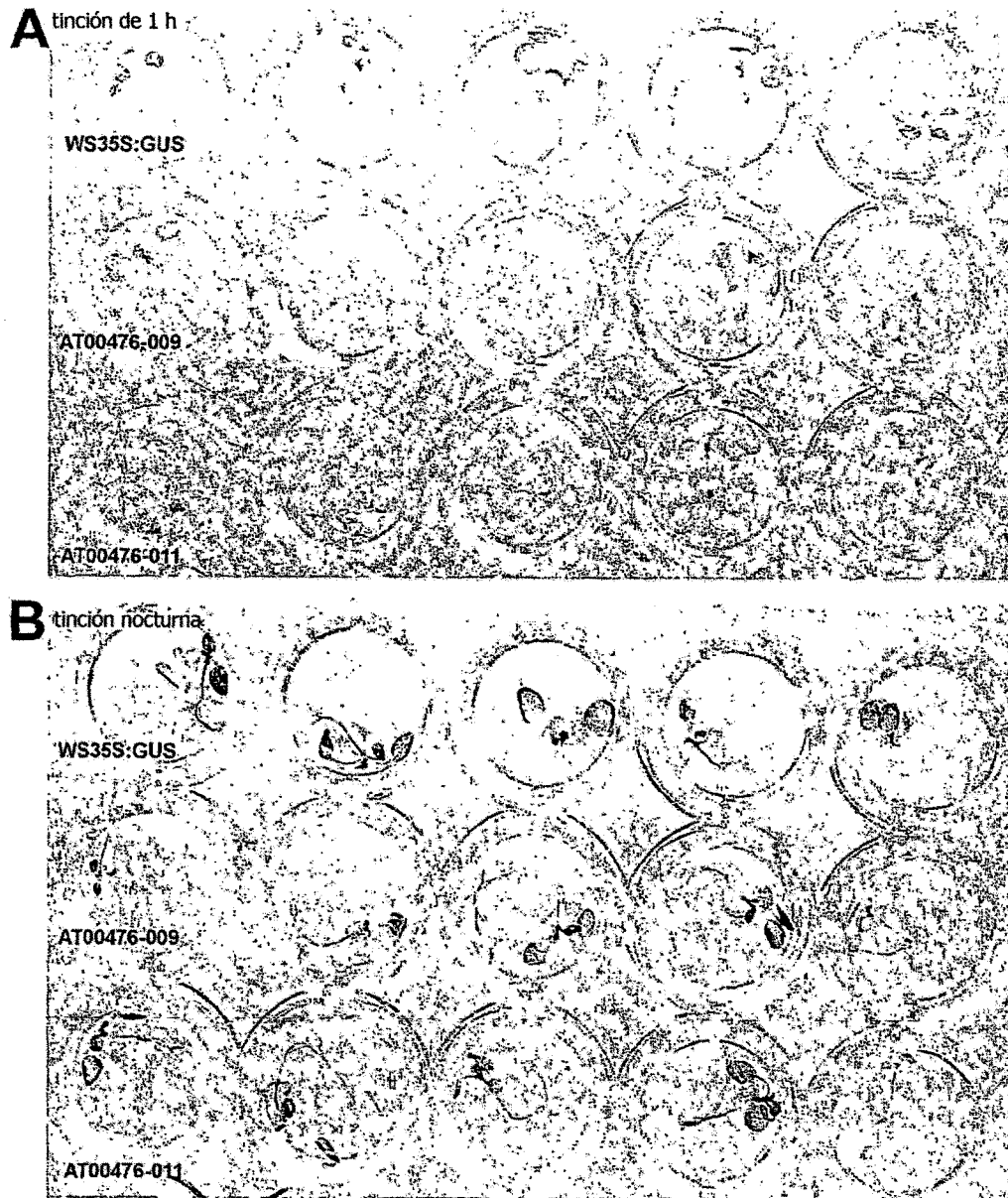


FIGURA 2

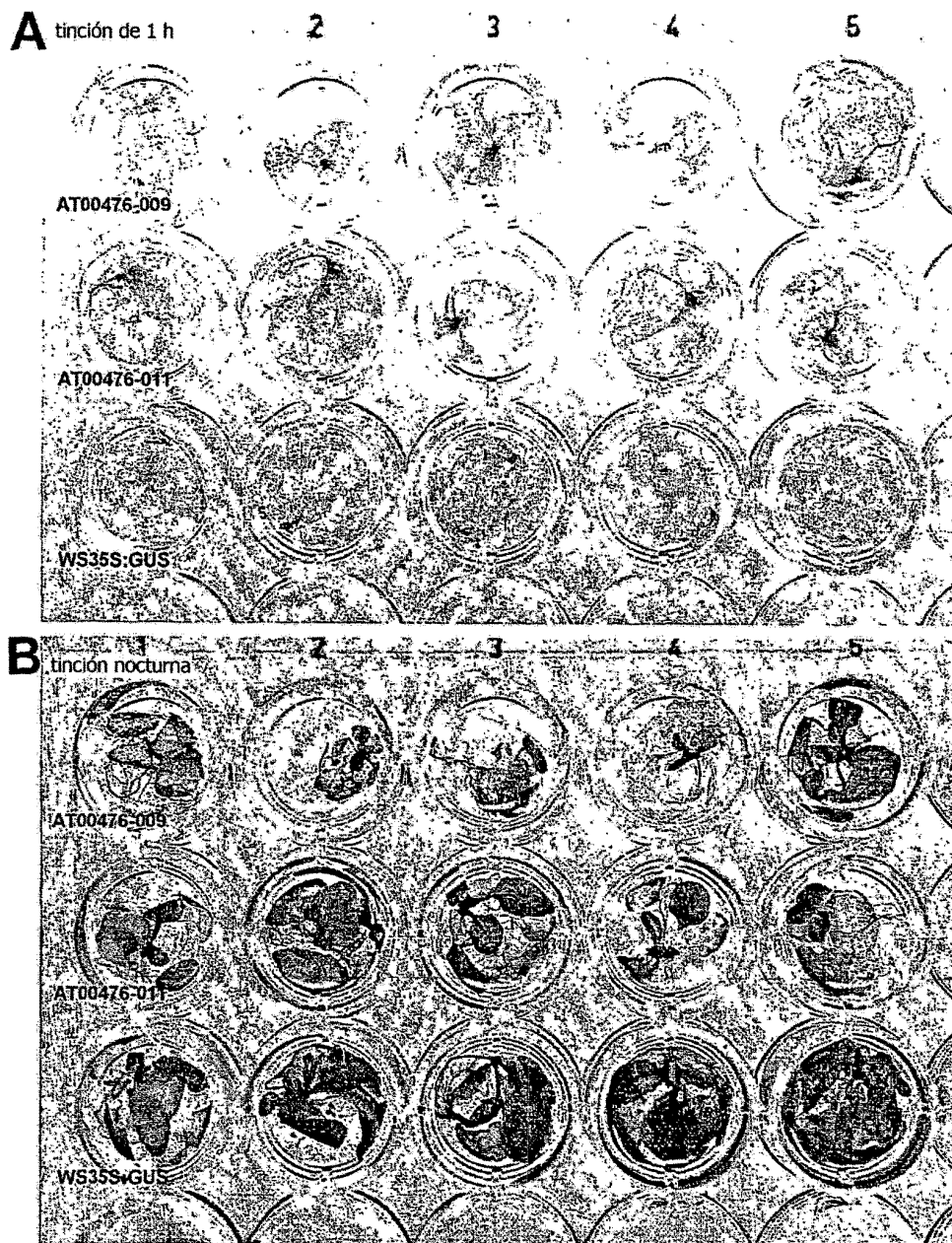


FIGURA 3

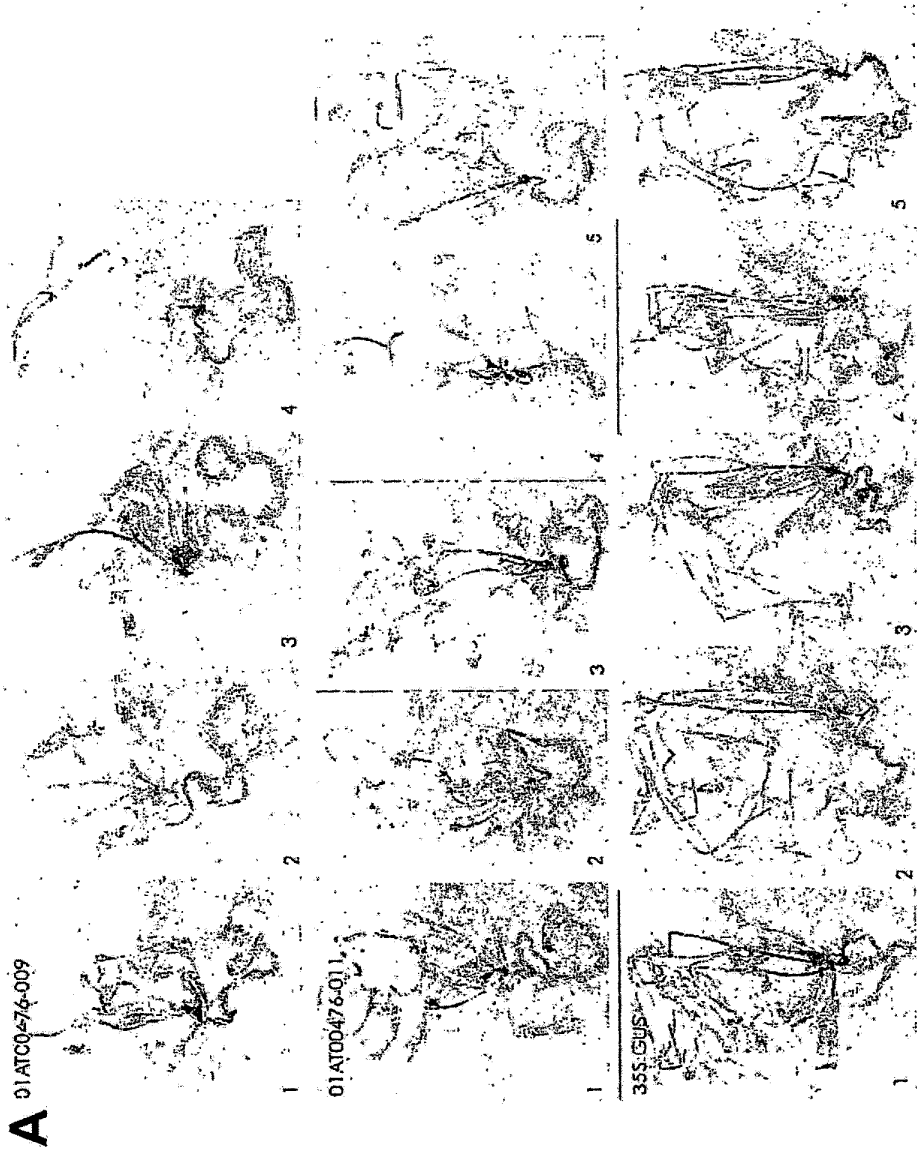


FIGURA 4



FIGURA 4 (continuación)

ES 2 279 339 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> CropDesign N.V.
- <120> Secuencia reguladora
- 5 <130> CD-072-PCT
- <150> EP 03075207.5
- <151> 2003-01-21
- 10 <160> 3
- <170> Patent In versión 3.1
- <210> 1
- <211> 2195
- 15 <212> DNA
- <213> *Oryza sativa*
- 20 <400> 1

	aatccgaaaa	gtttctgcac	cgttttcacg	tcctaactaa	caatataggg	aacgtgtgct	60
	aaatataaaa	tgagacctta	tatatgtagc	gctgataact	agaactatgt	aagaaaaact	120
25	catccacctt	cttttagtggc	aatcgggcta	aataaaaaag	agtcgctaca	ctagtttcgt	180
	tttccttagt	aattaagtgg	gaaaatgaaa	tcattattgc	ttagaatata	cgttcacatc	240
	tctgtcatga	agttaaatta	ttcgaggtag	ccataattgt	catcaaactc	ttcttgaata	300
	aaaaaatctt	tctagctgaa	ctcaatgggt	aaagagagat	atTTTTTTT	aaaaaaaaat	360
	agaatgaaga	tattctgaac	gtatcggcaa	agattttaa	atataattat	ataatTTTt	420
	agtttgtgca	ttcgttatat	cgcacgtcat	taaggacatg	tcttactcca	tctcaatTTT	480
30	tatttagtaa	ttaaagacaa	ttgacttatt	tttattattt	atctTTTTT	gattagatgc	540
	aaggtaactt	cgcacacact	ttgtgctcat	gtgcatgtgt	gagtgcaact	cctcatacac	600
	gttcaactag	cgacacatct	ccaatatcac	tcgcctattt	aatacattta	ggtagcaata	660
	tctgaattca	agcacttcac	catcaccaga	ccactTTTaa	taatatctaa	aatacaaaaa	720
	ataatTTTt	agaaatagcat	gaaaagtatg	aaacgaacta	tttaggTTTT	tcacatacaa	780
35	aaaaaaaaag	aatTTTgctc	gtgcgcgagc	gccaatctcc	catattgggc	acacaggcaa	840
	caacagagtg	gctgccca	gaacaacca	caaaaaacga	tgatctaacg	gaggacagca	900
	agtcgcaac	aacctTTTaa	cagcaggctt	tgccggccagg	agagaggagg	agaggcaaag	960
	aaaaccaagc	atcctcctcc	tcccactctat	aaattcctcc	cccctTTTcc	cctctctata	1020
	taggagggcat	ccaagccaag	aagagggaga	gcaccaagga	cacgcgacta	gcagaagccg	1080
40	agcgaccgcc	ttcttcgatc	catatcttcc	ggtcagattc	ttggtcgcac	tcttccctcc	1140
	tccacctcct	cctcacaggg	tatgtgcctt	tcggttgttc	ttggatttat	tgttctaggt	1200
	tgtgtagtac	ggcggttgat	gttaggaaag	gggatctgta	tctgtgatga	ttctgttctt	1260
	tggatttggg	atagaggggt	tcttgatggt	gcatgttatc	ggttcgggtt	gattagtagt	1320
	atggtTTTca	atcgtctgga	gagctctatg	gaaatgaaat	ggtttagggg	acggaatctt	1380
45	gcgattTTTt	gagtaccttt	tgTTTgaggt	aaaatcagag	caccggtgat	tttgcTTTgt	1440
	gtaataaaa	tacatttTgt	tggtcctcga	ttctggtagt	gatgcttctc	gatttgacga	1500
	agctatcctt	tgTTTattcc	ctattgaaca	aaaataatcc	aactttgaag	acggtcccgt	1560
	tgtgagatt	gaatgattga	ttcttaagcc	tgTccaaaat	ttcgcagctg	gcttgtTTtag	1620
	atacagtagt	ccccatcacg	aaattcatga	aaacagttat	aatcctcagg	aacaggggat	1680
50	tccctgttct	tccgatttgc	tttagtccca	gaatTTTttt	tcccaaatat	cttaaaaagt	1740
	cactttctgg	ttcagttcaa	tgaattgatt	gctacaaata	atgctTTTt	agcgttatcc	1800
	tagctgtagt	tcagTTTtata	ggtaataccc	ctatagTTTt	gtcaggagaa	gaacttatcc	1860
	gatttctgat	ctccattTTTt	aattatata	aatgaactgt	agcataagca	gtattcattt	1920
	ggattatttt	ttttattagc	tttcaccctt	tcattattct	gagctgaaag	tctggcatga	1980
55	actgtcctca	atTTTtgttt	caaattcaca	tcgattatct	atcgattatc	ctcttgtatc	2040
	tacctgtaga	agTTTtcttt	tggttattcc	ttgactgctt	gattacagaa	agaaatttat	2100
	gaagctgtaa	tcgggatagt	tatactgctt	gttcttatga	ttcatttctt	ttgtgcagtt	2160
	cttggtagt	cttgccactt	tcaccagcaa	agttc			2195

- 60 <210> 2
- <211> 61
- 65 <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>

ES 2 279 339 T3

<223> cebador de sentido attB1

<400> 2

5
ggggacaagt ttgtacaaa aagcaggctt cacaatgta cgtcctgtag aaacccaac 60
c 61

10

<210> 3

<211> 52

<212> DNA

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de antisentido attB2

20

<400> 3

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtt tggtagtca tggttgcct cc 52

25

30

35

40

45

50

55

60

65