

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
13 de Abril de 2006 (13.04.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/037834 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 15/29 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2005/070137

(22) Fecha de presentación internacional:
30 de Septiembre de 2005 (30.09.2005)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200402349 1 de Octubre de 2004 (01.10.2004) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS** [ES/ES]; C/ SERRANO, 117, E-28006
MADRID (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **POZO
BENITO, Juan, Carlos, del** [ES/ES]; Centro de Bi-
ología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de
Investigaciones Científicas, FTAD. CIENCIAS., UAM
CAMPUS DE CANTOBLANCO, E-28049 MADRID
(ES). **GUTIÉRREZ ARMENMTA, Crisanto** [ES/ES];
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo
Superior de Investigaciones Científicas, FTAD. CIEN-
CIAS., UAM CAMPUS DE CANTOBLANCO, E-28049
MADRID (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivin-
dicaciones y para ser republicada si se reciben modifica-
ciones
- con la parte de lista de secuencias de la descripción publi-
cada separadamente en forma electrónica y disponible por
medio de la Oficina Internacional previa petición

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: ATPSKP2D TRANSGENIC PLANTS, PRODUCTION METHOD THEREOF AND USES OF SAME

(54) Título: PLANTAS TRANSGÉNICAS ATPSKP2D, SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y SUS APLICACIONES

(57) Abstract: The invention relates to AtPSKP2D transgenic plants, the production method thereof and uses of same. More specif-
ically, the invention tackles the problem associated with obtaining novel transgenic plants that can adapt to restrictive environmental
situations, preferably by developing lateral roots. In particular, the invention relates to AtPSKP2D transgenic plants which can re-
spond to environmental situations and which contain a novel genetic material that can be used to control root development with the
specific expression of genes of interest in the pericycle cells that form the lateral roots (RLs). The aforementioned techniques can be
applied to plants of commercial interest, such that said transgenic plants can grow in media poor in nutrients or water and be fertilised
with a smaller concentration of fertilisers. As such, the inventive plants represent a significant innovation in the agri-food sector.

(57) Resumen: La presente invención se enfrenta al problema de proporcionar nuevas plantas transgénicas capaces de adaptarse
a situaciones limitantes del medio ambiente, preferentemente por su capacidad de desarrollar raíces laterales. Se describen plantas
transgénicas AtPSKP2D capaces de responder ante situaciones medioambientales que contienen un nuevo material genético que
permite el control del desarrollo radicular mediante la expresión de forma específica de genes de interés en la células del periciclo
formadoras de las raíces laterales (RLs). Estas técnicas pueden aplicarse a plantas de interés comercial de tal forma que estas plan-
tas transgénicas pueden crecer tanto en medios pobres en nutrientes o en agua, como fertilizadas con una menor concentración de
fertilizantes, por lo que representan una importante innovación en el sector agroalimentario.

WO 2006/037834 A1

TITULO**PLANTAS TRANSGÉNICAS A α PSKP2D, SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y SUS APLICACIONES****5 SECTOR DE LA TÉCNICA**

La invención tiene una aplicación en el sector de la agricultura, preferentemente en el desarrollo de plantas transgénicas. Esta invención describe una herramienta biotecnológica destinada a modificar el desarrollo radicular de las plantas, y por lo tanto, su acceso a los nutrientes y el agua en
10 función de las necesidades.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Las plantas, debido a su carácter sésil, necesitan adaptarse y responder a los diferentes ambientes en los que crecen. La arquitectura radicular está
15 directamente relacionada con la adquisición de nutrientes y agua del suelo, y por lo tanto con la adaptación de las plantas a los diferentes medioambientes. Por ello, estos organismos han desarrollado diferentes sistemas radiculares, que están determinados tanto por el número como por la longitud y la posición de las raíces laterales (RLs) desarrolladas. En muchos suelos, la disponibilidad
20 de ciertos nutrientes tales como el fosfato, el nitrato o el azufre, es un parámetro limitante para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Por ello, estos organismos han desarrollado diferentes sistemas que les permite cuantificar los niveles de estos nutrientes y responder tanto a nivel fisiológico como molecular para obtener estos nutrientes en caso de déficit. Así, por
25 ejemplo, una deficiencia de fosfato o de azufre estimula la formación de las raíces laterales, lo que incrementa la superficie de búsqueda de estos compuestos en el suelo circundante a la planta (revisado por López-Bucio et al. 2003, Current Opinión Plant Biology 6: 280-287). Las raíces laterales se forman a partir de unas células específicas en la raíz principal, llamadas células del periciclo. Drubovsky y colaboradores (Drubovsky et al. 2001, Planta, 214: 30-
30 36) han determinado que las células del periciclo adyacentes a los polos del xilema son las responsables de la formación de los primordios laterales. En un determinado momento del desarrollo las células del periciclo se paran en la

fase G1 del ciclo celular, manteniéndose en este estado hasta que se reactiva el proceso de división celular para dar lugar al primordio lateral (Beckman et al., J Exp Bot. 52: 403-11, 2001). La identificación de genes que se expresan en los primordios laterales y de mutantes que tienen alterado el desarrollo de las raíces laterales ha contribuido en gran medida a comenzar a entender las bases genéticas y moleculares que gobiernan este proceso (Casimiro et al. 2003, Trends Plant Science 8: 165-171). Sin embargo, los mecanismos que controlan el patrón espacio-temporal de formación de las raíces laterales, así como los mecanismos desencadenantes que hacen que las células del periciclo paradas en G1 re-entren en proliferación, son desconocidos hasta la fecha. Diversos resultados obtenidos del análisis de mutantes afectados en el desarrollo radicular han indicado que la hormona auxina y la proteólisis selectiva de proteínas a través de la ruta de la ubiquitina juega un papel crítico en la formación de las raíces laterales (Casimiro et al. 2003, Trends Plant Science 8: 165-171; Gray et al. 2001, Nature. 414: 271-6; Xie Q, et al. 2002, Nature 419: 167-170). Uno de los mutantes más severos en la respuesta a las auxinas es *axr1*. El gen *AXR1* codifica una proteína implicada en la modificación postraducciona de Culina1 con la proteína RUB. Culina1 es un componente estructural del complejo SCF. Este complejo interviene en la modificación de proteínas dianas con ubiquitina para su posterior degradación a través del proteosoma. Otro mutante de la respuesta a las auxinas, *tir1*, también tiene afectado la formación de RLs. *TIR1* codifica para una proteína con motivo-F que forma parte de un complejo ligasa E3 de ubiquitina que está implicada en el reclutamiento de proteínas dianas para su degradación (Gray et al. 2001, Nature, 414: 271-6). Mediante análisis genético, *TIR1* se ha situado por debajo de la función de *AXR1* en el proceso de formación de raíces laterales. Recientemente, Xie et al. (2002, Nature, 419: 167-170) describieron el gen *NAC*, que codifica para un factor de transcripción de la familia *NAM/CUC* (Aida M, et al. 1997, Plant Cell. 9: 841-57; Xie Q, et al. 2002, Nature, 419: 167-170), que funciona, aguas abajo de *TIR1*, como activador de formación de raíces laterales. La actividad de *NAC1* está también regulada mediante degradación selectiva a través de la ruta de la ubiquitina, implicando la función de la enzima E3 ligasa *SINAT5* (Xie Q, et al. 2002, Nature 419: 167-170). Estos

resultados indican que la degradación de reguladores a través de la ruta de la Ub juega un papel crítico en la formación de las raíces laterales. Además, estos datos han sugerido que las células del periciclo que van a dar lugar a los primordios laterales pueden estar paradas en G1 por la acción de un represor, y que posiblemente se degrade a través de la ruta de la Ub para permitir la re-entrada en la división celular de estas células. Sin embargo, aunque esta hipótesis es muy atractiva, hasta la fecha no existen evidencias experimentales que la sustenten.

Como se ha comentado anteriormente, la activación de genes implicados en la proliferación celular es necesaria para la activación y posterior desarrollo de los primordios laterales (Himanen et al. 2002, Plant Cell 14: 2339–2351). Diversos genes de proliferación se expresan constitutivamente en las células del periciclo, lo que los ha descartando como posibles candidatos responsables del disparo de la división celular en las células del periciclo (Mironov et al. 1997, Prog. Cell Cycle Res. 3: 29–41). Sin embargo, no se debe descartar la posibilidad de una modificación postraducciona de las proteínas codificadas por estos genes como el desencadenante de la reactivación de las células del periciclo. Debido a la parada de estas células del periciclo en G2, se especuló que la ciclina mitótica *B1;1* pudiera ser el gen regulador del proceso de formación de las LR. Sin embargo, la expresión ectópica del gen *CYCB1;1* bajo el control del promotor de la kinasa dependiente de ciclina *CDKA*, que se expresa en las células del periciclo, no incrementa la formación de primordios laterales (Doener, et al. 1996, Nature, 380: 520–523). Estos mismos autores han desarrollado una patente para el control del crecimiento de las plantas mediante la expresión de la *ciclina B1* (Methods for increasing growth and yield in plants (CYC1). Doerner, Lamb, Patente USA 6,252,139).

El gen *DFL1* pertenece a la familia de genes moduladores de la respuesta a las auxinas GH3. Mediante el análisis de un mutante para este gen, se ha observado que *DFL1* funciona en el desarrollo del tallo y de las raíces laterales, ya que dicho mutante genera muchas menos RLs sin afectar a la longitud de la raíz principal (Nakazawa et al. 2001, Plant J. 25: 213–221; Patente 2002-010786 Lateral root formation supresor gene. Miki Nakazawa et al.).

En resumen, para una buena adaptación de las plantas al medio ambiente, el desarrollo de un sistema radicular óptimo al terreno donde crecen es un proceso crítico para su supervivencia. Por ello, la manipulación de genes que permita controlar el sistema radicular es de gran interés agronómico, ya que se podrían obtener plantas que se adapten mejor a los diferentes medios ambientes hostiles (secos, pobres en nutrientes, etc). El incremento del sistema radicular hace que las plantas sean más eficientes en la captación de nutrientes y del agua, con lo que podría reducir tanto la cantidad de fertilizantes como de agua de regadío utilizados en diferentes cultivos. Para poder manipular genéticamente la arquitectura radicular es necesario conocer que genes están implicados en el desarrollo de las raíces. Sin embargo, los mecanismos genéticos y moleculares que determinan tanto el número como la localización de las RLs son completamente desconocidos. Asimismo, para evitar efectos secundarios en otras partes de las plantas, es muy importante disponer de promotores que permitan expresar de forma muy específica los genes de interés que controlen el desarrollo radicular.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Descripción breve

La presente invención se enfrenta al problema de proporcionar nuevas plantas transgénicas capaces de adaptarse a situaciones limitantes del medio ambiente, preferentemente por su capacidad de desarrollar raíces laterales.

Así, un objeto de la presente invención lo constituye una planta transgénica AtPSKP2D, en adelante planta transgénica AtPSKP2D de la presente invención, que contiene una secuencia de DNA AtPSKP2D que permite la expresión de una proteína de interés en las células de dicha planta, y que está constituida por una de las dos posibilidades siguientes:

- a) una secuencia de DNA promotora AtPSKP2D y una secuencia de DNA codificante de una proteína de interés, y
- b) una secuencia de DNA promotora y una secuencia de DNA codificante de una proteína AtPSKP2D

Otro objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de obtención de la planta transgénica AtPSPK2D, en adelante procedimiento de

obtención de plantas transgénicas AtPSPK2D de la presente invención, que consiste en la introducción en una planta de la secuencia de DNA AtPSKP2D que está constituida por una de las dos posibilidades siguientes:

- 5 a) una secuencia de DNA promotora AtPSKP2D y una secuencia de DNA codificante de una proteína de interés, y
- b) una secuencia de DNA promotora y una secuencia de DNA codificante de una proteína AtPSKP2D

Las secuencias de DNA, vectores de expresión y células o microorganismos transformados, desarrollados y necesarios para la puesta en práctica del procedimiento de obtención de plantas transgénicas AtPSPK2D de la presente invención, así como su empleo para la producción de dichas plantas, constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

Finalmente, otro objeto de la presente invención es el uso de las secuencias de DNA AtPSKP2D, vectores de expresión AtPSKP2D, células transformadas AtPSKP2D, y del procedimiento AtPSKP2D de la presente invención para la obtención de plantas transgénicas AtPSKP2D de interés comercial, entre otras, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención: arroz, trigo, soja, maíz, tomate, patata, tabaco, judía, melón, sandía, pepino, fresa, etc, así como diferentes especies frutales (naranja, limonero, peral, manzano, etc).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se enfrenta al problema de proporcionar nuevas plantas transgénicas capaces de adaptarse a situaciones limitantes del medio ambiente, preferentemente por su capacidad de desarrollar raíces laterales.

La solución proporcionada por esta invención se basa en que los inventores han observado que es posible obtener plantas transgénicas capaces de responder ante situaciones medioambientales porque contienen un nuevo material genético que permite el control del desarrollo radicular mediante la expresión de forma específica de genes de interés en la células del periciclo formadoras de las raíces laterales (RLs). Estas nuevas plantas transgénicas son plantas potencialmente mejoradas para su crecimiento tanto en medios pobres en nutrientes o en agua, como fertilizadas con una menor concentración

de fertilizantes, por lo que representan una importante innovación en el sector agroalimentario.

En la presente invención se describe la secuencia de DNA de un nuevo gen, la secuencia del gen *AtSKP2D* (ver SEQ ID NO2, entre el nucleótido 501-
5 2014), que codifica para una proteína con motivo-F, homóloga a SKP2 de humanos (Zhang, H., et al. 1995, *Cell* **82**: 915-925), la proteína *AtSKP2D* (SEQ ID NO3) y de su promotor. Esta familia de proteínas con motivo-F forman parte de los complejos E3-ligasas del tipo SCF que están implicados en la proteólisis de proteínas a través de la ruta de la ubiquitina. Datos recientes mostraron que
10 estas proteínas con motivo-F, y en concreto *AtSKP2A*, juegan un papel importante en el control de la proliferación celular mediante la proteólisis selectiva de reguladores de la división celular (del Pozo et al. 2002, *Plant Cell*. 14: 421-433).

Sin embargo, en la presente invención se ha observado por primera vez
15 que la expresión del gen *AtSKP2D* se induce en la raíz de la planta por tratamiento con las hormonas auxina y ácido abscísico (ABA) o por estrés salino (ver Figura 2 y Ejemplo 2). Dicho gen se expresa en parches discretos a lo largo de la raíz principal, y más concretamente en las células del periciclo (células a partir de las cuales se desarrollan las RLs) y con mayor intensidad
20 en las células próximas al xilema, que son las que se dividen para dar lugar a un primordio lateral (ver Figura 3 y Ejemplo 3). Análisis micro-morfológico de estos puntos de expresión de *AtSKP2D* han mostrado que en muchos de ellos aun no se ha producido ninguna división de las células del periciclo. Esto, junto al hecho de que muchos de estos puntos de expresión estén muy cercanos al
25 meristemo radicular, donde en condiciones normales no se forman primordios laterales, sugiere que estos parches de expresión son futuros puntos de formación de raíces laterales. Esta hipótesis se encuentra soportada igualmente por lo observado en plantas transgénicas *PSKP2D::GUS/axr1* (Figura 4 y Ejemplo 4).

30 Además, la invención está dirigida a desarrollar una secuencia de DNA promotora que permita la expresión génica en una planta, sino también, de forma preferente y específica, en las células del periciclo que van a dar lugar a la formación de raíces laterales para poder así controlar el desarrollo del

sistema radicular, es decir, en las raíces. Por ello, se han llevado a cabo delecciones de la secuencia de DNA del promotor de AtSKP2D para hallar el dominio responsable de la expresión en parches a lo largo de la raíz, identificándose una secuencia de DNA (PSKP2B549) (SEQ ID NO4) que dirige la expresión tan sólo en las células del periciclo de los puntos a lo largo de la raíz y no en otras células de otros órganos.

Así, un objeto de la presente invención lo constituye una planta transgénica AtPSKP2D, en adelante planta transgénica AtPSKP2D de la presente invención, que contiene una secuencia de DNA AtPSKP2D que permite la expresión de una proteína de interés en las células de dicha planta, y que está constituida por una de las dos posibilidades siguientes:

- c) una secuencia de DNA promotora AtPSKP2D y una secuencia de DNA codificante de una proteína de interés, y
- d) una secuencia de DNA promotora y una secuencia de DNA codificante de una proteína AtPSKP2D.

Tal como se utiliza en la presente invención el término "secuencia de DNA promotora AtPSPK2D" se refiere a una secuencia de DNA promotora de la expresión génica constituida por una de las secuencias de DNA pertenecientes al siguiente grupo:

- a) secuencia de DNA PSKP2D (SEQ ID NO1),
- b) secuencia de DNA PSKP2D549 (SEQ ID NO4),
- c) un fragmento de las secuencias de DNA de a) y b),
- d) secuencia de DNA análoga a las secuencias de a), b) y c), y
- e) cualquier secuencia de DNA que comprenda la secuencia de DNA de a), b), c) o d) y que sea capaz de mantener su misma actividad reguladora de la expresión génica.

El término "secuencia de DNA codificante de una proteína de interés" tal como se utiliza en la presente invención se refiere a:

- a) una secuencia de DNA codificante de una proteína directamente implicada en la formación y desarrollo de las raíces laterales para manipular la arquitectura radicular, es decir, capaz de modificar la arquitectura radicular de una planta - tanto el número como la posición de las raíces laterales - como por ejemplo, a título ilustrativo

- y sin que limite el alcance de la presente invención, las secuencias de DNA codificantes de las proteínas pertenecientes al siguiente grupo: la secuencia AtPSKP2D (SEQ ID NO2 codificante de la proteína de SEQ ID NO3), AtE2Fc, AtE2Fa, AtCYCA, AtCDKB1, AtKRP1, AtKRP2, AtCDT1, AtCDC6 (Vandepoele, et al. *Plant Cell* 2002, 14: 903-916.), AtAXR1 (Leyser et al. *Nature* 1993, 364: 161-164), AtECR1 (del Pozo et al. *Science* 1998, 280:1760-1763), AtTIR1 (Ruegger et al. 1998, *Genes Dev.* 12: 198-207), AtIAA14 (Fukaki et al. 2002, *Plant J.* 29: 153-168), AtNAC1 (Xie et al. 2000, *Gene Dev.* 14: 3024-3036), y
- b) una secuencia de DNA codificante de una proteína de interés comercial e industrial cuya expresión en la planta, y más preferentemente en la raíz, permita su recogida y purificación posterior, como por ejemplo, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, perteneciente al siguiente grupo: diferentes tipos de inmunoglobulinas (como por ejemplo IgGs contra la caries), de proteínas de uso médico (como por ejemplo la insulina o la relaxina), de diferentes tipos de fármacos, péptidos antimicrobianos y antifúngicos, y proteínas de interés agroalimentario (como por ejemplo, fitasas, liquenasas, transglutaminasas o glicosiltransferasas).

El término “una secuencia de DNA promotora” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a cualquier secuencia de DNA promotora capaz de regular la expresión génica en plantas como por ejemplo, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, un promotor fuerte constitutivo, como por ejemplo el promotor del virus del mosaico 35S, o un promotor que se exprese en todas las células del periciclo, como por ejemplo el de la kinasa dependiente de ciclinas del tipo A o del tipo B (Vandepoele, et al. *Plant Cell* 2002, 14: 903-916).

El término “secuencia de DNA codificante de una proteína AtPSKP2D” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a la secuencia de DNA del gen AtPSKP2D (SEQ ID NO2) codificante de la proteína AtPSKP2D (SEQ ID NO3), así como cualquier forma análoga de esta secuencia de DNA.

Un objeto particular de la presente invención lo constituye una planta transgénica AtPSKP2D de la presente invención en la que la secuencia de DNA promotora AtPSPK2D es la secuencia de DNA PSKP2D (SEQ ID NO1). Una realización particular de esta es la planta transgénica PSKP2D::GUS, y las
5 plantas *PSKP2B::GUS/axr1-12* y *PSKP2B::GUS/axr1-3*, generadas en la presente invención (ver Ejemplo 1 y 4).

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una planta transgénica AtPSKP2D que contiene una secuencia de DNA AtPSKP2D que permite la expresión de una proteína de interés de manera específica en las
10 células del periciclo que van a dar lugar a la formación de raíces laterales y que está constituida por una de las posibilidades siguientes:

- a) secuencia de DNA PSKP2D549 (SEQ ID NO4),
- b) un fragmento de las secuencias de DNA de a),
- c) secuencia de DNA análoga a las secuencias de a) y b), y
- 15 d) cualquier secuencia de DNA que comprenda la secuencia de DNA de a), b), o c) y que sea capaz de mantener su misma actividad reguladora de la expresión génica.

Una realización particular de la presente invención lo constituye una planta transgénica AtPSKP2D de la presente invención en la que la secuencia
20 de DNA promotora AtPSPK2D es la secuencia de DNA PSKP2D549 (SEQ ID NO4). Una realización particular de esta es la planta transgénica PSKP2D549::GUS, generada en la presente invención (ver Ejemplo 5).

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una planta transgénica AtPSKP2D de la presente invención en la que la secuencia de
25 DNA codificante de una proteína de interés es la secuencia de DNA codificante de la proteína AtPSKP2D (SEQ ID NO2).

Otro objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de obtención de la planta transgénica AtPSPK2D, en adelante procedimiento de obtención de plantas transgénicas AtPSPK2D de la presente invención, que
30 consiste en la introducción en una planta de la secuencia de DNA AtPSKP2D que está constituida por una de las dos posibilidades siguientes:

- c) una secuencia de DNA promotora AtPSKP2D y una secuencia de DNA codificante de una proteína de interés, y

10

- d) una secuencia de DNA promotora y una secuencia de DNA codificante de una proteína AtPSKP2D.

Una realización particular de la presente invención lo constituye un procedimiento de obtención de plantas transgénicas AtPSPK2D que
5 comprende los siguientes pasos:

- a) obtención de un vector de expresión que contiene una secuencia de DNA AtPSPK2D,
b) obtención de microorganismos portadores del vector a), y
c) transformación de las plantas con el vector de a) o con el
10 microorganismo de b).

Las secuencias de DNA, vectores de expresión y células o microorganismos transformados, desarrollados y necesarios para la puesta en práctica del procedimiento de obtención de plantas transgénicas AtPSPK2D de la presente invención, así como su empleo para la producción de dichas
15 plantas, constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

Así, otro objeto de la presente invención lo constituye una secuencia de DNA AtPSK2D, en adelante secuencia de DNA AtPSKP2D de la presente invención, que permite la expresión de una proteína de interés en las células de planta y que está constituida por una de las posibilidades siguientes:

- 20 a) una secuencia de DNA promotora AtPSKP2D y una secuencia de DNA codificante de una proteína de interés, y
b) una secuencia de DNA promotora y una secuencia de DNA codificante de una proteína AtPSKP2D

Un objeto particular de la presente invención lo constituye una secuencia
25 de DNA AtPSK2D de la invención en la que la secuencia de DNA promotora AtPSKP2D está constituida por una de las secuencias de DNA pertenecientes al siguiente grupo:

- a) secuencia de DNA PSKP2D (SEQ ID NO1),
b) secuencia de DNA PSKP2D549 (SEQ ID NO4),
30 c) un fragmento de las secuencias de DNA de a) y b),
d) secuencia de DNA análoga a las secuencias de a), b) y c), y

- e) cualquier secuencia de DNA que comprenda una secuencia DNA de a), b), c) o d) y que sea capaz de mantener su misma actividad reguladora de la expresión génica.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una
5 secuencia de DNA AtPSK2D de la invención en la que la secuencia de DNA codificante de una proteína de interés está constituida por una de las siguientes secuencias de DNA:

- a) una secuencia de DNA codificante de una proteína directamente implicada en la formación y desarrollo de las raíces laterales para
10 manipular la arquitectura radicular, es decir, capaz de modificar la arquitectura radicular de una planta - tanto el número como la posición de las raíces laterales - como por ejemplo, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, las secuencias de DNA codificantes de las proteínas pertenecientes al siguiente
15 grupo: la proteína AtPSKP2D (SEQ ID NO2 codificante de la proteína de SEQ ID NO3), AtE2Fc, AtE2Fa, AtCYCA, AtCDKB1, AtKRP1, AtKRP2, AtCDT1, AtCDC6 (Vandepoele, et al. *Plant Cell* 2002, 14: 903-916.), AtAXR1 (Leyser et al. *Nature* 1993, 364: 161-164), AtECR1 (del Pozo et al. *Science* 1998, 280:1760-1763), AtTIR1
20 (Ruegger et al. 1998, *Genes Dev.* 12: 198-207), AtIAA14 (Fukaki et al. 2002, *Plant J.* 29: 153-168) y AtNAC1 (Xie et al. 2000, *Gene Dev.* 14: 3024-3036), y
- b) una secuencia de DNA codificante de una proteína de interés comercial e industrial cuya expresión en la planta, y más
25 preferentemente en la raíz, permita su recogida y purificación posterior, como por ejemplo, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, perteneciente al siguiente grupo: diferentes tipos de inmunoglobulinas (como por ejemplo IgGs contra la caries), de proteínas de uso médico (como por ejemplo la insulina
30 o la relaxina), de diferentes tipos de fármacos, péptidos antimicrobianos y antifúngicos, y proteínas de interés agroalimentario (como por ejemplo, fitasas, liquenasas, transglutaminasas o glicosiltransferasas).

Estas proteínas de interés así como las secuencias de DNA codificantes de las mismas son conocidas por un experto en la materia e incluyen igualmente todas aquellas que se identifiquen en el futuro.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una
5 secuencia de DNA AtPSK2D de la invención en la que la secuencia de DNA promotora es cualquier secuencia de DNA promotora capaz de regular la expresión génica en plantas como por ejemplo, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, un promotor fuerte constitutivo, como por ejemplo el promotor del virus del mosaico 35S, o un promotor que se exprese
10 en todas las células del periciclo, como por ejemplo el de la kinasa dependiente de ciclinas del tipo A (CDKA) o del tipo B (Vandepoele, et al. *Plant Cell* 2002, 14: 903-916)

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una secuencia de DNA AtPSK2D de la invención en la que la secuencia de DNA
15 codificante de una proteína de interés es la secuencia de DNA AtPSKP2D (SEQ ID NO2) codificante de la proteína de SEQ ID NO3, así como cualquier forma análoga de esta secuencia de DNA.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "análoga" pretende incluir a cualquier secuencia de nucleótidos que pueda ser aislada o construida
20 en base a las secuencias de DNA mostradas en la presente invención, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o
25 en el interior de la secuencia.

En general, una secuencia de ADN análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos comentadas anteriormente. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "sustancialmente homóloga" significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de
30 identidad, a nivel de nucleótidos, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.

La secuencia de ADN promotora AtPSKP2D (SEQ ID NO1) y del gen AtPSKP2D (SEQ ID NO2) de la invención proceden de *Arabidopsis thaliana* y

pueden encontrarse en formas homólogas en otras especies de plantas superiores de interés comercial, entre otras, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención: arroz, trigo, soja, maíz, tomate, tabaco, judía, así como diferentes especies frutales (naranja, limonero, etc), donde pueden estar de forma natural o en otro caso, también podrían estar como resultado de un proceso de transformación génica en el que el organismo transformado reproduzca dichas moléculas de ADN. Estas formas homólogas de la secuencia de ADN promotora AtPSKP2D (SEQ ID NO 1) y del gen AtPSKP2D (SEQ ID NO2) de la invención pueden ser aisladas, mediante técnicas convencionales, a partir del ADN de cualquier planta que las contenga y mediante el empleo de sondas o de oligonucleótidos, preparados gracias a la información de las secuencias de nucleótidos de dichas moléculas de ADN proporcionadas en esta invención, por cualquier experto en la materia.

Por otro lado, a partir de las secuencias de DNA promotoras de la presente invención, AtPSKP2D y PSKP2D549, un experto en la materia puede fácilmente obtener otras delecciones o fragmentos que permitan regular la expresión génica específica o no de órgano, y preferentemente otras secuencias de DNA promotoras de forma específica de un gen de interés en la raíz.

La secuencia de DNA AtPSK2D de la invención puede ser utilizada, en general, en la generación de un vector de expresión que permite la expresión de estas proteínas en una amplia gama de células huésped.

Por lo tanto, la invención también se refiere a un vector de expresión que comprende la secuencia de DNA AtPSKP2D de la invención, en adelante vector de expresión AtPSKP2D de la presente invención, y que permite la transformación o transfección de microorganismos y células y la posterior obtención de las plantas transgénicas AtPSKP2D de la invención. Como realizaciones particulares del vector de expresión AtPSKP2D de la invención se han generado los vectores pBI101-PSKP2D (ver Ejemplo 1) y el vector pBI101-PSKP2D549 (ver ejemplo 5).

En general, el vector de expresión AtPSKP2D de la presente invención comprende, al menos, una secuencia de DNA AtPSKP2D de la invención y, al menos, un promotor que dirige la transcripción del gen de interés (la secuencia

de DNA promotora la contiene la secuencia de DNA AtPSKP2D), al que está operativamente enlazado, y otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción del gen de interés y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), etc. Ejemplos de vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso concreto entre plásmidos de expresión de plantas (Rothstein et al. (1987) Promoter cassettes, antibiotic-resistance genes, and vectors for plant transformation *Gene* 53:153-61; Potrykus, I. (1991). Gene transfer to plants: Assessment of published approaches and results. *Annu. Rev. Pl. Physiol. Pl. Mol. Biol.* 42, 205-255.), virus ("Plant Virology Protocols" From Virus Isolation to Transgenic Resistance Edited by: Gary D. Foster University of Bristol, Bristol, UK Published: 1998), que pueden contener, además, un origen bacteriano o de levadura de replicación para que pueda ser amplificado en bacterias o levaduras, así como un marcador utilizable para seleccionar las células transfectadas diferente al gen o genes de interés. Para la transformación de las plantas se pueden utilizar diferentes métodos - vectores plasmidicos, liposomas, electroporación, microinyección, etc - descritos en diversos manuales (ver por ejemplo: (Plant Gene Transfer and Expression Protocols Jones, Heddwyn University of Hertfordshire, Hatfield, UK. Human Press Publishers). La elección del vector dependerá de la célula hospedadora y de la planta en la que se va a introducir posteriormente.

Otro objeto de la invención lo constituye un microorganismo o célula, en adelante célula AtPSKP2D de la invención, que contiene la secuencia de DNA AtPSKP2D o el vector de expresión AtPSKP2D de la invención.

Finalmente, otro objeto de la presente invención es el uso de las secuencias de DNA AtPSKP2D, vectores de expresión AtPSKP2D, células transformadas AtPSKP2D, y del procedimiento AtPSKP2D de la presente invención para la obtención de plantas transgénicas AtPSKP2D de interés comercial, entre otras, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención: arroz, trigo, soja, maíz, tomate, patata, tabaco, judía,

melón, sandía, pepino, fresa, etc, así como diferentes especies frutales (naranja, limonero, peral, manzano, etc).

DESCRIPCIÓN DE FIGURAS

- 5 **FIGURA 1: Expresión del gen GUS mediante la secuencia de DNA promotora AtPSKP2D.** La secuencia de DNA promotora de AtPSKP2D se fusionó al gen reportador GUS (*pSKP2D::GUS*) para analizar el patrón de expresión de dicho gen. A) Plántulas transgénicas portadoras de la construcción *pSKP2D::GUS* de 6 días teñidas para actividad GUS. B) Actividad GUS en cotiledones (detalle del tejido vascular y de los estomas). C) Actividad GUS en flores jóvenes. D) Actividad GUS en una flor madura, mostrando tinción en los sépalos, en los pétalos, en los estambres y en el carpelo.

- Figura 2: La secuencia de DNA promotora AtPSKP2D induce la expresión de GUS por auxinas, ácido abscísico (ABA), sal y deficiencia nutricional.** A, 15 Control; B, Auxinas; C, ABA; D, NaCl; E, +PI, con fosfato; F, -PI, sin fosfato.

- Figura 3: La secuencia de DNA promotora AtPSKP2D induce la expresión de GUS en las células del periciclo.** A) Plántulas transgénicas portadoras de la construcción *pSKP2D::GUS* de 6 días teñidas para actividad GUS. B) Detalle de los puntos de tinción a lo largo de la raíz. C) Corte transversal de unos de 20 los puntos mostrados en B, y más cercanos al meristemo radicular, que muestra tinción GUS en las células del periciclo.

- Figura 4: La expresión génica de GUS inducida por La secuencia de DNA promotora AtPSKP2D está disminuida en las raíces de los mutantes *axr1*.** La construcción *pSKP2D::GUS* se introdujo en los mutantes *axr1-3* y *axr1-12*. 25 Raíces de las plantas *axr1-3/pSKP2D::GUS* y *axr1-12/pSKP2D::GUS* se teñieron para actividad GUS. Como se muestran en las fotografías, los mutantes *axr1* (*axr1-3* y *axr1-12*) desarrollan menos puntos de expresión de GUS a lo largo de la raíz principal.

- Figura 5: Expresión génica de GUS específica en la raíz inducida por La secuencia de DNA promotora PSKP2D549.** La región promotora que 30 comprende aproximadamente los primeros 549 pares de bases aguas arriba del ATG del gen *AtSKP2D* se fusionó al gen reportador GUS (*pSKP2D549::GUS*) para analizar la capacidad y el patrón de expresión de

dicho fragmento de DNA. Plántulas transgénicas portadoras de la construcción *pSKP2D::GUS* de 6 días teñidas para actividad GUS. A) Parte apical de plántulas *pSKP2D::GUS* y *pSKP2D549::GUS* B) Parte distal de las raíces de plántulas *pSKP2D::GUS* y *pSKP2D549::GUS*. C) Parte apical de las raíces de plántulas *pSKP2D::GUS* y *pSKP2D549::GUS*.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

Ejemplo 1.- Clonaje de una secuencia de DNA que controla la expresión de genes en puntos de formación de las raíces laterales (PSKP2D) y en los meristemos apical y radicular.

La secuencia de DNA del gen *AtSKP2D* se identificó por homología de secuencia al gen codificante de la proteína de humanos SKP2, que está implicada en el control del ciclo celular y en el desarrollo de diversos tumores (Zhang, H., et al. 1995, Cell **82**: 915-925). Para aislar esta secuencia de DNA *AtSKP2D*, se diseñaron a partir de la secuencia anotada en el banco de DNA del genoma de *Arabidopsis* (<http://www.arabidopsis.org>) los cebadores de la región codificante del cDNA de dicho gen (P3: 5' ATGGTGAGTG AAGGAGCAAC AAG 3' (SEQ ID NO5) y P4: 5' TCAATGCGCCGGGTGAGGGTA 3' (SEQ ID NO 6)) y se amplificó mediante PCR, utilizando una genoteca de flores de *Arabidopsis thaliana* como DNA molde. Dicho cDNA se clonó en el vector PCR2.1 (Invitrogen). De dicho clonaje se secuenciaron varios clones obteniéndose de todos ellos la misma secuencia de DNA, que correspondía a la secuencia de DNA *AtSKP2D* (SEQ ID NO2).

Para analizar la capacidad reguladora de la expresión génica de la secuencia de DNA promotora *AtSKP2D* a lo largo del desarrollo de las plantas se han generado plantas transgénicas que portan la secuencia de DNA del promotor del gen *AtSKP2D* capaz de dirigir la expresión del gen reportador GUS. Para clonar la secuencia de DNA del promotor del gen *AtSKP2D* se amplificó un fragmento de 1740 pares de bases, que supuestamente debería de contener toda la información de expresión del gen *AtSKP2D*, mediante PCR utilizando los oligonucleótidos P1: 5'-GAAGATTTGGGGGAAGCTGCCC-3' (SEQ ID NO7) y P2: 5'-GCTCCTAGGTACTCACCATCCTTGAAGCGG-3' (SEQ ID NO8). Dichos cebadores se diseñaron a partir de la secuencia anotada del

genoma de *Arabidopsis*. La secuencia de DNA del promotor se secuenció resultando una secuencia de DNA de 1740 nucleótidos (SEQ ID NO1). La secuencia de DNA amplificada, SEQ ID NO1, se clonó en el vector PCR2.1 (Invitrogen) generando el vector PCR2.1-PSKP2D. Este vector se digirió con las enzimas de restricción BamHI y SpeI para clonarlo posteriormente en el vector pBI101 (Clontech), que aporta la secuencia de DNA codificante del gen GUS utilizado como reportero, generando el vector pBI101-PSKP2D. El vector pBI101-PSKP2D se introdujo en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 mediante choque térmico (cepa *Agrobacterium tumefaciens* PSKP2D). Este *Agrobacterium* se utilizó para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia mediante infiltración (Bechtold et al. 1993. C. R. Acad. Sci. Paris Life Sci. 316: 15–18). Las plantas transgénicas portadoras de la secuencia de DNA del promotor del gen AtSKP2D fusionado al gen reportero β -glucoronidasa (GUS) (Jefferson et al., 1987. EMBO J. 6: 3901–3907), plantas transgénicas PSKP2D::GUS, se aislaron mediante resistencia al antibiótico kanamicina, y representan una realización particular de la planta transgénica AtPSKP2D de la presente invención.

Estas plantas transgénicas se analizaron mediante tinción histoquímica de la actividad GUS de acuerdo con el protocolo descrito por del Pozo et al. (2002, Plant Cell, 14: 421-433). Se identificaron 35 líneas diferentes y 32 de ellas mostraban el mismo patrón de tinción GUS, y de estas, dos líneas independientes fueron analizadas en más detalle. Un análisis histoquímico de estas plantas transgénicas ha mostrado que la secuencia de DNA del promotor *AtSKP2D* es capaz de dirigir la expresión del gen reportador GUS a lo largo de la raíz principal (Figura 1A), en zonas de división celular (meristemos apical y radicular), en el tejido vascular y en los estomas de las hojas (Figura 1).

Ejemplo 2.- La expresión génica a partir del promotor AtSKP2D es controlada por diferentes factores ambientales-hormonales

Diversos factores ambientales (NaCl) u hormonales (auxina, ABA) son capaces de inducir la expresión génica a través del promotor AtSKP2D en la raíz. La mayoría de estos factores están relacionados con el desarrollo del sistema radicular. Por ejemplo, las auxinas inducen la formación de raíces laterales; la deficiencia nutricional o de agua (salinidad) estimula el desarrollo

del sistema radicular para incrementar la superficie de búsqueda de nutrientes o agua en el suelo. Para analizar como diferentes estímulos que afectan a la formación de las raíces laterales modifican la expresión a través de la secuencia de DNA del promotor *AtSKP2D*, plantas PSKP2D::GUS de 5 días se

5 trataron con 0.1 μ M 2,4-D (auxina), 1 μ M de ABA ó 150 mM de sal (NaCl) durante 16 horas. Estas plantas se tiñeron posteriormente para la actividad GUS tal como se indica en el Ejemplo 1. Como se observa en la Figura 2 (A, B, C y D), estos tres estímulos incrementan la expresión de GUS a través del promotor del gen *AtSKP2D*.

10 Además, para analizar el efecto de la deficiencia nutricional sobre la expresión génica a partir del promotor *AtSKP2D*, plantas transgénicas PSKP2D::GUS de 5 días se crecieron durante 6 días más en un medio MS con (+Pi) o sin (-Pi) de fosfato. Posteriormente, estas plantas se tiñeron para la actividad GUS para analizar la expresión génica a partir del promotor *AtSKP2D*,

15 que como se observa en la Figura 2 (E y F), se induce claramente cuando las plantas crecen en un medio deficiente en nutrientes (-Pi, Figura 2F).

Ejemplo 3.- La expresión génica a partir del promotor *AtSKP2D* se produce en las células del periciclo formadoras de las raíces laterales.

El desarrollo de la invención se ha centrado en el análisis histoquímico

20 de las plantas transgénicas PSKP2D::GUS, que mostró la expresión de este gen GUS en puntos discretos a lo largo de toda la raíz (Figura 3A y 3B), que se correlacionan con los puntos de formación de las raíces laterales. Cortes transversales de estos puntos de expresión con actividad GUS han mostrado que el promotor del gen *AtSKP2D* (PSKP2D) dirige la expresión del gen GUS

25 en las células del periciclo, con mayor intensidad en las células próximas al xilema, que son las que se dividen para dar lugar a un primordio lateral (RLs) (Figura 3C).

El análisis micro-morfológico de estos puntos de expresión del gen GUS en estas plantas transgénicas han mostrado que en muchos de ellos aun no se

30 ha producido ninguna división de las células del periciclo. Esto, junto al hecho de que muchos de estos puntos de expresión estén muy cercanos al meristemo radicular, donde en condiciones normales no se forman primordios laterales,

sugiere que estos parches de expresión son futuros puntos de formación de raíces laterales.

Ejemplo 4.- Expresión de PSKP2B en mutantes deficientes en la formación de raíces laterales

5 Para poder determinar si existe una correlación entre el número de puntos de expresión inducidos por el promotor AtSKP2D a lo largo de la raíz y la distribución o número de las raíces laterales, el transgén PSKP2B::GUS se introdujo dentro del fondo genético *axr1* (dentro del alelo débil *axr1-3* y del alelo fuerte *axr1-12*). El gen *AXR1* codifica para una enzima implicada en la
10 modificación de AtCUL1, un componente estructural del complejo SCF de la ruta de la ubiquitina (del Pozo et al. 2002, Plant Cell, 14: 421-433). Las plantas mutantes *axr1-3* y *axr1-12* presentan una respuesta disminuida a las auxinas y además la formación de raíces laterales está disminuida (Lincon et al., 1990 Plant Cell 2: 1071–1080). Así, las plantas transgénicas PSKP2D::GUS se
15 cruzaron con plantas mutantes *axr1*(alelos 3 y 12) obteniéndose plantas transgénicas PSKP2D con mutaciones *axr1* (plantas *PSKP2B::GUS/axr1-12* y *PSKP2B::GUS/axr1-3*), que representan una realización particular de la planta transgénica AtPSKP2D de la presente invención. Las plantas transgénicas PSKP2B::GUS y *PSKP2B::GUS/axr1* de 5 días se tiñeron para actividad GUS.
20 Como se observa en la Figura 4, la mutación en el gen AXR1 (plantas *PSKP2B::GUS/axr1-12* y *PSKP2B::GUS/axr1-3*) reduce drásticamente tanto el número como la posición de los puntos de expresión de GUS a través del promotor AtSKP2D a lo largo de la raíz y, también, estas plantas mutadas *axr1* desarrollan muy pocas raíces laterales. Este resultado indica que existe una
25 correlación entre el número de puntos de expresión inducidos por el promotor AtSKP2D y el número de raíces laterales formadas.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que los puntos de la raíz donde la secuencia de DNA del promotor *AtSKP2D* permite la expresión son regiones de formación de las raíces laterales. Debido a que AtSKP2D es una proteína
30 implicada en la degradación, únicamente como hipótesis científica, es muy posible que el complejo SCF^{AtSKP2D} esté implicado en la degradación selectiva de un represor de la formación de primordios laterales a través de la ruta de la

UBQ. Además, la expresión en parches a lo largo de la raíz podría estar marcando donde se deben formar estos primordios laterales.

Ejemplo 5: Identificación de una región de DNA que dirige la expresión de genes de forma altamente específica a las células del periciclo.

5 La secuencia de DNA promotora AtSKP2D aislada es capaz de dirigir la expresión del gen chivato GUS en diferentes órganos como se ha descrito anteriormente (Figura 1). Para poder delimitar la región responsable de la expresión de AtSKP2D, sólo y de forma específica, en las células del periciclo que van a dar lugar a la formación de raíces laterales – es decir, la expresión
10 en parches a lo largo de la raíz - y, por tanto así controlar el desarrollo radicular, se han realizado delecciones de esta secuencia de DNA promotora AtSKP2D y analizado la capacidad reguladora de la expresión de un gen reportero. De las distintas delecciones estudiadas, y como una de las muchas posibles, se describe a continuación la generación y los resultados obtenidos
15 con la secuencia de DNA promotora PSKP2D549.

 Para generar dicha secuencia de DNA del promotor PSKP2D549, el vector pBI101-PSKP2D, descrito en el Ejemplo 1, se digirió con la enzima de restricción HindIII, eliminando una región 5' de 1191 pares de bases del promotor PSKP2B. El vector se religó, generándose el vector pBI101-
20 PSKP2D549, que contiene 549 nucleótidos de la región promotora aguas arriba del ATG del gen *AtSKP2D* (incluyendo las bases del ATG) fusionados al gen reportador GUS (SEQ ID NO4). Plantas de *Arabidopsis thaliana* se transformaron con *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 que tenía el plásmido binario pBI101-PSKP2D549 (desarrollado tal como se indica en el Ejemplo 1
25 para el plásmido pBI101-PSKP2D). Las plantas transgénicas así obtenidas, plantas transgénicas PSKP2D549::GUS, que representan una realización particular de la planta transgénica AtPSKP2D de la presente invención, se seleccionaron en medio MS con kanamicina (50 µg/ml) y posteriormente se analizó el patrón de tinción de la actividad GUS en plántulas de 6 días como se
30 ha comentado anteriormente. Las plantas transgénicas PSKP2D549::GUS mostraban un patrón de expresión del gen GUS diferente al de las plantas transgénicas PSKP2D::GUS, ya que la actividad GUS sólo se detectaba en los puntos discretos a lo largo de la raíz principal (Figura 5), concretamente en las

células del pericilo, y no en otras áreas o células de las plantas. Así, se ha identificado una secuencia de DNA promotora de 549 pares de bases aguas arriba del ATG (PSKP2D549, SEQ ID NO4) que dirige de forma altamente específica la expresión del gen GUS en las células del periciclo, en forma de
5 puntos discretos a lo largo de la raíz (Figura 5) y no en otras células de otros órganos.

Además, esta secuencia de DNA promotora PSKP2D549 (SEQ ID NO 4) no responde a diferentes estímulos externos frente a los que la secuencia de DNA promotora AtPSKP2D se inducía, tales como salinidad, exceso de
10 azúcares o tratamientos con las hormonas auxinas y ABA o por exposición a patógenos (los resultados son negativos y el patrón observado es idéntico al de las plantas PSKP2D549::GUS control). Los anteriores experimentos se realizaron tal como se han descrito anteriormente. Hay que destacar que esta especificidad es muy importante para evitar efectos secundarios de la
15 expresión de genes reguladores bajo la secuencia de DNA promotora de la invención.

REIVINDICACIONES

- 1.- Planta transgénica AtPSKP2D caracterizada porque contiene una secuencia de DNA AtPSKP2D que permite la expresión de una proteína de interés en las células de dicha planta y porque dicha secuencia de DNA está constituida por una de las dos posibilidades siguientes:
- a) una secuencia de DNA promotora AtPSKP2D y una secuencia de DNA codificante de una proteína de interés, y
 - b) una secuencia de DNA promotora y una secuencia de DNA codificante de una proteína AtPSKP2D.
- 2.- Planta transgénica AtPSKP2D según la reivindicación 1 caracterizada porque la secuencia de DNA promotora AtPSPK2D de a) es una secuencia de DNA promotora de la expresión génica constituida por una de las secuencias de DNA pertenecientes al siguiente grupo:
- a) secuencia de DNA PSKP2D (SEQ ID NO1),
 - b) secuencia de DNA PSKP2D549 (SEQ ID NO4),
 - c) un fragmento de las secuencias de DNA de a) y b),
 - d) secuencia de DNA análoga a las secuencias de a), b) y c), y
 - e) cualquier secuencia de DNA que comprenda la secuencia de DNA de a), b), c) o d) y que sea capaz de mantener su misma actividad reguladora de la expresión génica.
- 3.- Planta transgénica AtPSKP2D según la reivindicación 1 caracterizada porque la secuencia de DNA promotora AtPSPK2D es la secuencia de DNA PSKP2D (SEQ ID NO1).
- 4.- Planta transgénica AtPSKP2D según la reivindicación 1 caracterizada porque la secuencia de DNA codificante de una proteína de interés de a) es una secuencia de DNA perteneciente al siguiente grupo:
- a) una secuencia de DNA codificante de una proteína directamente implicada en la formación y desarrollo de las raíces laterales para manipular la arquitectura radicular, o
 - b) una secuencia de DNA codificante de una proteína de interés comercial e industrial cuya expresión en la planta, y más preferentemente en la raíz, permita su recogida y purificación posterior.

5.- Planta transgénica AtPSKP2D según la reivindicación 4 caracterizada porque la secuencia de DNA codificante de una proteína de a) es una de las secuencias perteneciente al siguiente grupo: secuencia AtPSKP2D (SEQ ID NO2 codificante de la proteína de SEQ ID NO3), AtE2Fc, AtE2Fa, AtCYCA, AtCDKB1, AtKRP1, AtKRP2, AtCDT1, AtCDC6, AtAXR1, AtTIR1, AtNAC1, así como cualquier forma análoga de estas secuencia de DNA.

6.- P lanta transgénica AtPSKP2D según la reivindicación 4 caracterizada porque la secuencia de DNA codificante de una proteína de b) pertenece al siguiente grupo de secuencias codificantes de proteínas: diferentes tipos de inmunoglobulinas (como por ejemplo IgGs contra la caries), de proteínas de uso médico (como por ejemplo la insulina o la relaxina), de diferentes tipos de fármacos, péptidos antimicrobianos y antifungicos, y proteínas de interés agroalimentario (como por ejemplo fitasas, transglutaminasas o glicosiltransferasas).

7.- Planta transgénica AtPSKP2D según la reivindicación 1 caracterizada porque la secuencia de DNA codificante de una proteína AtPSKP2D de b) está constituida por la secuencia de DNA del gen AtPSKP2D (SEQ ID NO2) codificante de la proteína AtPSKP2D (SEQ ID NO3), así como cualquier forma análoga de esta secuencia de DNA.

8.- Planta transgénica AtPSKP2D según la reivindicación 1 caracterizada porque la secuencia de DNA promotora de b) es una secuencia de DNA promotora capaz de regular la expresión génica en plantas perteneciente al siguiente grupo:

a) un promotor fuerte constitutivo, como por ejemplo el promotor del virus del mosaico 35S, y

b) un promotor que se exprese en todas las células del periciclo, como por ejemplo el de la kinasa dependiente de ciclinas del tipo A o del tipo B.

9.- Planta transgénica AtPSKP2D según la reivindicación 1 caracterizada porque contiene una secuencia de DNA AtPSKP2D que permite la expresión de una proteína de interés de manera específica en las células del periciclo que van a dar lugar a la formación de raíces laterales y que está constituida por una de las posibilidades siguientes:

- a) secuencia de DNA PSKP2D549 (SEQ ID NO4),
- b) un fragmento de las secuencias de DNA de a),
- c) secuencia de DNA análoga a las secuencias de a) y b), y
- d) cualquier secuencia de DNA que comprenda la secuencia de DNA de a), b), o c) y que sea capaz de mantener su misma actividad reguladora de la expresión génica.

10.- Planta transgénica AtPSKP2D según la reivindicación 9 caracterizada porque la secuencia de DNA promotora AtPSPK2D es la secuencia de DNA PSKP2D549 (SEQ ID NO4).

- 10 11. - Procedimiento de obtención de una planta transgénica AtPSPK2D según las reivindicaciones 1 a la 10 caracterizado porque consiste en la introducción en una planta de la secuencia de DNA AtPSKP2D que está constituida por una de las dos posibilidades siguientes:

- a) una secuencia de DNA promotora AtPSKP2D y una secuencia de DNA codificante de una proteína de interés, y
- b) una secuencia de DNA promotora y una secuencia de DNA codificante de una proteína AtPSKP2D.

12.- Procedimiento de obtención según la reivindicación 11 caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

- a) obtención de un vector de expresión que contiene una secuencia de DNA AtPSPK2D,
- b) obtención de microorganismos portadores del vector a), y
- c) transformación de las plantas con el vector de a) o con el microorganismo de b).

25 13.- Secuencia de DNA AtPSK2D caracterizada porque permite la expresión de una proteína de interés en las células de una planta y porque está constituida por una de las dos posibilidades siguientes:

- a) una secuencia de DNA promotora AtPSKP2D y una secuencia de DNA codificante de una proteína de interés, y
- b) una secuencia de DNA promotora y una secuencia de DNA codificante de una proteína AtPSKP2D.

14.- Secuencia de DNA AtPSK2D según la reivindicación 13 caracterizada porque la secuencia de DNA promotora AtPSKP2D de a) está constituida por una de las secuencias de DNA pertenecientes al siguiente grupo:

- a) secuencia de DNA PSKP2D (SEQ ID NO1),
- 5 b) secuencia de DNA PSKP2D549 (SEQ ID NO4),
- c) un fragmento de las secuencias de DNA de a) y b),
- d) secuencia de DNA análoga a las secuencias de a), b) y c), y
- e) cualquier secuencia de DNA que comprenda una secuencia DNA de a), b), c) o d) y que sea capaz de mantener su misma actividad reguladora de la expresión génica.

15.- Secuencia de DNA AtPSK2D según la reivindicación 14 caracterizada porque la secuencia de DNA codificante de una proteína de interés de a) está constituida por una de las siguientes secuencias de DNA:

- a) una secuencia de DNA codificante de una proteína directamente implicada en la formación y desarrollo de las raíces laterales para manipular la arquitectura radicular, o
- 15 b) una secuencia de DNA codificante de una proteína de interés comercial e industrial cuya expresión en la planta, y más preferentemente en la raíz, permita su recogida y purificación posterior.

16.- Secuencia de DNA AtPSK2D según la reivindicación 15 caracterizada porque la secuencia DNA codificante de una proteína de a) es una de las secuencias perteneciente al siguiente grupo: secuencia de DNA AtPSKP2D (SEQ ID NO2 codificante de la proteína de SEQ ID NO3), AtE2Fc, AtE2Fa, 25 AtCYCA, AtCDKB1, AtKRP1, AtKRP2, AtCDT1, AtCDC6 , AtAXR1, AtTIR1, AtNAC1, así como cualquier forma análoga de estas secuencia de DNA.

17.- Secuencia de DNA AtPSK2D según la reivindicación 15 caracterizada porque la secuencia de DNA codificante de una proteína de a) es la secuencia de DNA AtPSKP2D (SEQ ID NO2) codificante de la proteína de SEQ ID NO3, 30 así como cualquier forma análoga de esta secuencia de DNA.

18.- Secuencia de DNA AtPSK2D según la reivindicación 15 caracterizada porque la secuencia de DNA codificante de una proteína de interés comercial de b) pertenece al siguiente grupo de secuencias codificantes de proteínas:

diferentes tipos de inmunoglobulinas (como por ejemplo IgGs contra la caries), de proteínas de uso médico (como por ejemplo la insulina o la relaxina), de diferentes tipos de fármacos, péptidos antimicrobianos y antifungicos, y proteínas de interés agroalimentario (como por ejemplo fitasas, transglutaminasas o glicosiltransferasas).

19.- Secuencia de DNA AtPSK2D según la reivindicación 13 caracterizada porque la secuencia de DNA promotora es una secuencia de DNA promotora capaz de regular la expresión génica en plantas.

20.- Secuencia de DNA AtPSK2D según la reivindicación 19 caracterizada porque la secuencia promotora pertenece al siguiente grupo: el promotor del virus del mosaico 35S, y el promotor de la kinasa dependiente de ciclinas del tipo A (CDKA) o del tipo B.

21.- Vector de expresión caracterizado porque comprende la secuencia de DNA AtPSKP2D según las reivindicaciones 13 a la 20 y porque permite la transformación o transfección de microorganismos y células y la posterior obtención de las plantas transgénicas AtPSKP2D según las reivindicaciones 1 a la 10.

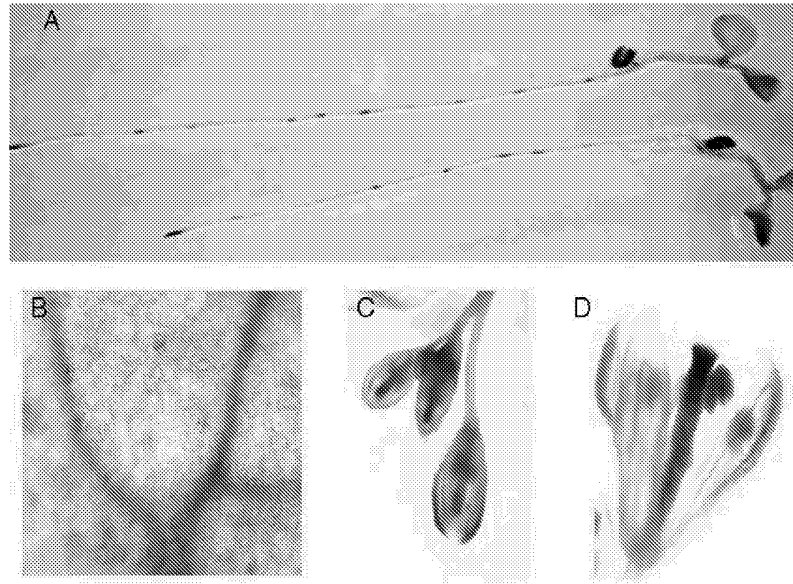
22.- Microorganismo o célula transformada caracterizada porque contiene la secuencia de DNA AtPSKP2D según las reivindicaciones 13 a la 20 ó el vector de expresión AtPSKP2D según la reivindicación 21

23.- Uso de las secuencias de DNA AtPSKP2D según las reivindicaciones 13 a la 20, el vector de expresión AtPSKP2D según la reivindicación 21, la célula transformada AtPSKP2D según la reivindicación 22, y del procedimiento AtPSKP2D según las reivindicaciones 11 y 12 para la obtención de plantas transgénicas AtPSKP2D de interés comercial.

24.- Uso según la reivindicación 23 caracterizado porque la planta de interés comercial pertenece al siguiente grupo: arroz, trigo, soja, maíz, tomate, patata, tabaco, judía, melón, sandía, pepino y fresa, y frutales como el naranjo, limonero, peral y manzano.

1/5

Figura 1



2/5

Figura 2

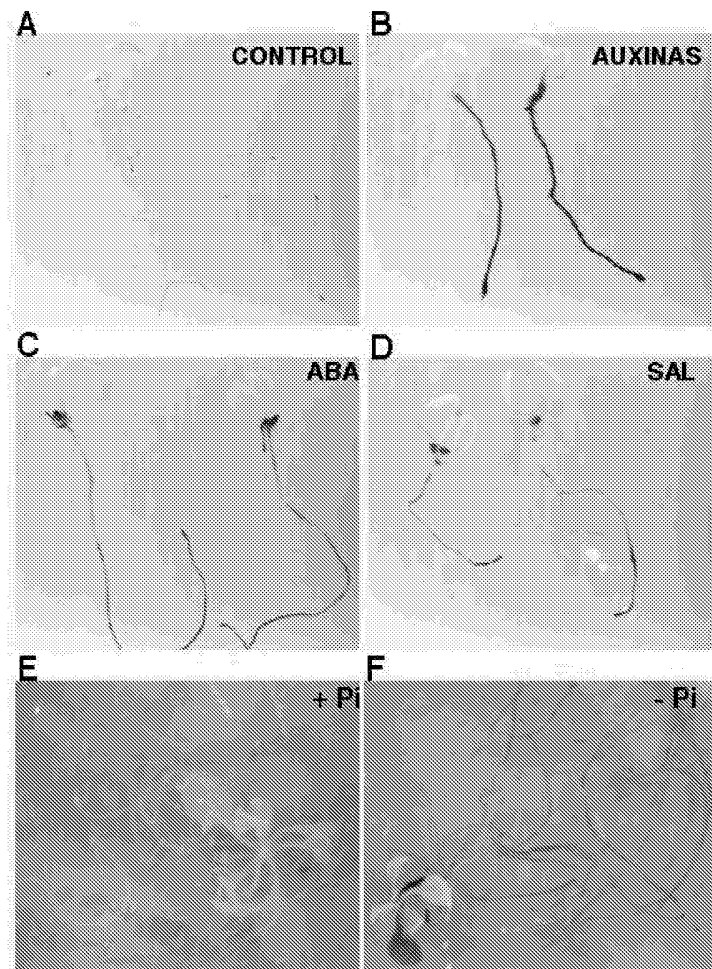


Figura 3

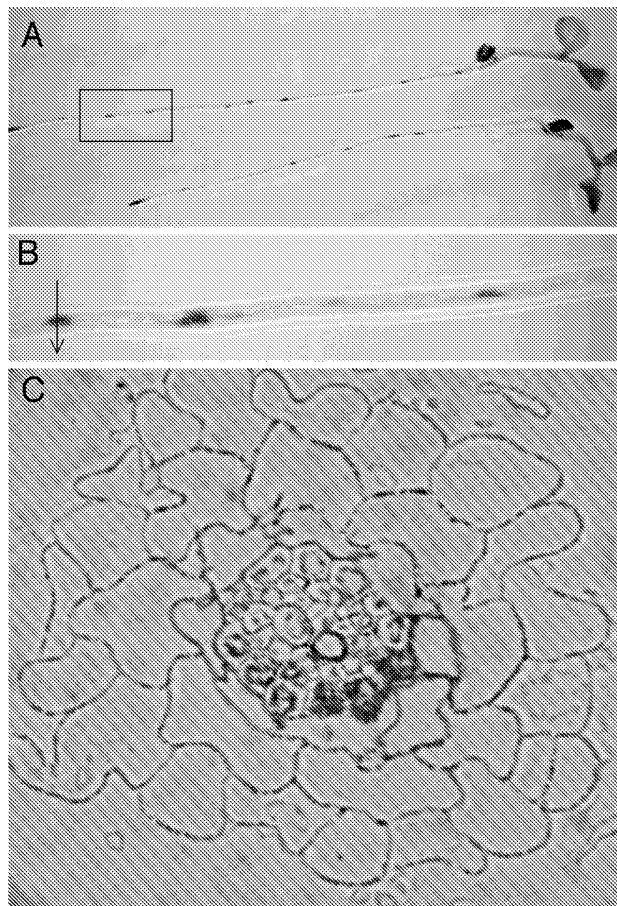


Figura 4

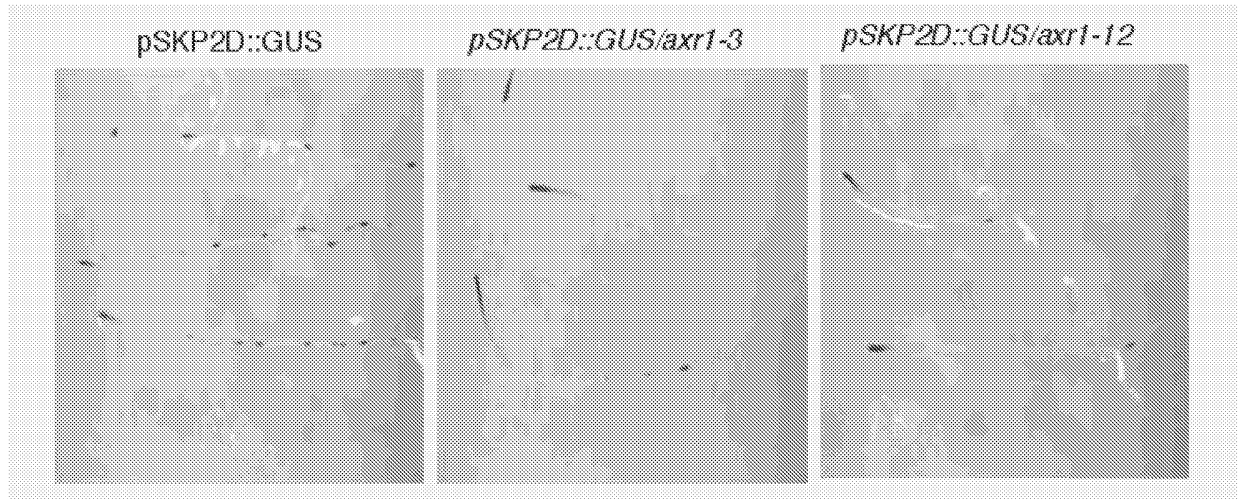
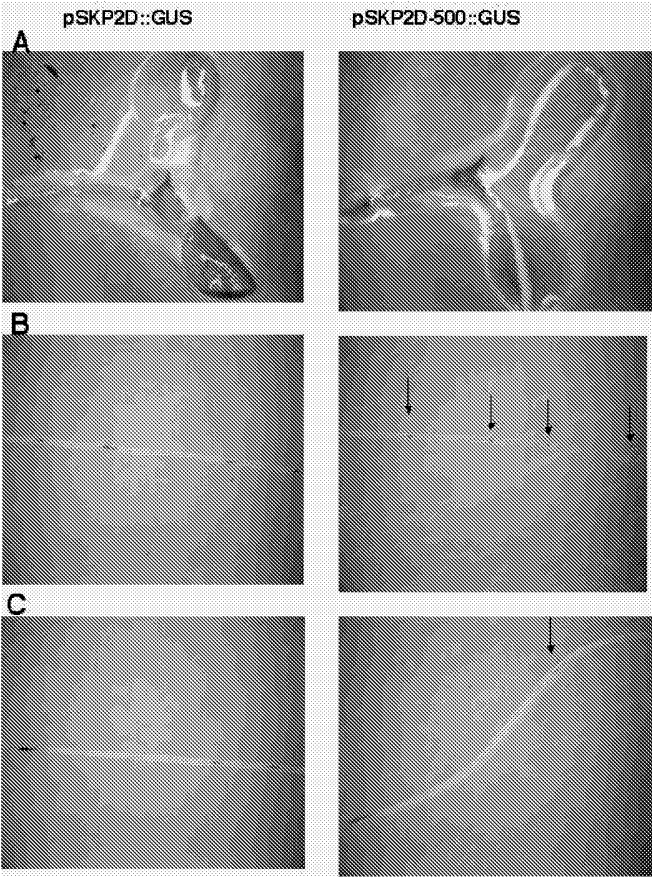


Figura 5



Listado de Secuencias

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
 <120> PLANTAS TRANSGÉNICAS AtPSKP2D, SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y SUS APLICACIONES
 <130> AtSKP2D
 <160> 6
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 1740
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana
 <220>
 <221> promoter AtSKP2D
 <222> (1)..(1698)
 <400> 1
 tgggaagctg cccattaga gcaaaaaacg tgcccaccaa ctcaaaggcc tcattagccc 60
 ccaatgtgca tttttgttat ctttaccagt tgcgtttttt cttctgtttt aaaaaaaaaa 120
 atatatctca tagtttgttt taattcaagg tgcatttatt tcctggctat taaatctgca 180
 attottgtac aatagttctt gtctttttca tgaaaatagg ttttgtttta tttgcacaag 240
 ataaaaatgc ttcgaagcta gtaaaatagt aaaagaagga aagagtccat taagtttata 300
 ggtgcatgtg ggtttcacag agagttcaga aaatacaaat agaaagctat actttttaca 360
 atggagatta ttcttttggt taacgttttt atgtaagata atgtcatttt ataagttact 420
 aattcactct tttttattat ttttgttggt gttgtttttc tacttctata gatacaaaaa 480
 cataatatat gagttgtttt aactgtctt gtaagttcta attgattaat gttatgaact 540
 tagtttatgc aacgttctac aaacaaagag ctaattttac accagcaaaa atccctcaag 600
 tcctacaatt atatgtccat cacaaccgag ttcgaacaat catataataa ttatttttgt 660
 taatgaaacg aggaacgtat gatagagaa aaggtcattt ctttaattta ataaatgaaa 720
 cagtgatata tctttggacg ttatctctcg acttgtaaac gagtttaatt acattatgcg 780
 actcaacttt gtaatcaatt atttaaagtt ctcaattttt gtcaattccg ttacgtaaat 840
 tattattaga ttaacaattt caataagata acttctcttg aatattttcc gaatatttcg 900
 ttttaattag atattacaac tatggttata aaaataaaat aaaataaccg taaaagagtc 960
 gtcgaatttg gaatataatt tgtaatagta ctgtattctc ctgtcagttt tagacacgtg 1020
 gcagttcacg tgtcatatag tcataaccg tacgtttact ctttgctctt ttccctttta 1080

tattcaaaac tcctttttga ttttgtctat cttatctcgt gaatcgtaa ttcggttatca 1140
aaagagctta aaaagcttta aaaaattaac ggattagtaa taattcaacc gaagagaaac 1200
ccaaggcacc gaagaacacg atttcagagg tatgatccgg aaaaaaaaaat ccaaagtttt 1260
gatccttttg ttttttggtg agcaaaaaaa ctggctctac gctagtcaat ggacattctc 1320
ctaaatTTTT gtctctgttt ttttagattg taaattataa agtaatttct ccaactttct 1380
ggaaaaatcc atccagcaaa agaaaagaat aattggtttt attgatcaaa gatcttcagt 1440
tttcaaaatt aagcactaat tatgggggtt tgtttattaa tgtcctaaaa aagagttaca 1500
catagagaga cattaatgct tgcagtttag tttaaagagt tttaagacca tatctcactc 1560
aatccttatt tccttacatt tgctgtcttt tgatgtcata gactcagaga tatttattta 1620
tcttctttct ctctcatttc tcattctcat atttactttt gatctcgtgg tgtagaatc 1680
aaagaaaccg cttcaaggat ggtgagtga ggagcaacaa gaaaagaact taacctctgt 1740

<210> 2
<211> 2514
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(500)
<223> región 5'-3'

<220>
<221> exon
<222> (501)..(718)
<223> Región codificante

<220>
<221> Intron
<222> (719)..(990)

<220>
<221> exon
<222> (991)..(1339)
<223> Región codificante

<220>
<221> Intron
<222> (1340)..(1434)
<223> Región codificante

<220>
<221> exon
<222> (1435)..(1576)
<223> Región codificante

<220>

```
<220>
<221> misc_feature
<222> (2015)..(2514)
<223> Región 3'
```

[illegible]

```

atttttgtgt ttgcttggttg tttgtttcttt ag g tgc aag aag aat atg aac agt 1012
                                Cys Lys Lys Asn Met Asn Ser
                                75                                80

ttg gtt cta tct ctt gct ccc aaa ttc gta aag ctt cag act tta gta 1060
Leu Val Leu Ser Leu Ala Pro Lys Phe Val Lys Leu Gln Thr Leu Val
                                85                                90                                95

ctg cga cag gac aaa ccg cag ctt gag gac aac gcg gtg gaa gcc ata 1108
Leu Arg Gln Asp Lys Pro Gln Leu Glu Asp Asn Ala Val Glu Ala Ile
                                100                                105                                110

gca aat cac tgt cat gag cta caa gat ttg gac tta agc aaa agc tcg 1156
Ala Asn His Cys His Glu Leu Gln Asp Leu Asp Leu Ser Lys Ser Ser
                                115                                120                                125

aaa atc act gac cat tcc cta tat tca ctt gct cgt ggt tgt act aac 1204
Lys Ile Thr Asp His Ser Leu Tyr Ser Leu Ala Arg Gly Cys Thr Asn
                                130                                135                                140

ctg act aaa ctc aac ctt agc ggc tgc act tcg ttc agc gac act gct 1252
Leu Thr Lys Leu Asn Leu Ser Gly Cys Thr Ser Phe Ser Asp Thr Ala
                                145                                150                                155                                160

ctt gcg cat ttg aca aga ttt tgc agg aag ctc aaa att ctg aat ctt 1300
Leu Ala His Leu Thr Arg Phe Cys Arg Lys Leu Lys Ile Leu Asn Leu
                                165                                170                                175

tgt ggt tgt gtt gaa gct gta tct gac aat aca ttg cag gtggctttta 1349
Cys Gly Cys Val Glu Ala Val Ser Asp Asn Thr Leu Gln
                                180                                185

aagattcaac tctctctaact actattagct ttctatgttc tttgtctcga tgataaccga 1409

ccaattcttc atccggttttg tgcag gct att gga gaa aac tgc aat cag ttg 1461
                                Ala Ile Gly Glu Asn Cys Asn Gln Leu
                                190                                195

cag tca cta aac ttg gga tgg tgt gag aat ata agt gat gat gga gtt 1509
Gln Ser Leu Asn Leu Gly Trp Cys Glu Asn Ile Ser Asp Asp Gly Val
                                200                                205                                210

atg agt tta gct tat ggt tgt cct gat tta aga act ctt gat ctt tgt 1557
Met Ser Leu Ala Tyr Gly Cys Pro Asp Leu Arg Thr Leu Asp Leu Cys
                                215                                220                                225                                230

agc tgt gtt cta atc aca g gtaaaaccga gaaaccgaa ccagagtttc 1606
Ser Cys Val Leu Ile Thr
                                235

tttgtcatct cttaaacatt tcttggttggt acag at gag agt gtt gtg gct ttg 1660
                                Asp Glu Ser Val Val Ala Leu
                                240

gcg aat cgg tgc att cac ttg agg tca ttg ggg tta tac tac tgc aga 1708
Ala Asn Arg Cys Ile His Leu Arg Ser Leu Gly Leu Tyr Tyr Cys Arg
                                245                                250                                255

aac att aca gac aga gca atg tac tct tta gct cag agc gga gtc aag 1756
Asn Ile Thr Asp Arg Ala Met Tyr Ser Leu Ala Gln Ser Gly Val Lys

```

5

```

260                265                270                275
aac aaa cac gag atg tgg cga gcg gta aag aaa gga aaa ttc gat gaa 1804
Asn Lys His Glu Met Trp Arg Ala Val Lys Lys Gly Lys Phe Asp Glu
                280                285                290

gaa gga cta aga agc ctt aac att agt caa tgc act tac cta aca cct 1852
Glu Gly Leu Arg Ser Leu Asn Ile Ser Gln Cys Thr Tyr Leu Thr Pro
                295                300                305

tca gct gtt caa gct gtc tgt gat aca ttc cct gct ctc cac act tgt 1900
Ser Ala Val Gln Ala Val Cys Asp Thr Phe Pro Ala Leu His Thr Cys
                310                315                320

tca ggc aga cat tca ctt gtc atg agc ggt tgt ttg aat cta caa tct 1948
Ser Gly Arg His Ser Leu Val Met Ser Gly Cys Leu Asn Leu Gln Ser
                325                330                335

gtt cat tgt gct tgt atc ctt caa gct cac cgc act cac acc gtt tac 1996
Val His Cys Ala Cys Ile Leu Gln Ala His Arg Thr His Thr Val Tyr
340                345                350                355

cct cac ccg gcg cat tga aacggtgtgt gagccagagg gtctactact 2044
Pro His Pro Ala His
                360

ctctagtatg tgtgtacata catataacca tatggtgtta ataaagcttc tttgagttcc 2104
ttctttgtct ttgatgcaat cttaagattt taacattacc tagtcttgaa aatcttgtaa 2164
tgaatcgcca aatacttatt tcttctaaca atttgtttaa gttgcatcca tcaatcaata 2224
atcatatcat taaagaatga ataacacaga aataagatga tgctgctttg catgtgagac 2284
taaaccggaa ccggaaatgg ttaaaaccaa atcggaatga gattttgaag tacaatagta 2344
gttacagggtt ttatctttca agtagttttc tccaagctat ggaagtagat tgtcggcggt 2404
attacgtacg tcttcttcaa tcatgcagca gcagaaatcg cgaaacttta tggagacaaa 2464
ccaatggatt gctcttgaag aagggttttc ttagttcaat tgtcattgtt 2514

<210> 3
<211> 360
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 3

Met Val Ser Glu Gly Ala Thr Arg Lys Glu Leu Asn Leu Cys Phe Glu
1                5                10                15

Asn Met Lys Met Glu Gly Val Leu Ile Ser Glu Trp Lys Asp Ile Pro
                20                25                30

Val Glu Leu Leu Met Lys Ile Leu Asn Leu Val Asp Asp Arg Thr Val
35                40                45

Ile Ile Ala Ser Cys Ile Cys Ser Gly Trp Arg Asp Ala Val Ser Leu

```

50		55		60
Gly 65	Leu Thr Arg	Leu Ser 70	Leu Ser Trp Cys 75	Lys Lys Asn Met Asn Ser 80
Leu Val 85	Leu Ser	Leu Ala Pro Lys Phe 90	Val Lys Leu Gln Thr 95	Leu Val
Leu Arg 100	Gln Asp Lys Pro Gln Leu Glu Asp 105	Asn Ala Val Glu Ala Ile 110		
Ala Asn 115	His Cys His Glu Leu Gln Asp 120	Leu Asp Leu Ser Lys Ser Ser 125		
Lys Ile 130	Thr Asp His Ser Leu Tyr Ser 135	Leu Ala Arg Gly Cys Thr Asn 140		
Leu Thr 145	Lys Leu Asn Leu Ser Gly Cys Thr 150	Ser Phe Ser Asp Thr Ala 155		
Leu Ala 165	His Leu Thr Arg Phe Cys Arg Lys 170	Leu Lys Ile Leu Asn Leu 175		
Cys Gly 180	Cys Val Glu Ala Val Ser Asp Asn Thr 185	Leu Gln Ala Ile Gly 190		
Glu Asn 195	Cys Asn Gln Leu Gln Ser Leu Asn Leu Gly Trp 200	Cys Glu Asn 205		
Ile Ser 210	Asp Asp Gly Val Met Ser Leu Ala Tyr 215	Gly Cys Pro Asp Leu 220		
Arg Thr 225	Leu Asp Leu Cys Ser Cys Val Leu Ile Thr Asp Glu Ser Val 230	235		
Val Ala 245	Leu Ala Asn Arg Cys Ile His Leu Arg Ser Leu Gly Leu Tyr 250	255		
Tyr Cys 260	Arg Asn Ile Thr Asp Arg Ala Met Tyr Ser Leu Ala Gln Ser 265	270		
Gly Val 275	Lys Asn Lys His Glu Met Trp Arg Ala Val Lys Lys Gly Lys 280	285		
Phe Asp 290	Glu Glu Gly Leu Arg Ser Leu Asn Ile Ser Gln Cys Thr Tyr 295	300		
Leu Thr 305	Pro Ser Ala Val Gln Ala Val Cys Asp Thr Phe Pro Ala Leu 310	315		
His Thr 325	Cys Ser Gly Arg His Ser Leu Val Met Ser Gly Cys Leu Asn 330	335		
Leu Gln 340	Ser Val His Cys Ala Cys Ile Leu Gln Ala His Arg Thr His 345	350		
Thr Val 355	Tyr Pro His Pro Ala His 360			

7

<210> 4
 <211> 549
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Región promotora mínima

<400> 4
 aagctttaaa aaattaacgg attagtaata attcaaccga agagaaacc aaggcaccga 60
 agaacacgat ttcagaggta tgatccggaa aaaaaaatcc aaagttttga tccttttggt 120
 ttttggtgag caaaaaaact ggtcctacgc tagtcaatgg acattctcct aaatttttgt 180
 ctctgttttt ttagattgta aattataaag taatttctcc aactttctgg aaaaatccat 240
 ccagcaaaag aaaagaataa ttggttttat tgatcaaaga tcttcagttt tcaaaattaa 300
 gcactaatta tgggggtttt tttattaatg tcctaaaaaa gagttacaca tagagagaca 360
 ttaatgcttg cagtttagtt taaagagttt taagaccata tctcactcaa tccttatttc 420
 cttacatttg tcgtcttttg atgtcataga ctgagagata tttatttatc ttctttctct 480
 ctcatttctc attctcatat ttacttttga tctcgtggtg ttagaatcaa agaaaccgct 540
 tcaaggatg 549

<210> 5
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Oligo P1

<400> 5
 gaagatttgg gggaagctgc cc 22

<210> 6
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Oligo P2

<400> 6
 gtccttaggt actcaccatc cttgaagcgg 30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2005/070137

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See additional sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EBI NUCLEOTIDE AND PROTEIN DATABASES, WPI, EPODOC, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 03000898 A1 (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG.) 03 enero 2003 Claim 27; SEQ 2284	1-6, 9-16, 18-19, 21-24 17
X Y	WO 02016655 A2 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 28 febrero 2002 Claim 144; SEQ 4906	1-6, 9-16, 18-19, 21-24 17
X Y	EP 1033404 A2 (CERES INCORPORATED) 06 september 2000	7-8, 20 17
X Y	DATABASE EMPL [Online] 08 june 1997 (08-06-1997), Arabidopsis thaliana chromosome I BAC F22K20 genomic sequence, complete sequence. Retrieved from EBI, accession n° AC002291	7-8, 20 17
X Y	DATABASE UNIPROT [Online] 01 june 1998 (08-06-1998) F22K20.10 protein (F-box protein family, AtFBL5). Retrieved from EBI, accession n° O49286	7-8, 20 17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

(24.02.2006)

Date of mailing of the international search report

(07-03-2006)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2005/070137

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DEL POZO JC. ET AL., "AXR1-ECR1-Dependent Conjugation of RUB1 to the Arabidopsis Cullin AtCUL1 Is Required for Auxin Response." The Plant Cell, February 2002, vol. 14, 421-433. Citado en la solicitud.	1-24
A	DEL POZO JC. ET AL., "Arabidopsis E2Fc Functions in Cell Division and Is Degraded by the Ubiquitin-SFC-AtSKP2 Pathway in Response to Light." The Plant Cell, December 2002, vol. 14, 3057-3071.	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 2005/070137

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0216655 A	28.02.2002	CA 2420555 A AU 8681101 A US 2002160378 A US 2004009476 A EP 1313867 A	28.02.2002 04.03.2002 31.10.2002 15.01.2004 28.05.2003
----- WO 03000898 A	----- 03.01.2003	----- EP 1402037 A	----- 31.03.2004
----- EP 1033405 A	----- 06.09.2000	----- CA 2300692 A EP 1586645 A	----- 25.08.2000 19.10.2005
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2005/070137

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ ES 2005/070137

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EBI NUCLEOTIDE AND PROTEIN DATABASES, WPI, EPODOC, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	WO 03000898 A1 (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG.) 03 enero 2003	1-6, 9-16, 18-19, 21-24
Y	Claim 27; SEQ 2284	17
X	WO 02016655 A2 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 28 febrero 2002	1-6, 9-16, 18-19, 21-24
Y	Claim 144; SEQ 4906	17
X	EP 1033404 A2 (CERES INCORPORATED) 06 septiembre 2000	7-8, 20
Y		17
X	DATABASE EMPL [Online] 08 june 1997 (08-06-1997), Arabidopsis thaliana chromosome I BAC F22K20 genomic sequence, complete	7-8, 20
Y	sequence. Retrieved from EBI, accession nº AC002291	17
X	DATABASE UNIPROT [Online] 01 june 1998 (08-06-1998) F22K20.10 protein (F-box protein family, AtFBL5). Retrieved from EBI, accession nº O49286	7-8, 20
Y		17

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
24.Febrero.2006 (24.02.2006)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
07 MARZO 2006 (07-03-2006)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
O.E.P.M.
C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
Nº de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado
M. Hernández Cuéllar
Nº de teléfono + 34 91 349

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES 2005/070137

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	DEL POZO JC. ET AL., "AXR1-ECR1-Dependent Conjugation of RUB1 to the Arabidopsis Cullin AtCUL1 Is Required for Auxin Response." The Plant Cell, February 2002, vol. 14, 421-433. Citado en la solicitud.	1-24
A	DEL POZO JC. ET AL., "Arabidopsis E2Fc Functions in Cell Division and Is Degraded by the Ubiquitin-SFC-AtSKP2 Pathway in Response to Light." The Plant Cell, December 2002, vol. 14, 3057-3071.	1-24

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2005/070137

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 0216655 A	28.02.2002	CA 2420555 A AU 8681101 A US 2002160378 A US 2004009476 A EP 1313867 A	28.02.2002 04.03.2002 31.10.2002 15.01.2004 28.05.2003
WO 03000898 A	03.01.2003	EP 1402037 A	31.03.2004
EP 1033405 A	06.09.2000	CA 2300692 A EP 1586645 A	25.08.2000 19.10.2005

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)