



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 316 199**

② Número de solicitud: 200402349

⑤ Int. Cl.:
C12N 15/29 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **01.10.2004**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2009**

Fecha de la concesión: **15.12.2009**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **29.12.2009**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
29.12.2009

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Pozo Benito, Juan Carlos del y
Gutiérrez Armenmta, Crisanto**

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Plantas transgénicas AtPSKP2D, su procedimiento de obtención y sus aplicaciones.**

㉑ Resumen:

Plantas transgénicas AtPSKP2D, su procedimiento de obtención y sus aplicaciones.

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 las células del periciclo formadoras de las raíces laterales (RLs). Estas técnicas pueden aplicarse a plantas de interés comercial de tal forma que estas plantas 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.

ES 2 316 199 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Plantas transgénicas AtPSKP2D, 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 función de las necesidades.

10 **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 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 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 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: 30-36) 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 postraduccional 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 descartado 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 postraduccional 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 invención

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:

- 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 AtPSPK2D, vectores de expresión AtPSPK2D, células transformadas AtPSPK2D, y del procedimiento AtPSPK2D de la presente invención para la obtención de plantas transgénicas AtPSPK2D 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 las 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 501-2014), 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

ES 2 316 199 B1

proteólisis de proteínas a través de la ruta de la ubiquitina. Datos recientes mostraron que 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).

5 Sin embargo, en la presente invención se ha observado por primera vez 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 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).
10 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 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).

15 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.

20 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:

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

35 Tal como se utiliza en la presente invención el término “secuencia de DNA promotora AtPSKP2D” 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),
- 40 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
- 45 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:

- 50 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
- 55 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, liquenetasas, transglutaminasas o glicosiltransferasas).
- 65

ES 2 316 199 B1

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 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 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.

Una realización 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 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 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 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
- 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 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).

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.

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:

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

ES 2 316 199 B1

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 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),
- 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 de 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 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 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 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 (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 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).

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 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 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 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 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 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 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,

ES 2 316 199 B1

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, UKPublished: 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).

50 Descripción de figuras

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, 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 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. Raíces de las plantas *axr1-3/pSKP2D::GUS* y *axr1-12/pSKP2D::GUS* se tiñeron 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.

5 Figura 5: *Expresión génica de GUS específica en la raíz inducida por La secuencia de DNA promotora PSKP2D549*. La región promotora que 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 invención

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

20 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' ATGGTGAGTGAAGGAGCAAC 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).

30 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.

50 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

65 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 trataron con 0.1

ES 2 316 199 B1

μM 2,4-D (auxina), 1 μM 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.

5 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, 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).

10

Ejemplo 3

15 *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 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 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).

20 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 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.

30

Ejemplo 4

Expresión de PSKP2B en mutantes deficientes en la formación de raíces laterales

35 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 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 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. 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 correlación entre el número de puntos de expresión inducidos por el promotor AtSKP2D y el número de raíces laterales formadas.

50

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

Ejemplo 5

60

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

65 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, sola y de forma específica, en las células del periciclo que van a dar lugar a la formación de raíces laterales - es decir, la expresión 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

ES 2 316 199 B1

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 con la secuencia de DNA promotora PSKP2D549.

5 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-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 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 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 periciclo, 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 puntos discretos a lo largo de la raíz (Figura 5) y no en otras células de otros órganos.

20 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 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 expresión de genes reguladores bajo la secuencia de DNA promotora de la invención.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 316 199 B1

REIVINDICACIONES

1. Planta transgénica **caracterizada** porque contiene una secuencia de DNA 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:

i) una secuencia de DNA promotora AtPSKP2D y una secuencia de DNA codificante de una proteína de interés, donde la secuencia de DNA promotora AtPSPK2D 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,

y,

ii) una secuencia de DNA promotora conjuntamente con una secuencia de DNA codificante de una proteína constituida por la secuencia de DNA del gen AtPSKP2D (SEQ ID NO2) codificante de la proteína AtPSPK2D (SEQ ID NO3) o con cualquier forma análoga de esta secuencia de DNA.

2. Planta transgénica según la reivindicación 1 **caracterizada** porque la secuencia de DNA promotora AtPSPK2D es la secuencia de DNA PSKP2D (SEQ ID NO1).

3. Planta transgénica según la reivindicación 1 **caracterizada** porque la secuencia de DNA codificante de una proteína de interés de i) 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.

4. Planta transgénica según la reivindicación 3 **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.

5. Planta transgénica según la reivindicación 3 **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 antifúngicos, y proteínas de interés agroalimentario (como por ejemplo fitasas, transglutaminasas o glicosiltransferasas).

6. Planta transgénica según la reivindicación 1 **caracterizada** porque la secuencia de DNA promotora de ii) 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.

7. Planta transgénica según la reivindicación 1 **caracterizada** porque contiene una secuencia de DNA 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

ES 2 316 199 B1

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.

5 8. Planta transgénica según la reivindicación 7 **caracterizada** porque la secuencia de DNA promotora es la secuencia de DNA PSKP2D549 (SEQ ID NO4).

9. Procedimiento de obtención de una planta transgénica según las reivindicaciones 1 a la 8 **caracterizado** porque consiste en la introducción en una planta de una secuencia de DNA constituida por una de las dos posibilidades siguientes:

10 i) una secuencia de DNA promotora y una secuencia de DNA codificante de una proteína de interés, donde la secuencia de DNA promotora es una secuencia de DNA promotora de la expresión génica constituida por una de las secuencias de DNA perteneciente al siguiente grupo:

15 a) secuencia de DNA PSKP2D (SEQ ID NO1),

b) secuencia de DNA PSKP2D549 (SEQ ID NO4),

20 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,

25 y,

30 ii) una secuencia de DNA promotora conjuntamente con una secuencia de DNA codificante de una proteína constituida por la secuencia de DNA del gen AtPSKP2D (SEQ ID NO2) codificante de la proteína AtPSKP2D (SEQ ID NO3) o con cualquier forma análoga de esta secuencia de DNA.

10. Procedimiento de obtención según la reivindicación 9 **caracterizado** porque comprende los siguientes pasos:

35 i) obtención de un vector de expresión que contiene una secuencia de DNA perteneciente al siguiente grupo:

a) secuencia de DNA PSKP2D (SEQ ID NO1),

b) secuencia de DNA PSKP2D549 (SEQ ID NO4),

40 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

45 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.

ii) obtención de microorganismos portadores del vector a), y

50 iii) transformación de las plantas con el vector de i) o con el microorganismo de ii).

11. Secuencia de DNA **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:

55 i) una secuencia de DNA promotora AtPSKP2D y una secuencia de DNA codificante de una proteína de interés, donde la secuencia de DNA promotora AtPSKP2D 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),

60 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

65 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,

ES 2 316 199 B1

y

- ii) una secuencia de DNA promotora conjuntamente con una secuencia de DNA codificante de una proteína constituida por la secuencia de DNA del gen AtPSKP2D (SEQ ID NO2) codificante de la proteína AtPSKP2D (SEQ ID NO3) o con cualquier forma análoga de esta secuencia de DNA..

12. Secuencia de DNA según la reivindicación 11 **caracterizada** porque la secuencia de DNA codificante de una proteína de interés de i) 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
- 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.

13. Secuencia de DNA según la reivindicación 12 **caracterizada** porque la secuencia de 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, AtCYCA, AtCDKB1, AtKRP1, AtKRP2, AtCDT1, AtCDC6, AtAXR1, AtTIR1, AtNAC1, así como cualquier forma análoga de esta secuencia de DNA.

14. Secuencia de DNA según la reivindicación 12 **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, así como cualquier forma análoga de esta secuencia de DNA.

15. Secuencia de DNA según la reivindicación 12 **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 antifúngicos, y proteínas de interés agroalimentario (como por ejemplo fitasas, transglutaminasas o glicosiltransferasas).

16. Secuencia de DNA según la reivindicación 11 **caracterizada** porque la secuencia de DNA promotora es una secuencia de DNA promotora capaz de regular la expresión génica en plantas.

17. Secuencia de DNA según la reivindicación 16 **caracterizada** porque la secuencia de DNA 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.

18. Vector de expresión **caracterizado** porque comprende la secuencia de DNA según las reivindicaciones 11 a la 17 y porque permite la transformación o transfección de microorganismos y células y la posterior obtención de las plantas transgénicas según las reivindicaciones 1 a la 8.

19. Microorganismo o célula transformada **caracterizada** porque contiene la secuencia de DNA según las reivindicaciones 11 a la 17 ó el vector de expresión según la reivindicación 18.

20. Uso de las secuencias de DNA según las reivindicaciones 11 a la 17, el vector de expresión según la reivindicación 18, la célula transformada según la reivindicación 19, y del procedimiento según las reivindicaciones 9 y 10 para la obtención de plantas transgénicas de interés comercial.

21. Uso según la reivindicación 20 **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.

Figura 1

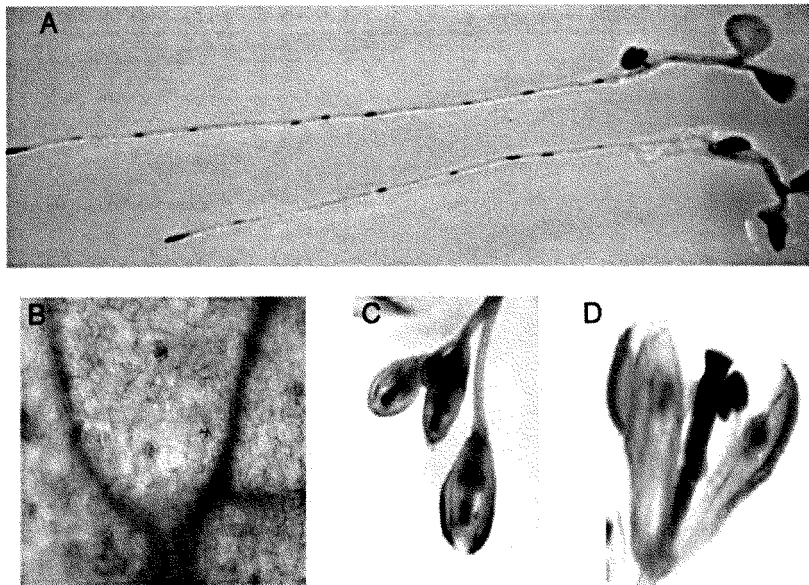


Figura 2

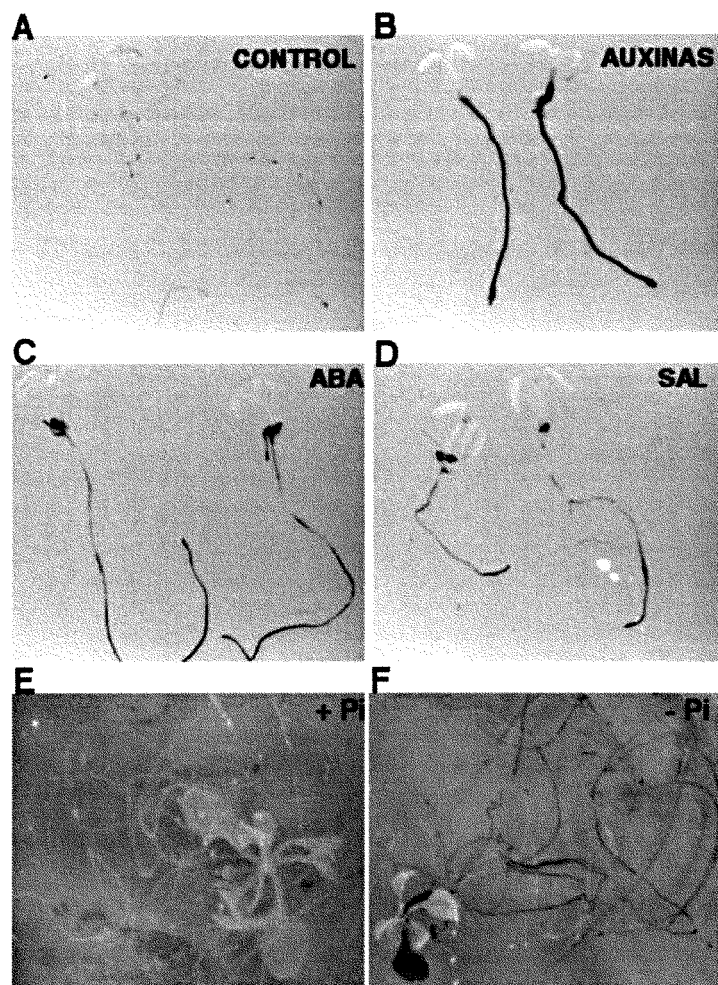


Figura 3

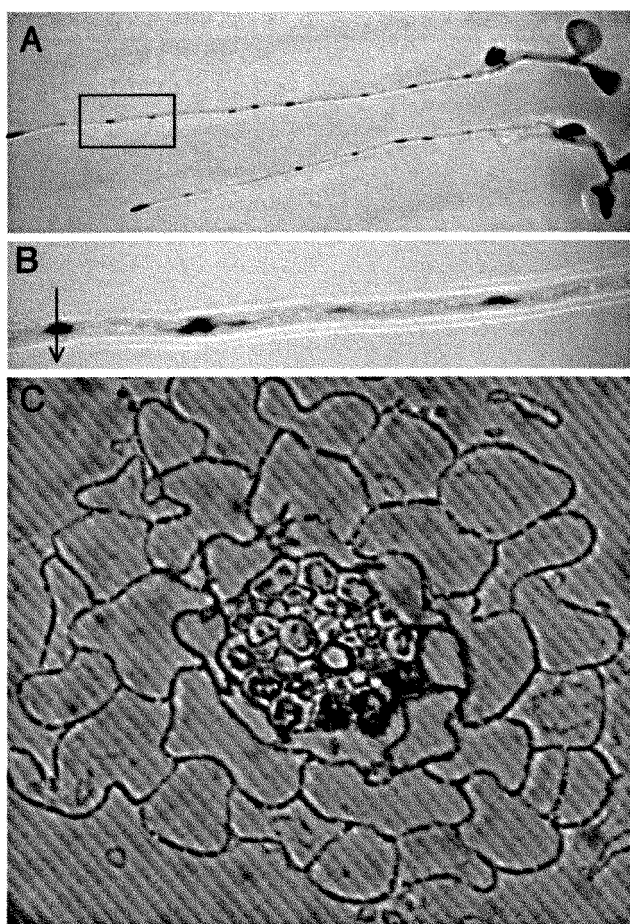
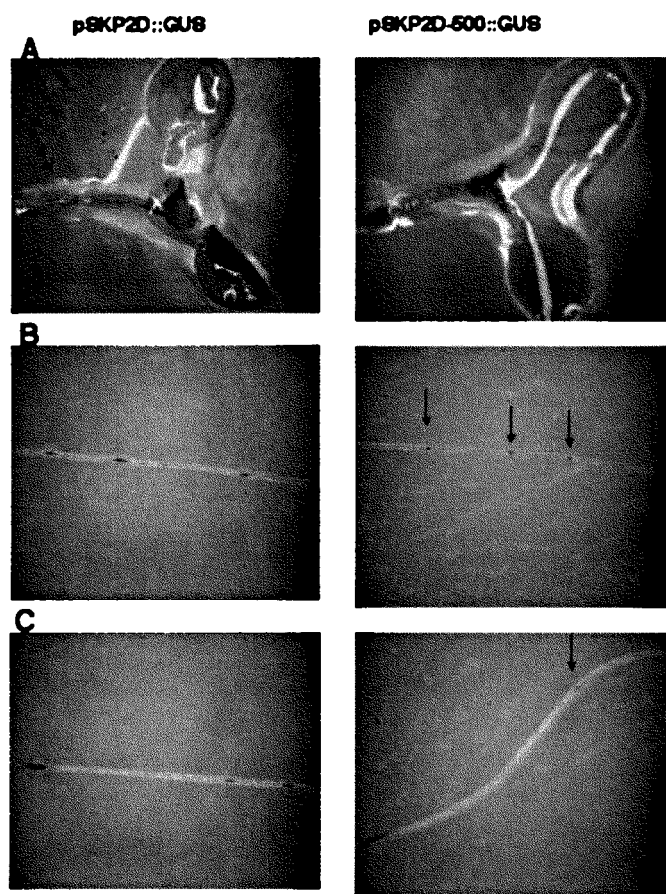


Figura 4



Figura 5



ES 2 316 199 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

5 <120> PLANTAS TRANSGÉNICAS AtPSKP2D, SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y SUS APLICACIONES

10 <130> AtSKP2D

<160> 6

15 <170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1740

<212> DNA

20 <213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

25 <221> promoter AtSKP2D

<222> (1)..(1698)

<400> 1

30 tgggaagctg cccattaga gcaaaaaacg tgcccaccaa ctcaaaggcc tcattagccc 60
ccaatgtgca tttttgttat ctttaccagt tgcggttttt cttctgtttt aaaaaaaaaa 120
35 atatatctca tagtttgttt taattcaagg tgcatttatt tcctggctat taaatctgca 180
attcttgtag aatagttcct gtctttttca tgaaaatagg ttttgtttta tttgcacaag 240
ataaaatata ttcgaagcta gtaaaatagt aaaagaagga aagagtccat taagtttata 300
40 ggtgcatgtg ggtttcacag agagttcaga aaatacaaat agaaagctat actttttaca 360
atggagatta ttcttttggt taacggtttt atgtaagata atgtcatttt ataagttact 420
45 aattcactct tttttattat ttttggtggt gttggttttc tacttctata gatacaaaaa 480
cataatattt gagttgtttt aactgtctt gtaagttcta attgattaat gttatgaact 540
50 tagtttatgc aacgttctac aaacaaagag ctaattttac accagcaaaa atccctcaag 600
tcctacaatt atatgtccat cacaaccgag ttogaacaat catataataa ttatttttgt 660
55 taatgaaacg aggaacgtat gatatgagaa aaggtcattt ctttaattta ataaatgaaa 720
cagtgatata tctttggacg ttatctctcg acttgtaaac gagtttaatt acattatgag 780
actcaacttt gtaatcaatt atttaaagtt ctcaattttt gtcaattccg ttacgtaaat 840
60 tattattaga ttaacaattt caataagata acttctcttg aatattttcc gaatatttgc 900
ttttaattag atattacaac tatggttata aaaataaaat aaaataaccg taaaagagtc 960
65 gtcgaatttg gaatataatt tgtaatagta ctgtattctc ctgtcagttt tagacacgtg 1020
gcagttcacg tgtcatatag tcataaccg tacgtttact ctttgectct ttccctttta 1080

ES 2 316 199 B1

tattcaaaac tcctttttga ttttgtctat cttatctcgt gaatcgtaa ttcgttatca 1140
aaagagctta aaaagcttta aaaaattaac ggattagtaa taattcaacc gaagagaaac 1200
5 ccaaggcacc gaagaacacg atttcagagg tatgatccgg aaaaaaaaaat ccaaagtttt 1260
gatccttttg ttttttgggtg agcaaaaaaa ctggctctac gctagtcaat ggacattctc 1320
ctaaattttt gtctctgttt ttttagattg taaattataa agtaatttct ccaactttct 1380
10 ggaaaaatcc atccagcaaa agaaaagaat aattggtttt attgatcaaa gatcttcagt 1440
tttcaaaatt aagcactaat tatgggggtt tgtttattaa tgtcctaaaa aagagttaca 1500
15 catagagaga cattaatgct tgcagtttag tttaaagagt ttttaagacca tatctcactc 1560
aatccttatt tccttacatt tgcctctctt tgatgtcata gactcagaga tatttattta 1620
tcttctttct ctctcatttc tcattctcat atttactttt gatctcgtgg tgttagaatc 1680
20 aaagaaaccg cttcaaggat ggtgagtgaa ggagcaacaa gaaaagaact taacctctgt 1740

<210> 2

<211> 2514

25 <212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

30 <221> misc_feature

<222> (1)..(500)

<223> región 5'-3'

35

<220>

<221> exon

<222> (501)..(718)

40 <223> Región codificante

<220>

<221> Intron

45 <222> (719)..(990)

<220>

<221> exon

50 <222> (991)..(1339)

<223> Región codificante

<220>

55 <221> Intron

<222> (1340)..(1434)

<223> Región codificante

60

<220>

<221> exon

<222> (1435)..(1576)

65 <223> Región codificante

<220>

ES 2 316 199 B1

<221> Intron
 <222> (1577)..(1640)

5 <220>
 <221> exon
 <222> (1641)..(2014)
 <223> Región codificante

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2015)..(2514)
 15 <223> Región 3'

<400> 2

```

20   acccaaggca ccgaagaaca cgatttcaga ggtatgatcc ggaaaaaaaa atccaaagtt   60
      ttgatccttt tgttttttgg tgagcaaaaa aactggctct acgctagtca atggacattc  120
25   tcctaaatth ttgtctctgt ttttttagat tgtaaattat aaagtaatth ctccaactth  180
      ctggaaaaat ccatccagca aaagaaaaga ataattgggt ttattgatca aagatcttca  240
30   gttttcaaaa ttaagcacta attatgggggt tttgthttatt aatgtcctaa aaaagagtha  300
      cacatagaga gacattaatg cttgcagtht agthtaaaaga gthtttaagac catatctcac  360
35   tcaatcctta thtccttaca thtgtctgtct thtgatgtca tagactcaga gataththatt  420
      tatctthctth ctctctcatt thtcattctc ataththactth thgatctctgt ggtgthtagaa  480
40   tcaaagaaac cgctthcaagg atg gtg agt gaa gga gca aca aga aaa gaa ctt   533
      Met Val Ser Glu Gly Ala Thr Arg Lys Glu Leu
      1             5             10
45   aac ctc tgt thc gag aat atg aag atg gaa gga gth thg atc tht gag   581
      Asn Leu Cys Phe Glu Asn Met Lys Met Glu Gly Val Leu Ile Ser Glu
      15             20             25
50   tgg aaa gat atc cct gtg gag cth ctc atg aag ath tht aac cth gth   629
      Trp Lys Asp Ile Pro Val Glu Leu Leu Met Lys Ile Leu Asn Leu Val
      30             35             40
55   gat gat cgg act gtg atc ath gct tht tgt ath tgt agt ggc tgg aga   677
      Asp Asp Arg Thr Val Ile Ile Ala Ser Cys Ile Cys Ser Gly Trp Arg
      45             50             55
60   gat gct gth thc cth ggc ctc act cgc ctc thc ctc tht thg   718
      Asp Ala Val Ser Leu Gly Leu Thr Arg Leu Ser Leu Ser Trp
      60             65             70
65   gtatgtctct gththcattct thgtthtgatt gtgthtatgat gththgtatta gaagatactth  778
      atatgcgaaa aagtgtththg ggaththgaaat aaathththgg athgatggat gataaathga  838
      tgagaccatg cctggthgatt gaaagagthca aactthththta thgaththggthc agaththththg  898
      tatgaggaca gththctggat gactgatcac aaththgtath thactaggag gatgathththg  958
  
```

ES 2 316 199 B1

```

atTTTTgtgt ttgcttgttg tttgttcttt ag g tgc aag aag aat atg aac agt 1012
                                Cys Lys Lys Asn Met Asn Ser
                                75                                80

5   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

10  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

15  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

20  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

25  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

30  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

35  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

40  aagattcaac tctctctaact actattagct ttctatgttc tttgtctcga tgataaccga 1409

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

45  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

50  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

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

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

65  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

70  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

```

ES 2 316 199 B1

	260	265	270	275	
5	aac aaa cac gag atg tgg cga gcg gta aag aaa gga aaa ttc gat gaa Asn Lys His Glu Met Trp Arg Ala Val Lys Lys Gly Lys Phe Asp Glu	280	285	290	1804
10	gaa gga cta aga agc ctt aac att agt caa tgc act tac cta aca cct Glu Gly Leu Arg Ser Leu Asn Ile Ser Gln Cys Thr Tyr Leu Thr Pro	295	300	305	1852
15	tca gct gtt caa gct gtc tgt gat aca ttc cct gct ctc cac act tgt Ser Ala Val Gln Ala Val Cys Asp Thr Phe Pro Ala Leu His Thr Cys	310	315	320	1900
20	tca ggc aga cat tca ctt gtc atg agc ggt tgt ttg aat cta caa tct Ser Gly Arg His Ser Leu Val Met Ser Gly Cys Leu Asn Leu Gln Ser	325	330	335	1948
25	gtt cat tgt gct tgt atc ctt caa gct cac cgc act cac acc gtt tac Val His Cys Ala Cys Ile Leu Gln Ala His Arg Thr His Thr Val Tyr	340	345	350	1996
30	cct cac ccg gcg cat tga aacgggtgtgt gagccagagg gtctactact Pro His Pro Ala His	360			2044
35	ctctagtatg tgtgtacata catataacca tatggtgtta ataaagcttc tttgagttcc ttctttgtct ttgatgcaat cttaagattt taacattacc tagtcttgaa aatcttgtaa				2104
40	tgaatcgga aatacttatt tcttctaaca atttgtttaa gttgcatcca tcaatcaata atcatatcat taaagaatga ataacacaga aataagatga tgctgctttg catgtgagac				2164
45	taaaccggaa ccggaatgg ttaaaaccaa atcggaat gattttgaag tacaatagta gttacagggt ttatctttca agtagttttc tccaagctat ggaagtagat tgtcggcggt				2224
50	attacgtacg tcttcttcaa tcatgcagca gcagaaatcg cgaaacttta tggagacaaa ccaatggatt gctcttgaag aagggttttc ttagttcaat tgtcattggt				2284
55					2344
60					2404
65					2464
70					2514
75	<210> 3				
80	<211> 360				
85	<212> PRT				
90	<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>				
95	<400> 3				
100	Met Val Ser Glu Gly Ala Thr Arg Lys Glu Leu Asn Leu Cys Phe Glu 1 5 10 15				
105	Asn Met Lys Met Glu Gly Val Leu Ile Ser Glu Trp Lys Asp Ile Pro 20 25 30				
110	Val Glu Leu Leu Met Lys Ile Leu Asn Leu Val Asp Asp Arg Thr Val 35 40 45				
115	Ile Ile Ala Ser Cys Ile Cys Ser Gly Trp Arg Asp Ala Val Ser Leu				

ES 2 316 199 B1

	50		55		60											
5	Gly 65	Leu	Thr	Arg	Leu	Ser 70	Leu	Ser	Trp	Cys	Lys 75	Lys	Asn	Met	Asn	Ser 80
	Leu	Val	Leu	Ser	Leu 85	Ala	Pro	Lys	Phe	Val 90	Lys	Leu	Gln	Thr	Leu	Val 95
10	Leu	Arg	Gln	Asp 100	Lys	Pro	Gln	Leu	Glu 105	Asp	Asn	Ala	Val	Glu 110	Ala	Ile
15	Ala	Asn	His 115	Cys	His	Glu	Leu	Gln 120	Asp	Leu	Asp	Leu	Ser 125	Lys	Ser	Ser
	Lys	Ile 130	Thr	Asp	His	Ser	Leu 135	Tyr	Ser	Leu	Ala	Arg 140	Gly	Cys	Thr	Asn
20	Leu 145	Thr	Lys	Leu	Asn 150	Leu	Ser	Gly	Cys	Thr	Ser 155	Phe	Ser	Asp	Thr	Ala 160
25	Leu	Ala	His	Leu	Thr 165	Arg	Phe	Cys	Arg	Lys 170	Leu	Lys	Ile	Leu	Asn	Leu 175
	Cys	Gly	Cys	Val 180	Glu	Ala	Val	Ser	Asp 185	Asn	Thr	Leu	Gln	Ala 190	Ile	Gly
30	Glu	Asn	Cys 195	Asn	Gln	Leu	Gln	Ser 200	Leu	Asn	Leu	Gly	Trp 205	Cys	Glu	Asn
35	Ile	Ser 210	Asp	Asp	Gly	Val	Met 215	Ser	Leu	Ala	Tyr	Gly 220	Cys	Pro	Asp	Leu
	Arg	Thr 225	Leu	Asp	Leu	Cys 230	Ser	Cys	Val	Leu	Ile 235	Thr	Asp	Glu	Ser	Val 240
40	Val	Ala	Leu	Ala	Asn 245	Arg	Cys	Ile	His	Leu 250	Arg	Ser	Leu	Gly	Leu	Tyr 255
45	Tyr	Cys	Arg	Asn 260	Ile	Thr	Asp	Arg	Ala 265	Met	Tyr	Ser	Leu	Ala 270	Gln	Ser
	Gly	Val	Lys 275	Asn	Lys	His	Glu	Met 280	Trp	Arg	Ala	Val	Lys 285	Lys	Gly	Lys
50	Phe	Asp 290	Glu	Glu	Gly	Leu	Arg 295	Ser	Leu	Asn	Ile	Ser 300	Gln	Cys	Thr	Tyr
55	Leu 305	Thr	Pro	Ser	Ala	Val 310	Gln	Ala	Val	Cys	Asp 315	Thr	Phe	Pro	Ala	Leu 320
	His	Thr	Cys	Ser	Gly 325	Arg	His	Ser	Leu	Val 330	Met	Ser	Gly	Cys	Leu	Asn 335
60	Leu	Gln	Ser	Val 340	His	Cys	Ala	Cys	Ile 345	Leu	Gln	Ala	His	Arg 350	Thr	His
65	Thr	Val	Tyr 355	Pro	His	Pro	Ala	His 360								

<210> 4

<211> 549

ES 2 316 199 B1

<212> DNA

<213> Artificial sequence

5 <220>

<223> Región promotora mínima

<400> 4

```
10      aagctttaaa aaattaacgg attagtaata attcaaccga agagaaaccc aaggcaccga      60
      agaacacgat ttcagaggta tgatccggaa aaaaaaatcc aaagttttga tccttttggt      120
15      ttttggtgag caaaaaaact ggtcctacgc tagtcaatgg acattctcct aaatttttgt      180
      ctctgttttt ttagattgta aattataaag taatttctcc aactttctgg aaaaatccat      240
20      ccagcaaaag aaaagaataa ttgggttttat tgatcaaaga tcttcagttt tcaaaattaa      300
      gcactaatta tgggggttttg tttattaatg tcctaaaaaa gagttacaca tagagagaca      360
25      ttaatgcttg cagtttagtt taaagagttt taagaccata tctcactcaa tccttatttc      420
      cttacatttg tcgtcttttg atgtcataga ctcagagata tttatttata ttctttctct      480
30      ctcatttctc attctcatat ttacttttga tctcgtggtg ttagaatcaa agaaaccgct      540
      tcaaggatg                                     549
```

<210> 5

35 <211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

40 <220>

<223> Oligo P1

45 <400> 5

gaagatttgg gggaagctgc cc

22

<210> 6

50 <211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

55 <220>

<223> Oligo P2

60 <400> 6

gctcctaggt actcaccatc cttgaagcgg

30

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 316 199

② N° de solicitud: 200402349

③ Fecha de presentación de la solicitud: 01.10.2004

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X Y	WO 03000898 A1 (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG.) 03.01.2003, reivindicación 27.	1-5,7-13, 15,16, 18-21 14
X Y	WO 02016655 A2 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 28.02.2002, reivindicación 144.	1-5,7-13, 15,16, 18-21 14
X Y	EP 1033404 A2 (CERES INCORPORATED) 06.09.2000, todo el documento.	6,17,14
X Y	"Arabidopsis thaliana chromosome I BAC F22K20 genomic sequence,complete". 08.06.1997. Recuperado de EBI. N° de acceso AC002291.	6,17,14
X Y	"F22K20.10 protein (F-box protein family, AtFBL5)". 01.06.1998. Recuperado de EBI. N° de acceso O49286.	6,17,14
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, Febrero 2002, Vol. 14, páginas 421-433.	1-21
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, Diciembre 2002, Vol. 14, páginas 3057-3071.	1-21

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

05.03.2009

Examinador

I.Rueda Molins

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)