



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 293 742**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Número de solicitud europea: **99961741 .8**
86 Fecha de presentación : **19.11.1999**
87 Número de publicación de la solicitud: **1133568**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.09.2001**

54 Título: **Secuencias reguladoras útiles para la expresión génica en tejido embrionario vegetal.**

30 Prioridad: **20.11.1998 US 109167 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2008

73 Titular/es: **Dow AgroSciences L.L.C.**
9330 Zionsville Road
Indianapolis, Indiana 46268, US

72 Inventor/es: **Armstrong, Katherine;**
Pareddy, Dayakar, R.;
Woosley, Aaron, T.;
Rubin-Wilson, Beth, C.;
Hey, Timothy, D.;
Folkerts, Otto y
Smith, Kelley, A.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

DESCRIPCIÓN

Secuencias reguladoras útiles para la expresión génica en tejido embrionario vegetal.

5 La presente invención se refiere a la biología molecular de las plantas. En particular, se refiere a secuencias de promotores útiles para la expresión génica en determinados órganos y tejidos vegetales.

10 Los promotores vegetales aislados son útiles para la modificación genética de las plantas para producir plantas transgénicas con los fenotipos deseados. Para producir tales plantas transgénicas, se introduce un promotor vegetal aislado en un vector y se une operativamente a una secuencia de ADN heterólogo. Luego, las células vegetales se transforman con el vector de tal forma que la expresión del ADN heterólogo queda controlada por el promotor.

15 Algunos promotores vegetales son específicos de tejido, mientras que otros son constitutivos y dirigen la expresión esencialmente en todos los órganos y tejidos. Se pueden identificar promotores específicos del tejido de genes que se expresan en determinados tejidos o en determinados momentos durante el desarrollo.

20 Existe la necesidad de una serie de promotores diferentes que sean útiles para la manipulación genética de las plantas. Los nuevos promotores específicos de tejido son particularmente útiles para la expresión controlada de diferentes secuencias de ácidos nucleicos en plantas transgénicas. La presente invención trata ésta y otras necesidades.

25 La presente invención proporciona promotores de la metalotioneína del maíz específicos de los embriones. Se pueden utilizar los promotores para proporcionar expresión específica de embriones de las secuencias heterólogas en las plantas. En particular, los promotores son útiles para la expresión en el maíz.

Más específicamente, de acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se da a conocer una molécula aislada de ADN que comprende los pares de bases 1446-1557, 1383-1557, 916-1557, 50-1557, 1446-1649, 1383-1649, 916-1649, 50-1649, 1558-1694 ó 1383-1465 de la SEQ ID n.º 5.

30 De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se da a conocer un casete de expresión que comprende un promotor específico de embriones unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico heterólogo, en el que el promotor comprende una secuencia que se extiende desde aproximadamente el par de bases 50 al par de bases 1649 de la SEQ ID n.º 5.

35 De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para expresar una secuencia de ácido nucleico heterólogo en una planta que comprende:

40 a) introducir en una célula vegetal un vector que comprende un promotor de la metalotioneína específico de embriones que comprende una secuencia que se extiende desde aproximadamente el par de bases 50 al par de bases 1649 de la SEQ ID n.º 5 unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico heterólogo; y

b) regenerar una planta a partir de dicha célula.

45 En una realización preferida del tercer aspecto, el método comprende además la transmisión sexual a la progenie de dicho promotor de la metalotioneína del maíz específico de embriones unido operativamente a dicha secuencia de ácido nucleico heterólogo.

50 De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención, se da a conocer un método para producir semillas que comprende expresar una secuencia de ácido nucleico heterólogo mediante un método de acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención para producir dicha progenie y recoger las semillas producidas por dicha progenie.

Definiciones

55 La terminología “ácidos nucleicos”, tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a ADN o a ARN. “Secuencia de ácido nucleico” o “secuencia polinucleotídica” se refiere a un polímero mono- o bicatenario de bases desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas leídas desde el extremo 5’ al 3’. Las regiones de la secuencia de una cadena de ADN que se encuentra en 5’ respecto al extremo 5’ de un transcrito de ARN codificado por el ADN se citan como “secuencias cadena arriba”. Las secuencias cadena arriba se numeran normalmente en una dirección negativa desde el sitio de inicio de la transcripción. Las regiones de la secuencia de la cadena de ADN que se encuentran en 3’ respecto al extremo 3’ de un transcrito de ARN se citan como “secuencias cadena abajo”.

65 La terminología “promotor” se refiere a una región de ADN cadena arriba desde el codón de inicio de la traducción y que está implicado en el reconocimiento y la unión de la ARN-polimerasa y otras proteínas para iniciar la transcripción. Un “promotor vegetal” es un promotor capaz de iniciar la transcripción en las células vegetales. La terminología “promotor de la metalotioneína del maíz” tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a los promotores vegetales que comprenden secuencias obtenidas de la región promotora de un gen de la metalotioneína del maíz. Los promotores de la invención contienen elementos específicos de tejido que permiten que las secuencias de ADN unidas operativamente se transcriban de forma específica en el embrión. Se considera que los promotores

son promotores específicos de los embriones porque la transcripción del ADN unido operativamente es mayor en los tejidos embrionarios que en otros tejidos.

Un promotor “específico de tejido” tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a un promotor que dirige la expresión de una secuencia de ácido nucleico unida operativamente en un tejido determinado de una planta o en una etapa determinada del ciclo de vida de la planta.

La terminología “unido operativamente” tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a la unión de un promotor cadena arriba de una secuencia de ADN de tal forma que el promotor interviene en la transcripción de la secuencia de ADN. Se entiende que el objetivo de la secuencia promotora incluye las secuencias transcritas entre el inicio de la transcripción y el inicio de la traducción y el codón de inicio de la traducción.

La frase “casete de expresión” se refiere a las secuencias nucleotídicas que son capaces de alterar la expresión de un gen estructural en los hospedadores compatibles con tales secuencias. Tales casetes incluyen al menos promotores y, opcionalmente, señales de terminación de la transcripción. También se pueden utilizar tal y como se describen en la presente memoria otros factores necesarios o útiles para alterar la expresión.

Un ácido nucleico o proteína “heterólogo” es el que tiene su origen en una fuente (o especie) ajena o, si es de la misma fuente, se modifica a partir de su forma original. Así, una secuencia promotora heteróloga en un casete de expresión procede de una fuente diferente de la fuente de la secuencia codificante o, si procede de la misma fuente, su forma original está modificada. La modificación se puede producir, por ejemplo, al tratar el ADN con una enzima de restricción para generar un elemento promotor que es capaz de conferir la expresión específica de tejido al casete de expresión que lo incluye.

Las frases “aislado” o “sustancialmente puro”, cuando se refieren a un polinucleótido o proteína, significan una composición química que está libre de otros componentes subcelulares del organismo del cual se obtiene. Por regla general, un compuesto está sustancialmente puro cuando al menos aproximadamente el 85% o más de una muestra presenta un único esqueleto polipeptídico o secuencia polinucleotídica. Por lo general, las variantes menores o las modificaciones químicas pueden compartir la misma secuencia polipeptídica. Dependiendo del procedimiento de purificación, son posibles una pureza del 85% y, preferiblemente, una pureza por encima del 95%. La pureza u homogeneidad del ácido nucleico y de la proteína se pueden mostrar de muchas maneras bien conocidas en la técnica, tales como la electroforesis en gel y similares.

La terminología “vegetal” o “planta” incluye plantas enteras, órganos vegetales (por ejemplo, hojas, raíces, tallos, etc.), semillas y células vegetales, y la progenie de las mismas. La clase de plantas que se pueden utilizar en el método de la invención es generalmente tan amplio como la clase de las plantas superiores tratables con las técnicas de transformación, incluidas las plantas monocotiledóneas y las dicotiledóneas.

El “porcentaje de identidad de la secuencia” para los polinucleótidos y los polipéptidos se determina comparando dos secuencias alineadas óptimamente sobre una ventana de comparación, en la que la porción de la secuencia polinucleotídica o polipeptídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (por ejemplo, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. Se calcula el porcentaje determinando el número de posiciones en las que se encuentran la misma base de ácido nucleico o el mismo resto de aminoácido en ambas secuencias para producir el número de posiciones idénticas, dividiendo el número de posiciones idénticas por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de la identidad de la secuencia. El alineamiento óptimo de las secuencias a comparar se puede realizar mediante aplicaciones informáticas con algoritmos conocidos (por ejemplo, GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package del Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wis, o BlastN y BlastX disponibles en el National Center for Biotechnology Information), o mediante inspección. Por regla general, se comparan las secuencias utilizando BESTFIT o BlastN con los parámetros por omisión.

Identidad sustancial de las secuencias polinucleotídicas significa que un polinucleótido comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos el 75%, preferiblemente al menos del 80%, más preferiblemente al menos del 90% y lo más preferiblemente al menos del 95%. Por regla general, se considera que dos polipéptidos son sustancialmente idénticos si al menos el 40%, preferiblemente al menos el 60%, más preferiblemente al menos el 90% y lo más preferiblemente al menos el 95%, son sustituciones idénticas o conservativas. Los polipéptidos que son “sustancialmente similares” comparten secuencias tal y como se destacó anteriormente, excepto que las posiciones de los restos que no son idénticos pueden diferir por cambios de aminoácidos conservativos. Las sustituciones de aminoácidos conservativas se refieren a la intercambiabilidad de los restos que tiene cadenas laterales similares.

Otra indicación de que las secuencias polinucleotídicas son sustancialmente idénticas se produce si dos moléculas se hibridan selectivamente una con la otra en condiciones rigurosas. La frase “que se hibrida selectivamente” se refiere a una sonda de ácido nucleico que se hibrida o se une sólo a una secuencia de ADN o ARN de diana particular cuando las secuencias de diana están presentes en una preparación de ADN o ARN celular total. Las condiciones rigurosas dependen de las secuencias y serán diferentes en circunstancias diferentes. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que estén a unos 20°C por debajo del punto de fusión térmico (T_m) de la secuencia específica a

una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (a una fuerza iónica y pH definidos) a la cual el 50% de la secuencia de diana se hibrida a una sonda emparejándose perfectamente.

Breve descripción de las secuencias

La SEQ ID n.º 1 es la secuencia del ADN del cebador SK.

La SEQ ID n.º 2 es la secuencia del ADNc de la metalotioneína Ec del maíz.

La SEQ ID n.º 3 es la secuencia del ADN del clon 651, que contiene las primeras 233 bases de la región codificante de la metalotioneína Ec del maíz.

La SEQ ID n.º 4 es la secuencia del ADN del cebador T3.

La SEQ ID n.º 5 es la secuencia del ADN del clon MGN 111-1.

La presente invención da a conocer nuevas secuencias de promotores vegetales útiles para la expresión de secuencias de ácido nucleico deseadas en los embriones de las plantas. En particular, la invención da a conocer moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden los pares de bases 1446-1557, 1383-1557, 916-1557, 50-1557, 1446-1649, 1383-1649, 916-1649, 50-1649, 1558-1649 ó 1383-1465 de la SEQ ID n.º 5 de los promotores obtenidos de un gen de la metalotioneína del maíz. Las secuencias del promotor de la invención se pueden utilizar para impulsar la expresión de una serie de secuencias de ácido nucleico heterólogo en el tejido embrionario de las plantas transgénicas.

I. Aislamiento de promotores de la metalotioneína del maíz

Las secuencias promotoras de la presente invención comprenden los pares de bases 1446-1557, 1383-1557, 916-1557, 50-1557, 1446-1649, 1383-1649, 916-1649, 50-1649, 1558-1649, ó 1383 - 1465 de la SEQ ID n.º 5. Por lo general, los promotores de la metalotioneína del maíz son idénticos o muestran una identidad de secuencia sustancial (determinada tal y como se describe más arriba) a porciones de la secuencia nucleotídica del promotor de la metalotioneína del maíz descrita en las pares de bases 50 a 1649 de la SEQ ID n.º 5. A partir del maíz se pueden aislar numerosos promotores diferentes que tienen homología o identidad de secuencia sustancial con las secuencias promotoras de la SEQ ID n.º 5.

Las secuencias del promotor de la metalotioneína del maíz se hibridan por regla general a un ácido nucleico que tiene una secuencia como la que se muestra en las pares de bases 50 a 1649 de la SEQ ID n.º 5 en condiciones rigurosas. Por regla general, las condiciones rigurosas para un protocolo de transferencia Southern implican lavar a 55°C con SSC 0,2X.

Se pueden utilizar una serie de métodos para aislar las secuencias promotoras de la metalotioneína. Por ejemplo, se puede aislar ADN de una genoteca genómica utilizando sondas de ácido nucleico marcadas que tienen secuencias complementarias a las secuencias descritas aquí. Se pueden utilizar sondas de longitud completa o también se pueden generar sondas oligonucleotídicas. Alternativamente, se pueden aislar clones genómicos que comprenden los genes y se puede subclonar el extremo 5' de los clones para proporcionar las secuencias del promotor. Las técnicas para la manipulación nucleotídica de los genes tales como subclonar las secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos en vectores de expresión, sondas de marcación, hibridación del ADN, y similares, se describen de forma general en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2ª Ed.), vol. 103, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989). A partir de ahora, este manual se cita como "Sambrook *et al.*".

Además de la detección por medio de las secuencias descritas aquí, se pueden utilizar técnicas diseñadas para identificar secuencias específicas para un tejido o tipos de células particulares para aislar secuencias (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*). Tales técnicas incluyen técnicas de hibridación diferencial como las descritas en la sección de ejemplos o en Gurr *et al. Mol. Gen. Genet.* 226: 361-366 (1991). Además, se pueden utilizar técnicas de hibridación sustractiva para preparar sondas específicas para detectar genotecas de ADNc o genómicas. También se pueden utilizar estas técnicas para preparar genotecas sustractivas enriquecidas en las secuencias deseadas. Una vez que se identifica un clon genómico deseado, se pueden analizar las secuencias en 5' para identificar la secuencia del promotor del gen. Esto se puede llevar a cabo introduciendo secuencias en 5' en frente de un gen indicador (por ejemplo, GUS) sin promotor para identificar las regiones que pueden conducir la expresión de un gen estructural.

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos como la tecnología de la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) también se pueden utilizar para amplificar los genes y secuencias promotoras deseados a partir de ARNm, de ADNc y de genotecas de ADNc o genómicas. En las técnicas de PCR se pueden sintetizar cebadores oligonucleotídicos basados en las secuencias descritas aquí y complementarios a los bordes en 5' y 3' de la región del ADN a amplificar. A continuación se lleva a cabo la reacción en cadena de la polimerasa utilizando los dos cebadores. Véase *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* [Innis, M, Gelfand, D., Sninsky, J. y White, T., eds., Academic Press, San Diego (1990)]. Se pueden seleccionar cebadores para amplificar las regiones completas que codifican una isocitrato-licasa de longitud completa o su promotor. También se puede utilizar la PCR para amplificar segmentos de ADN más pequeños de esas regiones como se desee.

Los oligonucleótidos a utilizar como cebador o sondas en los procedimientos antes mencionados se pueden sintetizar químicamente según las técnicas estándares tales como el método del triéster de fosoramidita en fase sólida descrito por primera vez por Beaucage *et al.* *Tetrahedron Lett.* 22(20): 1859-1862 (1981), que utiliza un sintetizador automático, como se describe en Needham-Van Devanter *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 12: 6159-6168 (1984).

Tal y como se demuestra más abajo, secuencias que confieren una expresión específica de tejido se encuentran en los promotores de la invención. Por esta razón, se pueden construir promotores heterólogos que tienen una expresión específica de tejido como resultado de la presencia de los elementos específicos del tejido contenidos en estas secuencias.

Otro elemento importante es el líder sin traducir en 5', es decir, el extremo 5' del ARNm que se extiende desde el sitio de la caperuza en 5' hasta el codón AUG de inicio de la traducción del ARNm. El líder desempeña una función decisiva en la iniciación de la traducción y en la regulación de la expresión del gen. Para la mayoría de los ARNm eucarióticos, la traducción se inicia con la unión de la proteína de unión a la caperuza, a la caperuza del ARNm. A continuación se produce la unión de otros diferentes factores de traducción, así como el complejo de preiniciación del ribosoma 43S. Este complejo se desplaza hacia 3' por la molécula del ARNm mientras rastrea la presencia de un codón de iniciación AUG en un contexto de secuencia adecuado. Una vez que lo ha encontrado, y con la adición de la subunidad ribosómica 60S, el complejo de iniciación 80S completo inicia la traducción de la proteína. Pain (1986); Moldave (1985); Kozak (1986). Se ha demostrado que la optimización de la secuencia líder de cara a la unión del complejo ribosómico aumenta la expresión del gen como resultado directo de la mejora de la eficacia del inicio de la traducción. Se han producido aumentos significativos en la expresión génica mediante la adición de secuencias líderes de virus vegetales o de genes de choque térmico. Raju *et al.* (1993); (Austin, 1994). Dietrich *et al.* (1987) informaron que la longitud del líder sin traducir en 5' era importante para la expresión génica en los protoplastos.

Las realizaciones específicas de la invención incluyen las siguientes porciones de la SEQ ID n.º 5:

pb de la SEQ ID NO:5	descripción
50-1649	promotor largo + líder sin traducir
916-1649	promotor + líder sin traducir
1383-1649	secuencia crítica para la expresión específica en el embrión y líder sin traducir
1466-1649	promotor mínimo y líder sin traducir
50-1557	promotor largo
916-1557	promotor
1383-1557	secuencias críticas para la expresión específica en el embrión
1466-1557	promotor mínimo
1383-1465	secuencias críticas para la expresión específica en el embrión
1558-1649	secuencia líder sin traducir

II. Construcción de casetes de expresión y vectores

Se conocen bien los métodos requeridos para construir vectores que contienen los casetes de expresión que comprenden un promotor de la invención unido operativamente a la secuencia deseada. Los requisitos mínimos del vector son que la secuencia deseada de ácido nucleico se introduzca en un estado relativamente intacto. Por esta razón, debería bastar cualquier vector que produzca una planta que lleve la secuencia introducida de ADN. La selección de los vectores y los métodos para construirlos son ampliamente conocidos por las personas expertas en la técnica y se describen en referencias técnicas generales (véase, en general, *Methods in Enzymology* vol. 153 ("Recombinant DNA Part D") 1987, Wu y Grossman Eds., Academic Press).

Los vectores recombinantes de la presente invención comprenden, por regla general, un casete de expresión diseñado para iniciar la transcripción de las secuencias polinucleotídicas en las plantas. Las secuencias acompañantes, de origen bacteriano, también se incluyen para permitir que el vector se clone en un hospedador bacteriano. El vector contendrá preferiblemente un origen de replicación procariótico de amplio espectro de hospedadores. También se debe incluir un marcador de selección para permitir la selección de células bacterianas que llevan la construcción deseada. Los marcadores de selección procarióticos adecuados incluyen la resistencia a antibióticos tales como la kanamicina o la tetraciclina.

Para la expresión de los polipéptidos en las plantas, el casete de expresión recombinante contendrá, además de la secuencia polinucleotídica deseada y de la secuencia promotora de la invención, un sitio de iniciación de la traducción (si la secuencia a transcribir carece de uno) y una secuencia de terminación de la transcripción. Los sitios únicos para enzimas de restricción en los extremos 5' y 3' del casete se incluyen por regla general para permitir la introducción fácil en vectores ya existentes.

En la construcción de las combinaciones de promotor heterólogo/gen estructural, el promotor se coloca preferiblemente a la misma distancia aproximadamente del sitio de inicio de transcripción heteróloga a la que está el sitio de inicio de la transcripción en el contexto natural. Sin embargo, tal y como se conoce en la técnica, se pueden realizar algunas variaciones de esto sin pérdida de la función del promotor.

Tal y como se observó anteriormente, un casete de expresión también debe contener una región de terminación de la transcripción cadena abajo del gen estructural para proporcionar una terminación eficaz. La región de terminación se puede obtener a partir del mismo gen como la secuencia promotora o se puede obtener a partir de genes diferentes.

Si el ARNm codificado por el gen estructural se traduce de manera eficaz, las secuencias de poliadenilación también se añaden normalmente a la construcción del vector. Alber y Kawasaki, *Mol. and Appl. Genet.*, 1: 419-434, 1982. Las secuencias de poliadenilación incluyen, pero sin limitarse a éstas, la señal de la octopina-sintasa de *Agrobacterium* (Gielen *et al.*, *EMBO J.*, 3: 835-846, 1984) o la señal de la nopalina-sintasa (Depicker *et al.*, *Mol. and Appl. Genet.*, 1: 561-573, 1982).

Por lo general, el vector contendrá un gen marcador de selección mediante el cual las células vegetales transformadas se pueden identificar en el cultivo. Normalmente, el gen marcador codificará una resistencia a antibióticos o a herbicidas. Estos marcadores incluyen la resistencia al G418, la higromicina, la bleomicina, la kanamicina, la gentamicina, Basta™ y el clorosulfurón. Después de transformar las células vegetales, las células que tienen el vector se identificarán por su capacidad para crecer en un medio que contiene el antibiótico en particular.

Ejemplos de genes estructurales adecuados que se pueden expresar utilizando las secuencias promotoras de la invención incluyen genes para la resistencia a los herbicidas; genes para la resistencia a enfermedades fúngicas (por ejemplo, quitinasas y glucanasas); genes para la resistencia a enfermedades bacterianas (por ejemplo, cecropinas); genes para la resistencia a los insectos (por ejemplo, toxina de *B. thuringiensis*); y genes que modifican el contenido de aceite o de aminoácidos del embrión.

III. Producción de plantas transgénicas

Se conocen bien y se describen en la bibliografía las técnicas para transformar una gran variedad de especies de plantas superiores. Véase, por ejemplo, Weising *et al.*, *Ann. Rev. Genet.* 22: 421-477 (1988). Las construcciones de ADN que contienen la secuencia promotora unida al ADN heterólogo se pueden introducir en el genoma del hospedador vegetal deseado mediante una serie de técnicas convencionales. Por ejemplo, la construcción de ADN se puede introducir directamente en el ADN genómico de la célula vegetal utilizando técnicas tales como la electroporación y la microinyección de protoplastos de células vegetales. Alternativamente, las construcciones de ADN se pueden introducir directamente en el tejido vegetal utilizando métodos balísticos, como el bombardeo con partículas de ADN. Normalmente, las construcciones de ADN se combinan con las regiones flanqueantes del ADN-T adecuadas y se introducen en un vector hospedador convencional de *Agrobacterium tumefaciens*.

Se conocen bien en la técnica las técnicas de transformación directa y se describen bien en la bibliografía científica. La introducción de construcciones de ADN utilizando la precipitación con polietilenglicol se describe en Paszkowski *et al.*, *Embo J.* 3: 2717-2722 (1984). Las técnicas de electroporación se describen en Fromm *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5824 (1985). Las técnicas de transformación balística se describen en Klein *et al.*, *Nature* 327: 70-73 (1987). La transformación mediada por bigotes se describe en Frame *et al.*, *Plant J.* 6:941-948 (1994).

Las técnicas de transformación mediadas por *Agrobacterium* son las técnicas que se utilizan con más frecuencia y se describen bien en la bibliografía científica. Véase, por ejemplo, Horsch *et al.*, *Science* 233: 496-498 (1984), y Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4803 (1983).

La expresión de las secuencias de ADN heterólogo se pueden detectar por distintos caminos, según la naturaleza de las secuencias heterólogas. Por ejemplo, se puede detectar la resistencia a un herbicida o patógeno mediante el tratamiento con el herbicida o el patógeno. Se puede detectar la expresión mediante la medición del producto de transcripción del ARN específico. Esto se puede realizar mediante, por ejemplo, procedimientos de transferencia Northern. Si las secuencias de ADN heterólogo codifican una nueva proteína, se puede analizar el producto proteico, por ejemplo, mediante su función o mediante una serie de técnicas de inmunoanálisis.

Las células vegetales transformadas que se obtienen mediante una cualquiera de las técnicas de transformación anteriores se pueden cultivar para regenerar una planta entera que posee el fenotipo transformado deseado. La regeneración de plantas a partir de protoplastos cultivados se describe en Evans *et al.*, "Protoplast Isolation and Culture", *Handbook of Plant Cell Culture*, MacMillan Publishing Company, Nueva York, págs. 124-176 (1983); y en "Binding, Regeneration of Plants", *Plant Protoplasts*, CRC Press, Boca Raton, págs. 21-73 (1985). También se puede conse-

guir la regeneración a partir de callos, explantos, órganos, o partes de los mismos, de las plantas. Tales técnicas de regeneración se describen de forma general en Klee *et al.*, *Ann. Rev. of Plant Phys.* 38: 467-486 (1987).

El experto en la técnica reconocerá que, después de que un casete de expresión que comprende una secuencia del promotor de la metalotioneína del maíz se incorpora de manera estable en las plantas transgénicas y se confirma que es operativo, se puede introducir en otras plantas mediante cruzamiento sexual. Se puede utilizar una cualquiera de las numerosas técnicas de reproducción estándares, según las especies a cruzar.

Las secuencias del promotor de la invención se pueden utilizar en la transformación de cualquier planta, incluidas las dicotiledóneas y las monocotiledóneas. La transformación de las dicotiledóneas se describe en las referencias anteriores. Se sabe que para la transformación de las monocotiledóneas se utilizan diferentes técnicas, incluida la electroporación [por ejemplo, Shimamoto *et al.*, *Nature* 338: 274-476 (1992) la balística (p. ej., solicitud de patente europea 270.356); y *Agrobacterium* [p. ej., Bytebier *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84:5345-5349 (1987)].

Los métodos y las composiciones de la invención se han utilizado en muchos tipos de plantas.

IV. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se dan a conocer a modo de ilustración y no de limitación.

Ejemplo 1

Secuenciación y análisis de los ADNc

Los ADNc del maíz específicos de embrión se identificaron secuenciando aleatoriamente clones individuales de una genoteca de ADNc de embriones del maíz.

A. Preparación de la genoteca de ADNc de embriones del maíz

La genoteca de ADNc se preparó a partir de granos recolectados a los 20 DDP (días después de la polinización) a partir de la estirpe endogámica de maíz CS608 que se había cultivado en el invernadero. Se recogieron los embriones de los granos, se congelaron inmediatamente en hielo seco y se guardaron a -70°C . Se extrajo ARN moliendo los embriones (2,5 g) en nitrógeno líquido para obtener un polvo fino. A continuación se añadieron 10 ml del tampón de extracción [Tris-HCl a 50 mM, pH 8,0, ácido para-amino-salicílico al 4% (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO), ácido tri-iso-propilnaftalenosulfónico al 1% (Eastman Kodak Co., Rochester, NY), ditiotreitól (DTT) a 10 mM (Bethesda Research Labs, Gaithersburg, MD) y meta-bisulfito de sodio a 10 mM (Sigma Chemical Co.)] y se homogeneizó la mezcla durante 1 minuto utilizando un TEKMAR TISSUMIZER (Tekmar Co., Cincinnati, OH). Se extrajo el homogeneizado con un volumen igual de fenol equilibrado con Tris-HCl a 0,1 M, pH 8,0. Se separaron las fases orgánica y acuosa mediante centrifugación a 4°C . Se retiró la fase acuosa y se extrajo con un volumen igual de cloroformo/octanol (24:1). Luego, se transfirió el sobrenadante, se centrifugó, se transfirió de nuevo y se añadió medio volumen de acetato de amonio a 7,5 M (pH 8,0). Después se precipitó el ARN en hielo durante 30 minutos.

El ARN precipitado se recogió por centrifugación y se disolvió en 1 ml de agua-DEPC (agua tratada con dietil-piropirarbonato) (0,1% v/v). Se añadió la mitad del volumen de acetato de amonio a 7,5 M (pH 8,0) y dos volúmenes de etanol al 100% y a continuación se precipitó el ARN a -20°C durante 30 minutos. Se recogió el precipitado por centrifugación, se lavó en etanol al 70% enfriado en hielo, se secó al aire y se disolvió en 0,5 ml de agua tratada con DEPC.

Se purificó el ARNm poliA⁺ en columnas de oligo dT-celulosa (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA). Se equilibró la oligo-dT celulosa (0,1 g) de tipo 3 en 5 ml del tampón 1 durante 30 minutos, en donde el tampón 1 es un tampón de carga con NaCl a 0,5 M y el tampón de carga es Tris-HCl a 20 mM, pH 7,6, ácido etileno-diaminotetraacético (EDTA) a 1 mM y lauril-sulfato de sodio (SDS) al 0,1%. Tras hacer fluir la columna, se lavó con 3 volúmenes de agua-DEPC, 3 volúmenes de un tampón de lavado [NaOH a 0,1 N, EDTA a 5 mM], 3 volúmenes de agua-DEPC y 5 volúmenes del tampón 1. El sedimento de ARN disuelto se calentó a 65°C durante 5 minutos, se diluyó 2 veces con el tampón 2 [tampón de carga a 2x] y, luego, se aplicó a la columna de oligo-dT. El material de flujo continuo se recogió, se volvió a calentar y se volvió a aplicar a la columna. A continuación, se lavó la columna con 10 volúmenes del tampón 1 y después con 10 volúmenes del tampón 3 [tampón de carga que tiene NaCl a 0,1 M]. Se eluyó el ARN poliA⁺ con 3 volúmenes del tampón de elución [Tris-HCl a 10 mM, pH 7,5, EDTA a 1 mM, SDS al 0,05%] y se recogió en fracciones de 0,5 ml. Se combinaron las fracciones del ARN, se tamponaron con acetato de sodio a 0,3 M pH 5,2 y se precipitó a -20°C durante 16 horas después de añadir 2,2 volúmenes de etanol al 100%. Se recogió el precipitado por centrifugación, se lavó con etanol al 70%, se secó y se disolvió en 50 μl de agua tratada con DEPC. A continuación se volvió a purificar este material sobre una columna nueva de oligo-dT, tal y como se describió más arriba, para producir ARNm muy enriquecido en poliA⁺. Se determinó la concentración del ARN midiendo la $\text{DO}_{260\text{ nm}}$.

Se convirtieron 5 μg de ARN poliA⁺ a ADNc y se clonaron en el vector LAMB-DA UNI-ZAP utilizando el kit de síntesis y clonación de ADNc en Lambda ZAP de acuerdo con los protocolos del fabricante (Stratagene, La Jolla, CA). La genoteca resultante tenía un título original de $3,38 \times 10^{10}$ unidades formadoras de calvas/ml (ufc/ml), más del

95% eran recombinantes y el tamaño medio del inserto era de 1,35 kb. Se amplificó la genoteca de ADNc de acuerdo con Sambrook *et al.*, (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press) y tuvo un título de $6,0 \times 10^6$ ufc/ml. Toda la genoteca de ADNc se guardó por lotes y se aisló tal como sigue: 5 ml de células de *E. coli* XL1 Blue (Stratagene) a una $DO_{600\text{ nm}} = 1,0$ en $MgSO_4$ en 10 mM se mezclaron con $8,3\ \mu\text{l}$ (5×10^8 ufp) de la reserva amplificada de fagos de la genoteca de ADNc de embriones y $100\ \mu\text{l}$ de fago ayudante EXAS-SIST (Stratagene), y se incubaron a 37°C durante 20 minutos. Se añadieron 25 ml del medio TY, pH 7,8 [triptona a 8,0 g/l, extracto de levadura a 5,0 g/l y NaCl a 2,5 g/l] y se incubaron las células a 37°C durante 3 horas en agitación. Después, se mataron con calor las células bacterianas a 68°C durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante. Se mezclaron $500\ \mu\text{l}$ de sobrenadante con 14,5 ml de células SOLR (Stratagene) ($DO_{600\text{ nm}} = 1,5$), se incubó a 37°C durante 15 minutos, se añadió a 500 ml de LB [triptona a 10 g/l, NaCl a 10 g/l y extracto de levadura a 5 g/l] que contiene ampicilina ($50\ \mu\text{g/ml}$) y se cultivó durante una noche. Después se obtuvo el ADN plasmídico por lisis alcalina/purificación en CsCl, de acuerdo con Sambrook *et al* (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press) y se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa tras la digestión con *EcoRI/XhoI*. Tras la electroforesis se observó una estela que iba de 0,5 a 3,0 kb.

B. Recuperación del fagómido, extracción del ADN y secuenciación

El fago se sembró en placa tal y como se describió en los protocolos proporcionados con el kit de síntesis de ADNc ZAP® (Stratagene, La Jolla, CA) para conseguir una densidad de 100 ufc por placa de Petri de 110 mm. Se picaron las calvas y se guardaron en 500 ml del tampón SM (por litro: NaCl 5,8 g, $MgSO_4$ 2,0 g, 50 ml de Tris-Cl a 1 M, pH 7,5, y 5 ml de gelatina al 2%) y se dejó difundir durante 1 a 2 horas a temperatura ambiente o durante una noche a 4°C . Se recuperaron los fagos en la forma fagómida mediante la excisión *in vivo* y la recirculación utilizando los protocolos descritos por Stratagene, con las modificaciones que siguen. A un tubo FALCON 2059 estéril de 5 ml se le añadieron los componentes siguientes: 200 ml de células XL1-BLUE (Stratagene) cultivadas a una DO_{600} de 1,0; 100 ml de la reserva de fagos en SM; 1 ml de fago ayudante EXASSIST (Stratagene). Se incubó esta mezcla a 37°C durante 15 minutos. Se añadieron 3 ml de medio YT a 2x (por litro: NaCl 10 g, extracto de levadura 10 g, triptona 16 g) a los tubos que, luego, se incubaron a 37°C durante 2-2,5 horas con agitación. Se calentaron los tubos a 65°C - 70°C durante 20 minutos y, a continuación, se transfirieron alícuotas de 1 ml a tubos de microcentrifugación estériles que se centrifugaron durante 5 minutos a $12.000\times g$. Este sobrenadante contiene el plásmido empaquetado como una partícula de fago filamentosa. Los fagómidos recuperados se sembraron en placas combinando 200 ml de células SOLR (Stratagene) cultivadas a una $DO_{600} = 1,0$ con 1 ml de la reserva de fagos descrita anteriormente. Se incubaron los tubos a 37°C durante 15 minutos. Las células que contienen el fagómido recuperado se rayaron sobre placas de LB-agar (por litro: NaCl 10 g, bactotripton 10 g, extracto de levadura 5 g, agar 15 g) que contiene ampicilina a 75 mg/ml y se cultivaron durante una noche a 37°C . Se cultivaron colonias aisladas en 3 ml de medio LB durante la extracción del ADN del fagómido utilizando el sistema de purificación de plásmidos QIAWELL (Qiagen, Santa Clarita, CA).

C. Secuenciación y análisis

El ADN plasmídico se secuenció utilizando el kit de secuenciación PRISM Ready Reaction DYEDEOXY Terminator Cycle (Perkin Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City, CA) de acuerdo con el protocolo número 401388. El cebador utilizado para secuenciar el extremo 5' de los ADNc corresponde al cebador SK (Stratagene) y se ofrece en la presente memoria como la SEQ ID n.º 1: 5' CGC TCT AGA ACT AGT GGA TC 3'. Se obtuvieron secuencias del extremo 5' con un solo pase utilizando un secuenciador de ADN ABI PRISM 373 (Perkin Elmer/Applied Biosystems Division). Se editaron las reacciones de secuenciación para localizar las ambigüedades utilizando el programa editor de secuencias de ADN SEQED 675 (Perkin Elmer/Applied Biosystems Division). Las secuencias que contenían menos de 10 lecturas de base ambiguas en 300 bases se utilizaron para buscar en las bases de datos utilizando el programa FastA del paquete Wisconsin Sequence Analysis (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin). Diez clones de los 390 clones secuenciados aleatoriamente de la genoteca del ADNc de embriones del maíz tenían una identidad entre el 96% y el 99% con el número de acceso U10696 de GenBank que codifica un posible homólogo de la metalotioneína Ec del maíz [*Plant physiol* (1995) 108: 831-832, Constance N White y Carol J. Riven, "Characterization and expression of a cDNA encoding seed-specific metallothionein in maize"]. Se seleccionó el plásmido p8.5Ec para la secuenciación de todo el ADNc. La secuencia del ADNc que codifica la metalotioneína Ec del maíz se ofrece en la lista de secuencias como la SEQ ID n.º 2.

D. Descripción del plásmido p8.5Ec

El plásmido p8.5Ec es un plásmido de 3502 pb que contiene el ADNc de la metalotioneína de Ec del maíz clonado en los sitios de restricción de *EcoRI* y *XhoI* del pBluescript® SK+ (Stratagene®, La Jolla, CA). La secuencia de ADN del p8.5Ec se basa en las siguientes asignaciones de secuencia: el nucleótido 1 corresponde a la A del codón ATG que codifica la metionina del gen de resistencia a la ampicilina y continúa por la hebra sentido del ADN hacia el codón de parada del gen de resistencia a la ampicilina, y luego hacia el ATG del gen *lacZ*. Los nucleótidos 1-2127 del p8.5Ec son el inverso complementario de los nucleótidos 707-2833 del plásmido pBluescript® SK+ tal y como se da a conocer en el sitio web de internet de Stratagene®; las bases 2128-2133 son el sitio de clonación único de *EcoRI* GAATTC; las bases 2134-2139 son GGCACG; las bases 2140-2704 corresponden al ADNc 8.5 de la metalotioneína (SEQ ID n.º 2); las bases 2705-2710 son el sitio de clonación único de *XhoI*; las bases 2711-3502 corresponden al inverso complementario de los nucleótidos 1-667/2834-2958 del plásmido pBluescript® SK+ tal y como se describe en el sitio web de internet de Stratagene®.

Ejemplo 2

Análisis de la expresión específica de tejido y el patrón de desarrollo en las semillas

- 5 Los genotipos de maíz propiedad de Dow AgroSciences CS608, HO1, CQ806, OQ414 y Hill, y una B73 endogámica de uso frecuente, se cultivaron en condiciones de invernadero estándares. Para el análisis de la expresión génica específica de tejido del gen de la metalotioneína (*Met*), se recogieron los tejidos en los momentos de desarrollo de interés y se congelaron a -70°C hasta que se vaya a extraer el ARN. Se analizaron los siguientes tejidos y genotipos: Carril 1: callos de Hill; 2: raíces del genotipo B73 a los 23 días después de la germinación; 3: raíces de B73 a los 63 días; 4: hoja de B73 a los 23 días; 5: hoja de Hill a los 60 días; 6: fleco del genotipo B73 en el momento del brote; 7: fibra de la mazorca B73 en el momento del brote; 8: grano de B73 a los 20 días después de la polinización (DDP); 9: endospermo de B73 a los 20 DDP; 10: embrión de CS608 a los 20 días DDP; 11: embrión de HO1 a los 20 DDP; 12: embrión de CQ806 a los 20 DDP; 13: embrión de OQ414 a los 20 días DDP; 14: embrión de Hill a los 20 DDP.
- 15 Para la determinación del patrón de expresión temporal de *Met* en los embriones de las semillas, se diseccionaron los granos de espigas de CQ806 y HO1 a diferentes días después de la polinización (DDP). Se analizaron los siguientes genotipos y las etapas de desarrollo: Carriles 1-7: embriones de CQ806 a los 15, 18, 21, 24, 27, 30 y 34 DDP, respectivamente; carriles 8-14: embriones de HO1 a los 13, 15, 19, 23, 25, 29 y 31 DDP, respectivamente.
- 20 Se diseccionaron los granos inmediatamente después de que se recogieran, y se recogieron los embriones y se congelaron en tubos cónicos de 50 ml en hielo seco. El material congelado se guardó a -70°C hasta que se extrajo el ARN. Se extrajo ARN moliendo los tejidos o los embriones (2,5 g) en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. A continuación se añadieron 10 ml del tampón de extracción [Tris-HCl a 50 mM, pH 8,0, ácido para-amino-salicílico al 4% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), ácido tri-iso-propilnaftalenosulfónico (Eastman Kodak Co., Rochester, NY), ditiotreitól (DTT) a 10 mM (Bethesda Research Labs, Gaithersburg, MD) y meta-bisulfito de sodio a 10 mM (Sigma Chemical Co.)], y se homogeneizó la mezcla durante 1 minuto con un TEKMAR TISSUMIZER (Tekmar Co., Cincinnati, OH). Se extrajo el homogeneizado con un volumen igual de fenol equilibrado con Tris-HCl a 0,1 M, pH 8,0. Se separaron las fases orgánica y acuosa mediante centrifugación a 4°C. Se retiró la fase acuosa y se extrajo con un volumen igual de cloroformo/octano (24:1). A continuación se transfirió el sobrenadante, se centrifugó, se transfirió de nuevo y se añadió medio volumen de acetato de amonio a 7,5 M (pH 8,0). Después se precipitó el ARN en hielo durante 30 minutos. Se recogió el ARN precipitado mediante centrifugación y se disolvió en 1 ml de agua tratada con dietilpicrocarbonato (0,1%, v/v), de aquí en adelante, agua-DEPC. Se añadió medio volumen de acetato de amonio a 7,5 M (pH 8,0) y dos volúmenes de etanol al 100% y después se precipitó el ARN a -20°C durante 30 minutos. Se recogió el precipitado mediante centrifugación, se lavó en etanol al 70% enfriado en hielo, se secó al aire y se disolvió en 0,5 ml de agua tratada con DEPC. Para el análisis de expresión, se fraccionaron 2 µg de ARN por muestra mediante electroforesis en geles de agarosa no desnaturizantes al 1,0%, NaPO₄ a 10 mM pH 6,8. El volumen de la muestra que contiene los 2 µg de ARN se diluyó hasta 8 µl con agua-DEPC, y se desnaturizó con un volumen igual del tampón de muestra a 2x [NaHPO₄ a 40 mM, pH 6,8, EDTA a 10 mM, formaldehído al 6%, formamida al 50%] y se calentó a 68°C durante 15 minutos. Se enfrió en hielo la muestra desnaturizada y se añadieron 4 µl de tampón de carga [glicerol al 50%, EDTA a 10 mM, NaPO₄ a 5 mM, pH 6,8, azul de bromofenol al 0,25%]. Se cargaron las muestras en el gel y se migraron por electroforesis durante 3 horas a 60 V en un tampón de fosfato a 10 mM. Se transfirió el ARN del gel a la membrana GENESCREEN PLUS (NEN Research Products) mediante transferencia capilar con agua estéril como el medio de transferencia. Después de la transferencia, se interconectó el ARN con la membrana utilizando un STRATALINKER UV (Stratagene). Se prehibridó la membrana con el ARN durante 3 horas a 42°C en tampón de hibridación [fosfato de sodio a 50 mM, pH 6,5, NaCl a 0,8 M, EDTA a 1 mM, SDS al 0,2%, seroalbúmina bovina al 0,05%, Ficoll tipo 40 al 0,05%, sulfato de dextrano al 10%]. Se obtuvo una sonda de hibridación específica para la región codificante de *Met* mediante la digestión del plásmido p8.5EcMet con las enzimas *EcoRI* y *XhoI*, y después se purificó del gel el fragmento de *Met* de 550 pb. Se marcaron 20 ng del fragmento purificado del gel con 50 µCi de [α -³²P]-dCTP (NEN Research Products) utilizando perlas de marcación READY-TO-GO (Pharmacia) siguiendo las instrucciones del fabricante y se purificaron en columnas de ajuste NUCTRAP (Stratagene). Se desnaturizó la sonda marcada hirviéndola durante 5 minutos y enfriándola en hielo durante 5 minutos, y se añadió directamente a los filtros prehibridados. Se realizó la hibridación en bolsas SEAL-A-MEAL (DAZEY Corp., Industrial Airport, KA) a 42°C durante 16 horas. Se lavaron los filtros 6 veces durante 30 minutos con gran exceso (500 ml) de una disolución de lavado [fosfato de sodio a 20 mM, pH 6,5, NaCl a 50 mM, EDTA a 1 mM y SDS al 0,1%] a temperatura a 60°C. Los filtros se expusieron a una película Kodak X-OMAT (Eastman Kodak Co., Rochester, NY) utilizando una pantalla de intensificación (DuPont Cronex) a -70°C. Los resultados demostraron que el gen *Met* se expresa específicamente en el embrión.

Ejemplo 3

- 60 *Clonación del promotor del gen de la metalotioneína del maíz específico de embrión*

- Se construyó una genoteca genómica de maíz (estirpe endogámica OQ414) mediante sistemas de clonación de Stratagene (La Jolla, CA) utilizando el ADN genómico que se purificó en Dow AgroSciences con los protocolos de extracción estándares que usan CTAB. Se construyó la genoteca utilizando el vector Lambda DASH™ II (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA). Se amplificó la genoteca en células *Epicurian Coli*® XL1-Blue MR tal y como sugiere el fabricante (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA). Se rastrearon 2 x 10⁶ calvas utilizando un fragmento de ADNc *EcoRI/XhoI* de 700 pares de bases del clon 8.5 como una plantilla para la síntesis de la sonda con un kit

de marcación aleatoria (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN). Se identificaron tres clones positivos (λ Met2, λ Met12 y λ Met14) después de varias rondas de hibridación de las calvas. Los ADN purificados de estos clones se digirieron con varias enzimas de restricción y se caracterizaron mediante el análisis por transferencia Southern. El mapa de restricción indicó que el inserto de los fagos contenía sólo el extremo 5' de la secuencia codificante, pero al menos 15 kilobases de las secuencias sin traducir en 5' que contendrían la secuencia del promotor. Los tres fagos tenían patrones de restricción idénticos con un inserto de 16 kb. Se eligió un clon, el λ Met14, para analizarlo con más detalle. Un fragmento de *EcoRI* de 1800 pb que se hibridó con la sonda del ADNc se extirpó a partir de un gel de agarosa al 1,0% y se purificó el ADN con Qiaex II (Qiagen, Hilden, Alemania) y se ligó en el sitio de clonación de *EcoRI* del pBluescript®II SK(-) (Stratagene, Inc.) [las endonucleasas de restricción y la ADN-ligasa de T4 se obtuvieron de Bethesda Research Laboratories (Bethesda, MD)]. Con las ligaciones se transformó DH5 α (Laboratory, Bethesda, MD). Se seleccionaron plásmidos recombinantes en agar de Luria (Gibco, Bethesda, MD) que contenía ampicilina a 75 mg/l (Sigma, St. Louis, MO) y 40 ml/placa de una solución madre de X-gal a 40 mg/ml (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Los ADN plasmídicos de ocho transformantes independientes se purificaron utilizando el sistema de purificación de ADN por minipreparación Wizard™ plus (Promega, Madison, WI). Siete de los ocho tenían el inserto esperado y se eligió el clon 65-1 para el análisis posterior.

Los cebadores para la secuenciación se sintetizaron en un sintetizador de ADN/ARN 394 (Applied Biosystems, Foster City, CA). La secuencia del clon 65-1 se ofrece en la lista de secuencias como la SEQ ID n.º 3. El clon 65-1 contenía las primeras 233 bases de la región codificante de la proteína metalotioneína tal y como se predecía a partir de la secuencia del ADNc.

Se amplificó el promotor utilizando la reacción en cadena de la polimerasa a partir del clon 65-3, el cebador T3 y el cebador MetNco, que se ofrece como SEQ ID n.º 4: (5' GCA CCC CAT GGC CGA TCG ACG CCT CTT AAT TTC CTC TA 3'). Esto introdujo un sitio de restricción *NcoI* para la posterior fusión del promotor con las regiones codificantes del gen. Las reacciones de amplificación se completaron con el sistema de PCR Expand™ Long Template (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Se realizaron las amplificaciones en placas de microtitulación a una temperatura de hibridación de 56°C. Se separaron los productos de la amplificación y se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,0%. El producto de la amplificación de 1800 pb resultante se recortó de la agarosa y se purificó el ADN utilizando Qiaex II (Qiagen, Hilden, Alemania). Se ligaron los productos en el pCR2.1 utilizando el kit de clonación Original TA (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Con las ligaciones se transformaron las células competentes One Shot™ INV α F del kit de clonación Original TA. Se aisló el ADN plasmídico de ocho transformantes independientes y siete de los ocho tenían el inserto del tamaño esperado sobre la base de las digestiones con *EcoRI*. Se liberó el promotor en un fragmento *XbaI/NcoI* del clon 67-8 aprovechando la presencia del sitio de restricción *XbaI* en el vector de clonación TA. Se ligó el promotor en el sitio *XbaI/NcoI* del GGN61-1 que reemplazó el promotor de la globulina del maíz S (glbs) que estaba fusionada al gen de la β -glucuronidasa (*GUS*) (Jefferson, 1986) y la región sin traducir en 3' de la nopalina-sintasa (*nos*). Con esta mezcla de ligación se transformó DH5 α , se hicieron crecer las colonias resistentes a la ampicilina sobre membranas de nilón y se rastrearon mediante hibridación con el fragmento *XbaI/NcoI* marcado del promotor de la metalotioneína del clon 67-8 descrito anteriormente. Se marcaron 20 ng del fragmento purificado del gel con 50 μ Ci de [α -³²P]-dCTP (Amersham Corp., Arlington Heights, IL) utilizando perlas de marcación READY-TO-GO (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) siguiendo las instrucciones del fabricante y se purificaron en Microcolumnas G-50 ProbeQuant™ (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Se desnaturalizó la sonda marcada hirviéndola durante 5 minutos y enfriándola en hielo durante 5 minutos, y se añadió directamente a los filtros. Se realizó la hibridación en bolsas ZipLoc (DowBrands, Indianapolis, IN) a 60°C durante 16 horas. Se lavaron los filtros tres veces durante 15 minutos con gran exceso (1000 ml) de la disolución de lavado [fosfato de sodio a 20 mM, pH 6,5, NaCl a 50 mM, EDTA a 1 mM y SDS al 0,1%] atemperada a 60°C. Se expusieron los filtros a una radiografía de Fuji NIF (Stamford, CT) utilizando dos pantallas intensificadoras (DuPont Lightning Plus) a - 70°C durante seis horas. Se aisló el ADN plasmídico de ocho de los clones que se hibridaron con el promotor tal y como se describió anteriormente y se analizó por digestión por restricción utilizando las enzimas *EcoRI* y *NcoI*. Los clones MGN77-1 y MGN77-4 se eligieron para el análisis de secuencia del ADN, el cual reveló que el promotor se encontraba en la orientación correcta; sin embargo, había una delección irregular de 46 pares de bases que comenzaba en la posición -185 desde el codón de inicio ATG y que continuaba hasta la base -256. Lo más probable es que esta delección se introdujera durante las reacciones de amplificación. Para corregir la secuencia, el fragmento *PinAI/KpnI* de 2212 pb de MGN77-4 se ligó con el fragmento *PinAI/KpnI* de 4482 pb de 65-1. Con esta mezcla de ligación se transformó DH5 α y se seleccionaron las colonias resistentes a la ampicilina. Se cultivaron ocho de las colonias resultantes para extraer el ADN tal y como se describió anteriormente, y se analizaron los ADN mediante digestión con *XhoI* y *NcoI*. Todos los clones parecían tener los fragmentos de restricción con el tamaño adecuado y se determinó la secuencia del clon MGN111-1 (SEQ ID n.º 5). La secuencia de este clon parecía correcta y se preparó el ADN para los experimentos de transformación.

60 Ejemplo 4

Comprobación transitoria de la construcción metalotioneína-Gus

Se analizó la expresión transitoria de dos plásmidos, el MGN111-1 (que contiene el promotor de la metalotioneína fusionado a *GUS*) así como el pDAB418 de control (que contiene el promotor de la ubicuitina fusionado a *GUS*) utilizando el genotipo "High II" [Armstrong *et al.* (1991) *Maize Genet. Coop. News Lett.* 65: 92-93] en embriones cigóticos inmaduros. Para analizar la expresión, se aislaron los embriones 13 a 18 DDP y se cultivaron sobre el medio 15Ag10 [Chu, C. (1978) "The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops". *Proc. Symp. Plant*

Tissue Culture, Peking Press, 43-56] durante 1 a 2 días antes de la administración del ADN. El medio 15Ag10 consistía en sales básicas N6 y vitaminas, Fe-EDTA, sacarosa a 20 g/l, L-prolina a 2,9 g/l, hidrolizado enzimático de caseína (ECH) a 100 mg/l, ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético (2,4-D) a 1 mg/l, nitrato de plata a 10 mg/l y GELRITE a 2,5 g/l (Schweizerhall, South Plainfield, NJ) a pH 5,8. Para la detonación, se dispusieron aproximadamente 12 embriones en un área de diana de aproximadamente 1 cm² en el medio de lisis y se cubrieron con una criba de acero inoxidable de 230 µm. El medio de detonación difería del 15Ag10 en que contenía L-prolina a 690 mg/l, agar al 2% y nada de nitrato de plata.

Para la detonación, se precipitaron 140 µg de ADN plasmídico sobre 60 mg de partículas de oro esféricas enjuagadas en alcohol (diámetro de 1,0 µm) añadiendo 74 µl de CaCl₂ a 2,5 M y 30 µl de espermidina a 0,1 M (base libre) a 300 µl de ADN plasmídico. Inmediatamente, se mezcló vorticialmente la disolución y se dejaron reposar las partículas de oro recubiertas de ADN. Se retiró el sobrenadante transparente resultante y se volvieron a suspender las partículas de oro en 1 ml de etanol absoluto. Se diluyó esta suspensión con etanol absoluto para obtener 15 mg de partículas de oro recubiertas de ADN por mililitro [Paredy *et al.*, (1997), *Maydica* 42: 193-154].

La detonación con helio aceleró las partículas de oro en suspensión recubiertas de ADN hacia y dentro de las dianas de tejido preparadas. El dispositivo utilizado fue un prototipo anterior al descrito en la patente de los EE. UU. n.º 5.141.131 que se incorpora en la presente memoria por referencia. Se cubrieron los tejidos con una criba de acero inoxidable (aberturas de 230 µm) y se colocaron en un vacío parcial de 25 pulgadas de Hg en la cámara del dispositivo. Las partículas de oro recubiertas de ADN se diluyeron adicionalmente 1:1 con etanol absoluto antes de la detonación y se aceleraron una vez en la diana de embriones con una presión de helio de 1500 psi, dispensándose con cada detonación 20 µl de la suspensión de ADN/oro.

Un día después de la detonación, se sometieron los embriones a un análisis histoquímico del GUS [Jefferson (1987) *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 387-405]. Brevemente, se colocaron los tejidos en placas de microtitulación de 24 pocillos (Corning) que contenían 500 µl del tampón de análisis [fosfato de sodio a 0,1 M, pH 8,0, ferricianuro de potasio a 5 mM, ferrocianuro de potasio a 0,5 mM, EDTA de sodio a 10 mM, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucurónico a 1,9 mM y TRITON X-100 al 0,06%] por pocillo y se incubaron en la oscuridad durante 1 a 2 días a 37°C antes del análisis. Se contaron al microscopio las unidades de expresión de GUS, visualizadas como puntos azules por área de diana. Los resultados de la expresión transitoria se presentan en la tabla 1. En resumen, se observaron niveles de expresión transitoria de moderados a elevados con el promotor de la metalotioneína en los embriones cigóticos inmaduros del maíz.

TABLA 1

Expresión transitoria de GUS de la construcción metalotioneína-GUS en los embriones inmaduros de maíz

Construcción	Promotor	Unidades de expresión de GUS/diana
MGN111-1	Metalotioneína	93
PDAB418 (control)	Ubicuitina	479

Ejemplo 5

Producción de callos transformados de manera estable y desarrollo de embriones somáticos maduros

Para producir callos transgénicos estables para la maduración *in vitro* de los embriones somáticos, se detonó sobre dianas de callos de "tipo II" tal y como se describió anteriormente. Se iniciaron cultivos de callos de "tipo II" a partir de embriones cigóticos inmaduros del genotipo "Hi-II" [Armstrong *et al.*, (1991) *Maize Cooperation Newsletter*, págs. 92-93]. Los embriones se aislaron de espigas crecidas en invernadero a partir de cruces entre un padre A Hi-II y un padre B Hi-II, o embriones F2 derivados de una autopolinización o la polinización entre hermanos de una planta Hi-II. Se cultivaron los embriones inmaduros (de 1,5 a 3,5 mm) en medio de iniciación de callo que consiste en sales N6 y vitaminas [Chu *et al.*, (1978) "The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops". *Proc. Symp. Plant Tissue Culture*, Peking Press, 43-56], 2,4-D a 1,0 mg/l, L-prolina a 25 mM, hidrolizado de caseína a 100 mg/l, AgNO₃ a 10 mg/l, GELRITE a 2,5 g/l y sacarosa a 20 g/l, con un pH de 5,8. La selección del callo de tipo II tuvo lugar durante alrededor de las 2 a 12 semanas. Después de cuatro semanas, se subcultivó el callo en un medio de mantenimiento (medio de iniciación en el que se omitió el AgNO₃ y se redujo la L-prolina a 6 mM).

Se realizó una preparación de partículas tal y como se describió previamente. Después, se extendieron alrededor de 600 mg de tejido de callo embriónico sobre la superficie del medio de mantenimiento del callo de tipo II, tal y como se describe en la presente memoria, que carece de hidrolizado de caseína y de L-prolina, pero que está complementado con sorbitol a 0,2 M y manitol a 0,2 M como un osmótico. Tras un pretratamiento de 4 a 16 horas, se transfirió el tejido a discos de cultivo que contenían el medio de detonación [medio osmótico solidificado con agar de cultivo de tejidos a 20 g/l (JRH Biosciences, Lenexa, KS) en vez de GELRITE (Schweizerhall) a 7 g/l]. Se realizó la detonación con

helio tal y como se describe en la presente memoria. Inmediatamente después de la detonación, se transfirió el tejido a medio osmótico durante un periodo de recuperación de 16 a 24 horas. Después, se dividió el tejido en piezas pequeñas y se transfirió al medio de selección [medio de mantenimiento que carece de hidrolizado de caseína y de L-prolina pero que tiene BASTA a 30 mg/l (Agrevo)]. Cada 4 semanas durante 3 meses, las piezas de tejido se transfirieron de manera no selectiva a un medio de selección nuevo. Después de 6 semanas y hasta las 20 semanas, se retiraron y se aislaron los sectores del callo que se encontraban en proliferación frente a un contexto de tejido con el crecimiento inhibido. El tejido resistente a BASTA resultante se subcultivó bisemanalmente en medio de selección nuevo.

A partir de estos cultivos transformados de forma estable, se hicieron desarrollar embriones somáticos a modo de embriones semilla haciendo crecer callo embriónico en medio MS que contiene sacarosa al 6% (p/v). Se hizo crecer el callo durante 7 días y, a continuación, se transfirieron individualmente los embriones somáticos al medio MS con sacarosa al 6% y ácido abscísico a 10 μ M, de aquí en adelante, ABA.

Ejemplo 6

15 *Análisis estable de la expresión de metalotioneína-GUS en embriones somáticos maduros*

A. Se sometieron 190 dianas de callo embriónico de tipo II a una detonación tal y como se describe en la presente memoria [Pareddy *et al.* (1997) *Maydica* 42: 143-154] cobombardeando pDAB308 (35T-bar) y MGN 111-1 (metalotioneína 1-GUS). Utilizando la selección con Basta[®], se produjeron 42 colonias resistentes a Basta[®]. Se transfirieron callos de unas 32 estirpes transgénicas a medio de maduración de embriones con o sin ABA para que se desarrollen embriones somáticos utilizando el procedimiento descrito anteriormente. Después de 14 días de cultivo, los embriones somáticos de diferentes estirpes transgénicas se sometieron a un análisis histoquímico de *GUS* tal y como se describe en la presente memoria. De las 32 estirpes analizadas, 14 expresaban el *GUS*. Aunque la intensidad de la expresión del *GUS* variaba de una estirpe a otra, se observaron unos niveles de expresión de moderados a elevados en unas pocas estirpes tal y como se muestra en la tabla 2.

B. *Análisis por southern del callo de maíz transgénico para Met*

Se analizó el callo transgénico para detectar la presencia del gen *GUS* integrado mediante el análisis por southern. Se retiró material del callo desde los medios y se sumergió en agua destilada durante 30 minutos antes de liofilizarlo. Se preparó ADN genómico de callo a partir del tejido liofilizado tal y como se describe en Saghai-Marooft *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 8014-8018. Se digirieron 8 μ g de cada ADN con las enzimas de restricción *EcoRI* y *KpnI* utilizando las condiciones sugeridas por el fabricante (Bethesda Research Laboratory, Gaithersburg, MD) y se separaron por electroforesis en gel de agarosa. Se transfirió el ADN a una membrana de nilón tal y como se describe en Southern, E. (1975) *J. Molec. Biol.* 98, 503 y en Southern, E. (1980) *Methods of Enzymol.* 69, 152.

Del plásmido pDAB418 se extrajo una sonda específica para la región codificante de la β -glucuronidasa (*GUS*) utilizando las enzimas de restricción *NcoI* y *SstI*. El fragmento de 1,9 kb resultante se purificó con el kit de purificación de ADN Qiaex II (Qiagen Inc., Chatsworth, CA). La sonda se preparó usando perlas de marcación de ADN Ready to Go (Pharmacia LKB, Piscataway, NJ) con 50 μ Ci de [α -³²P]-dCTP (Amersham Life Science, Arlington Heights, IL). Se hibridó la sonda de *GUS* con el ADN genómico sobre los filtros durante una noche a 60°C. Los filtros se lavaron a 60°C en SSC a 0,25X y SDS al 0,2% durante 45 minutos, se secaron sobre papel absorbente y se expusieron a una película XAR-5 con dos pantallas intensificadoras durante una noche.

Se caracterizaron 15 estirpes de MGN.callo transgénicas mediante análisis por southern. Se digirió el ADN genómico con las enzimas de restricción *EcoRI* y *KpnI* que deben dar lugar a un fragmento de 3,8 kb cuando se hibridan a una sonda específica para la región codificante del *GUS*. El producto de hibridación de 3,8 kb debe consistir en el promotor de la metalotioneína, la región codificante de la β -glucuronidasa y la 3' UTR de la nopalina-sintasa. Diez de las 15 estirpes de callo analizadas contenían una construcción del gen intacto tal y como resulta evidente mediante el producto de hibridación de 3,8 kb. Cuatro estirpes tenían un número de integraciones moderado al estar dos o tres productos de hibridación presentes. Seis estirpes tenían un número de integraciones complejo al contener más de tres y hasta 13 productos de hibridación. Los resultados del análisis de transferencia Southern para las estirpes de callo transgénicas se resumen en la tabla 2.

Ejemplo 7

Regeneración de plantas transgénicas y análisis de la expresión de metalotioneína-GUS

A. Se inició la regeneración transfiriendo tejido de callo a un medio de inducción a base de citocinas, que consistió en sales de Murashige y Skoog, de aquí en adelante, sales de MS, y vitaminas [Murashige and Skoog, (1962) *Physiol. Plant.* 15: 473-497], sacarosa a 30 g/l, mio-inositol a 100 mg/l, manitol a 30 g/l, 6-bencilaminopurina a 5 mg/l, de aquí en adelante BAP, 2,4-D a 0,025 mg/l, BASTA a 30 mg/l y GELRITE a 2,5 g/l (Schweizerhall) a pH 5,7. Se colocaron los cultivos con poca luz (125 ft-candelas) durante una semana y después otra semana con mucha luz (325 ft-candelas). Después de un periodo de inducción de dos semanas, se transfirió el tejido de manera no selectiva a un medio de regeneración sin hormonas, que era idéntico al medio de inducción, salvo que carecía de 2,4-D y de BAP, y se mantuvo con mucha luz. Se retiraron plántulas pequeñas (1,5 a 3 cm) y se colocaron en tubos de cultivo de 150 x 25 mm que contienen un medio SH [sales de SH y vitaminas [Schenk y Hildebrandt, (1972) *Can. J. Bot.* 50: 199-

ES 2 293 742 T3

204], sacarosa a 10 g/l, mio-inositol a 100 mg/l, FeEDTA a 5 ml/l y GELRITE a 2,5 g/l (Schweizerhall), pH 5,8]. Se transfirieron las plántulas a macetas de 10 cm que contenían aproximadamente 0,1 kg de METRO-MIX 360 (The Scotts Co. Marysville, OH) en el invernadero en cuanto mostraban crecimiento y desarrollaron un sistema de raíces suficiente. Se cultivaron con un fotoperiodo de 16 h complementado mediante una combinación de lámparas de sodio y de haluros metálicos a gran presión, y se mojaron según se necesitara con una combinación de tres formulaciones de fertilizantes de Peters Excel independientes (Grace-Sierra Horticultural Products Company, Milpitas, CA). En la etapa de 3 a 5 hojas, se transfirieron las plantas a macetas de 5 galones que contienen unos 4 kg de METRO-MIX 360.

B. Análisis de tipo Southern de las plantas transgénicas

Se completó el análisis de tipo Southern en tejido de la planta para confirmar la presencia de la fusión intacta del gen de GUS. Se recogió material foliar de hasta cuatro plantas por estirpe R_0 cuando alcanzaron la etapa de 6 a 8 hojas. Se preparó ADN genómico de las plantas R_0 a partir de tejido liofilizado tal y como se describió anteriormente. Se caracterizaron cuatro estirpes MGN R_0 mediante análisis de tipo Southern. Se digirió el ADN genómico con las enzimas de restricción *EcoRI* y *KpnI* que deben dar lugar a un fragmento de 3,8 kb que se hibrida a una sonda específica para la región codificante del GUS. El producto de hibridación de 3,8 kb debe consistir en el promotor de la metalotioneína, la región codificante de la β -glucuronidasa y la 3' UTR de la nopalinasintasa. Tres de las cuatro estirpes R_0 analizadas contenían una construcción del gen intacto tal y como resulta evidente por el producto de hibridación de 3,8 kb. Las cuatro estirpes tenían un número complejo de integraciones al contener desde más de tres y hasta 10 productos de hibridación. Los resultados del análisis de tipo Southern de las plantas de las cuatro estirpes transgénicas se resumen en la tabla 2.

TABLA 2

Expresión de GUS en los embriones somáticos maduros de diferentes estirpes transgénicas de maíz de metalotioneína-GUS.				
	Expresión histoquímica de GUS		Presencia de ADN que hibrida	
Estirpe transgénica	Presente/ausente	Nivel	Callo	Plantas R_0
308/Met1-02	No	NA	No	NA
308/Met1-05	Sí	Bajo	Sí	NA
308/Met1-12	Sí	Bajo	Sí	NA
308/Met1-14	Sí	Bajo	Sí	NA
308/Met1-15	Sí	Moderado	Sí	NA
308/Met1-16	Sí	Alto	NA	Sí
308/Met1-28	Sí	Alto	Sí	Sí
308/Met1-31	Sí	Alto	Sí	NA
308/Met1-35	Sí	Bajo	NA	No
308/Met1-43	No	NA	No	NA
308/Met1-44	Sí	Bajo	NA	Sí
En la tabla 2, «nivel» se refiere a la complejidad de los productos de hibridación y «NA» significa no analizado.				

Ejemplo 8

Polinización y análisis de GUS de las plantas transgénicas

A. Los regenerantes primarios (plantas R_0) se autopolinizaron o se polinizaron con un hermano cuando era posible después de 6 a 10 semanas adicionales en macetas de 5 galones, y se recogieron semillas R_1 a los 40 a 45 días después de la polinización. Cuando no fueron posibles la autopolinización o la polinización entre hermanos, se sometieron las plantas a exogamia con endogámicas elite. A continuación, estos granos se plantaron en macetas de cinco galones para obtener las plantas R_1 que se autocruzaron o se sometieron a exogamia con las endogámicas selectas para producir las semillas R_2 .

Para otro análisis de la expresión de metalotioneína-GUS, se regeneraron plantas de 9 estirpes transgénicas independientes. Las plantas R₀ de cuatro estirpes (pDAB308/MetI-16, 28, 35, 44) se hicieron crecer hasta la madurez y se polinizaron de forma controlada (autopolinización, polinización entre hermanos o polinización cruzada con CQ806) tal y como se describe en la presente memoria. El análisis histoquímico de la hoja y/o la raíz de las plantas R₀ y R₁ de dichas plantas (es decir, pDAB308/MetI-28) fue negativo. Sin embargo, los embriones de las semillas producidos por dicha planta a los 25 DDP mostraron unos niveles de expresión de GUS de bajos a altos (tabla 3). Aunque se observó la expresión de GUS en la capa de la aleurona, no se observó expresión en el endospermo.

TABLA 3

Expresión de GUS en diferentes tejidos de las plantas transgénicas con metalotioneína-GUS.					
Expresión histoquímica de GUS					
Estirpe transgénica	Embrión	Capa de aleurona	Endospermo	Hoja*	Raíz*
pDAB308/Met1-16	Sí	Sí	No	NA	NA
pDAB308/Met1-28	Sí	Sí	No	No	No
pDAB308/Met1-35	Sí	Sí	No	NA	NA
pDAB308/Met1-44	Sí	Sí	No	NA	NA
NA: no analizado					
* plantas R ₁					

B. Análisis de GUS en los embriones. Los embriones de las plantas 308/Met-16-04, 308/Met-28-01, 308/Met-44-11, CQ806 (control negativo), y UGN-28-05 y UGN-40-05 (controles positivos), que se polinizaron por exogamia con la CQ806 endogámica, y se examinaron histoquímicamente para detectar la expresión del *GUS*. Se recogieron embriones de las espigas 7 y 31 días después de la polinización (DDP). Se determinó histoquímicamente la expresión de GUS tal y como describió Jefferson (1987) *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 387-405. Los resultados se resumen en la tabla 4. No se observó ninguna expresión de GUS en los embriones de las plantas de control negativo. Se observó expresión en todos los embriones analizados de las estirpes transformadas con el plásmido de control negativo, UGN81-3 (control positivo), que contiene el gen de GUS impulsado por el promotor del gen de la ubicuitina 1 del maíz. El inicio de la expresión fue variable en las estirpes individuales transformadas con pMGN111-1, que contiene el *GUS* impulsado por el promotor de la metalotioneína. Se observó la primera expresión a los 10 días después de la polinización (DDP) en la estirpe 308/MET1-28 y lo más tardar a los 20 DDP en la estirpe 308/Met-44. La expresión en todas las estirpes de MET continuó hasta la madurez a los 31 DDP.

TABLA 4

Expresión de GUS en los embriones transgénicos de maíz evaluados por histoquímica										
Planta		Resultados histoquímicos de GUS (después de 24 horas)								
		7 DDP	10 DDP	13 DDP	16 DDP	19 DDP	22 DDP	25 DDP	28 DDP	31 DDP
A	Control negativo	NA	-	-	-	-	-	-	-	-
D	UGN-28.05.05	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	UGN-40-05.07	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F*	308/Met1-44-11.07	NA	NA	NA	-	-	+	+	+	+
G	308/Met1-16-4.06	NA	-	-	-	+	+	+	+	+
H	308/Met1-28-10.04	-	+	+	+	+	+	+	+	+
NA = no analizado										
*positivo a los 20 DDP										

C. Análisis de GUS en raíces y en hojas. Se hicieron crecer y se prepararon tejidos vegetales de las estirpes transgénicas 308/Met-16-04, 308/Met-28-10 y 308/Met-44-11 para la evaluación cuantitativa de la expresión de GUS. Además, se recogieron las muestras de la endogámica de maíz CQ806, que se utilizó como un control positivo para estos experimentos. También se recogieron y se analizaron muestras de las estirpes transgénicas UGN-40-05 y UGN-28-05, que se habían transformado con el plásmido pUGN81-3 y que sirve como un control positivo para la expresión. Se recogió tejido de hoja y de raíz de las plantas transgénicas R1 en la etapa V6 (seis hojas), se congeló en nitrógeno líquido y se molió para obtener un polvo fino en un mortero. Se pesaron las muestras en tubos de centrifugación de 50 ml. Por gramo de muestra, se añadieron a cada muestra 4 ml de tampón de extracción GUS-Light™ (Tropix, Bedford, MA), modificado por la adición de glicerol al 20%, polivinilpolipirrolidona al 1,0% y 7 ml/ml de β -mercaptoetanol, y se homogeneizó la muestra durante dos intervalos de 10 s. Se mantuvieron las muestras en hielo durante todo el protocolo de extracción y se limpió por centrifugación a 3000 rpm y 5°C durante 5 minutos. Se transfirieron dos alícuotas de sobrenadante de 1 ml a tubos de microcentrifugación estériles y se volvieron a centrifugar a la velocidad máxima (centrífuga Eppendorf modelo 5415). De retiró el sobrenadante otra vez a tubos nuevos y se guardaron a -70°C hasta que estuvieron listos para el análisis.

Se determinó la concentración de las proteínas basándose en el método de Bradford utilizando el reactivo colorante de Bio-Rad (Hercules) y el estándar de proteínas de seroalbúmina humana a 30 mg/dl (Sigma, St. Louis, MO). Para el análisis de la actividad GUS, se usó un kit de ensayo GUS-Light™ (Tropix, Bedford, MA). Se analizaron por duplicado ambas alícuotas de cada muestra utilizando 10 ml de extracto más tampón de extracción por vial del luminómetro. Se preparó el tampón de reacción GUS-Light™ a partir del kit de ensayo diluyendo el sustrato de Glucuron™ líquido de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se calentó este tampón hasta temperatura ambiente y se añadió en alícuotas de 190 μ l a cada vial del luminómetro a intervalos de 10 segundos. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 300 μ l de tampón acelerador de la emisión de luz GUS-Light™ y se detectó la luminiscencia durante un periodo de integración de 5 segundos. También se incluyeron en el ensayo de GUS "Reacciones blanco" (con 10 ml del tampón de extracción) y el estándar de β -glucuronidasa obtenida de *E. coli*. Se describió la actividad de GUS como unidades relativas de luz (URL)/mg de proteína.

D. Expresión de GUS en las raíces y en las hojas. No se observó ninguna expresión de GUS significativa en las hojas o en las raíces de las plantas 308/Met-16-04, 308/Met-28-10 o 308/Met-44-11 (tabla 5). Se observó expresión de GUS en las plantas transformadas con pUGN81-3 en las que el gen de GUS estaba impulsado por el promotor Ubil del maíz. Estos resultados confirman la observación de que el promotor de la metalotioneína del maíz no se expresa en las hojas o en las raíces de las plantas y que, por lo tanto, es específico de los embriones.

TABLA 5

Resultados del análisis de GUS-Light™ de las hojas y las raíces y de las plantas transformadas con el plásmido MGN111-1.			
Planta transgénica		Expresión histoquímica de GUS (URL/ μ g de proteína)	
Estirpe	Plásmido	Hoja	Raíz
CQ806(1) ¹	Ninguna	44	34
CQ806(2) ¹	Ninguna	40	13
UGN-28-05.01 ²	pUGN81-3	4858	26528
UGN-28-05.02 ²	pUGN81-3	4143	20870
UGN-40-05.01 ²	pUGN81-3	100281	154941
UGN-40-05.02 ²	pUGN81-3	91209	102148
308/Met-16-04.01	pMGN111-1	22	190
308/Met-16-04.02	pMGN111-1	7	50
308/Met-28-10.01	pMGN111-1	10	38
308/Met-28-10.02	pMGN111-1	7	64
308/Met-44-11.01	pMGN111-1	7	41
308/Met-44-11.02	pMGN111-1	7	25
¹ CQ806 es el control negativo			
² Las plantas transgénicas UGN sirven como controles positivos			

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ADN aislada que comprende los pares de bases 1446 a 1557 de la SEQ ID n.º 5.

2. Una molécula de ADN aislada de la reivindicación 1, que comprende los pares de bases 11383 a 1557 de la SEQ ID n.º 5, los pares de bases 916 a 1557 de la SEQ ID n.º 5, los pares de bases 50 a 1557 de la SEQ ID n.º 5; los pares de bases 1446 a 1649 de la SEQ ID n.º 5; los pares de bases 1383 a 1649 de la SEQ ID n.º 5; los pares de bases 916 a 1649 de la SEQ ID n.º 5; o los pares de bases 50 a 1649 de la SEQ ID n.º 5.

3. Una molécula de ADN aislada que comprende los pares de bases 1558 a 1649 de la SEQ ID n.º 5.

4. Una molécula de ADN aislada que comprende los pares de bases 1383 a 1465 de la SEQ ID n.º 5.

5. Un casete de expresión que comprende un promotor específico de embrión unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico heterólogo, en el que el promotor comprende una secuencia que se extiende desde aproximadamente el par de bases 50 al par de bases 1649 de la SEQ ID n.º 5.

6. Un método para expresar una secuencia de ácido nucleico heterólogo en una planta que comprende:

a) introducir en una célula vegetal un vector que comprende un promotor de la metalotioneína del maíz específico de embrión que comprende una secuencia que se extiende desde aproximadamente el par de bases 50 al par de bases 1649 de la SEQ ID n.º 5, unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico heterólogo;

y
b) regenerar una planta a partir de dicha célula.

7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende además la transmisión sexual a la progenie dicho promotor de la metalotioneína del maíz específico de embrión unido operativamente a dicha secuencia de ácido nucleico heterólogo.

8. Un método para producir semillas, que comprende expresar una secuencia de ácido nucleico heterólogo mediante un método de acuerdo con la reivindicación 7 para producir dicha progenie y recoger las semillas producidas por dicha progenie.

ES 2 293 742 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Armstrong, Katherine
Pareddy, Dayakar R
5 Woosley, Aaron T
Rubin-Wilson, Beth
Hey, Timothy D
Folkerts, Otto
Smith, Kelley A
10
<120> Secuencias reguladoras útiles para la expresión génica en el tejido embrionario vegetal

<130> 50529
15
<140>
<141>

20 <150> US 60/109167
<151> 1998-11-20

<160> 5
25
<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador SK

<400> 1
40
cgctctagaa ctagtggatc

<210> 2
45 <211> 565
<212> ADN
<213> *Zea mays*

50 <220>
<221> CDS
<222> (94)..(324)
55

60

65

20

ES 2 293 742 T3

<400> 2

```

5      agctcccccac acgtactactac cgccgctagc tggttcaagt gcggcgagcg gagccggaga 60

      ccggtagagg aaattaagag gcgtcgatcg ggc atg ggg tgc gac gac aag tgc 114
                                Met Gly Cys Asp Asp Lys Cys
10                                1                    5

      ggg tgc gcc gtg ccg tgc ccc ggc ggc aag gac tgc agg tgc acg tcg 162
      Gly Cys Ala Val Pro Cys Pro Gly Gly Lys Asp Cys Arg Cys Thr Ser
15                10                15                20

      ggg agc ggc ggg cag cgg gag cac acg act tgc ggc tgc ggg gag cac 210
      Gly Ser Gly Gly Gln Arg Glu His Thr Thr Cys Gly Cys Gly Glu His
20                25                30                35

      tgc gag tgc agc ccg tgc acg tgt ggc cgg gcc acg atg ccg tcc ggc 258
      Cys Glu Cys Ser Pro Cys Thr Cys Gly Arg Ala Thr Met Pro Ser Gly
25                40                45                50                55

      cgc gag aac agg agg gct aac tgc tcc tgc ggg gcg tcc tgc aac tgc 306
      Arg Glu Asn Arg Arg Ala Asn Cys Ser Cys Gly Ala Ser Cys Asn Cys
30                60                65                70

35      gca tcc tgc gcc tcg gcc tgatccgtgc gctcgccct cgtgctaccg 354
      Ala Ser Cys Ala Ser Ala
40                75

      cgctgcctag tggagggagt tgtctagtga ggctggagac gaagcaacta gcactacttc 414

45      taataaaggg cttgtgtcat gctcgccaga cgcattcacgc gctgcatctg cactgtggta 474

      tcgtgtagta agtttgtgta tgaataaaca ctaccacttc atgtttcgca aaaaaaaaaa 534

50      aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 565

```

```

55 <210> 3
    <211> 1843
    <212> ADN
    <213> Zea mays

60 <220>
    <221> CDS
    <222> (1601)..(1831)

```

65

ES 2 293 742 T3

<400> 3

gaattcctat gagcaaagaa gagaaaatct tttatgagaa gtggggttggg agaaaaccat 60
5 cactttcata cttgcgcaca tggggggtgc atggcgaaag tcagtgtacc aattaataaa 120
aagtgaagc ttggacaagg atagtggatt gtatctttct agattatgct tcctgtagca 180
10 tagcttatag attttttagta gttaaaaactg acgctcctga tgtgtatgta gataccatta 240
tagaatctcg cgatgctact ttctttgaaa acatatatcc agtaaaagac attcatagca 300
attctagata ttcttctgag ataactcctg aacataatgc acatgttgag agttttgaac 360
20 aaccacataa gaatgtecta gaggaggatg acaacgatgc tcctaaaagg agcaagatac 420
aaagggttga caaatccttt ggtgatgatt tcattatgta ccttgtggac gacactccta 480
25 ctactattac ggaagcattt gcctctccat ataaagatga ttggaaagaa gcatttcaga 540
atgatatgga ctcaattctt tcaaatggta gatgggaggc cactgattga ccctatgggt 600
gtaaacctgt gggttgtaag cggtgttta aaaagaagct caagtctgat ggcacaatcg 660
35 agaagtacaa ggctaggctt gtgactaaag gctatgctca gaaagaatga gaagacttct 720
ttaataactta ttacctgtt gctagaatgt ctactattcg agtactattt tccttggctt 780
40 gcaaccttta gagaacgatt catatgggta gcagtgtgtt ttaaatttta caclataata 840
tttaaggatc agatcagatt aggatcgagc tctattttta ttcattttta aactaaaatt 900
45 tattcagagt tatatcattt tgtgaagaag tatttggatc acgataaatt acatcgtcat 960
50 caatctaatz gcgtaaaata aacgtcgacg tggacagtgt aaatgcgcag ctgggtacac 1020

55

60

65

ES 2 293 742 T3

aaccittact atgtaaataa ataaattctg aatctgctag ctctgcaga tatccatgcg 1080
 5 aagcgacaat tcagagcaag cttagcggcc actgccaggt ctagtagtat ttaccatttc 1140
 atccaattct ccgaagcaaa ggcccttctag cggggccaact tcctttacct gctgatggac 1200
 10 cggcgtaggc tatcgcgac aggcagcggg acttcttctc ctcatgggccc gttcgaactcc 1260
 ggccattttt tcgtcgtcag cgacagcgtc agggggataa gaacgctcga gcaagggtatc 1320
 15 atcccgacat catccgcgc cgcggccggg gaccgcgtgt cccaccacct gtcgacgcgg 1380
 cgtgggagac gtgcgccgcg tgcgtgcgcg tcgcgcgccg gccgttctag acctgtagac 1440
 20 cttggggctc tggagctcca ttatatacag aggcaagtgg gagccgtttg ttcagcagcg 1500
 ctacttgtgc tcccccaacg ctactaccgc cgctagctgg ttcaagtgcg gcgagcggag 1560
 25 ccggagaccg gtagaggaaa ttaagaggcg tcgatcgggc atg ggg tgc gac gac 1615
 30 Met Gly Cys Asp Asp
 1 5
 aag tgc ggg tgc gcc gtg ccg tgc ccc ggc ggc aaa gac tgc agg tgc 1663
 35 Lys Cys Gly Cys Ala Val Pro Cys Pro Gly Gly Lys Asp Cys Arg Cys
 10 15 20
 acg tcg ggg agc ggc ggg cag cgg gag cac acg act tgc ggc tgc ggg 1711
 40 Thr Ser Gly Ser Gly Gly Gln Arg Glu His Thr Thr Cys Gly Cys Gly
 25 30 35
 gag cac tgc gag tgc agc ccg tgc acg tgt ggc cgg gcc acg atg ccg 1759
 45 Glu His Cys Glu Cys Ser Pro Cys Thr Cys Gly Arg Ala Thr Met Pro
 40 45 50
 tcc ggc cgc gag aac agg agg gct aac tgc tcc tgc ggg gcg tcc tgc 1807
 50 Ser Gly Arg Glu Asn Arg Arg Ala Asn Cys Ser Cys Gly Ala Ser Cys
 55 55 60 65
 aac tgc gca tcc tgc gcc tcg gcc tgatccgaat tc 1843
 60 Asn Cys Ala Ser Cys Ala Ser Ala
 70 75

<210> 4

<211> 38

65 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 293 742 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador T3

5 <400> 4

gcaccccatg gccgatcgac gcctcttaat ttctctta

38

10 <210> 5

<211> 6694

<212> ADN

<213> *Zea mays*

15

<400> 5

20

ccaccgcggt ggccggccgct ctagaactag tggatccccc gggtgcagg aattcctatg 60

agcaaagaag agaaaatctt ttatgagaag tgggttggga gaaaaccatc actttcatac 120

25

ttqcgcacat ggggggtgca tggcgaaagt cagtgtacca attaataaaa agtgcaagct 180

tggacaagga tagtggattg tatctttcta aattatgctt cctgtagcat agcttataga 240

30

tttttagtag ttaaaactga cgctcctgat gtgtatgtag ataccattat agaatctcgc 300

35

gatgctactt tctttgaaaa catatalcca gtaaaagaca ttcatacgaa ttctagatat 360

tcttctgaga taactcctga acataatgca catgttgaga gttttgaaca accacataag 420

40

aatgtcctag aggaggatga caacgatgct cctaaaagga gcaagataca aagggttgac 480

aaatcctttg gtgatgattt cattatgtac cttgtggacg acactcctac tactattacg 540

45

gaagcatttg catctccata taaagatgat tggaaagaag catttcagaa tgatatggac 600

tcaattcttt caaatggtag atgggaggtc actgattgac cctatggttg taaacctgtg 660

50

ggttgtaagc ggctgtttta aaagaagctc aagctctgatg gcacaatcga gaagtacaag 720

55

gctaggcttg tgactaaagg ctatgctcag aaagaatgag aagacttctt taatacttat 780

60

65

ES 2 293 742 T3

ttacctgttg ctagaatgtc tactattcga gtactatfff ccttggcttg caacctttag 840

5 agaacgattc atatgggtag cagtgtgttt taaatffffac actataatat ttaaggatca 900

gatcagatta ggatcgagct ctatffffat tcatffffaa actaaaattt attcagagtt 960

10 atatcatttt gtgaagaagt atttggatca cgataaatta catcgtcac cacttaattg 1020

cgtaaaataa acgtcgacgt ggacagtgt aatgcgcagc ttggtacaca acffffacta 1080

15 tgtaaaataa taaattctga atctgctagc tctgcagat atccatgcga agcgacaatt 1140

20 cagagcaagc ttagcggcca ctgccaggtc tagtagtatt taccatttca tccaattctc 1200

cgaagcaaa gcttcttagc gggccaactt cffffacctg ctgatggacc ggcgtaggct 1260

25 atcgcgga ggcagcggga cttcttctcc tcatgggccc ttcgactccg gctatfffft 1320

cgtcgtcagc gacagcgtca gggggataag aacgctcgag caaggtatca tcccgacatc 1380

30 atcccgccc gccggccggg acccgctgtc ccaccaactg tcgacgcggc gtgggagacg 1440

35 tgcgccgct gcgtgcgct cgcgcgccgc ccgttctaga cctgtagacc ttggggctct 1500

ggagctccat tatatacaga ggcaagtgg agccgtttgt tcagcagcgc tacttgtgct 1560

40 cccccaacgc tactaccgc gctagctggt tcaagtgcgg cgagcggagc cggagaccgg 1620

tagaggaaat taagaggcgt cgatcgccc atggctcgtc ctgtagaaac cccaaccctg 1680

45 gaaatcaaaa aactcgacgg cctgtgggca ttcagtctgg atcgcgaaaa ctgtggaatt 1740

gatcagcgtt ggtgggaaa agcggttaca gaaagccgg caattgctgt gccaggcagt 1800

50 tttaacgac agttcgcca tgcagatatt cgtaattatg cgggcaacgt ctggtatcag 1860

55 cgcgaagtct ttataccgaa aggttgggca ggccagcgt tctgtctgag ttctgatgag 1920

gtcactcatt acggcaaaagt gtgggtcaat aatcaggaag tgatggagca tcaggcggc 1980

60 tatacggcat ttgaagccga tgcacgccc tatgttattg ccgggaaaag tgtacgtatc 2040

65

ES 2 293 742 T3

accgtttgtg tgaacaacga actgaactgg cagactatcc cgccgggaat ggtgattacc 2100

5 gacgaaaacg gcaagaaaaa gcagtcttac ttccatgatt tctttaacta tgccggaatc 2160

catcgacgcg taatgctcta caccacgccc aacacctggg tggacgatat caccgtggtg 2220

10 acgcatgtcg cgcaagactg taaccacgcg tclgttgact ggacggtggt ggccaatggt 2280

gatgtcagcg ttgaactgcg tgatgcggat caacaggtgg ttgcaactgg acaaggcact 2340

15 agcgggactt tgcaagtggg gaatccgcac ctctggcaac cgggtgaagg ttatctctat 2400

gaactgtgcg tcacagccaa aagccagaca gagtgtgata tctaccgct tcgcgtcggc 2460

20 atccggtcag tggcagtgaa gggcgaacag ttcttgatta accacaaacc gttctacttt 2520

25 actggctttg gtcgtcatga agatgcggac ttacgtggca aaggattcga taacgtgctg 2580

atggtgcacg accacgcatt aatggactgg attggggcca actcctaccg tacctcgcac 2640

30 tacccttacg ctgaagagat gctcgactgg gcagatgaac atggcatcgt ggtgattgat 2700

gaaactgctg ctgctggctt taacctctct ttaggcattg gtttcgaagc gggcaacaag 2760

35 ccgaaagaac tgtacagcga agaggcagtc aacggggaaa ctcagcaagc gcacttacag 2820

40 gcgattaaag agctgatagc gcgtgacaaa aaccacccaa gcgtggtgat gtggagtatt 2880

gccaacgaac cggatacccg tccgcaagtg caccgggaata ttccgccact ggccgaagca 2940

45 acgcgtaaac tcgaccgcac gcgtccgac accctgcgtca atgtaatgtt ctgcgacgct 3000

cacaccgata ccatcagcga tctctttgat gtgctgtgcc tgaaccgtta ttacggatgg 3060

50 tatgtccaaa gcggcgattt ggaaacggca gagaaggtagc tggaaaaaga acttctggcc 3120

55 tggcaggaga aactgcatca gccgattatc atcaccgaat acggcgtgga tacgttagcc 3180

gggctgcact caatgtacac cgacatgtgg agtgaagagt atcagtgtgc atggctggat 3240

60 atgtatcacc gcgtctttga tcgcgtcagc gccgtcgtcg gtgaacaggt atggaatttc 3300

gccgattttg cgacctcgca aggcataattc cgcgttggcg gtaacaagaa agggatcttc 3360

65

ES 2 293 742 T3

actcgcgacc gcaaaccgaa gtcggcggtt tttctgctgc aaaaacgctg gactggcatg 3120

5 aacttcgggtg aaaaaccgca gcaggagggc aaacaatgaa tcaacaactc tcctggcgca 3480

ccatcgtcgg ctacagcctc ggtggggaat tggagctcga atttccccga tcgttcaaac 3540

10 atttggcaat aaagtttctt aagattgaat cctgttgccg gtcttgcgat gattatcata 3600

taatttctgt tgaattacgt taagcatgta ataattaaca tgtaatgcat gacgttattt 3660

15 atgagatggg tttttatgat tagagtcccg caattataca tttaatacgc gatagaaaac 3720

aaaatatagc gcgcaaacta ggataaatta tcgcgcgcgg tgatcatctat gttactagat 3780

20 cgatcgggaa ttaagcttat cgataccgtc gacctcgagg ggggcccggt acccaattcg 3840

ccctatagtg agtcgtatta caattcactg gccgtcgttt tacaacgtcg tgactgggaa 3900

aacctggcg ttaccaact taatcgctt gcagcacatc cccctttcgc cagctggcgt 3960

30 aatagcgaag aggcccgac cgatcgccct tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa 4020

tggcgcgaaa ttgtaaacgt taatatTTtg ttaaaattcg cgtaaattt ttgttaaate 4080

35 agctcatttt ttaaccaata ggccgaaatc ggcaaaatcc cttataaatc aaaagaatag 4140

accgagatag ggttgagtgt tgttccagtt tggaacaaga gtccactatt aaagaacgtg 4200

gactccaacg tcaaaggcg aaaaaccgtc tatcagggcg atggccact acgtgaacca 4260

45 tcaccctaata caagttttt ggggtcgagg tgccgtaaag cactaaatcg gaaccctaaa 4320

gggagcccc gatttagagc ttgacgggga aagccggcga acgtggcgag aaaggaaggg 4380

50 aagaaagcga aaggagcggg cgctagggcg ctggcaagtg tagcggtcac gctgcgcgta 4440

accaccacac ccgccgcgt taatgcgccg ctacagggcg cgtcccaggt ggcacttttc 4500

ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttgtt tatttttcta aataattca aatatgtatc 4560

60 cgtcatgag acaataacc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga 4620

65

ES 2 293 742 T3

gtattcaaca tttccgtgtc gcccttattc ccttttttgc ggcattttgc ctccctgttt 4680

5 ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag 4740

tggtttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgtcccgaag 4800

10 aacgtttttc aatgatgagc actttttaaag ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgta 4860

ttgacgcgg gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg 4920

15 agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca 4980

gtgctgccat aacctgagt gataaactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag 5040

20 gaccgaagga gctaaccqct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc 5100

25 gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg 5160

tagcaatggc aacaacgttg cgcaaactat taactggcga actacttact ctagcttccc 5220

30 ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagtgc aggaccactt ctgcgctcgg 5280

cccttcgggc tggttggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggctctcgg 5340

35 gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga 5400

40 cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac 5460

tgattaagca ttggttaactg tcagaccaag ttactcata tatacttttag attgatttaa 5520

45 aacttcattt ttaattttaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca 5580

aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag 5640

50 gatcttcttg agatcctttt ttctgcgcg taatctgctg ctgcaaaca aaaaaaccac 5700

cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactctttt ccgaaggtaa 5760

55 ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc 5820

60 accacttcaa gaactctgta gcaccgcta catacctcgc tctgctaate ctgttaccag 5880

tggtctgtgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac 5940

65

ES 2 293 742 T3

cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc 6000
 5 gaacgaccta caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc 6060
 ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcgggaaca ggagagcgca 6120
 10 cgaggggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg ttctgccacc 6180
 tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg 6240
 15 ccagcaacgc ggcttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct cacatgttct 6300
 20 ttctgcgtt atccctgat tctgtggata accgtattac cgcttttgag tgagctgata 6360
 ccgctcgcg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc 6420
 25 gccaatacgc caaaccgcct ctccccgcgc gttggcgat tcattaatgc agctggcacg 6480
 acaggtttcc cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc aattaatgtg agttagctca 6540
 30 ctcattaggc acccaggtt ttacacttta tgcttcgggc tcgtatgttg tgtggaattg 6600
 35 tgagcggata acaatttcac acaggaaaca gctatgacca tgattacgcc aagctcggaa 6660
 ttaaccctca ctaaaggga caaaagctgg agct 6694

40

45

50

55

60

65