

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 234 347**

21 Número de solicitud: 200200563

51 Int. Cl.:
C12N 15/29 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **08.03.2002**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2005**

Fecha de la concesión: **29.11.2006**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **16.12.2006**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.12.2006

73 Titular/es: **NEWBIOTECHNIC, S.A.**
Avda. Américo Vespucio, 69
41092 Sevilla, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas y
Universidad de Sevilla

72 Inventor/es: **Gutiérrez-Alcalá, Gloria;**
Calo Sánchez, Leticia;
Gotor Martínez, Cecilia y
Romero González, Luis Carlos

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Secuencias reguladoras de la expresión de genes en tricomas de plantas y sus aplicaciones.**

57 Resumen:

Secuencias reguladoras de la expresión de genes en tricomas de plantas y sus aplicaciones.

Se describen secuencias de nucleótidos que regulan la expresión de genes de interés en tricomas de plantas, construcciones y vectores que contienen dichas secuencias, y sus aplicaciones con fines biotecnológicos. De aplicación en Agricultura.

ES 2 234 347 B1

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

DESCRIPCIÓN

Secuencias reguladoras de la expresión de genes en tricomas de plantas y sus aplicaciones.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se relaciona, en general, con la expresión de genes en tejidos específicos de plantas. En particular, la invención se refiere a secuencias que regulan la expresión de un gen en tricomas de plantas, a construcciones y vectores que contienen dichas secuencias, y a sus aplicaciones.

10 **Antecedentes de la invención**

La transformación genética de plantas se inició y desarrolló en la década de los 80 gracias a la convergencia de un constante progreso en los protocolos de regeneración de cultivos celulares, el asentamiento de técnicas moleculares que permitieron la creación de vectores de expresión conteniendo marcadores genéticos; y finalmente, la diversificación en los métodos de insertar los DNA. La capacidad para introducir y expresar (o inactivar) genes específicos en plantas es una poderosa herramienta experimental, la cual permite dilucidar cuestiones en el área de la fisiología vegetal difíciles de resolver utilizando aproximaciones bioquímicas. Sin embargo, mucho del interés en desarrollar esta metodología proviene de los aspectos aplicados de ésta, tales como la generación de plantas con fenotipos útiles e inalcanzables mediante cría convencional, la producción de compuestos de un alto valor añadido, o la corrección de anomalías en las especies cultivables de forma más rápida que mediante cría convencional.

Importantes avances han sido ya obtenidos generándose líneas de plantas con interés comercial que expresan genes foráneos que confieren resistencia frente a virus, insectos o herbívoros, degeneración postcosecha, acumulación de productos de almacenamiento, y una lista creciente de ejemplos de producción de compuestos de interés farmacéutico o industrial (Birch, 1997).

La velocidad a la cual se extiendan las aplicaciones prácticas y comerciales, además de las de interés científico básico, dependerá en gran medida de la eficacia y predictibilidad en la producción de líneas con el deseado fenotipo y sin efectos colaterales indeseados. En este sentido, uno de los aspectos más importantes a mejorar es la capacidad para expresar los genes foráneos exclusivamente en aquellos tejidos o células en los cuales sean necesarios y no en otros donde, o bien no son necesarios o bien puedan tener un efecto negativo. Este control en la especificidad de expresión está determinado por la secuencia promotora situada cadena arriba del gen foráneo, que previamente ha sido modificado e insertado en los vectores de expresión específicos para plantas.

Habitualmente, cadena arriba del inicio de transcripción es posible encontrar elementos promotores que actúan como reguladores (activadores o represores) de la transcripción. Los elementos promotores regulatorios contienen sitios de enlaces para los factores de transcripción que proporcionan la información que decide en qué momento, en qué células y en qué magnitud debe expresarse el gen sobre el cual actúan. Estos elementos, una vez identificados en el promotor de un gen determinado, son capaces de conferir la misma regulación transcripcional a otros genes diferentes incluso en especies de plantas distintas (Heldt, 1997). Además de las secuencias contenidas en la región promotora, la información contenida en los intrones y exones presentes en las regiones 5' no codificantes de algunos genes, parece ser esencial para regular los niveles de mRNA en la célula (Maas *et al*, 1991).

45 **Vectores de expresión de plantas**

Los vectores de expresión utilizados para transformación en plantas están basados en el plásmido Ti de la bacteria fitopatógena *Agrobacterium tumefaciens*. El plásmido Ti de *Agrobacterium* tiene la capacidad de transferir al genoma de las plantas a las que infecta un fragmento de su propio DNA, llamado T-DNA. El fragmento de T-DNA se integra al azar en el genoma nuclear de la planta comportándose como si fuera un gen eucariótico y heredándose según el patrón Mendeliano. La planta replica este DNA como si fuera un gen propio. Si a dicho T-DNA se le incorpora un promotor eucariótico, adquiere también la capacidad de transcribirse (Heldt, 1997).

Los denominados vectores binarios para transformación de plantas contienen una serie de fragmentos de DNA esenciales para su función:

- los orígenes de replicación en *Agrobacterium* y *E. coli* esenciales para replicar el plásmido en bacteria;
- un marcador de selección genética para la transformación en bacteria y que suele ser un gen que confiere resistencia a un antibiótico (por ejemplo resistencia a kanamicina); y
- el fragmento T-DNA modificado; esta modificación consiste en eliminar los genes de biosíntesis de fitohormonas y mantener solamente los bordes derecho e izquierdo del T-DNA; el trozo eliminado de T-DNA se sustituye por una secuencia de clonaje múltiple (esencial para insertar el gen foráneo de interés) flanqueada en el extremo 5' por una secuencia promotora que controle la transcripción del gen foráneo. Además se le añade también un marcador de selección genético para la transformación en planta (por ejemplo el gen de resistencia al antibiótico kanamicina).

Tradicionalmente, con objeto de obtener una elevada expresión del gen foráneo y de forma generalizada en todas las partes de la planta se ha utilizado como secuencia promotora el fragmento de DNA 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Benfey *et al*, 1990). Aunque esta expresión alta y generalizada puede ser adecuada para algunos genes y aplicaciones biotecnológicas, para otras puede producir efectos colaterales indeseados como por ejemplo un derroche metabólico al producir una proteína en células o tejidos donde no tiene función. Igualmente, se han observado fenómenos de inactivación en cis a nivel post-transcripcional (silenciamiento génico) cuando se expresan genes foráneos bajo el control de promotores fuertes como el 35S CaMV, obteniéndose el efecto contrario al deseado (Vaucheret *et al*, 1998).

10 *Promotores específicos de tricoma*

Los tricomas son apéndices unicelulares o pluricelulares, que se forman a partir de células epidérmicas que se desarrollan hacia el exterior sobre la superficie de los diversos órganos de la planta (hojas, tallos, flores, frutos, semillas) (Marks, 1997; Wercker, 2000). La función de estas estructuras ha sido ampliamente estudiada en el caso de los tricomas secretores pero muy poco estudiada en el caso de los tricomas unicelulares no secretores. Existen evidencias de que los tricomas desempeñan un papel esencial en la defensa de la planta frente al ataque de insectos, absorción de agua, secreción de sal y la secreción de compuestos para atraer a insectos para su reproducción o alimentación (Wercker, 2000). En *Arabidopsis thaliana* parece que desempeñan un papel esencial en la defensa de la planta frente al ataque de depredadores (Mauricio y Rausher, 1997; Eisner *et al*, 1998).

Recientemente, se ha identificado que los tricomas de *Arabidopsis* presentan una alta tasa de biosíntesis de cisteína y glutatión (Gutiérrez-Alcalá *et al*, 2000). La biosíntesis de cisteína está catalizada por un complejo bi-enzimático denominado Cisteína Sintasa. Este complejo está constituido por la enzima O-acetilserina(tiol)lisa (OASTL) que cataliza la síntesis de cisteína a partir de sulfuro y O-acetilserina; y la serina acetiltransferasa (SAT) que forma O-acetilserina a partir de serina y acetil-CoA. Se ha identificado que existen tres isoformas de OASTL y SAT con localización en el citoplasma, el cloroplasto y la mitocondria (Barroso *et al*, 1997). Análisis mediante hibridación *in situ* del gen *Atcys-3A* que codifica la isoforma citosólica de la enzima OASTL en *A. thaliana* ha mostrado que está fuertemente expresado en los tricomas de hoja y tallo, observándose unos niveles constitutivos más bajos en el resto de las células de la lámina de la hoja y en el cortex y tejidos vasculares de la raíz (Gotor *et al*, 1997). Además de especificidad por tejido, este gen presenta regulación por deficiencia nutricional de azufre (Barroso *et al*, 1995), por la hormona ABA y por estrés salino (Barroso *et al*, 1999). Otros genes de la ruta de biosíntesis de cisteína, como por ejemplo los genes SAT, también presentan el mismo patrón de regulación que OASTL (Gutiérrez-Alcalá *et al*, 2000).

35 *Importancia biotecnológica de los tricomas*

La presencia de estructuras glandulares o no glandulares como los tricomas, es una característica anatómica general del reino vegetal. Muchos de los productos formados en estas estructuras son comercialmente muy importantes por su papel en atraer polinizadores, proteger las plantas frente al ataque de herbívoros, contribuir al flavor y aroma característico de muchas plantas y por las aplicaciones en la industria de química fina. Los productos principalmente producidos son terpenoides, flavonoides, ácidos grasos, compuestos nitrogenados, compuestos fenólicos y un largo etcétera de familias químicas (McCaskill y Croteau, 1999).

Entre la variedad más importante por su interés comercial se encuentran los terpenoides. Estos compuestos son ampliamente utilizados en la industria en forma de aceites esenciales o resinas directamente, o son utilizados como materia prima para su modificación posterior. El destilado de los aceites esenciales o los directamente extraídos de plantas tales como la menta, cítricos y flores son ampliamente utilizados en la industria del flavor y de la perfumería. Terpenos aislados de los aceites esenciales de la familia de las *Laminaceae* (e.g., romero) son muy atractivos por su potencial uso como antioxidantes en la industria alimentaria. Por último, no se debe olvidar que la fibra de algodón se produce en los tricomas y representa una de las mayores cosechas mundiales.

Un importante avance biotecnológico sería la modificación de los tricomas mediante la expresión ectópica de nuevos compuestos con objeto de proporcionar a bajo coste una fuente renovable de compuestos específicos de alto valor añadido. Para ello sería necesario utilizar un vector de expresión específico en tricoma, tal como el que se describe en esta descripción. Modificaciones en la ruta de biosíntesis de terpenoides podrían obtenerse mediante la expresión en orientación sentido (sobreexpresión) o antisentido (supresión) del gen de las enzimas implicadas en esta ruta, entre las que se encuentran enzimas del tipo sintasa (e.g., la 3-hidroxi-3-metil glutaril-CoA sintasa) (Hamano *et al*, 2001), reductasa (e.g., 3-hidroxi-3-metil glutaril-CoA reductasa) (Kato-Emori *et al*, 2001), quinasa (e.g., mevalonato quinasa) (Schulte *et al*, 2000), descarboxilasa (e.g., mevalonato-5-fosfato descarboxilasa), polimerasa (e.g., tiolasa) (Yamagami *et al*, 2001), isomerasa (e.g., IPP-isomerasa) (Hamano *et al*, 2001), transferasa (e.g., prenil transferasa) (Knoss y Reuter, 1996) e hidroxilasa (e.g., citocromo P450 limoneno-6-hidroxilasa) (Wust *et al*, 2001).

Mejora en la resistencia de plantas frente a enfermedades fúngicas y al ataque de insectos

La mejora en la protección de plantas es uno de los objetivos prioritarios en agricultura. El ataque de fitopatógenos produce masivas pérdidas de productividad en las cosechas que pueden ser muy importantes en infecciones epidémicas locales. Una de las estrategias actuales para la obtención de cosechas resistentes al ataque de fitopatógenos está basada en las modernas técnicas de ingeniería genética.

Las plantas responden de manera natural al ataque de patógenos mediante la puesta en marcha de un complejo mecanismo de defensa (Lamb, 1994). Esto incluye la inducción de la biosíntesis de polímeros de la pared celular de la planta (cutina, lignina, callosa, etc) para que actúen como barrera física frente al ataque, y la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (denominadas PR) tales como quitinasas y glucanasas capaces de degradar la pared celular de los hongos fitopatógenos (Joosten y de Wit, 1989). Otras de estas proteínas PR son responsables de la biosíntesis de metabolitos con actividad antimicrobiana, tales como fitoalexinas, saponinas, glicósidos de cianógeno y glucosinolatos (Osbourn, 1996). Algunos mecanismos de defensa frente a insectos implican la biosíntesis de polipéptidos inhibidores de proteasas, que actúan inhibiendo las enzimas digestivas del insecto, o de lectinas que se unen y destruyen las células del epitelio intestinal del insecto (Gatehouse *et al*, 1984).

La resistencia de una planta al ataque de un patógeno depende en cierto modo de la velocidad con que ésta pone en marcha los mecanismos de defensa frente al patógeno. Existen una gran variedad de ejemplos en los cuales la activación constitutiva de los genes de defensa o la sobreexpresión de algunas de estas proteínas PR producen una mejora significativa en la protección frente al patógeno (Broglie *et al*, 1991; Hain *et al*, 1993; Jach *et al*, 1995; Logemann *et al*, 1992). También se ha obtenido una mejora en la resistencia frente a insectos en plantas transgénicas que expresan inhibidores de serín proteasa (Hilder *et al*, 1987), cisteín proteasa (Leplé *et al*, 1995), α -amilasa (Altabella y Chrispeels, 1990), lectinas (Boulter *et al*, 1990; Gatehouse *et al*, 1996), etc. Sin embargo, dado que estas proteínas presentan inhibición sobre enzimas presentes en el epitelio intestinal de los animales, el uso masivo de plantas modificadas genéticamente en alimentación animal o humana podría ser perjudicial.

La obtención de vectores de expresión específicos de tricomas puede tener además una importante aplicación en la mejora de tolerancia de la plantas frente a bacterias, hongos e insectos, entre otras. Es evidente que la primera barrera que deben superar los insectos y los hongos que realizan un ataque aéreo a la planta son los tricomas. La localización, de manera específica, de una elevada cantidad de proteínas con actividad antifúngica o insecticida como las descritas anteriormente en tricomas, supone una importante mejora en la defensa de la planta.

Función de los tricomas en protección frente a estreses abióticos

Existen evidencias de que los tricomas de las hojas y el tallo, en algunas especies de planta, desempeñan un papel esencial en la protección frente a estreses medioambientales abióticos. Existen tricomas capaces de secretar sal que consisten en células vivas que secretan una solución rica en diferentes minerales. Entre las especies que poseen tricomas secretores de sal se encuentran *Atriplex*, *Phyllyrea latifolia* y *Monarda fistulosa* Cicer entre otras, aunque la estructura de sus tricomas difiere en morfología y composición de las sales secretadas (Wercker, 2000). También se han descrito varias especies de plantas capaces de acumular metales pesados como cadmio, plomo y níquel en tricomas de especies como *Nicotiana* (Choi *et al*, 2001), *Nymphaea* (Lavid *et al*, 2001), *Arabidopsis* (Kupper *et al*, 2000), *Brassica* (Salt *et al*, 1995), etc. Aunque se desconocen los mecanismos de acumulación de estos metales pesados, las plantas son capaces de sintetizar péptidos y proteínas ricos en cisteínas, denominados fitoquelatinas y metalotioneinas, que forman complejo con el metal, evitando el efecto tóxico de los mismos (Zenk, 1996). Recientemente, también se ha descrito que los tricomas de *Arabidopsis* son capaces de sintetizar una elevada tasa de glutatión, y este efecto se ha relacionado con la capacidad de acumular xenobióticos, como herbicidas y hormonas en la vacuola del tricoma, eliminando de esta manera la toxicidad de los mismos (Gutiérrez-Alcalá *et al*, 2000).

Regulación del desarrollo de los tricomas

Dada la función que desempeñan los tricomas en las plantas, una mejora significativa en la planta sería la de incrementar el número y el tamaño de ellos. La regulación y el control en la iniciación y formación de los tricomas está siendo ampliamente estudiada. Varios genes han sido identificados como reguladores de la iniciación del tricoma y el espaciado entre ellos, como *gll*, *ttgl*, *gl3* y *try* (Szymanski *et al*, 2000). Una vez que se ha decidido la diferenciación de una célula epidérmica en tricoma, entra en un complejo programa de morfogénesis que todavía no es completamente conocido. Para culminar el proceso de morfogénesis, el núcleo entra en un proceso de endoreduplicación hasta alcanzar un nivel de DNA entre 20C y 32C, proceso que parece estar controlado igualmente por varios genes como *gl3*, *try*, *kak* y *sim* (Szymanski *et al*, 2000). Una vez que se conozca el complejo mecanismos de regulación de estos procesos, la expresión de los genes reguladores en células específicas de tricomas puede ser necesaria para alterar el número de tricomas presente en la planta, y por tanto, modificar las características fenotípicas que proporcionen estas estructuras según su función que desempeñen en la misma.

Compendio de la invención

La invención se enfrenta, en general, con el problema de desarrollar un sistema útil para regular la expresión de un gen en tricomas de plantas.

La solución proporcionada por esta invención se basa en el aislamiento y caracterización de un ácido nucleico que comprende una secuencia reguladora de la transcripción y/o traducción de un gen en tricomas de plantas, cuyo empleo permite producir plantas que expresan un gen de interés en tricoma. En los Ejemplos 3 y 4 se describe la obtención de plantas transformadas con un plásmido que contiene una construcción que comprende un ácido nucleico proporcionado por esta invención operativamente fusionado a un gen informador observándose su especificidad al dirigir la expresión del gen testigo en tricomas.

ES 2 234 347 B1

Por consiguiente, un objeto de esta invención lo constituye un ácido nucleico aislado que tiene la capacidad de regular la expresión en tricomas de plantas de un gen de interés que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1 o en la SEC. ID. N°: 2, o una secuencia de nucleótidos sustancialmente análoga a dichas secuencias. El empleo de dicho ácido nucleico en diversos fines biotecnológicos constituye un objeto adicional de esta invención.

5

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye una construcción de DNA que comprende la totalidad o una parte de dicho ácido nucleico, así como un vector que contiene dicho ácido nucleico o dicha construcción de DNA y una célula transformada con dicho vector.

10

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye el empleo de dicho ácido nucleico, o de dicha construcción de DNA, o de dicho vector, en la producción de plantas transgénicas que expresan en tricoma un gen de interés. Las plantas transgénicas resultantes constituyen otro objeto adicional de esta invención.

15

Otros objetos adicionales de esta invención serán evidentes para los expertos en la materia a la vista de la descripción.

Breve descripción de las figuras

20

La Figura 1 es una representación esquemática de las características de la secuencia P3-2692 (SEC. ID. N°: 1) y de su fragmento derivado TSP-1809 (SEC. ID. N°: 2). La secuencia P3-2692 contiene una región promotora (P3-1490) en el extremo 5' dibujada como una caja negra; seis secuencias exones indicadas como Ex-1 a 6, dibujadas como cajas rayadas; y cinco secuencias intrones indicadas como In-1 a 5 y dibujadas como cajas grises. Las flechas de las cajas indican el sentido de las secuencias de DNA. Las características de la secuencia TSP-1809 son idénticas a las descritas en el caso de la secuencia P3-2692.

25

La Figura 2 muestra de forma esquemática el plásmido pBI-TSP-1809-GFP utilizado en la transformación de plantas para el análisis funcional de la secuencia reguladora TSP-1809. Las cajas negras representan las secuencias promotoras del gen de la nopalina sintetasa (NOS-pro) y TSP-1809; las cajas grises punteadas indican las secuencias de cDNA de los genes de la neomicina fosfotransferasa (NPTII (Kan)) utilizada como marcador genético de resistencia a kanamicina y de la proteína fluorescente verde modificada (smGFP) utilizada como gen informador. Como cajas grises se dibujan la secuencias 3' de poliadenilación del gen de la nopalina sintetasa (NOS-ter).

30

La Figura 3 es un conjunto de fotografías que muestran las imágenes, obtenidas al microscopio de fluorescencia, de células de tricomas de plantas de *Arabidopsis* silvestres (A,B,C) y transformadas con el plásmido pBI-TSP-1809-GFP (D,E,F).

35

Descripción detallada de la invención

40

La invención proporciona un ácido nucleico aislado, en adelante ácido nucleico de la invención, que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

45

- a) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEC. ID. N°:1;
- b) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEC. ID. N°: 2; y
- c) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de nucleótidos definida en a) o en b).

50

El ácido nucleico de la invención comprende una región reguladora de la expresión de un gen en tricomas de plantas y tiene, por tanto, la capacidad de regular la expresión de un gen en tricomas de plantas.

55

En el sentido utilizado en esta descripción, “una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de nucleótidos definida en a) o en b)” pretende incluir a cualquier secuencia de nucleótidos que es sustancialmente similar o semejante a la secuencia de nucleótidos definida en a) o en b), y, además, tiene la capacidad de regular la expresión de un gen en tricomas de plantas. Esta capacidad de regular la expresión en tricomas puede ponerse de manifiesto fácilmente mediante un ensayo similar al descrito en los Ejemplos 3 y 4. Brevemente, la secuencia a ensayar se fusiona operativamente a un gen informador, por ejemplo, el cDNA que codifica la proteína fluorescente verde modificada (smGFP), y la construcción resultante se inserta en un vector binario, tal como pBI121, con lo que se obtiene un plásmido que se utiliza para transformar plantas, y, posteriormente, se analiza la expresión y traducción de la proteína informadora (si ésta es la proteína GFP sus niveles de expresión pueden ser detectados mediante microscopía de fluorescencia).

60

Tal como se utiliza en esta descripción, una secuencia de nucleótidos es “sustancialmente similar o semejante a la secuencia de nucleótidos definida en a) o en b)” cuando dicha secuencia de nucleótidos tiene un grado de identidad de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos un 80%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.

65

Una “secuencia reguladora de la expresión de un gen en tricomas de planta” se refiere a una secuencia reguladora de la transcripción y traducción que puede funcionar en plantas, tejidos de plantas y células de plantas, y es capaz de afectar los niveles de transcripción y/o traducción, y, consecuentemente de expresión en tricoma, de un gen que esté

fusionado en el extremo 3' de dicha secuencia reguladora. En general, una secuencia reguladora de la transcripción y/o traducción comprende secuencias promotoras del extremo 5' responsables del control cualitativo y cuantitativo de la expresión de un gen, secuencias presentes en las regiones transcribibles (intrones y exones) que estabilizan los mRNA, y secuencias de control de la traducción responsables del enlace a los ribosomas.

Una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de nucleótidos definida en a) o en b) se puede aislar de cualquier organismo que la contiene en base a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1, o en la SEC. ID. N°: 2, o bien se puede construir en base a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1 o en la SEC. ID. N°: 2, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, la inserción de uno o más nucleótidos en la secuencia, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la secuencia, o la delección de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos o en el interior de la secuencia; a modo ilustrativo, la secuencia de nucleótidos análoga puede ser un fragmento o una sub-secuencia de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1 o en la SEC. ID. N°: 2 que comprende la capacidad de regular la expresión de un en tricomas de plantas.

El ácido nucleico de la invención puede proceder de cualquier organismo que lo contenga de forma natural o bien de un organismo hospedador transformado con dicho ácido nucleico. El ácido nucleico de la invención, puede ser aislado, mediante técnicas convencionales, a partir de un ácido nucleico de cualquier organismo que lo contenga mediante el empleo de sondas o de oligonucleótidos preparadas a partir de la información sobre la secuencia de nucleótidos proporcionada en esta descripción.

En una realización particular, el ácido nucleico de la invención es el ácido nucleico denominado P3-2692 en esta descripción, cuya secuencia de nucleótidos comprende, o está constituida por, la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1 y se representa esquemáticamente en la Figura 1. Como puede apreciarse, P3-2692 contiene un fragmento elevado de la región codificante del gen *Atcys-3A* (cinco intrones y seis exones). Dicho fragmento ha sido obtenido a partir del DNA genómico del gen *Atcys-3A* (N° de acceso en base de datos en GenBank, X84097) de *Arabidopsis thaliana*, un gen que codifica la isoforma citosólica de la enzima O-acetilserina(tiol)lasi. El promotor de dicho gen se aisló mediante el escrutinio de una genoteca de DNA con una sonda específica del gen *Atcys-3A* obteniéndose el fragmento de DNA denominado P3-2692 (Ejemplo 1).

En otra realización particular, el ácido nucleico de la invención es el denominado TSP-1809 en esta descripción, cuya secuencia de nucleótidos comprende, o está constituida por, la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 2. La denominación TSP-1809 corresponde al acrónimo de la frase inglesa "Trichome Specific Promoter" seguido de la longitud del ácido nucleico indicada en número de nucleótidos. En una realización particular, dicho ácido nucleico TSP-1809 ha sido obtenido a partir del ácido nucleico P3-2692, tras la eliminación parcial de los cinco intrones y seis exones de la región codificante del gen *Atcys-3A* de *A. thaliana* presentes en dicho P3-2692, y ha sido amplificado mediante PCR (véase el Ejemplo 2). TSP-1809 es una secuencia reguladora transcripcional y traduccional, cuya funcionalidad ha sido confirmada mediante la fusión de dicha secuencia reguladora TSP-1809 al cDNA que codifica la proteína fluorescente verde modificada (smGFP) de *Aequorea victoria* (N° de acceso en base de dato GenBank, U70495). Todo este fragmento de DNA fue a su vez insertado en el vector binario pBI121 obteniéndose un plásmido derivado denominado pBI-TSP-1809-GFP (véase la Figura 2) para su integración en el genoma de una planta. Se obtuvieron plantas transformadas con el plásmido pBI-TSP-1809-GFP con objeto de analizar la expresión y traducción de la proteína GFP. Los niveles de proteína GFP fueron detectados mediante microscopia de fluorescencia convencional, tal como se muestran en la Figura 3. Los resultados obtenidos demuestran que los niveles de proteína GFP detectados fueron muy elevados en los tricomas de hojas de *A. thaliana* transformadas y, por tanto, la funcionalidad de TSP-1809.

En otra realización particular, el ácido nucleico de la invención es un fragmento o sub-secuencia de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1 o en la SEC. ID. N°: 2, o análoga a dichas secuencias, que conserva la capacidad de regular la expresión de genes en tricomas de plantas.

El ácido nucleico de la invención puede obtenerse utilizando métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. En el Ejemplo 1 se describe una forma de obtener el ácido nucleico identificado como P3-2692 mientras que en el Ejemplo 2 se describe la obtención del ácido nucleico identificado como TSP-1809.

La invención proporciona, además, una construcción de DNA, en adelante, construcción de DNA de la invención, que comprende la totalidad del ácido nucleico de la invención o un fragmento del mismo que conserva la capacidad de regular la expresión de un gen en tricomas de plantas y, opcionalmente, un sitio para la inserción de un gen de interés. En una realización particular, dicha construcción de DNA de la invención es una construcción o cassette de expresión que comprende la totalidad del ácido nucleico de la invención o un fragmento del mismo que conserva la capacidad de regular la expresión de un gen en tricomas de plantas operativamente unido a un gen de interés a través de un sitio para la inserción de dicho gen de interés presente en dicha construcción de DNA de la invención. En una realización particular, el ácido nucleico de la invención presente en la construcción de la invención comprende, o está constituido por, la secuencia reguladora transcripcional y traduccional TSP-1809.

El ácido nucleico de la invención, o la construcción de DNA de la invención, pueden ser insertados en un vector apropiado. Por tanto, la invención también se refiere a un vector, en adelante vector de la invención, tal como un plásmido recombinante o un vector de expresión, que comprende dicho ácido nucleico de la invención, o una construcción

de DNA que lo contiene, y, opcionalmente, un gen de interés operativamente unido al ácido nucleico de la invención o un fragmento del mismo que conserva la capacidad de regular la expresión de un gen en tricomas de plantas. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir posteriormente. A modo de ejemplo, el vector donde se introduce dicho ácido nucleico de la invención puede ser un plásmido o un vector que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de dicha célula y se replica junto con el cromosoma (o cromosomas) en el que (o en los que) se ha integrado. En una realización particular, dicho vector en el que se inserta dicho ácido nucleico de la invención o dicha construcción de DNA de la invención es un vector binario de expresión en plantas, tal como, por ejemplo, el vector pBI121.

Tal como se utiliza en esta descripción, “gen de interés” incluye a cualquier gen de interés agrícola, tal como un gen que codifica una proteína que proporciona un valor nutricional añadido al fruto, semilla, o parte comestible de la planta, o bien un gen que codifica una proteína que aumenta la resistencia a patógenos, etc. Alternativamente, el gen de interés puede ser una construcción antisentido para modificar la expresión de los transcritos naturales presentes en los tricomas. A modo ilustrativo, el gen de interés que puede estar presente en la construcción de DNA o en el vector de la invención es un gen que codifica un producto que presenta una o más de las siguientes funciones: resistencia a bacterias, resistencia a hongos, resistencia a insectos, resistencia a nemátodos, resistencia a herbicidas, resistencia a fungicidas, resistencia a insecticidas, resistencia a metales pesados, resistencia a estrés medioambiental, y/o actividades: enzima glicolítica, enzima proteolítica, enzima oxidoreductasa, enzima isomerasa, enzima sintetasa, enzima sintasa, enzima transferasa, enzima ciclasa, enzima hidroxilasa, enzima fosfatasa, enzima quinasa, enzima polimerasa, proteína transportadora, reguladora de la transcripción, reguladora de la traducción, reguladora del ciclo celular, reguladora de la endo-reduplicación, formadora del citoesqueleto, utilización de nutrientes, inhibidora o inductora de la formación de tricomas en hojas, tallos, semillas o flores, inhibidora o inductora de la formación de pelos radicales, o inhibidora o inductora de la formación de vacuolas (Altabella y Chrispeels, 1990; Boulter *et al.*, 1990; Broglie *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 2001; Domínguez-Solís, *et al.*, 2001; Gatehouse *et al.*, 1996; Gatehouse *et al.*, 1984; Gotor, *et al.*, 1997; Hain *et al.*, 1993; Hamano *et al.*, 2001; Hilder *et al.*, 1987; Jach *et al.*, 1995; Joosten y de Wit, 1989; Kato-Emori *et al.*, 2001; Knoss y Reuter, 1996; Kupper *et al.*, 2000; Lavid *et al.*, 2001; Leplé *et al.*, 1995; Logemann *et al.*, 1992; Osbourn, 1996; Salt *et al.*, 1995; Schulte *et al.*, 2000; Szymanski *et al.*, 2000; Wercker, 2000; Wust *et al.*, 2001; Yamagami *et al.*, 2001; Zenk, 1996)

El vector de la invención puede construirse mediante el empleo de técnicas bien conocidas por los técnicos en la materia.

La invención también proporciona una célula, en particular, una célula transformada que comprende un ácido nucleico de la invención, o una construcción de DNA de la invención, o dicho vector mencionado más arriba. Las células hospedadoras que se pueden transformar con dicho material biológico pueden ser células procarióticas o, preferentemente, eucarióticas, tales como células de tejidos vegetales. La transformación de células de tejidos vegetales puede realizarse por métodos convencionales. Para una revisión de la transferencia génica a plantas, incluyendo vectores, métodos de transferencia de DNA, etc., véase, por ejemplo, el libro titulado “Ingeniería genética y transferencia génica”, de Marta Izquierdo, Ed. Pirámide (1999), en particular, el capítulo 9, titulado “Transferencia génica a plantas”, páginas 283-316.

Diversos estudios realizados hasta la fecha han puesto de manifiesto la potencial utilidad del ácido nucleico de la invención para regular la expresión de un gen de interés en tricomas de plantas, por lo que puede utilizarse con fines biotecnológicos en cualquier planta apropiada.

El ácido nucleico de la invención puede ser utilizado en procesos de mejora de plantas, por ejemplo, aumentando la calidad nutricional de la planta o del fruto, la tolerancia de las plantas a patógenos o a estreses abióticos, etc. Adicionalmente, debido a que regula la expresión de genes en tricomas de plantas se puede utilizar como secuencia reguladora transcripcional y/o traduccional de la expresión de genes de interés en dichos tejidos para fines biotecnológicos, de forma controlada y programada.

En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la introducción en una planta de un gen de interés expresable en tricomas que comprende transformar dicha planta con un vector de la invención. La transformación de dicha planta puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. La planta a transformar puede ser cualquier planta. En una realización particular, dicha planta se selecciona entre una planta monocotiledónea y una planta dicotiledónea.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para expresar un gen de interés en tricomas de una planta, que comprende introducir en una planta una construcción de ADN de la invención, o un vector de la invención, que comprende el ácido nucleico de la invención, o un fragmento del mismo que conserva la capacidad de regular la expresión de un gen en tricomas de plantas, operativamente enlazado a un gen de interés.

La invención también proporciona un procedimiento para modificar una o más características del fenotipo de una planta que comprende introducir en dicha planta un gen de interés expresable en tricomas. Brevemente, dicho procedimiento puede realizarse transformando dicha planta con un vector de la invención que comprende un gen de interés, operativamente enlazado al ácido nucleico de la invención o a un fragmento del mismo que conserva la capacidad de regular la expresión de un gen en tricoma de plantas, codificando dicho gen de interés un producto susceptible de modificar, al menos, una característica del fenotipo de dicha planta. La planta a transformar puede

ES 2 234 347 B1

ser cualquier planta. En una realización particular, dicha planta se selecciona entre una planta monocotiledónea y una planta dicotiledónea. A modo ilustrativo, la característica del fenotipo de la planta susceptible de ser modificada según la presente invención se selecciona entre protección frente a insectos, protección frente a hongos, protección frente a bacterias, protección frente a nematodos, producción de biomoléculas con interés industrial, resistencia y acumulación de metales pesados, tolerancia climática, resistencia y eliminación de sales, resistencia y eliminación de herbicidas, resistencia y eliminación de fungicidas, resistencia y eliminación de insecticidas, producción de fibra, valor ornamental, absorción de agua y nutrientes, pigmentación, sabor, velocidad de crecimiento de las plántulas, inhibición o inducción de la formación de tricomas en hojas, tallos, semillas o flores, inhibición o inducción de la formación de pelos radicales, y mezclas de las mismas.

El ácido nucleico de la invención también puede utilizarse en la obtención de plantas transgénicas que expresan un gen de interés. Para la obtención de dichas plantas transgénicas se puede proceder con las técnicas convencionales de obtención de plantas transgénicas conocidas por los técnicos en la materia.

Por tanto, la invención proporciona una célula transgénica de una planta que comprende, insertado en su genoma, un ácido nucleico de la invención o una construcción de ADN de la invención. Una planta transgénica que comprende, al menos, una de dichas células transgénicas, constituye un objeto adicional de esta invención. En una realización particular, dicha planta transgénica es una planta monocotiledónea o dicotiledónea.

La utilización del ácido nucleico de la invención, o de construcciones o vectores que lo contienen, puede generar plantas transgénicas más resistentes al ataque de patógenos, así como plantas y frutos más resistentes a situaciones de estrés abiótico, o plantas y frutos con un valor nutritivo aumentado, o plantas con una producción de fibra aumentada (algodón), etc., mediante la expresión en tricoma de un gen de interés en los mismos, lo que redundará en un valor económico añadido de las mismas.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Obtención del ácido nucleico identificado como P3-2692

El DNA genómico correspondiente al cDNA *Atcys-3A* (Barroso *et al*, 1995) fue aislado mediante escrutinio de una genoteca en el vector EMBL3 (Clontech, USA) usando como sonda el cDNA *Atcys-3A* (Gotor *et al*, 1997). Tras análisis de los clones aislados, mediante restricción con la enzima *KpnI*, se identificó un fragmento de 2.692 pb (identificado como P3-2692 en esta descripción) que daba señal positiva de hibridación que fue subclonado en el plásmido pBluescriptKSII (Stratagene, USA), en el sitio *KpnI* de la región de clonaje múltiple de dicho plásmido. Para confirmar la identidad del fragmento aislado, se secuenció el DNA de doble cadena mediante el procedimiento de terminación de la cadena de dideoxinucleótidos (Sanger *et al*, 1977). La secuencia de nucleótidos de P3-2692 se muestra en la SEC. ID. N°: 1. Por comparación de la secuencia identificada con la secuencia del gen *Atcys-3A*, se identificaron las siguientes características (véase la Figura 1):

Promotor eucariótico (1 total)

Empieza: 1 Termina: 1490
Secuencia promotora de *Atcys-3A*

Intrones (5 total)

In-1
Empieza: 1513 Termina: 1766
INTRON *Atcys3A*

In-2
Empieza: 1826 Termina: 1910
INTRON *Atcys3A*

In-3
Empieza: 2021 Termina: 2107
INTRON *Atcys3A*

In-4
Empieza: 2169 Termina: 2248
INTRON *Atcys3A*

In-5
Empieza: 2513 Termina: 2603
INTRON *Atcys3A*

Exones (6 total)

Ex-1

Empieza: 1491 Termina: 1512

EXON-*Atcys3A*

Ex-2

Empieza: 1767 Termina: 1825

EXON *Atcys3A*

Ex-3

Empieza: 1911 Termina: 2020

EXON *Atcys3A*

Ex-4

Empieza: 2108 Termina: 2168

EXON *Atcys3A*

Ex-5

Empieza: 2249 Termina: 2512

EXON *Atcys3A*

Ex-6

Empieza: 2604 Termina: 2692

EXON *Atcys3A*

Ejemplo 2

Obtención de la secuencia reguladora TSP-1809

Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se obtuvo la secuencia reguladora TSP-1809 a partir del fragmento genómico P3-2692 con objeto de eliminar parte de las secuencias intrones y exones del gen *Atcys-3A* y delimitar la secuencia reguladora presente en el extremo promotor no transcribible y en el primer intrón y exón del gen. Los oligonucleótidos utilizados para la reacción de PCR fueron los siguientes:

Primer sentido: ATGCCCGGGTACCTACTGCAGTCCGGT [SEC. ID. N°: 3]

Primer antisentido: ATGGGATCCCGAGGCCATGATTCAAGC [SEC. ID. N°: 4]

El primer sentido contiene una secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción *SmaI* (CCCGGG) en el extremo 5' del oligonucleótido con objeto de facilitar la clonación del fragmento amplificado. De igual manera, el primer antisentido contiene una secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción *BamHI* (GGATCC).

Cada reacción de PCR contenía los siguiente reactivos: 10 ng de DNA, MgCl₂ 1,5 mM, dATP 0,2 mM, dCTP 0,2 mM, dGTP 0,2 mM, dTTP 0,2 mM, 50 pmoles de cada primer sentido y antisentido y 2,5 U de Taq polimerasa. La reacción se llevo a cabo en 30 ciclos en las siguientes condiciones por ciclo: 95°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 1 min. El fragmento amplificado de 1.818 pb fue digerido con las enzimas de restricción *SmaI* y *BamHI* y purificado en gel de agarosa. El fragmento obtenido de 1.809 pb (identificado en esta descripción como TSP-1809) fue insertado en el plásmido pBI121 (Clontech, USA) que previamente había sido digerido con *HindIII*, rellenado este extremo promiamente con la enzima Klenow, y digerido con *BamHI*. Este procedimiento elimina del plásmido pBI121 un fragmento de DNA conteniendo el promotor 35S CaMV y deja un extremo cohesivo *BamHI* y un fragmento romo, a los cuales se ligaron los extremos del fragmento de 1.809 pb (TSP-1809).

Ejemplo 3

Obtención de plantas transformadas

El ácido nucleico identificado como TSP-1809 se fusionó al cDNA que codifica la proteína fluorescente verde modificada (smGFP) de *Aequorea victoria* (N° de acceso en base de dato GenBank, U70495) y el fragmento de DNA resultante fue a su vez insertado en el vector binario pBI121 (Clontech, USA) con lo que se obtuvo el plásmido derivado denominado pBI-TSP-1809-GFP (véase la Figura 2) que se utilizó para transformar plantas de *A. thaliana*.

La transformación de plantas de *A. thaliana* fue realizada mediante el método de infiltración a vacío según ha sido descrito por Bechtold y colaboradores (Bechtold *et al.*, 1993).. Brevemente, el plásmido pBI-TSP-1809-GFP fue

introducido en la estirpe CV58 de *Agrobacterium* y se utilizó para la transformación de *Arabidopsis*. Semillas de las plantas transformadas con *Agrobacterium* portando el plásmido pBI-TSP-1809-GFP fueron sembradas en un medio MS (Murashige and Skoog, 1962) solidificado con agar conteniendo 50 µg/ml del antibiótico kanamicina. Las semillas que fueron capaces de germinar y crecer en este medio fueron trasplantadas a macetas con tierra y seleccionadas para posterior análisis de sus descendientes.

Ejemplo 4

Análisis funcional del promotor TSP-1809

Plantas transformadas de *A. thaliana* con el plásmido pBI-TSP-1809-GFP fueron estudiadas con objeto de analizar la funcionalidad del promotor TSP-1809 fusionado al gen informador smGFP. Los niveles de expresión y síntesis de proteína GFP fueron estudiados mediante el análisis de fluorescencia detectada en los tejidos de las plantas transformadas y comparadas con plantas silvestres sin transformar. Los niveles de fluorescencia fueron analizados en un microscopio Olympus BX50 adaptado con un filtro de emisión U-M32001 GFP LP (Olympus). Los niveles de fluorescencia fueron observados *in situ* en tejidos de hoja sin fijar colocados en una microceldilla construida en un portaobjeto y cubierta con un cubreobjeto de vidrio. Las imágenes obtenidas al microscopio de fluorescencia de células de tricomas de plantas de *Arabidopsis* silvestres (A,B,C) y transformadas con el plásmido pBI-TSP-1809-GFP (D,E,F) (véase la Figura 3). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que los niveles de proteína GFP detectados fueron muy elevados en los tricomas de hojas de *A. thaliana* transformadas y, por tanto, la funcionalidad de TSP-1809. Estos resultados demuestran que TSP-1809 es una secuencia reguladora transcripcional y traduccional de la expresión de genes en tricomas de plantas.

Referencias bibliográficas

1. Altabella, T., Chrispeels, M.J. (1990) *Plant Physiol.* **93**: 805-810
2. Barroso, C., Romero, L.C., Cejudo, F.J., Vega, J.M., Gotor, C. (1999) *Plant Mol. Biol.* **40**: 729-736
3. Barroso, C., Romero, L.C., Vega, J.M., Gotor, C. (1997). *Current Topics Phytochem.* **1**: 19-29
4. Barroso, C., Vega, J.M., Gotor, C. (1995) *FEBS Lett.* **363**: 1-5
5. Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G. (1993) *C.R. Acad. Sci. Paris Sciences de la vie/Life sciences.* **316**: 1194-1199
6. Benfey, P.N., Ren, L., Chua, N-H. (1990) *EMBO J.* **9**: 1677-1684
7. Birch, R.G. (1997) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**:297-326
8. Boulter, D., Edwards, G.A., Gatehouse, A.M.R., Gatehouse, J.A., Hilder, V.A. (1990) *Crop Protectio* **9**: 351-354
9. Broglie, K., Chet, I., Holliday, M., Cressman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Mauvais, C.J., Broglie, R. (1991) *Science* **254**: 1194-1197
10. Choi, Y.-E., Harada, E., Wada, M., Tsuboi, H., Morita, Y., Kusano, T., Sano, H. (2001) *Planta* **213**: 45-50
11. Domínguez-Solís, J.R., Gutierrez-Alcalá, G., Vega, J.M., Romero, L.C., Gotor, C. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**: 9297-9302
12. Eisner, T., Eisner, M., Hoebeke, E.R. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 4410-4414
13. Gatehouse, A.M.R., Dewey, F.M., Dove, J., Fenton, K.A., Pusztai, A. (1984) *J. Sci. Food. Agric.* **35**: 373-380
14. Gatehouse, A.M.R., Down, R.E., Powell, K.S., Sauvion, N., Rahbe, Y., Newell, C.A., Merryweather, A., Hamilton, W.D., Gatehouse, J.A. (1996) *Entomol. Exp. Appl.*
15. Gotor C., Cejudo F.J., Barroso C., Vega J.M. (1997). *Plant J.* **11**: 347-352
16. Gutiérrez-Alcalá, G., Gotor, C., Meyer, A., Fricker, M., Vega, J.M., Romero, L.C. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 11108-11113
17. Hain, R., Reif, H-J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vormam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P.H., Stocker, R.H., Stenzel, K. (1993) *Nature* **361**: 153-156

ES 2 234 347 B1

18. **Hamano, Y., Dairi, T., Yamamoto, M., Kawasaki, T., Kaneda, K., Kuzuyama, T., Itoh, N., Seto, H.** (2001) *Biosci Biotechnol Biochem* 65:1627-1635
19. **Heldt, H.W.** (1997) *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford University Press. pp. 472-503
20. **Hilder, V.A.; Gatehouse, A.M.R., Sherman, S.E.; Barker, R.F.; Boulter, D.** (1987) *Nature* **330**: 160-163
21. **Jach, G.; Görnhardt, B.; Mundy, J.; Logemann, J.; Pinsdorf, E.; Leah, R.; Schell, J.; Maas, C.** (1995) *Plant J.* 8: 97-109
22. **Joosten, M.H.A.J.; de Wit, P.J.G.M.** (1989) *Plant Physiol.* 89: 945-951
23. **Kato-Emori, S., Higashi, K., Hosoya, K., Kobayashi, T., Ezura, H.** (2001) *Mol Genet Genomics* 265:135-142
24. **Knoss, W., Reuter, B.** (1996) *Anal Biochem* 239:208-212
25. **Kupper, H., Lombi, E., Zhao, F.-J., McGrath, S.P.** (2000) *Planta* 212: 75-84
26. **Lamb, C.J.** (1994) *Cell* **76**: 419-422
27. **Lavid, N., Barkay, Z., Tel-Or, E.** (2001) *Planta* 212: 313-322
28. **Leplé, J.C.; Bonadé-Botino, M.; Augustin, S.; Pilate, G.; Le Tam, V.D.; Delplanque, A.; Cornu, D.; Jouanin, L.** (1995) *Mol. Breeding* **1**: 319-328
29. **Logemann, J.; Jack, G.; Tommerup, H.; Mundy, J.; Schell, J.** (1992) *Bio/Technology* **10**: 305-308
30. **Maas, C., Laufs, J., Grant, S., Korfhage, C., Werr, W.** (1991) *Plant Mol. Biol.* **16**: 199-207
31. **Marks, M.D.** (1997) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 137-163
32. **Mauricio, R., Rausher, M.D.** (1997). *Evolution* **51**, 1435-1444
33. **McCaskill, D., Croteau, R.** (1999) *Nature Biotech.* **17**, 31-36
34. **Murashige, T., Skoog, F.** (1962) *Physiol. Plant.* 15, 485
35. **Osbourn, A.E.** (1996) *Plant Cell* **8**: 1821-1831
36. **Salt, D.E., Prince, R.C., Pickering, I.J., Raskin, I.** (1995) *Plant Physiol.* 109: 427-433
37. **Sanger et al** (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 74: 8073-8077
38. **Schulte, A.E., van der Heijden, R., Verpoorte, R.** (2000) *Arch Biochem Biophys* 378:287-298
39. **Szymanski, D.B., Lloyd, A.M., Marks, M.D.** (2000) *Trends Plant Science* 5: 214-9
40. **Wercker, E.** (2000) In "Advances in Botanical Research" vol 31 pp 1-35
41. **Wust, M., Little, D.B., Schalk, M., Croteau, R.** (2001) *Arch Biochem Biophys.* 387: 125-36.
42. **Vaucheret, H.; Béclin, C.; Elmayan, T.; Feuerbach, F.; Godon, C.; Morel, J-B; Mourrain, P.; Palauqui, J-C.; Vernhettes, S.** (1998) *Plant J.* 16: 651-659
43. **Yamagami, S., Iida, T., Nagata, Y., Ohta, A., Takagi, M.** (2001) *Biochem Biophys Res Commun* 282:832-838
44. **Zenk, M.H.** (1996) *Gene* 179:21-30

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico aislado que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

- 5 a) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEC. ID. N°: 1;
- 10 b) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEC. ID. N°: 2; y
- 15 c) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de nucleótidos definida en a) o en b), que (i) tiene un grado de identidad de, al menos, un 60%, respecto a una secuencia de nucleótidos definida en a) o en b), y (ii) tiene la capacidad de regular la expresión de un gen en tricomas de plantas.

2. Acido nucleico según la reivindicación 1, seleccionado entre (i) un ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos comprende, o está constituida por, la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1, (ii) un ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos comprende, o está constituida por, la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 2, y (iii) un ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos comprende, o está constituida por, un fragmento o sub-secuencia de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1 o en la SEC. ID. N°: 2, o en una secuencia análoga a una de dichas secuencias SEC. ID. N°: 1 o SEC. ID. N°: 2, que conserva la capacidad de regular la expresión de genes en tricomas de plantas.

3. Una construcción de DNA que comprende un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, y, opcionalmente, un sitio para la inserción de un gen de interés.

4. Construcción según la reivindicación 3, que comprende, además, un gen de interés operativamente unido a dicho ácido nucleico.

5. Construcción según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, en el que dicho ácido nucleico comprende, o está constituido por, el ácido nucleico identificado como TSP-1809 (SEC. ID. N°: 2).

6. Un vector que comprende un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o una construcción de DNA según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, y, opcionalmente, un gen de interés operativamente unido a dicho ácido nucleico.

7. Vector según la reivindicación 6, en el que dicho gen de interés es una construcción antisentido para modificar la expresión de los transcritos naturales presentes en los tricomas.

8. Vector según la reivindicación 6, en el que dicho gen de interés es un gen que codifica un producto que presenta una o más de las siguientes funciones: resistencia a bacterias, resistencia a hongos, resistencia a insectos, resistencia a nemátodos, resistencia a herbicidas, resistencia a fungicidas, resistencia a insecticidas, resistencia a metales pesados, resistencia a estrés medioambiental, y/o actividades: enzima glicolítica, enzima proteolítica, enzima oxidoreductasa, enzima isomerasa, enzima sintetasa, enzima sintasa, enzima transferasa, enzima ciclasa, enzima hidroxilasa, enzima fosfatasa, enzima quinasa, enzima polimerasa, proteína transportadora, reguladora de la transcripción, reguladora de la traducción, reguladora del ciclo celular, reguladora de la endo-reduplicación, formadora del citoesqueleto, utilización de nutrientes, inhibidora o inductora de la formación de tricomas en hojas, tallos, semillas o flores, inhibidora o inductora de la formación de pelos radicales, o inhibidora o inductora de la formación de vacuolas.

9. Una célula transformada que comprende un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o una construcción de DNA según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, o un vector según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.

10. Empleo de un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o de una construcción de DNA según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, o de un vector según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, para regular la expresión de un gen de interés en tricomas de plantas.

11. Un procedimiento para la introducción en una planta de un gen de interés expresable en tricomas que comprende transformar dicha planta con un vector según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.

12. Un procedimiento para expresar un gen de interés en tricomas de una planta, que comprende introducir en una planta una construcción de DNA según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, o un vector según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o un fragmento del mismo que conserva la capacidad de regular la expresión de un gen en tricomas de plantas, operativamente enlazado a un gen de interés.

13. Un procedimiento para modificar una o más características del fenotipo de una planta que comprende transformar dicha planta con un vector según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 que comprende un gen de interés,

ES 2 234 347 B1

operativamente enlazado a dicho ácido nucleico o a un fragmento del mismo que conserva la capacidad de regular la expresión de un gen en tricoma de plantas, en el que dicho gen de interés codifica un producto susceptible de modificar, al menos, una característica del fenotipo de dicha planta.

5 14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que dicha característica del fenotipo de la planta susceptible de ser modificada se selecciona entre protección frente a insectos, protección frente a hongos, protección frente a bacterias, protección frente a nematodos, producción de biomoléculas con interés industrial, resistencia y acumulación de metales pesados, tolerancia climática, resistencia y eliminación de sales, resistencia y eliminación de herbicidas, resistencia y eliminación de fungicidas, resistencia y eliminación de insecticidas, producción de fibra, valor ornamental,
10 absorción de agua y nutrientes, pigmentación, sabor, velocidad de crecimiento de las plántulas, inhibición o inducción de la formación de tricomas en hojas, tallos, semillas o flores, inhibición o inducción de la formación de pelos radicales, y mezclas de las mismas.

15 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que dicha planta es una planta monocotiledónea o una planta dicotiledónea.

16. Una célula transgénica de una planta que comprende insertado en su genoma un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.

20 17. Una planta transgénica que comprende, al menos, una célula transgénica según la reivindicación 16.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

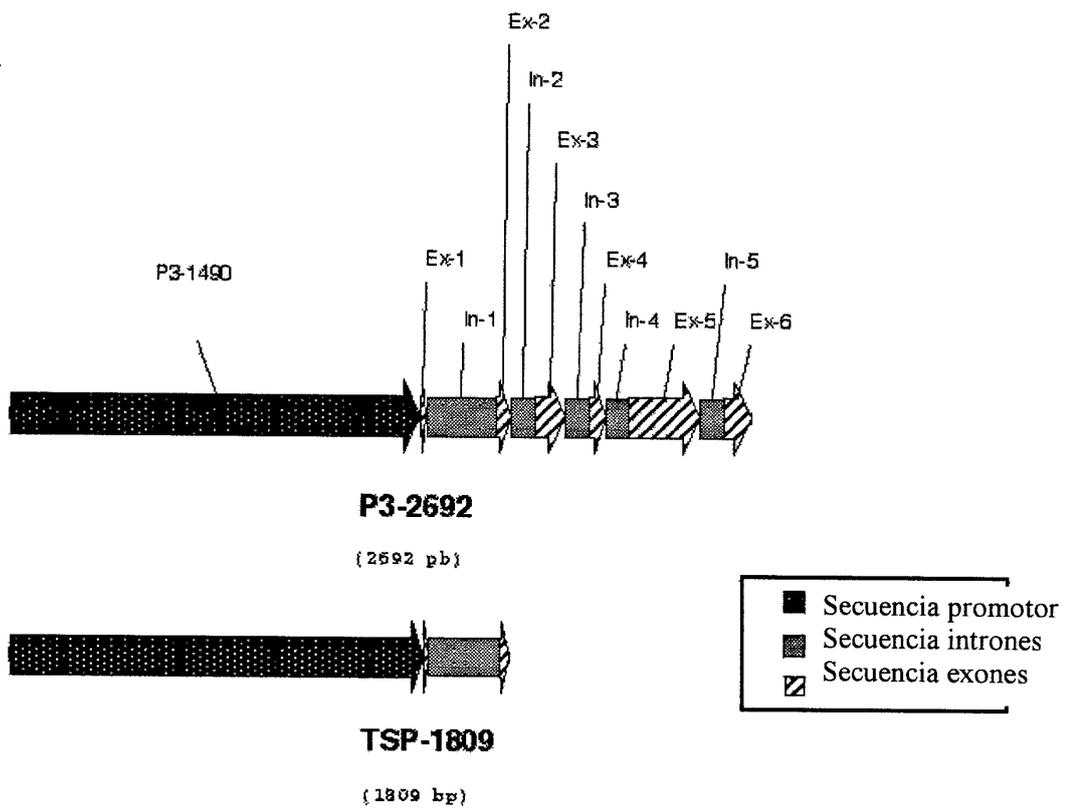


Figura 2

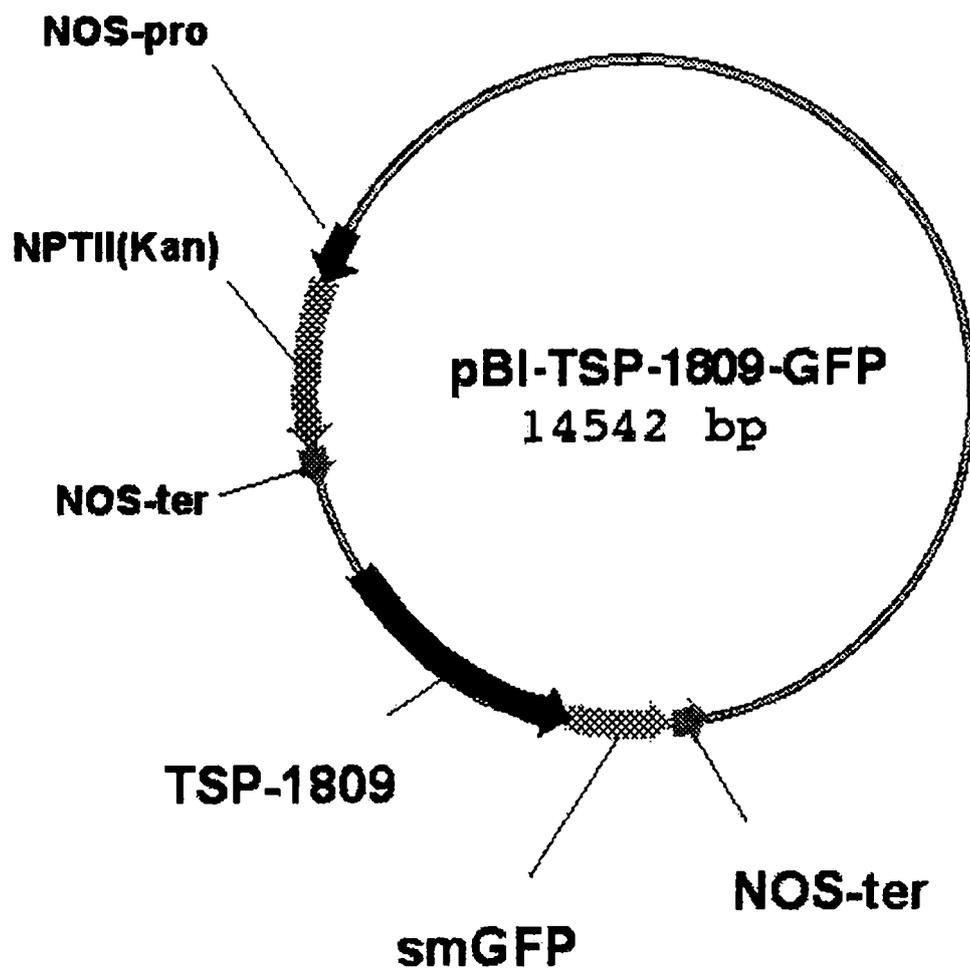
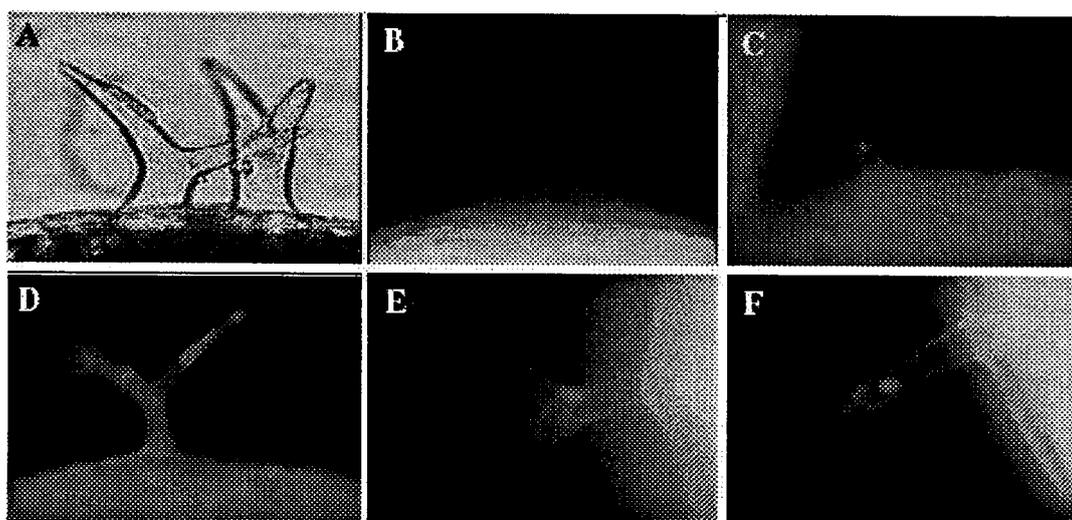


Figura 3



ES 2 234 347 B1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Newbiotechnic, S.A.
- 5 <110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas
- <110> Universidad de Sevilla
- <120> Secuencias reguladoras de la expresión de genes en tricomas de plantas y sus aplicaciones
- <160> 4
- 10 <170> PatentIn versión 2.0
- <210> 1
- 15 <211> 2.692
- <212> ADN genómico
- <213> *Arabidopsis thaliana*
- 20 <400> 1

```

GGTACCTACT GCAGTCCGGT GGCTGCTCCA CCCCCTCCAG TTTACCATCC TCACCCGCAC 60
CACCACCACC ATATTCAGCA TGCTTACTAC TGATTAGACA ATGACAAAGG AAAAAAGAAG 120
25 ATGGTAAGTA ACCAACCCT GATCTCTGGT GTCTACGTTT TGTCTCTACC TCGTTTTTGT 180
TGTAATCTCT CTTTTTTTAT ATCGTATCAT TTGTAGCTAA CACTCTCACT CTTTCTGGTT 240
CTGAATTAGT CTACCCTTGT GTGTTTATTA ATCTAAATTA TACATATCTA TTCACTTTCC 300
TAATGTTTCA ATCAACGAAT TTAGTTCAGT ACTTAATAGA TTCATCTTAA ACCAGGAATG 360
TTTCACTGTG ATTATGTGAT GTATCACTGT TTGTATTGGC TCATTGAAAT CAAGATTTCCG 420
30 AAGTCTCATA GCAAGATTCG TTACAAAGTG GTCNTATTA CACCAAAAAA AAGACTTCTT 480
TAGTCTAAAT CAAGAAGATG ATTAGTCGTT GGCAGTGGCG AGCTGGAGAG ACAAGAGTTC 540
TTCCTCAGGG ATCATCTTAA TGTGACAAATC AGAAGTTGGA TACGAAGCAC ATAGAAGCGT 600
GTAGCCACGT TCAACCACAT CATCACTTAG CATCCCACCA CTTTGATCCA CCGTTCGGT 660
CACGAGTTTC GCTGGACAAG TCATACAAA ACCGAGATTG CAGTCGTAGG GAACGTCAAG 720
35 GCCAGAGTCA AGAGCCTTAG ATAGAATCGT CTCGTCTGGT TCGACTTCCA ATTCAGTCTG 780
CTTTCCGTCG TGCTCTACCA CCACTTTATA TGCCCGAGCT ATGATCCTTC CGGTGGTGAG 840
AAAGTTCGGG CGGTTTGTTG TTGTTGAGAG TGTTCGCTTA CGGAGTGGGA AGGAGAAGGA 900
ATTGGAGAGA TAAGGTTTAG GGAGAGAGAT TGTAGAAAGTT TGAGTCGGGA GAGGAAGAGT 960
40 CGCCATGAGA GACAGAGAGA CGGAGACAAA AGAGTTTTTG TGTCAAAGTA GAGTGATGAC 1020
TGTTTGTGGT GAATACGGAG ATAAGGTTGA TCATCGGTTG TAGATAGTGG TGGGACATAA 1080
AAACCGAAAA CCGACTTAAA CCGAAATTCA TTAATGCATT AAACCGAATT AACCAGATC 1140
TAATAAAATG AATTTTAAAA TTTTAATTAT ATTCGTAATT AAGGGAAATA TTTTTTCCAA 1200
AACAGTTTGA ACAAATAAAT TCAGTATTAT TTTTCCATAC TCAAACTCC AAATCGGACT 1260
45 AACTGAAAAA AAGAAACCGA ATGTTCAAAC CCCAGTTATG GAAAATATTA ACCGGACTTA 1320
ATACGGATAT GACCAAAATCA GACCAGAAAG TAGTAATTCT GGTGACCAAC CACCGCGTTT 1380
TTCTAAATTG ATAGCGTGTG CCATGTGACT GACACCAAAG AGATCATATA TCTCACATCG 1440
AAGATTTTAT TCCATACACC GATTTTCCA TTTCTCAAAC GATTCGGGTC AGGTTATTGA 1500
CTTCTCATT CAGGTATCAT CTTCTTCTC GTCCATACT TTTGATTCAC TTGCTTATTC 1560
50 CTCTGCCGGT TTCGATTATA TTTGTTTGA TCGGATAATT GTATGGGCTT AAGCTTATTT 1620
CGCTGTAAA TCTGTTGATT TGGTGTAAAG AGTGTGTAT AACTGGATTG GTGCTCATAC 1680
ATCTGGAGAT TTATGTTTGA TGATTTTGA TGATGTGTTT TTGGTTTGA GATGATTTAT 1740
TCCTTTGGTC TTAATTTTCT CTTTTTGTGA ATTTAAGCAG TGAAGCTTGA ATCATGGCCT 1800
55 CGAGAATTGC TAAAGATGTG ACTGAAGTAA GGCTTCAAG TTCCTTCACT GTTCATTTCA 1860

```

60

65

ES 2 234 347 B1

```

CGAAGGAGTG AGCTTTGTTC CATGTTTCATG TATTGATTGA TTCTATTTGG CAGTTGATTG 1920
GGAACACTCC ATTGGTGTAT TTGAACAATG TTGCTGAAGG ATGTGTTGGT CGTGTGCTG 1980
CTAAGCTTGA GATGATGGAA CCGTGCCTA CCGTCAAAGA CAGGTTTCTT CTCTAGTCCA 2040
5 GAAACTATGT GTTGTTCCTC GCTTCGAGTT TCGGTTTTGT GAAGACCTTG TACTTTGTTT 2100
ATTTCTGCAG GATTGGTTTT AGCATGATTT CTGATGCAGA AAAGAAGGGT CTTATCAAAC 2160
CAGGAGAGGT CAGTTTCGAT TATCTGAATC TTCAAACCAC TATTTTGTTC TTGTTTTTCAT 2220
TGTTTCTGAC TTTTGTGTTG TTCTTTAGAG TGTGCTGATT GAGCCAACAA GTGGAAACAC 2280
TGGAGTTGGG TTAGCATTCA CGGCAGCTGC CAAAGGCTAC AAGCTTATTA TTCCAATGCC 2340
10 AGCTTNTATG AGTACTGAGA GAAGAATCAT TCTCTTAGCT TTTGGAGTTG AGTTGGTTTT 2400
AACTGACCCA GCTAAGGGCA TGAAAGGAGC TATCGCAAAG GCGGAAGAGA TTTTGGCGAA 2460
AACACCCAAT GGTACATGC TTCAGCAGTT TGAGAACCCT GCCAACCCCTA AGGTATGCTT 2520
ATTATTTACT ATTGCTTTAG TGTATCTGTT TTTGTCTGTT TTTGAACCAT ATTAAGTCGA 2580
TGGAAATTTCA CTGTCAAATG CAGATCCACT ATGAGACTAC GGGACCTGAG ATATGGAAAG 2640
15 GCACTGGTGG CAAAATCGAT GGCTTTGTTT CTGGGATTGG TACTGGTGGT AC 2692

```

<210> 2

20 <211> 1.809

<212> ADNc

<213> *Arabidopsis thaliana*

25 <400> 2

```

GGGTACCTAC TGCAGTCCGG TGGCTGCTCC ACCCCCTCCA GTTTACCATC CTCACCCGCA 60
CCACCACCAC CATATTCAGC ATGCTTACTA CTGATTAGAC AATGACAAAG GAAAAAAGAA 120
GATGGTAAGT AACCAACCAC TGATCTCTGG TGTCTACGTT TTGTCTCTAC CTCGTTTTTG 180
20 TTGTAATCTC TCTTTTTTTA TATCGTATCA TTTGTAGCTA AACTCTCAC TCTTCTGGT 240
TCTGAATTAG TCTACCTTGG TGTGTTTATT AATCTAAATT ATACATATCT ATTCACTTTC 300
CTAATGTTTC AATCAACGAA TTTAGTTCAG TACTTAATAG ATTCATCTTA AACCAGGAAT 360
GTTTCACTGT GATTATGTGA TGTATCACTG TTTGTATTGG CTCATTGAAA TCAAGATTTTC 420
GAAGTCTCAT AGCAAGATTC GTTACAAAGT GGTCCNTATT ACACCAAAAA AAAGACTTCT 480
35 TTAGTCTAAA TCAAGAAGAT GATTAGTCGT TGGCAGTGGC GAGCTGGAGA GACAAGAGTT 540
CTTCCTCAGG GATCATCTTA ATGTGACAAT CAGAAGTTGG ATACGAAGCA CATAGAAGCG 600
TGTAGCCACG TTCAACCACA TCATCACTTA GCATCCCACC ACTTTGATCC ACCGTTCCGG 660
TCACGAGTTT CGCTGGACAA GTCATACAAA CACCGAGATT GCAGTCGTAG GGAACGTCAA 720
GGCCAGAGTC AAGAGCCTTA GATAGAATCG TCTCGTCTGG TTCGACTTCC AATTCAGTCG 780
40 TCTTCCGTC GTGCTCTACC ACCACTTAT ATGCCGAGC TATGATCCTT CCGGTGGTGA 840
GAAAGTTCCG GCGGTTTTGT TTTGTTGAGA GTGTTGCGTT ACGGAGTGGG AAGGAGAAGG 900
AATTGGAGAG ATAAGGTTTA GGGAGAGAGA TTGTAGAAGT TTGAGTCGGG AGAGGAAGAG 960
TCGCCATGAG AGACAGAGAG ACGGAGACAA AAGAGTTTTT GTGTCAAGTG AGAGTGATGA 1020
CTGTTTGTGG TGAATACGGA GATAAGGTTG ATCATCGGTT GTAGATAGTG GTGGGACATA 1080
45 AAAACCGAAA ACCGACTTAA ACCGAAATTC ATTAATGCAT TAAACCGAAT TAACCAAGAT 1140
CTAATAAAAT GAATTTTTAA ATTTTAATTA TATTCGTAAT TAAGGGAAAT ATTTTTTCCA 1200
AAACAGTTTG AACAAATAAA TTCAGTATTA TTTTTCCATA CTCAAAATC CAAATCGGAC 1260
TAACTGAAA AAAGAAACCG AATGTTCAA CCCCAGTTAT GGAAAATATT AACCAGACTT 1320
50 AATACGGATA TGACCAAATC AGACCGAGAA GTAGTAATTC TGGTGACCAA CCACCGCGTT 1380
TTTCTAAATT GATAGCGTGT GCCATGTGAC TGACACCAA GAGATCATAT ATCTCACATC 1440
GAAGATTTTA TTCCATACAC CGATTTTTCC ATTTCTCAA CGATTCCGGT CAGGTTATTG 1500
ACTTCTCAT TCAGGTATCA TCTTCTTCC CTGCCATAC TTTTGATTCA CTTGCTTATT 1560
CCTCTGCCGG TTTTCGATTAT ATTTGTTTGG ATCGGATAAT TGTATGGGCT TAAGCTTATT 1620
55 TCGCTGTTAA ATCTGTTGAT TTGGTGTTAA GAGTGTTGTA TAACTGGATT GGTGCTCATA 1680
CATCTGGAGA TTTATGTTTG ATGATTTTGT ATGATGTGTT TTTGGTTTGA GGATGATTTA 1740
TTCCTTTGGT CTTACTTTTC TCTTTTTGTG AATTTAAGCA GTGAAGCTTG AATCATGGCC 1800
TCGGGATCC 1809

```

60 <210> 3

<211> 27

<212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador sentido

ES 2 234 347 B1

<400> 3

ATGCCCGGGT ACCTACTGCA GTCCGGT

27

5

<210> 4

<211> 27

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso

<400> 4

15

ATGGGATCCC GAGGCCATGA TTCAAGC

27

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 234 347

② Nº de solicitud: 200200563

③ Fecha de presentación de la solicitud: 08.03.2002

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12N 15/29, 15/82

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	JOST R. et al. "Genomic and functional characterization of the oas gene family encoding O-acetylserine(thiol)lyases enzymes catalyzing the final step in cysteine biosynthesis in Arabidopsis thaliana"Gene, 2000, 253 (2):237-247. Todo el documento, en particular, Sequence de oasA1 (AJ272027), figura 2, página 242.	1-17
A	BARROSO et al. "A new member of the O-acetylserine(thiol)lyase gene family in Arabidopsis thaliana"FEBS Lett., 1995, 363 (1,2):1-5.	1-17
A	GOTOR C. et al. "Tissue-specific expression of ATCYS-3A, a gene encoding the cytosolic isoform of O-acetylserine(thiol)lyase in Arabidopsis"Plant J., 1997, 11:347-352.	1-17
A	DOMINGUEZ SOLIS JR et al. "The cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance"Journal of Biological Chemistry, 2001, 276 (12):9297-9302.	1-17
A	ROMERO L et al. "Salt regulation of O-acetylserine(thiol)lyase in Arabidopsis thaliana and increased tolerance in yeast"Plant Physiology and Biochemistry, 2001, 39 (7-8):643-647.	1-17

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

05.05.2005

Examinador

M. Hernández Cuéllar

Página

1/1