



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 188 400**

⑫ Número de solicitud: 200102215

⑮ Int. Cl.⁷: **C12N 15/29**

C12N 15/82

C12N 15/53

C12N 15/11

C12N 5/14

A01M 5/00

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **03.10.2001**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2003**

Fecha de la concesión: **05.04.2004**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
09.01.2004

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.05.2004**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.05.2004

⑰ Titular/es: **Universidad de Málaga**
Plaza del Ejido s/n
29013 Málaga, ES

⑰ Inventor/es: **Agius Guadalupe, María Fernanda;**
Botella Mesa, Miguel Ángel y
Valpuesta Fernández, Victoriano

⑰ Agente: **No consta**

⑰ Título: **Secuencia reguladora de la expresión específica en fruto de un gen y sus aplicaciones.**

⑰ Resumen:

Secuencia reguladora de la expresión específica en fruto de un gen y sus aplicaciones.

La secuencia reguladora (promotor) es útil para la expresión específica en fruto de una secuencia de ADN codificante de un producto de interés, por ejemplo, un péptido, polipéptido, proteína, actividad o ARN de interés. La secuencia puede ser utilizada en construcciones de ADN que contienen dicha secuencia operativamente unida a una secuencia de ADN codificante de un producto de interés, y dichas construcciones pueden ser utilizadas en la construcción de plantas transgénicas.

ES 2 188 400 B1

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

DESCRIPCIÓN

Secuencia reguladora de la expresión específica en fruto de un gen y sus aplicaciones.

Campo de la invención

La invención se relaciona, en general, con la obtención de secuencias de ADN reguladoras de la expresión específica de tejidos o de células diana de genes, por ejemplo, genes heterólogos en plantas, en particular, con una secuencia de ADN reguladora (promotor) específico de fruto, por ejemplo, de fresa, que determina la expresión en ese órgano de cualquier gen que se introduzca en dicha especie por ingeniería genética.

Antecedentes de la invención

Uno de los objetivos de la ingeniería genética es el de obtener plantas con características mejoradas. En relación con plantas que producen fruto, estas características incluyen, entre otras, el control de la maduración del fruto, mejoras en las características nutricionales de las partes comestibles del fruto, resistencia a plagas y enfermedades de plantas, etc.

Para manipular y controlar de forma estable una determinada característica de una planta se requiere, por una parte, identificar y aislar el gen o genes que codifican o regulan dicha característica particular, y, además, identificar y aislar los elementos genéticos esenciales para la expresión y/o control del gen o genes aislados para que la planta manifieste dicha característica de forma controlada o controlable. Entre dichos elementos genéticos esenciales se encuentran los elementos de control de la transcripción conocidos como promotores.

Se han descrito algunos promotores que dirigen la expresión de genes heterólogos específicos de fruto de fresa silvestre (*Fragaria vesca*), por ejemplo, los promotores identificados como SAR5 y RJ39 (US 6.043.410). El ARNm SAR5 se expresa durante el desarrollo del fruto y la maduración, exhibe una expresión decreciente durante la maduración del fruto de fresa, y es reprimido por auxina. El ARNm RJ39 se expresa abundantemente durante la maduración, de forma creciente a medida que avanza la maduración del fruto. No obstante, no se aportan pruebas funcionales de la acción promotora de los mismos, por ejemplo, mediante estudios funcionales de expresión transitoria.

Aunque se han identificado promotores que dirigen la expresión de genes heterólogos en plantas, por ejemplo, de fresa, algunos de ellos específicos de fruto, siguen existiendo promotores específicos de fruto que todavía no han sido descritos. La identificación de dichos promotores específicos de fruto es crítica para la introducción de las mejoras específicas previamente mencionadas en plantas que producen fruto.

Compendio de la invención

La invención se enfrenta, en general, con el problema de desarrollar un sistema que sea capaz de expresar un gen heterólogo específicamente en fruto, por ejemplo, en fruto de fresa.

La solución proporcionada por esta invención se basa en el aislamiento y caracterización de un promotor capaz de dirigir la expresión específica de frutos en plantas de fresa, en particular, el promotor del gen FaALKE de fresa (*Fragaria x ananassa*). La especificidad de dicho promotor se ha puesto de manifiesto mediante un ensayo que comprende la expresión del gen de la luciferasa en frutos de fresa bajo el control

de dicho promotor (Ejemplo 2).

El empleo de un promotor como el proporcionado por esta invención permite manipular genéticamente frutos, por ejemplo, el fruto de fresa y obtener plantas, por ejemplo, plantas de fresa, con características mejoradas, a la vez que se evitan los efectos deletéreos de una expresión del gen heterólogo en la totalidad o en parte de la planta. Una de las ventajas de disponer de un promotor como el proporcionado por esta invención es que permite circunscribir la expresión del gen heterólogo al cual antecede para que éste se exprese sólo en el lugar y momento deseado para obtener el efecto esperado. Otra de las ventajas radica en que la secuencia de nucleótidos correspondiente al promotor no es foránea en la especie (para el caso de la fresa), lo que garantiza su especificidad y evita su identificación como molécula extraña por la célula.

Por consiguiente, un objeto de esta invención lo constituye una secuencia de nucleótidos reguladora de la expresión específica en fruto de un gen que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1, o un fragmento de la misma, o una secuencia de nucleótidos sustancialmente análoga a dichas secuencias. El empleo de dicha secuencia de nucleótidos para la obtención de plantas transgénicas constituye un objeto adicional de esta invención.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye una construcción de ADN que comprende la totalidad o parte de dicha secuencia de nucleótidos y una secuencia de ADN codificante de un producto de interés, así como un vector que contiene dicha secuencia o construcción de ADN y una célula transformada con dicho vector.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye el empleo de dicha secuencia de ADN, o de dicha construcción de ADN, en la producción de plantas transgénicas que expresan específicamente en fruto una secuencia de ADN de interés. Las plantas transgénicas resultantes constituyen otro objeto adicional de esta invención.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye un método para modificar el fenotipo de un fruto en una planta transgénica que comprende crecer dicha planta transgénica para que produzca frutos, en el que las células de dichos frutos comprenden en su genoma, al menos, una de dichas construcciones de ADN. Otro objeto adicional de esta invención lo constituye un método para expresar un gen heterólogo en un fruto que comprende introducir en una planta dicha construcción de ADN.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una representación esquemática del vector plasmídico pGL3-Basic (Promega).

La Figura 2 es una gráfica que muestra la actividad luciferasa de los extractos de frutos maduros de fresa que habían sido disparados con ADN correspondientes a plásmidos pGL3 sin promotor, con promotor FaALKE, e incubados los frutos en luz y en oscuridad.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona una secuencia de nucleótidos reguladora de la expresión específica en fruto de una secuencia de ácido nucleico, en adelante secuencia de nucleótidos de la invención, seleccionada entre:

- a) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1

- b) un fragmento de dicha SEC. ID. Nº: 1 que mantiene la capacidad reguladora de la expresión específica en fruto; y
- c) una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente análoga a la secuencia de nucleótidos definida en a) o en b).

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análoga” pretende incluir a cualquier secuencia de nucleótidos que posee, al menos, la capacidad reguladora de la expresión específica en frutos. Típicamente la secuencia de ADN análoga se puede aislar de cualquier organismo productor de dicha secuencia análoga en base a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. Nº: 1; o bien se construye en base a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. Nº: 1 mediante la sustitución de uno o más nucleótidos, 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 cualquier extremo o en el interior de la secuencia. Por ejemplo, la secuencia de ADN análoga puede ser una sub-secuencia de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. Nº 1.

En general, la secuencia de ADN análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos identificada como la SEC. ID. Nº: 1. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad, a nivel de nucleótidos, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.

La secuencia de nucleótidos de la invención puede proceder de cualquier organismo que la contiene, por ejemplo, fresa (*Fragaria x ananassa*) o de un organismo hospedador transformado con dicha secuencia de ADN. La secuencia de nucleótidos de la invención, puede ser aislada, mediante técnicas convencionales, a partir del ADN de cualquier especie que la contiene mediante el empleo de sondas o de oligonucleótidos preparadas a partir de la información sobre la secuencia de nucleótidos de la invención.

En una realización particular, la secuencia de nucleótidos de la invención es la secuencia mostrada en la SEC. ID. Nº: 1, que corresponde a la secuencia de nucleótidos del promotor del gen FaALKE de fresa (*Fragaria x ananassa*). Ensayos funcionales realizados por los inventores han puesto de manifiesto que dicha secuencia es una secuencia reguladora de la expresión específica en fruto de fresa de una secuencia de un ácido nucleico heterólogo (Ejemplo 2).

El aislamiento e identificación de dicho promotor se ha realizado mediante su clonación a partir de una genoteca de clones genómicos de fresa (*Fragaria x ananassa*, cv. Chandler). Para la clonación se procedió como se indica a continuación. Brevemente, se preparó una genoteca de clones genómicos de fresa en el vector Lambda FIXII (Stratagene) por métodos convencionales descritos en los manuales de Biología Molecular y siguiendo las especificaciones de la casa comercial (Stratagene) para el vector Lambda FIXII. La genoteca fue plaqueada en placas de Petri sobre un soporte de agar, analizándose hasta un total de 10^6 placas de lisis. Como sonda se utilizó la región 5' de un clon parcial de ADN complementario (ADNc), que fue denominado FaALKE por la homología en la secuencia codificada de aminoácidos a proteínas de

la familia aldo-ceto reductasas. Dicho clon parcial, que se utilizó como molde para la sonda, se obtuvo a partir de una genoteca de sustracción (rojos menos verdes) preparada a partir de frutos de fresa. De la hibridación de la sonda con el ADN de las placas de lisis transferidos a membranas se identificó un único clon genómico que hibridaba con la sonda de FaALKE, en condiciones de alta astringencia. El clon genómico identificado, de 4,2 kilobases (kb), se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la enzima Pwo polimerasa termoestable (Boehringer) y un programa de PCR estándar. El fragmento amplificado se digirió con la enzima de restricción *Bam*HI, y uno de los fragmentos de la digestión, de 2,7 kb, hibridó con la sonda de FaALKE, por lo que se identificó como el fragmento que tenía la región promotora de FaALKE. Este fragmento que contenía la región promotora, fue subclonado en el vector PBSKII (Stratagene), en el sitio *Bam*HI-*Eco*RV de la región de clonaje múltiple de dicho vector. El fragmento de ADN correspondiente a la región promotora de FaALKE fue secuenciado en su totalidad, por el método de dideoxi. En la secuencia del fragmento se identificó la región 5' correspondiente al ADNc de FaALKE. De esta forma se obtuvo la secuencia definitiva de 1,2 kb del promotor, obtenida al quitar de la secuencia de ADN clonada la correspondiente a la región 5' del ADNc de FaALKE. La secuencia de nucleótidos resultante es la identificada como SEC. ID. Nº: 1.

La secuencia de nucleótidos de la invención puede actuar como secuencia reguladora de la expresión de una secuencia de un ácido nucleico heterólogo en frutos, por ejemplo, frutos cuya parte comestible sea fundamentalmente tejido de receptáculo, tales como fresas, manzanas, peras, etc., frutos de la vid, hortalizas, tales como tomates, pimientos, etc.

La secuencia de nucleótidos de la invención puede utilizarse en el desarrollo de construcciones de ADN que incluyan, además, secuencias codificantes de productos de interés que, a su vez, pueden integrarse en vectores recombinantes de expresión. Para ello, se pueden utilizar distintas técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica [Sambrook et al., “Molecular cloning, a Laboratory Manual”, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 Vol 1-3] algunas de los cuales se muestran en la presente invención. Estos vectores recombinantes permiten la expresión de distintos productos de interés en frutos, por ejemplo, en fruto de fresa. Estas construcciones pueden contener otros elementos reguladores de la expresión específica del fruto en cuestión dependiendo del vector recombinante utilizado, etc. Todas estas posibles construcciones de ADN conteniendo como denominador común la secuencia de nucleótidos de la invención así como el uso de las mismas para la transformación de plantas forman parte de la presente invención.

Por tanto, la invención proporciona una construcción de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de la invención operativamente unida a una secuencia de ADN heterólogo codificante de un producto de interés, por ejemplo, un péptido, polipéptido, proteína, actividad o ARN de interés. En una realización particular, se preparó una construcción de ADN que comprendía una secuencia de ADN codificante de actividad luciferasa bajo el control de la secuencia de nucleótidos de la invención para evaluar la especifici-

dad de la expresión de dicho gen en frutos de fresa. La construcción de ADN proporcionada por esta invención también puede contener, operativamente unidos, unos elementos reguladores de la expresión funcionales en plantas, por ejemplo, una secuencia de terminación de la transcripción, etc.

La secuencia de nucleótidos de la invención, o la construcción de ADN proporcionada por esta invención, puede ser insertada en un vector apropiado. Por tanto, la invención también se refiere a un vector, tal como un vector de expresión, que comprende dicha secuencia de nucleótidos de la invención, o dicha construcción de DNA. 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 dicha secuencia de ADN 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. La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrook et al., 1989, citado *supra*]. La invención también proporciona una célula que comprende una secuencia de nucleótidos de la invención, o una construcción de ADN que contiene a dicha secuencia de nucleótidos o dicho vector mencionado más arriba. Las células hospedadoras que se pueden transformar con la secuencia de nucleótidos de la invención pueden ser procarióticas o, preferentemente, eucarióticas, tales como células de tejidos vegetales. La transformación de células de tejidos vegetales también puede realizarse por métodos convencionales. Para una revisión de la transferencia génica a plantas, incluyendo vectores, métodos de transferencia de ADN, 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.

La secuencia de nucleótidos de la invención puede ser utilizada para transformar plantas, por ejemplo, de fresa, manzana, pera, vid, tomate, pimiento, etc., y obtener plantas transformadas. La transformación de plantas está ampliamente descrita en el estado de la técnica. Como es bien conocido, pueden utilizarse múltiples sistemas, por ejemplo, vectores plasmídicos, liposomas, electroporación, microinyección, difusión, bombardeo de partículas (gene gun), coprecipitación con fosfato de calcio, empleo de vectores virales, etc.

La secuencia de nucleótidos de la invención puede utilizarse para regular la expresión específica en fruto de una secuencia codificante de un péptido, polipéptido, proteína, actividad o ARN de interés en una planta. En este sentido, la secuencia de nucleótidos de la invención puede utilizarse para manipular plantas con el fin de introducir en ellas alguna característica comercial o agrícolamente deseable, por ejemplo, retardo en la maduración del fruto, incremento del contenido en azúcares, resistencia a patógenos, cambio en las propiedades organolépticas del fruto, desarrollo de color, cambios de aroma, cambios en el tamaño del fruto, dureza de los frutos, vida post-cosecha, etc. A modo ilustrativo, la secuencia de nucleótidos de la invención puede utilizarse para aumentar el contenido en azúcares del fruto de fresa, por ejemplo, inhibiendo la acción del gen de la glucosa-6-fosfatasa mediante

el control de la transcripción de una secuencia antisentido correspondiente a una o ambas subunidades de dicha enzima. Otros genes involucrados en el control del contenido en azúcares en frutos incluyen el gen de la sacarosa sintasa, el de la sacarosa fosfato sintasa, el de la ADP glucosa pirofosforilasa o el de la invertasa. Alternativamente, en las construcciones de ADN proporcionadas por esta invención se podrían utilizar genes o secuencias de ADN que proporcionan resistencia frente a patógenos, por ejemplo, genes que estimulan la producción de fitoalexinas, genes de resistencia a enfermedades, genes de inducción de defensas, genes de resistencia a insectos.

La invención también proporciona un procedimiento para producir una planta transgénica que comprende transformar dicha planta con una construcción de ADN proporcionada por esta invención, comprendiendo dicha construcción de ADN una secuencia de ADN codificante de un producto de interés que proporciona al fruto de dicha planta una característica mejorada, bajo el control de la secuencia de nucleótidos de la invención, de manera que la expresión de la secuencia de ADN codificante contenida en dicha construcción provoca una característica mejorada en el fruto de dicha planta. La planta resultante puede ser utilizada para la producción de frutos con características mejoradas. Ejemplos no limitativos de plantas a transformar incluyen, plantas de fresa, manzana, pera, vid, tomate, pimiento, etc. Asimismo, ejemplos no limitativos de dichas características mejoradas incluyen el control de la maduración del fruto, la mejora en las características nutricionales de las partes comestibles del fruto, la resistencia a plagas y enfermedades de plantas, el cambio en las propiedades organolépticas del fruto, el desarrollo de color, cambios de aroma, cambios en el tamaño del fruto, dureza de los frutos, vida post-cosecha, etc.

En una realización particular, la secuencia de nucleótidos de la invención puede ser utilizada para producir plantas de fresa transgénicas mediante un procedimiento que comprende transformar dicha planta de fresa con una construcción de ADN proporcionada por esta invención, comprendiendo dicha construcción de ADN una secuencia de ADN codificante de un producto de interés que proporciona al fruto de fresa una característica mejorada, bajo el control de la secuencia de nucleótidos de la invención, de manera que la expresión de la secuencia de ADN codificante contenida en dicha construcción provoca una característica mejorada en el fruto de fresa. La planta resultante puede ser utilizada para la producción de fresa (frutos) con características mejoradas.

Por tanto, la invención también proporciona un método para modificar el fenotipo de un fruto en una planta transgénica que comprende crecer una planta transgénica para que produzca frutos, en el que las células de dichos frutos comprenden en su genoma, al menos, una de las construcciones de ADN proporcionadas por esta invención. En una realización particular, dicho fruto se selecciona entre fresa, manzana, pera, uva, tomate y pimiento.

Asimismo, la invención proporciona un método para expresar un gen heterólogo en un fruto de una planta que comprende transformar dicha planta con una construcción de ADN proporcionada por esta invención que comprende una secuencia de ADN codificante de un producto de interés.

En otra realización particular, la invención proporci-

na una célula transgénica que comprende una secuencia de nucleótidos de la invención integrada en su genoma, así como una planta transgénica que comprende, al menos, una de dichas células transgénicas. Dichas plantas transgénicas, que constituyen un objeto adicional de la invención, se pueden obtener mediante el empleo de técnicas convencionales, por ejemplo, mediante el empleo de técnicas convencionales de ARNm antisentido y/o sobreexpresión (silenciamiento en sentido), u otras, por ejemplo, utilizando vectores binarios u otros vectores disponibles para las diferentes técnicas de transformación de plantas existentes en la actualidad.

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

Ejemplo 1

Obtención del promotor de FaALKE

Para clonar la región promotora se utilizó una librería de ADN de fresa clonada en el vector Lambda FIXII (Stratagene). Se analizaron 10⁶ placas de lisis y solo se obtuvo un clon positivo. Como sonda se utilizaron 900 pb correspondientes a la región 5' del clon parcial aislado de la librería sustractiva de ADNc de fruto rojo. Una vez identificado el clon positivo se aisló el ADN del fago (Sambrook et al., "Molecular cloning, a Laboratory Manual", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 Vol 1-3) y se realizó un análisis de restricción e hibridación con la misma sonda, para identificar el fragmento correspondiente a la región promotora. El clon genómico identificado, de 4,2 kb no se pudo subclonar y, como alternativa, se realizó una amplificación enzimática mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de dicho clon utilizando los cebadores identificados como T7 (SEC. ID. N°: 2) [TAATACGACTCACTATAGGG] y ROC4 (SEC. ID. N°: 3) [GCCTGGCAATCTCTTCG] utilizando la enzima Pwo taq polimerasa (Boehringer) termoestable. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial de 2 minutos 95°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, anillamiento a 50°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 4 minutos, y finalmente, un ciclo de extensión final a 72°C durante 5 minutos. Posteriormente se realizó un análisis de restricción e hibridación del fragmento amplificado y se identificó una banda de 2,7 kb (en el fragmento amplificado digerido con *Bam*HI) que contenía la región promotora del gen FaALKE que se subclonó en el vector PBSKII (Stratagene).

El análisis de la secuencia de este clon puso de manifiesto que de las 2,7 kb solo 1,2 kb correspondían a la región promotora. Dicha secuencia, analizada utilizando varios programas informáticos, reveló la presencia de cajas reguladoras presentes en genes de plantas que se inducen por luz y daño mecánico. El fragmento que contenía la región promotora, fue subclonado en el vector PBSKII (Stratagene), en el sitio *Bam*HI-*Eco*RV de la región de clonaje múltiple de dicho vector. El fragmento de ADN correspondiente a la región promotora de FaALKE fue secuenciado en su totalidad, por el método de didesoxi [Servicio de Secuenciación del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid]. En la secuencia del fragmento se identificó la región 5' correspondiente al ADNc de FaALKE. De esta forma se obtuvo la secuencia definitiva de 1,2 kb del promotor, obtenida al quitar de

la secuencia de ADN clonada la correspondiente a la región 5' del ADNc de FaALKE. La secuencia de nucleótidos resultante es la identificada como SEC. ID. N°: 1.

5 Ejemplo 2

Expresión del gen de la luciferasa en fruto de fresa bajo el control del promotor de FaALKE

Se realizó este ensayo para comprobar que el promotor de FAALKE controla la expresión de un gen en el fruto de fresa. El gen de la luciferasa se utilizó como gen testigo.

2.1 Materiales

Se utilizaron frutos maduros de fresa (*Fragaria x ananassa*, cv. Chandler) que habían sido crecidos en macetas en condiciones estándar correspondiente a las ambientales en la provincia de Huelva en el período Febrero-Mayo de 2000. Para las pruebas biolísticas se prepararon secciones transversales del fruto (2-3 mm de espesor), inmediatamente antes de ser ensayados. El equipo utilizado para hacer los disparos fue Biolistic PSD-1000/He (Dupont, BioRad).

2.2 Métodos

El ADN utilizado para el recubrimiento de las partículas de oro coloidal se preparó tal como se indica a continuación. El fragmento correspondiente al ADN del promotor de FAALKE se amplificó por PCR utilizando los cebadores identificados como KpnI f (SEC. ID. N°: 4) [AGGTACCCCATCACATCACCAGT] y HindIII r (SEC. ID. N°: 5) [AAAGCTTTGAGCTAGTTTACAAT], que tenían sitios de restricción *Kpn*I y *Hind*III. La ADN polimerasa termoestable utilizada fue la Pwo (Boehringer). El programa de PCR empleado fue estándar y las condiciones de la realización de la PCR fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial de 2 minutos 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, anillamiento a 57°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 3 minutos, y finalmente, un ciclo de extensión final a 72°C durante 5 minutos. El fragmento amplificado se subclonó en el vector plasmídico pBSKII-*Eco*RV. El fragmento subclonado en pBSKII-*Eco*RV fue liberado por digestión con *Kpn*I y *Hind*III, y subclonado en el vector plasmídico pGL3-Basic (Promega), que contiene el gen luciferasa [Figura 1], en los sitios *Kpn*I - *Hind*III de la región de clonaje múltiple de este vector. Células DH5α fueron transformadas con la construcción pGL3-promotor. El ADN de la construcción pGL3-promotor fue amplificado *in vivo* mediante cultivo nocturno de las células transformadas y el ADN fue purificado utilizando el kit comercial Midiprep (Promega). Posteriormente, 3 mg de partículas de oro fueron recubiertas con 5 µg de ADN plasmídico obtenido tal como se ha descrito previamente. Para el recubrimiento se siguió el protocolo descrito por BioRad para aplicación en el equipo Biolistic PSD-1000/He. El método utiliza Cl₂Ca y espermidina.

Las condiciones del ensayo biolístico fueron las siguientes:

60	Presión de disparo	1.800 psi
	Distancia ente disco de ruptura y macrocarrier (nivel 2)	4 cm
65	Distancia entre macrocarrier y la muestra (nivel 4)	4 cm
	Tamaño de partículas de oro	1,6 µg

Cantidad de ADN por disparo	0,167 μ g
Tamaño del corte del fruto	2-3 mm
Disparos por muestra.	2
Medio de pre-incubación 5 min	CPW12
Medio de post-incubación	
24 horas	CPW12, agar 0,7%

El medio CPW (Banks & Evans, 1976, Plant Science Letters, 7:409-416) se suplementa con 12% (w/v) de manitol y con ácido 3-N-morfolinpropano sulfónico (MOPs) 20 mM pH 7.

Para medir la actividad luciferasa, los frutos disparados fueron macerados en nitrógeno líquido, añadiendo 1 ml de tampón de lisis [CCLR (del inglés Cell Culture Lysis Reagent) 1X (Promega) suplementado con Tris/fosfato 0,3 M pH 7,8] por cada 0,5 g de tejido de fruto. Se centrifugó a 4°C durante 10 minutos en microcentrífuga de mesa a máxima velocidad. Posteriormente, se añadieron 20 μ l del sobrenadante a 100 μ l del reactivo luciferasa (kit Luciferase Assay System, Promega), y se midió en un luminómetro el desarrollo de la reacción.

2.3 Resultados

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2, donde se representa la actividad luciferasa de los extractos de frutos maduros de fresa que habían sido disparados con DNA correspondientes a plásmidos pGL3 sin promotor FAALKE (pGL3), con promotor FAALKE e incubados los frutos en luz (Pro-Luc Luz) y en oscuridad (Pro-Luc Osc).

2.4 Discusión

Los resultados muestran que la región clonada identificada como promotor FAALKE es capaz de inducir la expresión de un gen indicador, el gen de la luciferasa (gen luc), en frutos maduros de fresa. Para que ocurra dicha inducción, los frutos han de ser incubados en la luz continua durante 24 horas.

La necesidad de la luz no es sorprendente puesto que en la secuencia de nucleótidos correspondiente a la región promotora se han identificado cajas reguladoras que responden a la exposición a la luz.

La expresión en frutos de fresa refuerza los resultados previos obtenidos sobre la expresión del gen FAALKE en frutos de fresa durante la maduración. Dichos resultados se obtuvieron por hibridación tipo Northern utilizando como sonda el ADNc correspondiente al FaALKE.

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de nucleótidos reguladora de la expresión específica en frutos de un gen heterólogo seleccionada entre:

- a) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1;
- b) un fragmento cualquiera de dicha SEC. ID. N°: 1 que mantiene la capacidad reguladora de la expresión específica en fruto; y
- c) una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente análoga a la secuencia de nucleótidos definida en a) o en b).

2. Una construcción de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1, operativamente unida a una secuencia de ADN codificante de un producto de interés.

3. Un vector recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1, o una construcción de ADN según la reivindicación 2.

4. Una célula transformada que comprende una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1, o

una construcción de ADN según la reivindicación 2, o un vector recombinante según la reivindicación 3.

5. Una célula transgénica que comprende, insertada en su genoma, una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1, o una construcción de ADN según la reivindicación 2, o un vector recombinante según la reivindicación 3.

6. Una planta transgénica que comprende, al menos, una célula transgénica según la reivindicación 5.

7. Un método para expresar un gen heterólogo en una planta, que comprende transformar dicha planta con una construcción de ADN según la reivindicación 2.

8. Método según la reivindicación 7, en el que dicha planta se selecciona entre plantas de fresa, manzana, pera, vid, tomate y pimiento.

9. Un método para modificar el fenotipo del fruto de una planta transgénica que comprende crecer una planta transgénica para que produzca frutos, en el que las células de dichos frutos comprenden en su genoma, al menos, una construcción de ADN según la reivindicación 2.

10. Método según la reivindicación 9, en el que dicha planta transgénica se selecciona entre plantas de fresa, manzana, pera, vid, tomate y pimiento.

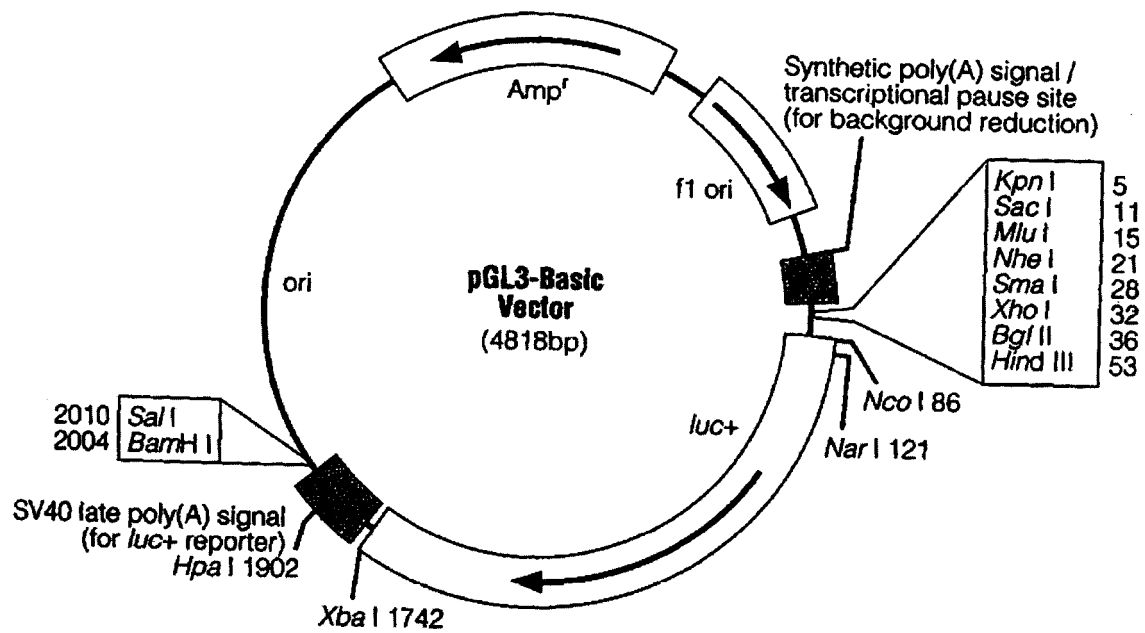


FIGURA 1

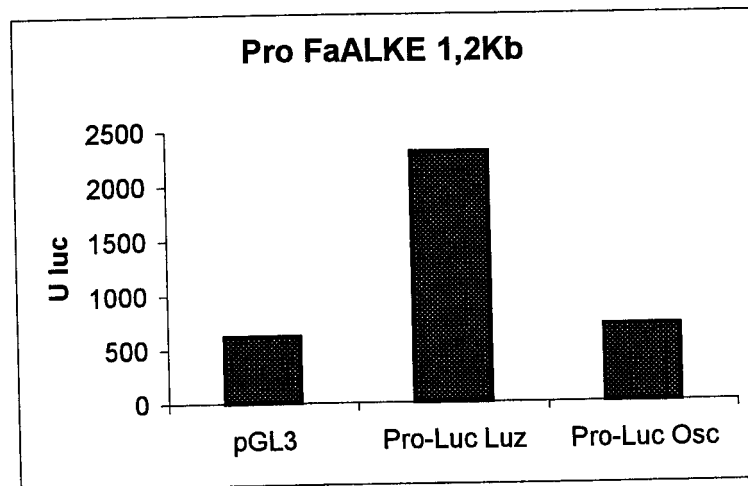


FIGURA 2

ES 2 188 400 B1

LISTA DE SECUENCIAS

	<110>	Universidad de Málaga		
5	<120>	Secuencia reguladora de la expresión específica en fruto de un gen y sus aplicaciones		
	<130>	región promotora de expresión en fruto de fresa		
	<160>	5		
	<170>	PatentIn Ver.2.1		
10	<210>	1		
	<211>	1198		
	<212>	ADN		
	<213>	<i>Fragaria x ananassa</i>		
15	<400>	1		
		aaaccctctg antccccctt ggaggcnccc gctctagaac tagtggatcc atcacatcac 60		
		cagttattgt tttcccagaa tacaatatag tgatcaatcc agcgattca tcttctaatt 120		
		aaattaaatt aaataaccac acgattaccc gccatatata tatgcattat tttatggatt 180		
20		gctagctctt cttttttcaa attaatcaca ttatttagac ggatgctaga tttgggaatc 240		
		acgacgtacc gttttataaa agatcgagga tcggagtcga atatcttgct cctaaattaa 300		
		ggggaactcg agattcaatc aagcagacaa acttgattct gtgacctta atgtgctctt 360		
		gtttcgaaag ggggtataaa actataaatt agcgccaacc aaaatgcca agcaatccta 420		
		gcttaatggt aattcccatg cacattagcc gctttaattc catacatttc aacgtgaaaa 480		
25		agaagaagat aaaaccttaa aaacaattat atgtcgccgt ttaaagacta tgagtcgtga 540		
		cttgggttaat taaagtgttt aattgacaat tttaaggtca tgggttttaa cctcacgaca 600		
		tatatatgta aggtgtgtga gttattaata aaaaattaaa aaaagaagaa gatgtcgtca 660		
		tttaaatctc acggttataa atgatgatga atatcattat atcaataact aatcgtttaa 720		
		atcttaggat tgtgatacat gtgataagta tattatttgt tagcgatttg caggtgcaaa 780		
30		ataattaatc gtacgtagta aaataatgga aattgatgac caacaaacac gtactgtgat 840		
		gtcttgagtc cagtatgggc caagaccaac tcttccagcg accagctgcc aatatcaaag 900		
		ccagaataag aaaaggaata aattaaagca aagaaaaagg aataaagtaa aataagaaag 960		
		gaataaaaaca cagcctaatt ttccaaagaa aaatatcaaa aaagaaagaa agcgtacgtg 1020		
35		gtggcactct gaggtttgcc tatataaacg caaggcgtta gtgcagatgg aaatcacctg 1080		
		gcacaacaca catctatcta tctatttcga ctgaacgttg ttctcttaaa ccaaggtatt 1140		
		tagccagagg catatatacc cacattcgat ccattcattt caattgtaaa ctagctca 1198		
	<210>	2		
40	<211>	20		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<223>	Oligonucleótido iniciador T7		
45	<400>	2		
		TAATACGACTCACTATAGGG		20
	<210>	3		
50	<211>	17		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<223>	Oligonucleótido iniciador ROC4		
55	<400>	3		
		GCTTGGCAATCTCTTCG		17
	<210>	4		
	<211>	23		
60	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<223>	Oligonucleótido iniciador KpnI f		
65	<400>	4		
		AGGTACCCCATCACATCACCAGT		23
	<210>	5		

ES 2 188 400 B1

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <223> Oligonucleótido iniciador HindIII r

<400> 5

AAAGCTTTGA GCTAGTTTAC AAT

23

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 188 400

⑫ Nº de solicitud: 200102215

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 03.10.2001

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.7: C12N 15/29, 15/82, 15/53, 15/11, 5/14, A01H 5/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GONZALEZ-LAMOTHE et al. "Analysis and characterization of cDNAs with differential expression during fruit ripening" 20 enero 1998 EMBL/GENEBANK DATABASES [en línea] [recuperado el 13 diciembre 2002] Accesion nº AF039182, Sequence identification AF039182.1	1-10
A	WO 0151637 A1 (INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE) 19.07.2001	1-10
A	WO 9940211 A2 (CALGENE INC.) 12.08.1999	1-10
A	WO 9831812 A1 (MONSANTO COMPANY) 23.07.1998	1-10

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

17.04.2003

Examinador

M. Hernández Cuéllar

Página

1/1