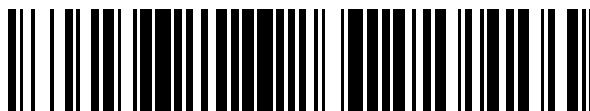


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 765**

51 Int. Cl.:
C07K 14/415 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02740441 .7**
96 Fecha de presentación: **28.03.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1373311**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2004**

54 Título: **Método para mejorar la tolerancia de las plantas al estrés ambiental**

30 Prioridad:
28.03.2001 EP 01870069
29.06.2001 US 301912 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.11.2012

73 Titular/es:
**CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS (CSIC) (100.0%)
SERRANO, 117
28006 MADRID, ES**

72 Inventor/es:
**PAGES, MONTSERRAT;
KIZIS, DIMOSTHENIS y
SANZ MOLINERO, ANA, ISABEL**

74 Agente/Representante:
CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 391 765 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para mejorar la tolerancia de las plantas al estrés ambiental.

5 Campo de la invención

La presente solicitud se refiere en general a un método para mejorar la tolerancia de las plantas al estrés ambiental, incluyendo pero sin limitarse a estrés por sequía, y/o salinidad, y/o deshidratación, y/o calor, y/o frío, y/o congelación, y/o anegación, y/o lesiones, y/o estrés mecánico, y/o estrés oxidativo, y/o ozono, y/o luz alta, y/o metales pesados, y/o privación de nutrientes, y/o productos químicos tóxicos y/o patógeno (incluyendo virus, bacterias, hongos, insectos y nemátodos) y/o combinaciones de los mismos, dicho método comprendiendo la expresión de una proteína de enlazamiento de DRE regulada por ácido abscísico (ABA), de la familia del factor de transcripción AP2/EREBP, tal como DBF1 del maíz, en la planta, operativamente bajo el control de una secuencia del promotor constitutiva o regulable tal como un promotor inducible por estrés, un promotor específico de la célula, un promotor específico del tejido, o secuencia del promotor específica del órgano. Preferiblemente, las características modificadas por la presente invención se relacionan con crecimiento, y/o rendimiento, y/o con supervivencia bajo condiciones de crecimiento por debajo del óptimo. La presente invención se extiende a constructos genéticos, que son útiles para llevar a cabo el método de la invención y para las plantas transgénicas producidas con el mismo que tienen propiedades alteradas de crecimiento y/o rendimiento, y/o de supervivencia en comparación con sus contrapartes isogénicas.

20

Antecedentes de la invención

El crecimiento, la producción de biomasa, el rendimiento, el desarrollo, la morfología y la supervivencia de las plantas está determinada por las condiciones de crecimiento. Los factores que afectan estas características de importancia agrícola incluyen, entre otros, la disponibilidad de agua, minerales y nutrientes, temperatura, intensidad de luz, la presencia de competidores o patógenos, y de suciedad o la contaminación del aire. En agricultura, las condiciones de crecimiento por debajo del óptimo a menudo se puede remediar. Por ejemplo, los suelos secos se irrigan, los suelos pobres se fertilizan, mientras se aplican pesticidas y herbicidas para controlar plagas de patógenos y competidores, respectivamente. Sin embargo, la preocupación creciente por una agricultura sostenible y respetuoso con el medio ambiente demanda cambios en las prácticas agrícolas. La irrigación masiva de tierras de cultivo, comúnmente utilizada para el cultivo de algodón y de otros cultivos, está siendo cada vez menos aceptada porque conduce a la salinización de los suelos y a la reducción de los niveles de agua en zonas bajas. Del mismo modo, el uso intensivo de agroquímicos es fuertemente criticado, debido a presuntos efectos negativos para el bienestar de los seres humanos y los animales. Al mismo tiempo, la creciente población mundial está obligando a la agricultura al uso de tierras marginales, lo que amplía el rango de ambientes en los cuales se siembran cultivos. Como resultado de esto, la producción de variedades tolerantes al estrés se ha convertido en una prioridad en todo el mundo para la mayoría de los cultivos importantes.

35

Aunque los programas convencionales de fitomejoramiento han mejorado los rendimientos de los cultivos en ambientes estresantes, hay una creencia cada vez mayor de que se obtendrán ganancias adicionales principalmente a través de la manipulación dirigida de los genes involucrados en la tolerancia al estrés. Se han identificado muchos genes inducibles por estrés en los últimos años, algunos de los cuales han demostrado que confieren un cierto aumento de la tolerancia al estrés, cuando se sobreexpresan en las plantas transgénicas. Sin embargo, a partir de estos estudios surgió la idea de que la tolerancia al estrés ambiental es altamente compleja, que requiere de una activación coordinada de múltiples genes. Esto ha llevado a la adopción de estrategias transgénicas que hacen uso de componentes de transducción de señales que controlan la expresión o la actividad de proteínas para defenderse del estrés, más que de las proteínas para defenderse del estrés en sí mismas.

45

Ejemplos exitosos de este tipo son la sobreexpresión de factores de transcripción del dominio AP2, CBF1 y DREB1 A, y de los factores de choque térmico HSF1 y 3 en Arabidopsis. CBF1 ha demostrado que mejora la tolerancia a la congelación (Jaglo-Ottosen et al., Science 280: 104 - 106, 1998; Thomashow, patente de los Estados Unidos No. 5.929.305), mientras que la tolerancia al estrés por frío y sequía inducida por DREB1A (Kasuga et al., Nature Biotechnol 19: 287 - 291, 1999) en Arabidopsis. HSF1 y 3, confieren ambos tolerancia al calor en plantas transgénicas (Lee y Schoffl, Plant J 8: 603 - 612, 1995; Prandl et al., Mol Gen Genet 258: 269 - 278, 1998).

55

Resumen de la invención

La presente invención incluye una secuencia aislada de ADN con una secuencia de nucleótidos tal como la presentada en la SEQ ID NO 2, que codifica al factor de transcripción con una secuencia de aminoácidos como la presentada en la SEQ ID NO 3, que es capaz de enlazarse al elemento regulador cis DRE2 del promotor Rab17 del maíz. Este factor de transcripción pertenece a un nuevo tipo de factores de transcripción que contienen el dominio AP2 y se denominan adicionalmente como DBF1. Se muestran en la presente invención que DBF1 y el elemento DRE2 median la respuesta del ácido abscísico (ABA) en las plantas. ABA es una hormona de las plantas implicada en muchos procesos de las mismas, entre los cuales están la inducción de tolerancia al estrés. Es la primera vez

60

que se establece un vínculo entre una proteína sensible a ABA o una ruta sensible a ABA y un elemento que actúa sobre cis en DRE. Además, este enlace se establece por medio de la identificación de una proteína de enlazamiento DRE que, sorprendentemente, pertenece a la clase de proteína que contiene el dominio AP2, de cuyos miembros anteriormente conocidos están todos involucrados de manera independiente de ABA.

5 La presente invención incluye también métodos para identificar proteínas de maíz y de otras plantas que pueden unirse al elemento regulador DRE2, así como los métodos para identificar las proteínas y los compuestos que interactúan con DBF1.

10 Una primera realización de la presente invención comprende una secuencia aislada de ácido nucleico que codifica una proteína DBF1 de la planta o un fragmento de la misma de al menos 50 aminoácidos de longitud capaz de enlazarse a una secuencia de ADN reguladora de cis en DRE seleccionada del grupo que consiste de:

15 (a) ácido nucleico que comprende la secuencia de ADN, como la representada en la SEQ ID NO 2, y
(b) ácido nucleico que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos como la representada en la SEQ ID NO 3.

20 Incorporada en la presente invención están también métodos para modificar la tolerancia al crecimiento, el rendimiento, y el estrés de las plantas, que comprende la modificación de la expresión en células, tejidos u órganos particulares de una planta, de una secuencia de ácido nucleico como la definida anteriormente, expresada bajo el control de un promotor constitutivo y/o ubicuo o regulado. El promotor regulado puede ser controlado por factores sensibles al estrés o específicos de células / tejidos / órganos.

25 La presente invención se refiere también a una célula o planta que contiene dicho constructo genético.

La presente invención además abarca métodos para modificar el crecimiento, el rendimiento y la tolerancia al estrés de las plantas, que comprende la modificación de la expresión de secuencias de DBF1 como se describió anteriormente.

30 Descripción detallada de la invención

35 El estrés por deshidratación es probablemente el estrés abiótico más importante en la agricultura. Una célula padece estrés por deshidratación cuando experimenta una escasez de agua. Por lo general, esta situación se produce como consecuencia de la sequía. Sin embargo, también el estrés por sal y frío (en particular congelación) conducen a estrés por deshidratación a nivel celular. Además, cualquier lesión del tejido (como consecuencia de heridas, tensión mecánica, patógenos), así como el calor, puede conducir a una mayor evaporación del agua y por lo tanto a estrés por deshidratación. La pérdida de agua a nivel celular también puede ocurrir como resultado de daño de la membrana, por ejemplo como consecuencia de la peroxidación de lípidos durante el estrés oxidativo.

40 La hormona vegetal ácido abscísico (ABA) juega un papel importante en la protección de las plantas frente al estrés por deshidratación. ABA estimula el cierre de los estomas, y, a nivel celular, induce la síntesis de proteínas que protegen a los componentes celulares contra el daño por deshidratación. La invención descrita en la presente memoria mejora la síntesis de tales proteínas protectoras en las plantas. Mediante el uso de los métodos de la presente invención, tales proteínas protectoras se sintetizan sin inducir todos los efectos pleiotrópicos de ABA en la planta, ya que estos métodos no involucran la aplicación de ABA en sí misma.

45 Se ha demostrado que la inducción de respuestas de defensa por medio de ABA involucra dos vías de señalización, una de ellas involucra a los factores de transcripción MYC / MYB (Urao et al., Plant Cell 5: 1529 - 1539, 1993), y los segundos involucran a los factores BZIP, que se enlazan a los ABRE (elementos sensibles a ABA; Guiltinan et al., Science 250: 267 - 271, 1990). Los elementos individuales ABRE también han sido identificados como elementos que actúan sobre cis en los promotores de genes que no están regulados por ABA. Sin embargo, se ha demostrado que la unión de factores BZIP a repeticiones de ABRE en respuesta a ABA requiere de repeticiones de elementos ABRE (revisado por Busk y Pages, Plant Mol. Biol. 37: 425 - 435, 1998).

55 El gen rab17 (sensible al ácido abscísico) es un ejemplo bien conocido de un gen sensible a ABA en el maíz. El promotor Rab17 contiene 5 elementos putativos ABRE, y por lo tanto, clasifica como un elemento BZIP funcional que se enlaza sobre cis, involucrado en la señalización de ABA (Busk et al., Plant J 11: 1285 - 1295, 1997). El promotor rab17 también contiene elementos DRE, de los cuales la secuencia de núcleo es idéntica a la de DRE (sensible a la sequía) y elementos CRT (elementos de respuesta al frío) en Arabidopsis. Los elementos DRE / CRT se encuentran en los promotores de genes tales como rd29A, rd17, cor6.6, cor15a, erd10 y kin1, y la inducción de estos genes implica a los elementos DRE / CRT. Sin embargo, parece que diferentes factores de transcripción son reclutados para estos elementos, dependiendo de la naturaleza de la situación de estrés. Estos factores de transcripción pertenecen al tipo AP2/ERE BP (proteína de enlazamiento al elemento de respuesta a apetala 2 / etileno) y se designan DREB (factor de enlazamiento DRE; Liu et al., Plant Cell 10: 1391 - 1406, 1998) o CBF (factor de enlazamiento CRT; Stockinger et al., Proc Natl Acad Sci 94: 1035 - 1040, 1997). Por ejemplo, la expresión

de DREB1A es fuertemente inducida frío y débilmente por sequía, mientras que DREB2A es principalmente sensible a la sequía (Liu et al., Plant Cell 10: 1391 - 1406, 1998). CBF (idéntica a DREB1B) es expresada constitutivamente (Stockinger et al., Proc Natl Acad Sci 94: 1035 - 1040, 1997), si bien hay cierta controversia sobre si es adicionalmente inducida por frío (Stockinger et al., Proc Natl Acad. Sci. 94: 1035 - 1040, 1997; Liu et al., Plant Cell 10: 1391 - 1406, 1998).

Curiosamente, ABA no parece desempeñar un papel en la activación de DREB/CBF1 en Arabidopsis, ya que el control de la transcripción mediada por DRE se produce en una forma independiente de ABA. Fue sorprendente por lo tanto encontrar que los elementos DRE en el promotor rab17 de maíz toman parte en la activación de la expresión génica por parte de ABA (Busk et al., Plant J 11: 1285 - 1295, 1997). Este hallazgo nos llevó a iniciar investigaciones para lograr la elucidación de los factores de transcripción que se enlazan al elemento DRE2 en maíz y que activan la expresión génica a través de DRE2 en respuesta a ABA. La caracterización de tal factor es la base de la presente invención.

La presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica una proteína DBF1 de la planta o un fragmento de la misma de al menos 50 aminoácidos de longitud capaz de enlazarse con una secuencia de ADN reguladora de cis en DRE seleccionada del grupo de:

- (a) ácido nucleico que comprende la secuencia de ADN como la presentada en la SEQ ID NO 2, y
- (b) ácido nucleico que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácido como la presentada en la SEQ ID NO 3.

La presente invención también se refiere a un ácido nucleico aislado como se definió anteriormente que codifica un polipéptido o un fragmento del mismo de al menos 50 aminoácidos de longitud que se enlaza a una secuencia de ADN reguladora de cis en DRE, por ejemplo una secuencia de DRE como la presentada en la SEQ ID NO 1.

La secuencia de DRE como la presentada en la SEQ ID NO 1 comprende tres repeticiones en tándem del elemento DRE2.

La presente invención también se refiere a una secuencia aislada de ácido nucleico que codifica un factor de transcripción que contiene un dominio AP2/ERE BP o un fragmento del mismo como se definió anteriormente que se enlaza a una secuencia de ADN reguladora de cis y para la cual la intensidad de dicho enlazamiento está regulada por ABA. Un ejemplo de tal secuencia de ADN reguladora de cis de acuerdo con la invención es un elemento DRE, por ejemplo un elemento DRE como se presenta en la SEQ ID NO 1. La intensidad del enlazamiento puede medirse por medio de varios métodos conocidos por la persona capacitada en el arte. Un ejemplo de un método in vivo es el uso de la técnica de un solo híbrido en levadura como se describe en el ejemplo 1. Aquí la intensidad del color producido por la enzima del gen reportero es representativo de la intensidad del enlazamiento entre la proteína al oligonucleótido. Un método alternativo es, por ejemplo, un experimento del enlazamiento ADN-proteína in vitro. Los resultados pueden ser medidos a través de técnicas de ensayo de desplazamiento en gel de electroforesis como se describe en el ejemplo 6. Además, la intensidad del enlazamiento puede medirse por medio de ensayos de competición, por ejemplo como se describe en el ejemplo 6.

La presente invención también se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica un factor de transcripción que contiene el dominio AP2/ERE BP o un fragmento del mismo como se definió anteriormente que se enlaza a una secuencia de ADN reguladora de cis y que activa la transcripción de las secuencias reguladas por dicho elemento regulador de cis en respuesta a ABA. Un ejemplo de tal secuencia de ADN reguladora de cis es un elemento DRE, por ejemplo un elemento DRE como se presenta en la SEQ ID NO 1.

La memoria descriptiva también describe un ácido nucleico aislado que codifica un factor de transcripción que contiene un dominio AP2/ERE BP o un fragmento funcional o inmunológicamente activo del mismo que comprende una secuencia como la representada en la SEQ ID NO 14, o que comprende una secuencia que es al menos 50%, más preferiblemente 60%, y lo más preferiblemente al menos 70% o 75% idéntica a la SEQ ID NO 14: PLXXXV(D/N) AKL(Q/E)XIC. La presente invención también se refiere a un ácido nucleico aislado de la invención como se definió anteriormente que es ADNc, ADN, ADN genómico o ADN sintético, o ARN en donde T es reemplazado por U.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los ácidos nucleicos aislados como se definieron anteriormente, pero que se derivan de una planta monocotiledónea.

La presente invención también se refiere a un polipéptido codificado por cualquiera de los ácidos nucleicos de la invención como se describió anteriormente.

La presente invención también se refiere a un vector que comprende cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de la invención como se describió anteriormente.

La presente invención también se refiere a un vector de la invención de la invención como se describió

anteriormente que es un vector de expresión en donde dicha secuencia de ácido nucleico está operativamente enlazada a una o más secuencias de control que permite la expresión en células huésped procariontas y/o eucariotas.

5 La presente invención también se refiere a una célula huésped que contiene un transgén DBF1 que comprende una molécula de ácido nucleico o un vector de la invención como se describió anteriormente.

La presente invención también se refiere a una célula huésped de la invención como se describió anteriormente seleccionada del grupo que consiste de una célula bacteriana, de insecto, de hongo, de planta o de animal.

10 La presente invención se refiere también a un método para la producción de plantas transgénicas, células de plantas o tejido de plantas que comprende la introducción de un ácido nucleico de la invención como se describió anteriormente o de un vector de la invención como se describió anteriormente en el genoma de una planta, célula de una planta o tejido de una planta.

15 La presente invención se refiere también a un método de la invención como se describió anteriormente que comprende además la regeneración de una planta a partir de dicho tejido de la planta o célula de la planta.

20 La presente invención también se refiere a una célula de una planta transgénica que comprende un transgén DBF1 que contiene un ácido nucleico de la invención como se describió anteriormente, que está enlazado operativamente a elementos reguladores que permiten la transcripción y/o expresión de la secuencia de ácido nucleico en células de plantas o que puede obtenerse de acuerdo con el método de la invención como se describió anteriormente.

25 La presente invención también se refiere a la célula de planta transgénica de la invención como se describió anteriormente en el que dicha secuencia de ácido nucleico o dicho vector se integran de manera estable en el genoma de la célula de la planta.

La presente invención también se refiere a una planta transgénica o a un tejido de una planta que comprende células vegetales de la invención como se describió anteriormente.

30 La presente memoria descriptiva también se refiere a homólogos, análogos o parálogos de las proteínas DBF1 (y los ácidos nucleicos) de la invención y a los usos de los mismos.

35 Un ejemplo interesante es un homólogo DBF1 de arroz que se agrupa cercanamente con DBF1 como se muestra en la figura 7. La secuencia de ADN del homólogo de arroz se representa en la SEQ ID NO 15 y la correspondiente secuencia de proteína se representa en la SEQ ID NO 16 (véase el ejemplo 8).

40 La memoria descriptiva se refiere también a un método para la producción de plantas transgénicas, dichas plantas caracterizadas por tener un mayor crecimiento y/o rendimiento bajo condiciones de estrés y/o no estresadas, comprendiendo dicho método:

- 45 a) introducir un ácido nucleico o un vector de la invención como se describió anteriormente en el genoma de una célula de una planta o tejido de una planta, o,
 b) introducir un ácido nucleico que comprende una secuencia como la representada en la SEQ ID NO 15, o un homólogo o análogo o parálogo de la misma, o un vector que comprende una secuencia como la representada en la SEQ ID NO 15 en una célula de una planta o tejido de una planta,
 c) regenerar plantas a partir de dichas células o tejidos de la planta transformada, y,
 d) seleccionar una planta que exhiba dicho aumento en el crecimiento y/o el rendimiento.

50 La memoria descriptiva también describe un método para la producción de plantas transgénicas, dichas plantas caracterizadas por tener una mayor expresión de al menos una proteína relacionada con el estrés, comprendiendo dicho método:

- 55 a) introducir un ácido nucleico o un vector de la invención como se describió anteriormente en el genoma de una célula de una planta o tejido de una planta, o,
 b) introducir un ácido nucleico que comprende una secuencia como la representada en la SEQ ID NO 15, o un homólogo o análogo o parálogo de la misma, o un vector que comprende una secuencia como la representada en la SEQ ID NO 15 en una célula de una planta o tejido de una planta,
 c) regenerar plantas a partir de dichas células o tejidos de la planta transformada, y,
 d) seleccionar una planta que exhiba dicha mayor expresión de dicha proteína relacionada con el estrés.

60 La presente invención también se refiere a una planta transgénica que puede ser obtenida mediante cualquiera de los métodos de la invención como se describió anteriormente.

65 La presente invención también se refiere a una planta transgénica de la invención como se describió anteriormente o

que puede ser obtenida por medio de cualquiera de los métodos de la invención como se describió anteriormente en el que dicha planta es una planta monocotiledónea.

5 La presente invención también se refiere al tejido de una planta que comprende un transgén DBF1 que contiene un ácido nucleico o un vector como se definió anteriormente derivado de una planta de la invención como se describió anteriormente o de una planta que puede ser obtenida por un método de la invención como se describió anteriormente.

10 La presente invención también se refiere a una parte cosechable o propágulo derivado de una planta de la invención como se describió anteriormente o de una planta obtenible por un método de la invención como se describió anteriormente.

15 La presente invención también se refiere a una parte cosechable o a un propágulo derivado de una planta de la invención como se describió anteriormente, o de una planta que puede ser obtenida por un método de la invención como se describió anteriormente, dicha parte cosechable o propágulo que comprende un transgén DBF1 que contiene un ácido nucleico o un vector como se definió anteriormente.

20 La presente invención también se refiere a la parte cosechable de la invención como se describió anteriormente que se selecciona del grupo que consiste de semillas, hojas, raíces, flores, frutos, tallos, rizomas, tubérculos y bulbos, dichas partes cosechables comprendiendo un transgén DBF1 que contiene un ácido nucleico o un vector como se definió anteriormente.

25 La presente invención se refiere también a la progenie dicha progenie comprendiendo un transgén DBF1 que contiene un ácido nucleico o un vector como se definió anteriormente derivados de cualquiera de las plantas, tejidos de las plantas o partes de las plantas de la invención como se describió anteriormente.

30 La presente invención se refiere también a un método para identificación de polipéptidos que interactúan con un polipéptido de la invención como se describió anteriormente, que comprende un ensayo de selección de doble híbrido en donde al menos un polipéptido de la invención, como cebo y una biblioteca de ADNc de una planta o parte de una planta como presa se expresan.

35 La memoria descriptiva describe también un método para identificar y obtener ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que enlazan DRE(2) que comprende un ensayo de selección de un híbrido en donde un elemento DRE, tal como una secuencia como la representada en la SEQ ID NO 1 que contiene uno o más elementos DRE, como cebo y una biblioteca de ADNc de una planta monocotiledónea o parte de una planta como presa se expresan.

40 La memoria descriptiva describe también un método para identificar y obtener ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que enlazan ADN que modifica ABA y respuestas relacionadas con el estrés en plantas que comprende un ensayo de selección de un híbrido en donde un elemento DRE, tal como una secuencia como la representada en la SEQ ID NO 1 se usa como cebo y una biblioteca de ADNc de una planta monocotiledónea o parte de una planta como presa se expresan.

45 La presente invención se refiere también al vector de la invención como se describió anteriormente que es un vector de expresión en donde dicho ácido nucleico está operativamente enlazado a una o más secuencias de control que permite la expresión en células huésped procariotas y/o eucariotas. La presente memoria descriptiva describe también un método para la producción de plantas monocotiledóneas transgénicas, dichas plantas caracterizadas por tener, mayor expresión de al menos una proteína relacionada con el estrés, y/o que muestran mayor tolerancia al estrés, y/o que producen un mayor rendimiento y mejor crecimiento, comprendiendo dicho método:

- 50 (a) introducir un ácido nucleico o un vector de la invención como se describió anteriormente en el genoma de una célula de una planta o tejido de una planta,
 (b) regenerar plantas a partir de dichas células o tejidos de una planta transformada, y
 55 (c) seleccionar una planta que exhiba dicha expresión incrementada.

Sorprendentemente, los presentes inventores encontraron que el promotor rab17 de maíz no es inducible más por ABA cuando se expresa en Arabidopsis, lo que demuestra que los componentes de señalización involucrados en el control de ABA de elementos DRE2 o bien están ausentes en Arabidopsis o no están funcionalmente conservados entre Arabidopsis y maíz. Alternativamente, los componentes de señalización involucrados en el control de ABA de elementos DRE2 están presentes en Arabidopsis, pero el contexto del promotor rab17 del maíz no es el contexto apropiado para permitir el enlazamiento de estas proteínas ortólogas de Arabidopsis como las identificadas en la presente invención en el genoma de Arabidopsis con el elemento DRE. Por lo tanto, en una realización interesante de la presente invención, los ácidos nucleicos o los polipéptidos de la presente invención se derivan de una planta monocotiledónea; las células huésped y las plantas transgénicas de la presente invención son células o plantas monocotiledóneas; y los métodos de la presente invención se van a utilizar en células, tejidos o plantas

monocotiledóneas.

Alternativamente, en una realización particular relacionada de la presente invención, los ácidos nucleicos de la presente invención o los polipéptidos se deriva de una dicotiledónea, las células huésped y las plantas transgénicas de la presente invención son una dicotiledónea, o los métodos de la presente invención son para ser usados en dicotiledóneas.

Los experimentos para obtención de la impronta (footprinting) revelaron que el enlazamiento de la proteína con el elemento DRE2 se produjo tanto en embriones de maíz como en hojas bajo condiciones no estresadas, pero que el enlazamiento se incrementó y/o se intensificó después de estrés hídrico o la aplicación de ABA (Busk et al., Plant J. 11: 1285 - 1295, 1997). Con el fin de caracterizar las proteínas de enlazamiento con el elemento DRE2, se llevaron a cabo selecciones de un solo híbrido en levadura usando tres repeticiones en tándem del elemento DRE2 de 19 pb (SEQ ID NO 1) como cebo (véase el Ejemplo 1). Dos clones diferentes que se enlazan a DRE2 fueron identificados a partir de una biblioteca de ADNc de hojas estresadas por humedad. Cada uno de estos clones fue aislado varias veces a partir de un experimento independiente, que apoya la validez de la interacción. Este resultado demuestra que el elemento DRE2 constituye un elemento promotor funcional que actúa sobre cis para la expresión génica y enseña cómo aislar proteínas que enlazan DRE2 de maíz o de otras especies. La identificación de DRE2 como un elemento regulador de cis involucrado en las respuestas de ABA también permite seleccionar promotores de otros genes para secuencias que son idénticas o muy similares a DRE2 y para aislar polipéptidos que se enlazan a tales elementos. Por lo tanto, la memoria descriptiva describe un método para identificar y obtener polipéptidos que se enlazan con DRE-2 que comprende un ensayo de selección de un solo híbrido en el que se utilizan la SEQ ID NO 1 como cebo y una biblioteca de ADNc de una planta monocotiledónea o parte de una planta como presa. Del mismo modo, la memoria descriptiva describe un método para identificar y obtener polipéptidos que enlazan ADN que modifican las respuestas relacionadas con ABA y con el estrés en plantas que comprende un ensayo de selección de un solo híbrido en el que una secuencia que es al menos 70% idéntica a la SEQ ID NO 1 se utiliza como un cebo y una biblioteca de ADNc de una planta o parte de una planta monocotiledónea se utilizan como una presa.

Uno de los clones de enlazamiento de DRE2 fue denominado DBF1, que significa Factor 1 de Enlazamiento de DRE. El ADN y las secuencias de aminoácido de DBF1 se da en la SEQ ID NO 2 y la SEQ ID NO 3 (véase el Ejemplo 2). DBF1 contiene una región de sesenta aminoácidos que constituye un dominio de enlazamiento del ADN, el dominio AP2, que está altamente conservado en los miembros de la familia AP2/ERE BP de factores de transcripción de la planta (Figura 1). Sorprendentemente, las secuencias de aminoácidos de DBF1 no muestran homología significativa por fuera de esta región con los miembros reportados de la familia AP2/ERE BP, incluyendo CBF1, DREB1A, y DREB2A, que enlazan los elementos DRE / CRT en Arabidopsis. Esto implica que el papel de DBF1 como proteína de enlazamiento de DRE2 y como una proteína señal en las respuestas de ABA (véase más adelante) no solamente pueden ser deducidas a partir de la similitud del ADN o de la secuencia de aminoácidos con los miembros conocidos de la familia AP2/ERE BP. Esto se ilustra adicionalmente mediante una búsqueda Blast de similitud de secuencia contra una base de datos de proteína no redundante (Ejemplo 3): las mayores similitudes con DBF1 fueron encontradas con 6 proteínas AP2/ERE BP de Arabidopsis de función desconocida (valores de E de e^{-44} hasta e^{-39}). Todas las proteínas AP2/ERE BP de función conocida tenían puntajes similares de e^{-20} o inferiores. Las CBF1, DREB1A, y DREB2A tenían valores de E de e^{-16} hasta e^{-15} y habían aproximadamente otras 50 proteínas de la familia AP2/ERE BP en Arabidopsis que tenían valores similares a DBF1 que caen dentro del mismo rango. La mayoría de estas son de función desconocida, mientras que algunas otras han sido implicadas en las respuestas hormonales, principalmente con etileno. Sólo una de ellas, denominada AB14, había sido previamente implicado en respuestas de ABA, pero su función precisa o el modo de acción siguen siendo desconocidos en la actualidad (Finkelstein et al., Plant Cell 10: 1043 - 1054, 1998). AB14 tiene un valor de E de e^{-19} , y por lo tanto no está particularmente estrechamente relacionada en estructura con DBF1.

El papel de DBF1 en las respuestas de ABA y el estrés por deshidratación fue adicionalmente corroborado por medio de los datos siguientes. En primer lugar, el patrón de expresión de DBF1 está en línea con tal función (Ejemplo 4). DBF1 se transcribió fuertemente después del tratamiento de deshidratación en todas las partes vegetativas y también fue inducido por salinidad y ABA, con los niveles de expresión más altos en las raíces (Figura 2). Este patrón de expresión es similar a aquel de rab17, de acuerdo con el papel de DBF1 más arriba de rab17. El análisis de la cinética de esta inducción mostró que los niveles de ARNm para DBF1 aumentaron en menos de una hora (Figura 3). DBF1 también se expresó fuertemente en embriones de maíz, y esta expresión fue también inducible por ABA. Los genes relacionados con la deshidratación, incluyendo rab17, también se expresan durante la embriogénesis, con el fin de proteger al embrión durante la desecación de la semilla. Por lo tanto, estos datos indican que DBF1 no sólo controla las respuestas de deshidratación durante un estrés ambiental, sino también durante el desarrollo. Los perfiles de la proteína DBF1, detectados usando anticuerpos producidos contra la proteína DBF1, fueron congruentes con los patrones de ARNm para DBF1 antes mencionados (Figura 4). En segundo lugar, se demostró que la sobreexpresión de DBF1 potencia la respuesta de ABA en células de callo de maíz (Ejemplo 5). La fusión promotor rab17-GUS se expresó en células de callo de maíz, la mitad de las cuales se cultivaron cultivaron en presencia de ABA y la otra mitad sin. La expresión de DBF1 indujo actividad promotora, tanto en presencia como en ausencia de ABA (Figura 5). Además, la mutación del elemento DRE2 en la fusión promotor rab17-GUS redujo la actividad del promotor y su sensibilidad a ABA. Tomados en conjunto, estos datos demuestran que DBF1, a través

del enlazamiento con el elemento DRE2, regula las respuestas de ABA y los mecanismos de defensa contra el estrés.

5 Aparte del enlazamiento con DRE2, no se excluyen otros modos de acción de DBF1. DBF1 no se enlaza con elementos DRE1 o ABRE (Figura 6, Ejemplo 6), que también se localizan en el promotor rab17. Sin embargo, se propone que DBF1 puede promover el enlazamiento y/o la actividad de los factores de enlazamiento con DRE1, ABRE u otros elementos promotores rab17. De conformidad con ese modelo, se han demostrado interacciones entre factores b-ZIP, que se enlazan con elementos ABRE, y las proteínas del dominio AP2/EREBP en relación con otros elementos reguladores de cis (Büttner y Singh, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 94: 5961 - 5966, 1997). Por lo tanto, sin estar ligado a un modo de acción, proponemos que DBF1 toma parte en el control de las respuestas de ABA y la activación de los mecanismos de defensa contra el estrés en maíz.

10 No obstante, no se excluye que DBF1 sea capaz de enlazarse también con otros elementos que actúan en cis diferentes a DRE2. Tomados en conjunto, los datos presentados aquí son los primeros en demostrar que la regulación de ABA de los elementos que actúan en cis de DRE en maíz involucran factores de transcripción del dominio AP2/EREBP factores de transcripción de dominio. Los datos de esta invención son también los primeros en describir la secuencia de ADN y de la proteína de un factor de transcripción del dominio AP2/EREBP con una función en la señalización de ABA y en demostrar que esta proteína es estructuralmente muy divergente de los dominios AP2/EREBP de función conocida. Tanto el papel de los factores de transcripción del dominio AP2/EREBP en la señalización de ABA como la secuencia específica de un factor de transcripción del dominio AP2/EREBP con tal función eran hasta ahora desconocidos y, en consecuencia, la invención presentada y sus realizaciones no podría ser previstas.

25 Dada la estrecha relación filogenética de especies de cereales, una persona capacitada en la técnica será capaz de identificar proteínas con una función similar a DBF1 de otros cereales, o de otras monocotiledóneas. Además, los factores de enlazamiento de DRE en Arabidopsis son parte de familias de genes, por lo tanto, es probable que el maíz y otros cereales contengan varios genes que codifican para proteínas que están estructural y funcionalmente relacionadas con DBF1. Los métodos para identificar homólogos de DBF1 de la misma o de otras especies incluyen, pero no se limitan a, la alineación de secuencias, las hibridaciones de ADN o ARN, selecciones con un híbrido con el elemento DRE1 o purificación de proteínas por afinidad con el elemento DRE1.

Las modalidades descritas más adelante se refieren a: una secuencia de polipéptidos que comprende al menos parte (al menos 50 aminoácidos de longitud) de la secuencia de la proteína, como se presenta en la SEQ ID NO 3.

35 En una realización descrita aquí, la expresión modificada de DBF1, en las plantas transgénicas proporcionará tales plantas con una característica de valor comercial. La modificación de la expresión de DBF1, se logra preferentemente por medio de la fusión de la secuencia que codifica a un promotor heterólogo y la transformación de tal fusión en un modo expresable en plantas transgénicas. La planta es preferiblemente un cereal, tal como maíz, trigo, arroz, cebada, o sorgo.

40 En otra realización de la invención, se reivindica un método para la producción de plantas monocotiledóneas transgénicas, dichas plantas caracterizadas por tener mayor expresión de al menos una proteína relacionada con el estrés, tal como Rab17, comprendiendo dicho método la transformación de un ácido nucleico que codifica DBF1 en una forma expresable en una planta transgénica, preferiblemente un cereal, tal como maíz, trigo, arroz, cebada, o sorgo. En otra realización de la invención, la expresión de DBF1, bajo el control de un promotor constitutivo fuerte mejorará la tolerancia de las plantas al estrés ambiental, en particular estrés por deshidratación. La planta es preferiblemente un cereal, tal como maíz, trigo, arroz, cebada, o sorgo.

50 En otra realización descrita aquí, la expresión de DBF1, bajo el control de un promotor inducible por estrés aumentará la tolerancia de las plantas al estrés ambiental, en particular estrés por deshidratación. La planta es preferiblemente un cereal, tal como maíz, trigo, arroz, cebada, o sorgo.

55 En otra realización de la invención, la expresión de DBF1, bajo el control de un promotor específico del tejido mejorará la tolerancia de los órganos de la planta que son particularmente propensos al estrés ambiental, en particular al estrés por deshidratación. La planta es preferiblemente un cereal, tal como maíz, trigo, arroz, cebada, o sorgo. El promotor se expresa preferiblemente ya sea en raíces, tallos o en anteras.

60 En otra realización de la invención, la expresión de DBF1, bajo el control de un promotor controlado por desarrollo mejorará la tolerancia de las plantas en etapas específicas de desarrollo que son particularmente propensas al estrés medioambiental, en particular, estrés por deshidratación. La planta es preferiblemente un cereal, tal como maíz, trigo, arroz, cebada, o sorgo. El promotor se expresa preferiblemente ya sea en polen, óvulos, o en semillas.

En otra realización de la invención, la expresión de DBF1, bajo el control de un promotor que contiene DRE1 aumentará la tolerancia de las plantas frente al estrés ambiental, en particular, estrés por deshidratación. La planta

es preferiblemente un cereal, tal como maíz, trigo, arroz, cebada, o sorgo. Curiosamente, los presentes resultados mostraron que la mutación del elemento DRE2 no elimina completamente la actividad del promotor Rab17 o la sensibilidad a ABA, aunque anula el enlazamiento de DBF1. Esto indica que la actividad del promotor Rab17 y la sensibilidad a ABA es una superposición de diferentes rutas de regulación, que ejercen efectos aditivos. Se propone por lo tanto que la sobreexpresión combinada de DBF1 con factores de transcripción que median las respuestas de ABA a través de elementos que actúan en cis diferentes a DRE, tendrá efectos más fuertes sobre la expresión de proteínas de respuesta al estrés, tales como Rab17, que la sobreexpresión de DBF1 solo. Las proteínas candidatas para coexpresión con DBF1 son moléculas que se conocen en el estado del arte existente como moléculas de señalización de la ruta sensible a ABA de respuesta al estrés, tal como los factores de enlazamiento de ABRE de la familia b-zip, tales como EMBP-1 (Guiltinan et al., Science 250: 267 - 271, 1990; Gupta et al., Plant Mol. Biol. 37: 629 - 637, 1998) y las proteínas MYB / MYC involucradas en la señalización de ABA (Abe et al., Plant Cell 9: 1859 - 1868, 1999). Ya que el enlazamiento de factores BZIP con elementos ABRE se ve reforzada por la interacción con las proteínas dedo de zinc del tipo C2H2, tales como SCOF-1 (Jong et al., Abstract S31 - 46, Libro de Resúmenes de la reunión ISPMB en Quebec, junio 18 - 24, 2000, Suplemento del Reporte 18: 2), incluso se proponen niveles más altos de expresión de genes sensibles al estrés, tales como Rab17, cuando la sobreexpresión de DBF1, factores b-zip y proteínas dedo de zinc del tipo C2H2, se combina en una sola planta.

Las realizaciones preferidas de la invención por lo tanto también incluyen la sobreexpresión de DBF1 en combinación con las proteínas de señalización de otras rutas de ABA que controlan la activación génica.

En otra realización descrita aquí, la expresión modificada de DBF1, en combinación con la expresión modificada de un factor de enlazamiento de ABRE de la familia BZIP, en plantas transgénicas mejorará la tolerancia de las plantas frente al estrés ambiental, en particular, estrés por deshidratación. La planta es preferiblemente un cereal, tal como maíz, trigo, arroz, cebada, o sorgo. Los promotores utilizados para dirigir la expresión de estas proteínas son preferentemente ya sea constitutivos y/o ubicuos, inducibles por estrés, específicos del tejido o controlados por desarrollo.

En otra realización de la invención, la expresión modificada de DBF1, en combinación con la expresión modificada de un factor MYC que es inducible por ABA, en plantas transgénicas mejorará la tolerancia de las plantas frente al estrés ambiental, en particular, estrés por deshidratación. La planta es preferiblemente un cereal, tal como maíz, trigo, arroz, cebada, o sorgo. Los promotores utilizados para dirigir la expresión de estas proteínas son preferentemente o bien constitutivos y/o ubicuos, inducibles por estrés, específicos del tejido o controlados por desarrollo.

En otra realización descrita aquí, la expresión modificada de DBF1, en combinación con la expresión modificada de una proteína dedo de zinc del tipo C2H2 que enlaza a los factores de enlazamiento de ABRE de la familia BZIP, en plantas transgénicas mejorará la tolerancia de las plantas frente al estrés ambiental, en particular al estrés por deshidratación. La planta es preferiblemente un cereal, tal como maíz, trigo, arroz, cebada, o sorgo. Los promotores utilizados para dirigir la expresión de estas proteínas son preferentemente o bien constitutivos y/o ubicuos, inducibles por estrés, específicos del tejido o controlados por desarrollo.

En otra realización de la invención, la expresión modificada de DBF1, en combinación con la expresión modificada de un factor MYB que es inducible por ABA, en plantas transgénicas mejorará la tolerancia de las plantas frente al estrés ambiental, en particular, estrés por deshidratación. La planta es preferiblemente un cereal, tal como maíz, trigo, arroz, cebada, o sorgo. Los promotores utilizados para dirigir la expresión de estas proteínas son preferentemente constitutivos, inducibles por estrés, específicos del tejido o controlados por desarrollo.

En otra realización descrita aquí, la expresión modificada de proteínas de las siguientes clases en una planta transgénica individual mejorará la tolerancia frente al estrés ambiental, en particular, al estrés por deshidratación: DBF1, en combinación con un factor de enlazamiento de ABRE de la familia bZIP, en combinación con una proteína dedo de zinc del tipo C2H2 que enlaza factores de enlazamiento de ABRE de la familia bZIP. La planta es preferiblemente un cereal, tal como maíz, trigo, arroz, cebada, o sorgo. Los promotores utilizados para dirigir la expresión de estas proteínas son preferentemente o bien constitutivos y/o ubicuos, inducibles por estrés, específicos del tejido o controlados por desarrollo.

En otra realización descrita aquí, la expresión modificada de proteínas de las siguientes clases en una planta transgénica individual mejorará la tolerancia frente al estrés ambiental, en particular, al estrés por deshidratación: DBF1, en combinación con un factor MYC a partir del cual la expresión es inducible por ABA, en combinación con un factor MYB a partir del cual la expresión es inducible por ABA. La planta es preferiblemente un cereal, tal como maíz, trigo, arroz, cebada, o sorgo. Los promotores utilizados para dirigir la expresión de estas proteínas son preferentemente o bien constitutivos, inducibles por estrés, específicos del tejido o controlados por desarrollo.

En otra realización descrita aquí, la expresión modificada de proteínas de las siguientes clases en una planta transgénica individual mejorará la tolerancia frente al estrés ambiental, en particular, estrés por deshidratación: DBF1, en combinación con factores de enlazamiento de ABRE de la familia bZIP, en combinación con una proteína

- dedo de zinc del tipo C2H2 que enlaza factores de enlazamiento de ABRE de la familia bZIP, en combinación con un factor MYC a partir del cual la expresión es inducible por ABA, en combinación con un factor de MYB que la expresión es inducible por ABA. La planta es preferiblemente un cereal, tal como maíz, trigo, arroz, cebada, o sorgo. Los promotores utilizados para dirigir la expresión de estas proteínas son preferentemente o bien constitutivos, inducibles por estrés, específicos del tejido o controlados por desarrollo.
- Alternativamente, la expresión de DBF1 se combina con la expresión con (al menos una) otra molécula de señalización de la ruta independiente de ABA (tal como proteínas de enlazamiento DRE) con el fin de potenciar el efecto sobre la expresión de genes que llevan en su promotor un elemento DRE, tal como genes sensibles al estrés (rd29A o Rab17 etc.). Los ejemplos de tales proteínas de enlazamiento de DRE que se combinan con la proteína DBF1 de la presente invención son: proteínas del tipo CBF1 (Stockinger et al., Proc Natl Acad Sci 94: 1035 - 1040, 1997) o DREB1A o DREB2A (Liu et al. , Plant Cell 10: 1391 - 1406, 1998).
- Además, en una realización particular descrita aquí, el propósito es combinar ambas rutas conocidas sensibles al estrés, es decir, combinar la ruta que depende de ABA y la ruta independiente de ABA. Esto se hace particularmente combinando la expresión de moléculas de señalización involucradas en estas rutas, ejemplos de las cuales se han descrito anteriormente. Por consiguiente, en una realización particular descrita aquí, la expresión de la molécula de DBF1 se combina con una molécula de señalización de la ruta que depende de ABA, así como con una molécula de señalización de la ruta independiente de ABA.
- La proteína zmDBF1 como la identificada en la presente invención también tiene homólogos en otras especies de plantas. Los inventores fueron capaces de identificar los homólogos más cercanos de Arabidopsis: AAF87854 y T02511, el homólogo más cercano de Atriplex hortensis: AAF76898 y el homólogo más cercano de Lupinus polyphyllis PZ02-LUPPO. Como para las plantas monocotiledóneas, más particularmente plantas de cultivo, también se encontraron homólogos de DBF1 de la caña de azúcar y homólogos de DBF1 del arroz. Un ejemplo de un homólogo de DBF1 del arroz que se agrupa cercanamente con DBF1 se muestra en la figura 7. La secuencia de ADN del homólogo de arroz se representa en la SEQ ID NO 15 y la correspondiente secuencia de proteína se representa en la SEQ ID NO 16 (véase el ejemplo 8).
- Por consiguiente, la memoria descriptiva describe el uso de homólogos de los ácidos nucleicos y proteínas ZmDBF1 para todas las aplicaciones descritas para los ácidos nucleicos y proteínas ZmDBF1 pero con dichos ácidos nucleicos y proteínas derivados de otras especies de plantas.
- La memoria descriptiva describe más particularmente el uso de los homólogos de DBF1 del arroz tal como se presentan en la SEQ ID NO 15, por ejemplo, en un vector descrito aquí y/o en las células huésped y en las plantas transgénicas descritas aquí y/o en los métodos descritos en la presente invención.
- La memoria descriptiva describe un vector, una célula huésped o una célula, tejido, o planta transgénicos que contienen un ácido nucleico que tiene una secuencia como la representada en la SEQ ID NO 15.
- La memoria descriptiva describe además el uso de cualquiera de las secuencias como las representadas en la SEQ ID NO 15 o 16, o un vector o una célula huésped que comprende cualquiera de dichas secuencias, en cualquiera de los métodos descritos aquí.
- Los genes y los métodos de la presente invención son particularmente útiles para la producción de células huésped u organismos huésped con crecimiento y/o rendimiento modulado (por ejemplo, mayor) bajo condiciones estresadas y/o no estresadas. Esto se puede lograr al influir directamente en el nivel de expresión y/o el nivel de actividad de los genes DBF1 o proteínas DBF1 de la presente invención en dicha célula huésped u organismo huésped. Más particularmente, se puede lograr influir en el nivel de expresión y/o de actividad de DBF1 mediante el uso del gen endógeno DBF1 o la proteína DBF1 de la célula huésped, o mediante el uso de un transgén DBF1, o mediante el uso de una proteína exógena DBF1.
- Alternativamente, la modulación del crecimiento y/o el rendimiento con los genes y los métodos de la presente invención también se puede lograr indirectamente influyendo sobre el nivel de expresión y/o actividad de otros genes de interés, por ejemplo otros genes de tolerancia al estrés o inducibles por estrés, u otros genes reguladores del crecimiento. Esto se puede hacer elaborando un constructo en el que se pone ese gen particular bajo el control de un promotor que contiene al menos un elemento DRE, e introducir simultáneamente ese constructo en una célula huésped junto con la proteína DBF1 de la presente invención. El efecto es que la proteína DBF1 puede ser capaz de activar la expresión de dicho gen y para conferir características alteradas de crecimiento para esa célula huésped.
- La introducción simultánea de la proteína DBF1 con dicho constructo puede lograrse de diferentes maneras: el gen endógeno DBF1 o la proteína de la célula huésped pueden ser activados, se puede introducir un transgén que codifica DBF1 en la célula huésped, o se puede administrar la proteína DBF1 a la célula huésped.
- Definiciones y elaboraciones de las realizaciones

A todo lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprende", y sus variaciones se entenderá que implican la inclusión de un número entero establecido o etapa o grupo de enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

5 Tal como se utiliza aquí, el término "derivado de" debe entenderse que indica que un entero particular o grupo de números enteros se ha originado a partir de las especies especificadas, pero no necesariamente ha sido obtenido directamente a partir de la fuente especificada.

10 Los términos "proteína(s)", "péptido(s)" u "oligopéptido(s)", cuando se usan en la presente memoria se refieren a aminoácidos en una forma polimérica de cualquier longitud. Dichos términos incluyen también modificaciones conocidas de aminoácidos tales como la formación de enlaces disulfuro, cisteinilación, oxidación, glutationilación, metilación, acetilación, farnesilación, biotinilación, estearoilación, formilación, adición de ácido lipoico, fosforilación, sulfatación, ubiquitinación, miristoilación, palmitoilación, geranilgeranilación, ciclación (por ejemplo, formación de ácido piroglutámico), oxidación, desamidación, deshidratación, glicosilación (por ejemplo pentosas, hexosaminas, N-acetilhexosaminas, desoxihexosas, hexosas, ácido siálico, etc.), acilación y marcadores radiactivos (por ejemplo ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, ¹⁴C, ³²P, ³³P, ³H), así como residuos de aminoácidos de origen no natural, residuos de L-aminoácidos y residuos de D-aminoácidos.

20 Tabla 1: Propiedades de los aminoácidos de origen natural.

Propiedades de carga / hidrofobicidad	Grupo lateral	Aminoácido
hidrófobos no polares	alifático	Ala, Ile, Leu, Val
	alifático, contiene S	Met
	aromático	Phe, Trp
	imino	Pro
polares no cargados	alifático	Gly
	amida	Asn, Gln
	aromático	Tyr
	hidroxilo	Ser, Thr
	sulfhidrilo	Cys
cargados positivamente	básico	Arg, His, Lys
	ácido	Asp, Gly

25 "Homólogos" de una proteína son aquellos péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas y enzimas que contienen sustituciones de aminoácidos, supresiones y/o adiciones con relación a dicha proteína con respecto a cuál de ellos son un homólogo sin alterar una o más de sus propiedades funcionales, en particular sin reducir la actividad de la resultante. Por ejemplo, un homólogo de dicha proteína consistirá de una variante bioactiva de una secuencia de aminoácidos de dicha proteína. Para producir tales homólogos, los aminoácidos presentes en dicha proteína pueden ser reemplazados por otros aminoácidos que tengan propiedades similares, por ejemplo hidrofobicidad, hidroflicidad, momento hidrófobo, antigenicidad, propensión a formar o romper estructuras helicoidales α o estructuras de lámina β , y así sucesivamente. Una visión general de las propiedades físicas y químicas de los aminoácidos se presenta en la Tabla 1.

35 Dos formas especiales de homología, ortólogos y parálogos, son conceptos evolutivos utilizados para describir relaciones ancestrales de los genes. El término "parálogos" se refiere a las duplicaciones de genes dentro del genoma de una especie, que conduce a genes parálogos. El término "ortólogos" se relaciona con genes homólogos en organismos diferentes, debido a una relación ancestral. La memoria descriptiva también se refiere a homólogos, parálogos y ortólogos de las proteínas de acuerdo con la invención. Las variantes de sustitución de una proteína descrita aquí son aquellas en las que al menos un residuo en dicha secuencia de aminoácidos de la proteína ha sido removido y se ha insertado un residuo diferente en su lugar. Las sustituciones de aminoácidos son típicamente de residuos individuales, pero pueden agruparse dependiendo de las restricciones funcionales colocadas sobre el polipéptido; las inserciones normalmente serán del orden de aproximadamente 1 a 10 residuos de aminoácidos y las supresiones variarán en un rango de aproximadamente 1 a 20 residuos. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos comprenderán sustituciones conservadoras de aminoácidos, tales como aquellas descritas más arriba.

Las variantes por inserción de la secuencia de aminoácidos de una proteína de la invención son aquellas en las que se introducen uno o más residuos de aminoácidos en un sitio predeterminado en dicha proteína. Las inserciones pueden comprender fusiones en el terminal amino y/o en el terminal carboxilo así como inserciones dentro de la secuencia de aminoácidos individuales o múltiples. Generalmente, las inserciones dentro de la secuencia de aminoácidos serán más pequeñas que las fusiones en el terminal amino o en el terminal carboxilo, del orden de aproximadamente 1 a 10 residuos. Los ejemplos de proteínas o péptidos de fusión en los terminales amino o carboxilo incluyen el dominio de enlazamiento o el dominio de activación de un activador transcripcional como se utiliza en el sistema de doble híbrido en levadura, las proteínas de recubrimiento de fago, etiqueta de (histidina)₆, glutationa S-transferasa, proteína A, proteína de enlazamiento de maltosa, dihidrofolato reductasa, epítipo Tag-100 (EETARFQPGYRS), epítipo c-myc (EQKLISEEDL), epítipo FLAG® (DYKDDDK), lacZ, CMP (péptido de enlazamiento de calmodulina), epítipo HA (YPYDVPDYA), epítipo de proteína C (EDQVDPRLIDGK) y epítipo de VSV (YTDIEMNRLGK).

Las variantes de supresión de una proteína de la invención se caracterizan por la remoción de uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de dicha proteína.

Las variantes de aminoácidos de una proteína de la invención se pueden elaborar fácilmente utilizando técnicas de síntesis de péptidos bien conocidas en la técnica, tales como síntesis de péptidos en fase sólida y similares, o por medio de manipulaciones de ADN recombinante. Las manipulaciones de secuencias de ADN para producir variantes de proteínas, que se manifiestan como variantes por sustitución, inserción o supresión son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, las técnicas para elaborar mutaciones por sustitución en sitios predeterminados en el ADN que tiene una secuencia conocida son bien conocidas por aquellos capacitados en la técnica, tales como por mutagénesis M13, el kit de mutagénesis in vitro T7-Gen (USB, Cleveland, OH), el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange (Stratagene, San Diego, CA), la mutagénesis dirigida al sitio mediada por PCR u otros protocolos de mutagénesis dirigida al sitio. Otra alternativa para manipular secuencias de ADN para producir proteínas variantes, que se manifiestan como variantes por sustitución, de inserción o de supresión comprende una modificación génica dirigida in vivo que puede ser lograda por medio de oligonucleótidos quiméricos de ARN / ADN como se describe por ejemplo en (Palmgren 1997; Yoon et al. 1996).

El "valor E" se utiliza para indicar el valor esperado. El número de alineaciones diferentes con puntuaciones equivalentes a o mejores que S que se espera que ocurran en una búsqueda de base de datos por casualidad. Cuanto menor sea el valor E, más significativa es la puntuación (<http://www.Ncbi.Nlm.Nih.gov/BLAST/tutorial/Altschul-1.html#head2>).

Los "derivados" de una proteína descritos aquí son aquellos péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas y enzimas que comprenden al menos aproximadamente cinco residuos de aminoácidos contiguos de dicho polipéptido pero que retienen la actividad biológica de dicha proteína. Un "derivado" puede comprender además residuos de aminoácidos adicionales de origen natural, glicosilados alterados, acilados o de origen no natural en comparación con la secuencia de aminoácidos de una forma de origen natural de dicho polipéptido. Alternativa o adicionalmente, un derivado puede comprender uno o más sustituyentes no aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de una forma de origen natural de dicho polipéptido, por ejemplo una molécula reportera u otro ligando, enlazado en forma covalente o no covalente a la secuencia de aminoácidos tal como, por ejemplo, una molécula reportera que está enlazada a la misma para facilitar su detección.

Por "inmunológicamente activo" se entiende que una molécula o fragmentos específicos de la misma, tales como epítopos o haptenos son reconocidos por, es decir, enlazados a anticuerpos.

La memoria descriptiva también describe homólogos, derivados y/o fragmentos inmunológicamente activos de cualquiera entre el factor de enlazamiento de DRE (DBF1) o un homólogo, derivado o fragmento del mismo tal como se define más arriba.

Los "anticuerpos" incluyen anticuerpos monoclonales, policlonales, sintéticos, o de camello de cadena pesada así como fragmentos de anticuerpos tales como fragmentos Fab, Fv o scFv. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar por medio de técnicas como se describió anteriormente por ejemplo, (Liddle & Cryer 1991), que comprende la fusión de células de mieloma de ratón con células de bazo derivadas de animales inmunizados. Además, pueden obtenerse anticuerpos o fragmentos de los mismos con una molécula o fragmentos de la misma mediante el uso de métodos como los descritos, por ejemplo en (Harlow & Carril 1988). En el caso de anticuerpos dirigidos contra péptidos pequeños tales como fragmentos de una proteína de la invención, dichos péptidos se acoplan generalmente a una proteína portadora antes de la inmunización de los animales. Tales portadores de proteína incluyen a la hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA), ovoalbúmina y toxoide tetánico. La proteína portadora mejora la respuesta inmune del animal y proporciona epítopos para los sitios de enlazamiento del receptor de células T. El término "anticuerpos" incluye además derivados de los mismos tales como anticuerpos marcados. Las etiquetas de anticuerpos incluyen fosfatasa alcalina, PKH2, PKH26, PKH67, fluoresceína (FITC), Hoechst 33258, R-ficoeritrina (PE), rodamina (TRITC), Quantum Red, Rojo Texas, Cy3, biotina, agarosa, peroxidasa, esferas de oro y marcadores radiactivos (por ejemplo, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, ¹⁴C, ³²P, ³³P, ³H). Las

herramientas en biología molecular que dependen de anticuerpos contra una proteína incluyen análisis de transferencias en gel de la proteína, la selección de bibliotecas de expresión que permite la identificación de genes, métodos cuantitativos de proteínas incluyendo ELISA y RIA, purificación por inmunoafinidad de proteínas, inmunoprecipitación de proteínas, por ejemplo (Magyar et al. 1997) e inmunolocalización. Otros usos de los anticuerpos y especialmente de anticuerpos de péptidos incluyen el estudio del procesamiento proteolítico (Loffler et al. 1994; Woulfe et al. 1994), la determinación de sitios activos de la proteína (Lerner 1982), el estudio del procesamiento del precursor y post-traducciona (Baron & Baltimore 1982; Lerner et al. 1981; Semler et al. 1982), la identificación de dominios de las proteínas involucrados en las interacciones proteína-proteína (Murakami et al. 1992) y el estudio del uso del exón en la expresión génica (Tamura et al. 1991).

Incorporados en la presente memoria descriptiva están los anticuerpos que reconocen un factor de enlazamiento DRE tales como DBF1 o un homólogo, derivado o fragmento del mismo tal como se definió más arriba.

Los términos "gen(es)", "polinucleótido(s)", "secuencia(s) de ácido nucleico", "secuencia(s) de nucleótidos", "secuencia(s) de ADN" o "molécula(s) de ácido nucleico", cuando se usan aquí, se refieren a los nucleótidos, ya sea ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una combinación de ambos, en una forma polimérica de cualquier longitud. Dichos términos incluyen además ADN y ARN monocatenarios y bicatenarios. Dichos términos incluyen también modificaciones conocidas de nucleótidos, tales como metilación, ciclización y 'taonamientos' y la sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo tal como inosina. Las modificaciones de nucleótidos incluyen la adición de acridina, amina, biotina, azul cascada, colesterol, Cy3®, Cy5®, Cy5.5®, Dabcilo, digoxigenina, dinitrofenilo, Edans, 6-FAM, fluoresceína 3'-glicerilo, HEX, IRD-700, IRD-800, JOE, psoraleno fosfato, rodamina, ROX, tiol (SH), espaciadores, TAMRA, TET, AMCA-S®, SE, BODIPY®, Marina Blue®, Pacific Blue®, Oregon Green®, Rhodamine Green®, Rhodamine Red®, Rhodol Green® y Texas Red®. Las modificaciones de la columna vertebral de los polinucleótidos incluyen metilfosfonato, ARN 2'-OMe-metilfosfonato, fosforotiorato, ARN, 2'-OMeARN. Las modificaciones de bases incluyen 2-amino-dA, 2-aminopurina, 3'-(ddA), 3'dA (cordicepina), 7-deaza-dA, 8-Br-dA, 8-oxo-dA, N⁶-Me-dA, sitio abásico (dEspaciador), biotina dT, 2'-OMe-5ME-C, 2'-OMe-propinil-C, 3'-(5-Me-dC), 3'-(ddC), 5-Br-dC, 5-I-dC, 5-Me-dC, 5-F-dC, carboxi-dT, dA convertible, dC convertible, dG convertible, dT convertible, dU convertible, 7-deaza-dG, 8-Br-dG, 8-oxo-dG, O⁶-Me-dG, S6-DNP-dG, 4-metil-indol, 5-nitroindol, 2'-OMe-inosina, 2'-dl, O⁵-fenil-dl, 4-metil-indol, 2'-desoxinebularina, 5-nitroindol, 2-aminopurina, dP (análogo de purina), dK (análogo de la pirimidina), 3-nitropirrol, 2-tio-dT, 4-tio-dT, biotina-dT, carboxi-dT, O⁴-Me-dT, O⁴-triazol dT, 2'-OMe-propinil-U, 5-Br-dU, 2'-dU, 5-F-dU, 5-I-dU, O⁴-triazol dU y marcadores radioactivos (por ejemplo, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, ¹⁴C, ³²P, ³³P, ³H). Dichos términos también abarcan ácidos nucleicos peptídicos (PNA), un análogo de ADN en el que la columna vertebral es un pseudopéptido que consiste de unidades de N-(2-aminoetil)-glicina en lugar de un azúcar. Los PNA imitan el comportamiento del ADN y enlazan las cadenas complementarias de ácidos nucleicos. La columna vertebral neutra de PNA resulta en un enlazamiento más fuerte y en una mayor especificidad de lo que normalmente se alcanzaría. Además, las propiedades químicas, físicas y biológicas únicas del PNA han sido explotadas para producir herramientas biomoleculares poderosas, agentes antisentido y antígenos, sondas moleculares y biosensores. Por "molécula de ADN recombinante" o "gen quimérico" se entiende un ADN híbrido producido por unión de piezas de ADN de diferentes fuentes. Por "secuencia heteróloga de nucleótidos" se entiende una secuencia que no es de origen natural con la secuencia del promotor. Si bien esta secuencia de nucleótidos es heteróloga a la secuencia del promotor, puede ser homóloga, o nativa, o heteróloga, o foránea, a la planta huésped. "Cadena de sentido" se refiere a la cadena de una molécula de ADN bicatenaria que es homóloga a una transcripción de ARNm de la misma. La "cadena anti-sentido" contiene una secuencia invertida, que es complementaria a aquella de la "cadena sentido".

Una "secuencia de codificación" o "marco de lectura abierto" u "ORF" se define como una secuencia de nucleótidos que puede ser transcrita en ARNm y/o traducida en un polipéptido cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas, es decir, cuando dicha secuencia de codificación u ORF está presente en un formato expresable. Dicha secuencia de codificación de ORF está delimitada por un codón de inicio de la traducción 5' y un codón de detención de la traducción 3'. Una secuencia de codificación u ORF puede incluir, pero no se limita a ARN, ARNm, ADNc, secuencias recombinantes de nucleótidos, secuencias de nucleótidos fabricadas en forma sintética o ADN genómico. Dicha secuencia de codificación u ORF puede ser interrumpida por medio de secuencias de ácido nucleico intervinientes.

Los genes y secuencias de codificación que codifican esencialmente la misma proteína pero aislados de diferentes fuentes pueden consistir en secuencias de ácido nucleico sustancialmente divergentes. Recíprocamente, las secuencias de ácido nucleico sustancialmente divergentes pueden ser diseñadas para efectuar la expresión de esencialmente la misma proteína. Dichas secuencias de ácido nucleico son el resultado, por ejemplo de la existencia de diferentes alelos de un gen dado, de la degeneración del código genético o de diferencias en el uso de codones. Por lo tanto, como se indica en la Tabla 2, aminoácidos tales como la metionina y el triptófano son codificados por un solo codón mientras que otros aminoácidos tales como arginina, leucina y serina pueden ser traducidos cada uno a partir hasta de seis codones diferentes. Las diferencias en el uso de codones preferidos se ilustra a continuación para *Agrobacterium tumefaciens* (una bacteria), *A. thaliana*, *M. sativa* (dos plantas dicotiledóneas) y *Oryza sativa* (una planta monocotiledónea). Estos ejemplos fueron extraídos de (<http://www.kazusa.or.jp/codon>). Para dar un ejemplo, el codón GGC (para glicina) es el codón más frecuentemente utilizado en *A. tumefaciens* (36,2%), es el

segundo codón más frecuentemente utilizado en *O. sativa* pero se utiliza con frecuencias mucho más bajas en *A. thaliana* y *M. sativa* (9% y 8,4%, respectivamente). De los cuatro posibles codones que codifican glicina (véase la Tabla 2), dicho codón GGC es más preferiblemente utilizado en *A. tumefaciens* y *O. sativa*. Sin embargo, en *A. thaliana* este es el codón GGA (y GGU) mientras que en *M. sativa* este es el codón GGU (y GGA).

5

Tabla 2. La degeneración del código genético.

Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra	Codones posibles					
Alanina	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
Arginina	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Asparagina	Asn	N	AAC	AAU				
Ácido aspártico	Asp	D	GAC	GAU				
Cisteína	Cys	C	UGC	UGU				
Ácido glutámico	Glu	E	GAA	GAG				
Glutamina	Gln	Q	CAA	CAG				
Glicina	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		
Histidina	His	H	CAC	CAU				
Isoleucina	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
Leucina	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
Lisina	Lys	K	AAA	AAG				
Metionina	Met	M	AUG					
Fenilalanina	Phe	F	UUC	UUU				
Prolina	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
Serina	Ser	S	AGC	AGU	UCA	ucc	UCG	UCU
Treonina	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
Triptófano	Trp	W	UGG					
Tirosina	Tyr	Y	UAC	UAU				
Valina	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
			Posibles codones de "DETENCIÓN"					
			UAA	UAG	UGA			

10 "Hibridación" es el proceso en el que las secuencias de nucleótidos complementarias sustancialmente homólogas hibridan entre sí. El proceso de hibridación puede ocurrir enteramente en solución, es decir ambos ácidos nucleicos complementarios están en solución. Las herramientas en biología molecular que confían en tal proceso incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, y todos los métodos basados en la misma), hibridación sustractiva, extensión aleatoria del cebador, mapeo de la nucleasa S1, extensión de cebador, transcripción inversa, síntesis de ADNc, despliegue diferencial de los ARN, y determinación de la secuencia de ADN. El proceso de hibridación también puede ocurrir con uno de los ácidos nucleicos complementarios inmovilizado a una matriz tal como cuentas magnéticas, cuentas de Sefarosa o cualquier otra resina. Las herramientas en biología molecular que confían en tal proceso incluyen el aislamiento de ARNm con una cola de poli (A+). El proceso de hibridación puede ocurrir además con uno de los ácidos nucleicos complementarios inmovilizado a un soporte sólido tal como una membrana de nitrocelulosa o de nylon o inmovilizado por ejemplo por fotolitografía, por ejemplo a un soporte de vidrio silíceo (este último conocido como arreglos de ácido nucleico o microarreglos o como chips de ácido nucleico). Las herramientas en biología molecular que confían en tal proceso incluyen análisis de transferencias en gel de ARN y ADN,

20

5 hibridación de colonias, hibridación en placa, hibridación in situ e hibridación de microarreglos. A fin de permitir que se produzca la hibridación, las moléculas de ácido nucleico son generalmente desnaturalizadas térmica o químicamente para fundir una cadena doble en dos cadenas sencillas y/o para remover horquillas u otras estructuras secundarias de ácidos nucleicos monocatenarios. La rigurosidad de la hibridación está influenciada por condiciones tales como la temperatura, concentración de sal y composición del amortiguador de hibridación. Las condiciones de alta rigurosidad para la hibridación incluyen alta temperatura y/o baja concentración de sal (las sales incluyen NaCl y citrato de Na₃) y/o la inclusión de formamida en el amortiguador de hibridación y/o disminución de la concentración de compuestos tales como SDS (detergente) en el amortiguador de hibridación y/o exclusión de compuestos tales como sulfato de dextrano o polietilenglicol (promoción de hacinamiento molecular) del amortiguador de hibridación. Condiciones específicas para "hibridación específicamente" son por ejemplo: hibridación en condiciones rigurosas, tal como a una temperatura de 60° C seguido de lavados en 2xSSC, 0,1XSDS y 1X SSC, 0,1X SDS. Las condiciones convencionales de hibridación se describen por ejemplo en (Sambrook et al. 1989), pero la persona capacitada se dará cuenta que numerosas condiciones diferentes de hibridación se pueden diseñar en función de la homología conocida o la esperada y/o la longitud de la secuencia de ácido nucleico. Se prefieren particularmente condiciones de rigurosidad de hibridación suficientemente bajas para aislar ácidos nucleicos heterólogos a las secuencias de ADN de la invención definidas más arriba. Los elementos que contribuyen a dicha heterología incluyen alelismo, degeneración del código genético y diferencias en el uso del codón preferido como se discutió más arriba.

20 La memoria descriptiva describe el uso de secuencias de ADN de la invención que codifican un factor DBF1 de enlazamiento de DRE, un homólogo, un derivado y/o un fragmento inmunológicamente activo del mismo tal como se define más arriba en cualquier método de hibridación. Las secuencias de ADN tal como se definen en la presente invención puede estar interrumpidas por secuencias intervinientes. Por "secuencias intervinientes" se entiende cualquier secuencia de ácido nucleico que interrumpe una secuencia de codificación que comprende dicha secuencia de ADN de la invención o que interrumpe el formato expresable de una secuencia de ADN que comprende dicha secuencia de ADN de la invención. La remoción de la secuencia de interviniente restaura dicha secuencia de codificación o dicho formato expresable. Los ejemplos de secuencias intervinientes incluyen intrones, secuencias móviles de ADN tales como transposones y etiquetas de ADN, tales como por ejemplo, un ADN-T. Por "secuencia móvil de ADN" se entiende cualquier secuencia de ADN que puede ser movilizada como resultado de un evento de recombinación.

35 Para efectuar la expresión de una proteína en una célula, tejido u órgano, preferiblemente de origen vegetal, o bien la proteína puede ser introducida directamente en dicha célula, tal como por medio de microinyección o por medios balísticos o alternativamente, se puede introducir en dicha célula, tejido u órgano una molécula aislada de ácido nucleico que codifica dicha proteína, en un formato expresable.

40 Preferiblemente, la secuencia de ADN de la invención comprende una secuencia de codificación o un marco de lectura abierto (ORF) que codifica un factor DBF1 de enlazamiento de DRE o un fragmento del mismo como se definió más arriba. La proteína preferida de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de dicho factor de transcripción del dominio AP2/EREBP.

45 Por "vector" o "secuencia del vector" se entiende una secuencia de ADN, que puede ser introducida en un organismo mediante transformación y puede ser mantenida de forma estable en dicho organismo. El mantenimiento del vector es posible por ejemplo en cultivos de *Escherichia coli*, *A. tumefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*. Otros vectores tales como fagémidos y vectores cósmidos pueden ser mantenidos y multiplicados en bacterias y/o en virus. Las secuencias del vector generalmente comprenden un conjunto de sitios únicos reconocidos por enzimas de restricción, el sitio de clonación múltiple (MCS), en donde se pueden insertar una o más secuencias que no son del vector.

50 Por "secuencia que no es del vector" se entiende en consecuencia una secuencia de ADN que se integra en uno o más de los sitios del MCS comprendidos dentro de un vector.

55 Los "vectores de expresión" forman un subconjunto de vectores que, en virtud de incluir las secuencias reguladoras apropiadas que permiten la creación de un formato expresable para la(s) secuencia(s) insertada(s) que no es(son) del vector, lo que permite la expresión de la proteína codificada por dicha(s) secuencia(s) que no es(son) del vector. Los vectores de expresión son conocidos en la técnica que permiten la expresión de proteínas en organismos incluídas bacterias (por ejemplo, *E. coli*), hongos (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Pichia pastoris*), células de insecto (por ejemplo vectores de expresión de baculovirus), células animales (por ejemplo, células COS o CHO) y células de plantas (por ejemplo, vectores de expresión basados en el virus X de la patata, véase, por ejemplo Vance et al. 1998 - W09844097).

60 La presente invención incluye claramente cualquier vector o vector de expresión que contenga una secuencia de ADN que no es de vector que incluye la secuencia del promotor de acuerdo con la presente invención o una secuencia que no es del vector que codifica un factor DBF1 de enlazamiento de DRE, o un fragmento del mismo como se definió más arriba.

65

Como una alternativa a la producción de proteínas mediada por un vector de expresión en sistemas biológicos, se puede aplicar la síntesis química de proteínas. Los péptidos sintéticos se pueden fabricar en fase de solución o en fase sólida. La síntesis de péptidos en fase sólida (Merrifield, 1963) es, sin embargo, la forma más común e involucra la adición secuencial de aminoácidos para crear una cadena lineal de péptidos. La síntesis de péptidos en fase sólida incluye ciclos que constan de tres etapas: (i) la inmovilización del aminoácido del terminal carboxilo de la cadena peptídica en crecimiento a un soporte sólido o resina; (ii) ensamblaje de la cadena, un proceso que consiste de activación, acoplamiento y desprotección del aminoácido que va a ser añadido a la cadena peptídica en crecimiento; y (iii) la escisión que incluye la remoción de la cadena peptídica completada de la resina y la remoción de los grupos protectores de las cadenas laterales de aminoácidos. Los enfoques comunes en la síntesis de péptidos en fase sólida incluyen Fmoc / tBu (9-fluorenilmetiloxycarbonil/t-butilo) y Boc (t-butiloxycarbonilo) como los grupos protectores del terminal amino de los aminoácidos. Los grupos protectores de la cadena lateral de aminoácidos incluyen metilo (Me), formilo (CHO), etilo (Et), acetilo (Ac), t-butilo (t-Bu), anisilo, bencilo (Bzl), trifluoroacetilo (Tfa), N-hidroxisuccinimida (ONSu, OSu), benzoilo (Bz), 4-metilbencilo (Meb), tioanizilo, tiocresilo, benciloximetilo (Bom), 4-nitrofenilo (ONp), benciloxycarbonilo (Z), 2-nitrobenzoilo (NBz), 2-nitrofenilsulfenilo (Nps), 4-toluenosulfonilo (tosilo, Tos), pentafluorofenilo (Pfp), difenilmetilo (Dpm), 2-clorobenciloxycarbonilo (Cl-Z), 2,4,5-triclorofenilo, 2-bromobenciloxycarbonilo (Br-Z), trifenilmetilo (tritol, Trt), y 2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo (Pmc). Durante el ensamblaje de la cadena, se remueven Fmoc o Boc dando lugar a un terminal amino activado del residuo aminoácido enlazado a la cadena en crecimiento. El extremo terminal carboxilo del aminoácido entrante es activado por conversión en un éster altamente reactivo, por ejemplo, por HBTU. Con las tecnologías actuales (por ejemplo, un sintetizador PerSeptive Biosystems 9050, un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems Modelo 431), se puede fabricar péptidos lineales de hasta 50 residuos. Una serie de directrices están disponibles para producir péptidos que sean adecuados para uso en sistemas biológicos incluyendo (i) limitar el uso de aminoácidos difíciles tales como Cys, Met, Trp (se oxidan fácilmente y/o degradan durante la síntesis de péptidos) o arg; (ii) minimizar los aminoácidos hidrófobos (puede perjudicar la solubilidad del péptido), y (iii) evitar un ácido glutámico en el terminal amino (puede ciclarse hasta piroglutamato).

Por "formato expresable" se entiende que la molécula aislada de ácido nucleico está en una forma adecuada para ser transcrita en ARNm y/o traducida para producir una proteína, ya sea constitutivamente o después de inducción por medio de una señal intracelular o extracelular, tal como un estímulo o estrés ambiental (mitógenos, anoxia, hipoxia, temperatura, sal, luz, deshidratación, etc.) o un compuesto químico tal como IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) o tal como un antibiótico (tetraciclina, ampicilina, rifampicina, kanamicina), hormona (por ejemplo, giberelina, auxina, citoquinina, glucocorticoides, brasinoesteroides, etileno, ácido abscísico, etc.), análogo de la hormona (ácido yodoacético (IAA), 2,4-D, etc.), metal (zinc, cobre, hierro, etc.), o dexametasona, entre otros. Como será conocido para aquellos capacitados en la técnica, la expresión de una proteína funcional también puede requerir de una o más modificaciones posteriores a la traducción, tales como glicosilación, fosforilación, desfosforilación, o una o más interacciones proteína-proteína, entre otros. Todos estos procesos están incluidos dentro del alcance del término "formato expresable".

Preferiblemente, la expresión de una proteína en una célula, tejido, u órgano específicos, preferiblemente de origen vegetal, se efectúa mediante la introducción y expresión de una molécula aislada de ácido nucleico que codifica dicha proteína, tal como una molécula de ADNc, un gen genómico, una molécula sintética de oligonucleótido, una molécula de ARNm o un marco de lectura abierto, en dicha célula, tejido u órgano, en donde se coloca dicha molécula de ácido nucleico operativamente en conexión con secuencias reguladoras adecuadas, incluyendo un promotor, preferiblemente un promotor expresable en plantas, y una secuencia de terminación.

"Secuencia reguladora" se refiere a secuencias de ADN de control, que son necesarias para afectar la expresión de las secuencias de codificación a las que están ligadas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped. En procariontes, las secuencias de control generalmente incluyen promotores, sitios de enlazamiento ribosomal, y terminadores. En eucariotes generalmente las secuencias de control incluyen promotores, terminadores y potenciadores o silenciadores. El término "secuencia de control" pretende incluir, como mínimo, a todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales convenientes y que determinan cuándo, cuánto y donde se expresa un gen específico.

Referencia que se hace aquí a un "promotor" se debe tomar en su contexto más amplio e incluye las secuencias reguladoras de la transcripción derivadas de un gen genómico eucariótico clásico, que incluye la caja TATA que se requiere para la iniciación precisa de la transcripción, con o sin una secuencia de caja CCAAT y elementos reguladores adicionales (es decir, secuencias activadoras secuencia arriba, potenciadores y silenciadores) que alteran la expresión génica en respuesta a estímulos de desarrollo y/o externos, o en una forma específica del tejido.

El término "promotor" incluye también las secuencias reguladoras de la transcripción de un gen procarionte clásico, en cuyo caso puede incluir una secuencia de caja -35 y/o secuencias reguladoras de la transcripción de caja -10.

El término "promotor" se utiliza también para describir una molécula sintética o de fusión o un derivado que confiere, activa o potencia la expresión de una molécula de ácido nucleico en una célula, tejido u órgano.

Los promotores pueden contener copias adicionales de uno o más elementos reguladores específicos, para mejorar aún más la expresión y/o para alterar la expresión espacial y/o la expresión temporal de una molécula de ácido nucleico a la que están conectados operativamente. Tales elementos reguladores puede colocarse en forma adyacente a una secuencia heteróloga del promotor para dirigir la expresión de una molécula de ácido nucleico en respuesta por ejemplo, a cobre, glucocorticoides, dexametasona, tetraciclina, giberelina, cAMP, ácido abscísico, auxina, lesiones, etileno, jasmonato o ácido salicílico o para conferir expresión de una molécula de ácido nucleico a células, tejidos u órganos específicos tales como meristemas, hojas, raíces, embriones, flores, semillas o frutos.

En el contexto de la presente invención, preferiblemente el promotor es una secuencia del promotor expresable en una planta. Los promotores, sin embargo, que también funcionan o únicamente funcionan en células que no son de una planta tales como bacterias, células de levadura, células de insecto y células animales no están excluidos de la invención. Por "expresable en plantas" se entiende que la secuencia del promotor, incluyendo cualquiera de los elementos reguladores adicionales añadidos a la misma o contenidos en la misma, es al menos capaz de inducir, conferir, activar o mejorar la expresión en una célula, tejido u órgano de una planta, preferiblemente una célula, tejido u órgano de una planta monocotiledónea o dicotiledónea. El término "operable en una planta" cuando se utiliza aquí, con respecto a una secuencia de promotor, se tomará como equivalente a una secuencia de promotor expresable en una planta.

En el presente contexto, un "promotor regulado" o una "secuencia regulable de promotor" es un promotor que es capaz de conferir expresión sobre un gen estructural en una célula, tejido, u órgano particular o grupo de células, tejidos u órganos de una planta, opcionalmente bajo condiciones específicas, sin embargo generalmente no confiere expresión a través de la planta bajo todas las condiciones. Por consiguiente, una secuencia regulable de promotor puede ser una secuencia de promotor que confiere expresión sobre un gen al que está operativamente conectado en un lugar particular dentro de la planta o alternativamente, a través de la planta bajo un conjunto específico de condiciones, tales como después de la inducción de la expresión génica por un compuesto químico u otro provocador.

Preferiblemente, el promotor regulable utilizado en la realización de la presente invención confiere expresión en una ubicación específica dentro de la planta, ya sea constitutivamente o después de la inducción, sin embargo no en la planta completa bajo ninguna circunstancia. Incluidos dentro del alcance de tales promotores están las secuencias del promotor específico de la célula, las secuencias del promotor específico del tejido, las secuencias del promotor específico del órgano, las secuencias del promotor del gen específico del ciclo celular, secuencias inducibles del promotor y secuencias constitutivas del promotor que han sido modificadas para conferir expresión en una determinada parte de la planta en un momento dado, tal como mediante la integración de dicho promotor constitutivo dentro de un elemento genético transponible (Ac, Ds, Spm, En, u otro transposón). Aquellas personas capacitadas en la técnica serán conscientes de que un "promotor inducible" es un promotor cuya actividad transcripcional se incrementa o se induce en respuesta a un estímulo de desarrollo, químico, ambiental o físico. De manera similar, la persona capacitada entenderá que un "promotor constitutivo" es un promotor que es transcripcionalmente activo en la mayor parte, pero no necesariamente en todas las partes de un organismo, preferiblemente una planta, durante la mayor parte, pero no necesariamente todas las fases de su crecimiento y desarrollo. Contrariamente el término "promotor ubicuo" se entiende que hace referencia a un promotor que es transcripcionalmente activo en la mayor parte, pero no necesariamente todas las partes de un organismo, preferiblemente una planta.

Generalmente por "promotor débil" se entiende un promotor que dirige la expresión de una secuencia de codificación a un nivel bajo. Por "nivel bajo" se entiende a niveles de aproximadamente 1/10.000 de transcripciones hasta aproximadamente 1/100.000 de transcripciones, hasta aproximadamente 1/500.000 de transcripciones. Por el contrario, un "promotor fuerte" dirige la expresión de una secuencia de codificación a un nivel alto, o hasta aproximadamente 1/10 de transcripciones hasta aproximadamente 1/100 de transcripciones hasta aproximadamente 1/1.000 de transcripciones.

El término "específico de la célula" se usa para indicar que la expresión es predominantemente en una célula o tipo de célula particular, preferiblemente de origen vegetal, aunque no necesariamente de forma exclusiva en dicha célula o tipo de célula.

Asimismo, el término "específico del tejido" se usa para indicar que la expresión es predominantemente en un tejido o tipo de tejido particular, preferentemente de origen vegetal, aunque no necesariamente de forma exclusiva en dicho tejido o tejido de tipo.

Asimismo, el término "específico del órgano" se usa para indicar que la expresión es predominantemente en un órgano particular, preferentemente de origen vegetal, aunque no necesariamente de forma exclusiva en dicho órgano. "Específico de la raíz" significa que el promotor se expresa en la raíz únicamente y no en otros tejidos de la planta.

Por "preferido de la raíz" se entiende que la expresión de la secuencia heteróloga de nucleótidos es más abundante en la raíz, pero también podría tener bajos niveles de expresión en otras partes de la planta. Aunque un cierto nivel

de expresión de la secuencia heteróloga de nucleótidos se produce en otros tipos de tejidos vegetales, la expresión se presenta en forma más abundante en la raíz incluyendo las raíces primarias, laterales y adventicias.

5 Por "raíz" se entiende cualquier parte de la estructura de la raíz, que comprende la cofia, el meristemo apical, el protoderma, el meristemo a nivel del suelo, el procambium, la endodermis, la corteza, la corteza vascular, la epidermis, y similares.

10 Aquellos capacitados en la técnica fácilmente serán capaces de seleccionar secuencias apropiadas de promotores para uso en la regulación de la expresión apropiada del factor DBF1 de enlazamiento de DRE descrito anteriormente a partir de fuentes públicamente disponibles o fácilmente disponibles, sin una experimentación excesiva.

15 La colocación de una molécula de ácido nucleico bajo el control regulador de una secuencia del promotor, o en conexión operativa con una secuencia del promotor significa posicionar dicha molécula de ácido nucleico de tal manera que la expresión sea controlada por la secuencia del promotor. Un promotor está usualmente, pero no necesariamente, situado secuencia arriba, o en el extremo 5', y dentro de 2 kb del sitio de inicio de la transcripción, de la molécula de ácido nucleico que la regula. En la construcción de las combinaciones promotor heterólogo / gen estructural se prefiere generalmente posicionar el promotor a una distancia del sitio de inicio de la transcripción del gen que sea aproximadamente la misma que la distancia entre ese promotor y el gen que controla en su entorno natural (es decir, el gen a partir del cual se deriva el promotor). Como es conocido en la técnica, se puede acomodar alguna variación en esta distancia sin pérdida de función del promotor. De manera similar, el posicionamiento preferido de un elemento de la secuencia reguladora con respecto a un gen heterólogo que va a ser colocado bajo su control está definido por el posicionamiento del elemento en su entorno natural (es decir, el gen a partir del cual se deriva). De nuevo, como se conoce en la técnica, puede presentarse alguna variación en esta distancia.

25 "Expresión" significa la producción de una proteína o secuencia de nucleótidos en la propia célula o en un sistema libre de células. Incluye la transcripción en un producto de ARN, una modificación posterior a la transcripción y/o la traducción a un producto de proteína o polipéptido a partir de un ADN que codifica ese producto, así como posibles modificaciones postraduccionales.

30 "Operativamente enlazada(o)" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Una secuencia de control "operativamente enlazada" a una secuencia de codificación está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia de codificación se logra bajo condiciones compatibles con las secuencias de control. En caso de que la secuencia de control sea un promotor, es obvio para una persona capacitada que se usa preferiblemente un ácido nucleico bicatenario.

35 Los ejemplos de promotores adecuados para su uso en construcciones génicas de la presente invención incluyen a aquellos enumerados en la Tabla 3, entre otros. Los promotores enlistados en la Tabla 3 se proporcionan para los propósitos de ejemplificación únicamente y la presente invención no está limitada por la lista proporcionada aquí. Aquellos capacitados en la técnica estarán fácilmente en posición de proporcionar promotores adicionales que son útiles en la realización de la presente invención.

40 En el caso de promotores constitutivos o promotores que inducen la expresión a través de toda la planta, se prefiere que tales secuencias sean modificadas por medio de la adición de secuencias de nucleótidos derivadas de uno o más de los promotores específicos de los tejidos enlistados en la Tabla 3, o alternativamente, secuencias de nucleótidos derivadas de uno o más de los promotores inducibles específicos del tejido mencionados anteriormente, que confieren especificidad del tejido sobre el mismo. Por ejemplo, el promotor 35S del CaMV puede ser modificado por medio de la adición de la secuencia del promotor Adh1 de maíz, para conferir expresión específica de la raíz regulada anaeróbicamente sobre el mismo, como se describió anteriormente (Ellis et al. 1987). Otro ejemplo describe como conferir expresión génica específica de la raíz o abundante de la raíz mediante la fusión del promotor 35S de CaMV a elementos del gen GRP3 para la proteína rica en glicina del maíz (Feix y Wulff 2000 - W00015662). Tales modificaciones se pueden lograr mediante experimentación rutinaria por parte de aquellos capacitados en la técnica.

55 El término "terminador" se refiere a una secuencia de ADN al extremo de una unidad transcripcional que señala la terminación de la transcripción. Los terminadores son secuencias de ADN no traducidas 3' que contienen una señal de poliadenilación, que facilita la adición de secuencias de poliadenilato al extremo 3' de un transcrito primario. Los terminadores activos en células derivadas de virus, levaduras, mohos, bacterias, insectos, aves, mamíferos y plantas son conocidos y están descritos en la literatura. Pueden ser aislados de bacterias, hongos, virus, animales y/o plantas.

60 Los ejemplos de terminadores particularmente adecuados para uso en las construcciones génicas de la presente invención incluyen al terminador del gen de la nopalina sintasa (NOS) de *Agrobacterium tumefaciens*, a la secuencia terminadora del gen de la octopina sintasa (OCS) de *Agrobacterium tumefaciens*, a la secuencia terminadora del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), la secuencia terminadora de la ADP-glucosa pirofosforilasa de *Oryza sativa* (t3'Bt2), la secuencia terminadora del gen de la zeína de *Zea mays*, el terminador del gen *rbcS-1A*, y las

secuencias terminadoras del gen rbcS-3A, entre otras.

Aquellos capacitados en la técnica serán conscientes de secuencias adicionales del promotor y secuencias adicionales de terminación que pueden ser adecuadas para ser usadas en la realización de la invención. Tales secuencias pueden ser fácilmente utilizadas sin ninguna experimentación excesiva.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, "expresión ectópica" o "sobreexpresión ectópica" de un gen o de una proteína que les confieren a los patrones de expresión y/o a los niveles de expresión de dicho gen o proteína normalmente no se presentan en condiciones naturales. La expresión ectópica se puede lograr en una cantidad de formas, incluyendo enlazar operativamente una secuencia de codificación que codifica dicha proteína a un promotor homólogo o heterólogo aislado con el fin de crear un gen quimérico y/o enlazar operativamente dicha secuencia de codificación a su propio promotor aislado (es decir, el promotor no aislado que dirige naturalmente la expresión de dicha proteína) con el fin de crear una duplicación del gen recombinante o un efecto de multiplicación génica. Por "coexpresión ectópica" se entiende la expresión ectópica o sobreexpresión ectópica de dos o más genes o proteínas. El mismo o, más preferiblemente, promotores diferentes se utilizan para conferir expresión de dichos genes o proteínas.

Tabla 3. Ejemplos de promotores expresables en plantas para uso en la realización de la presente invención

I: PROMOTORES ESPECÍFICOS DE LA CÉLULA, ESPECÍFICOS DEL TEJIDO Y ESPECÍFICOS DE UN ÓRGANO		
FUENTE DEL GEN	PATRÓN DE EXPRESIÓN	REFERENCIA
α -amilasa (Amy32b)	aleurona	Lanahan et al., Plant Cell 4: 203 - 211, 1992; Skriver et al., Proc Natl Acad Sci USA 88: 7266 - 7270, 1991
gen tipo catepsina β	aleurona	Cejudo et al., Plant Mol Biol 20: 849 - 856, 1992
rolB de Agrobacterium rhizogenes	cambium	Nilsson et al., Physiol Plant 100: 456 - 462, 1997
AtPRP4	flores	http://salus.medium.edu/mmg/tierney/html
chalcona sintasa (chsA)	flores	Van der Meer et al, Plant Mol Biol 15: 95 - 109, 1990
LAT52	antera	Twel et al., Mol Gen Genet 217: 240-245, 1989
apetala-3	flores	
quitinasa	fruto (bayas, uvas, etc.)	Thomas et al. CSIRO Plant Industry, Urrbrae, South Australia, Australia; http://winetitles.com.au/gwrdc/csh95-1.html
rbcS-3A	tejido verde (por ejemplo hoja)	Lam et al., Plant Cell 2: 857 - 866, 1990; Tucker et al., Plant Physiol 113: 1303 - 1308, 1992
genes específicos de la hoja	hoja	Baszczynski et al, Nucl Acid Res 16: 4732, 1988
AtPRP4	hoja	http://salus.medium.edu/mmg/tierney/html
promotor del gen para adenina metiltransferasa del virus clorela	hoja	Mitra y Higgins, Plant Mol Biol 26: 85 - 93, 1994
promotor del gen aldP de arroz	hoja	Kagaya et al., Mol Gen Genet 248: 668 - 674, 1995
promotor rbcS de arroz o tomate	hoja	Kyozuka et al., Plant Physiol 102: 991 - 1000, 1993
Pinus cab-6	hoja	Yamamoto et al., Plant Cell Physiol 35: 773 - 778, 1994
promotor de la rubisco	hoja	

ES 2 391 765 T3

cab (proteína de enlazamiento de clorofila a/b)	hoja	
gen Blec4 de guisante	tejidos epidérmico floral y vegetativo	Mandaci y Dobres, Plant Mol Biol 34: 961 - 965
SAM22	hoja senescente	Crowell et al, Plant Mol Biol 16: 459 - 466, 1992
gen ltp (gen de transferencia de lípido)		Fleming et al., Plant J 2: 855 - 862, 1992
gen nif de R. japonicum	nódulo	Patente de los Estados Unidos No 4 803165
gen nifH de B. japonicum	nódulo	Patente de los Estados Unidos No 5008194
GmENOD40	nódulo	Yang et al., Plant J 3: 573 - 585, 1993
PEP carboxilasa (PEPC)	nódulo	Pathirana et al., Plant Mol Biol 20: 437 - 450, 1992
legaemoglobina (Lb)	nódulo	Gordon et al, J Exp Bot 44: 1453 - 1465, 1993
gen del virus baciliforme Tungro	floema	Bhattacharyya-Pakrasi et al, Plant J 4: 71 - 79, 1992
genes específicos del polen	polen; microespora	Albani et al., Plant Mol Biol 15: 605, 1990; Albani et al., Plant Mol Biol 16: 501, 1991
Zm13	polen	Guerrero et al, Mol Gen Genet 224: 161-168, 1993
gen apg	microespora	Twel et al., Sex Plant Reprod 6: 217 - 224, 1993
gen específico del polen del maíz	polen	Hamilton et al., Plant Mol Biol 18: 211 - 218, 1992
gen expresado en el polen de girasol	polen	Baltz et al., Plant J 2: 713 - 721, 1992
gen específico del polen de B. napus	polen; antera; tapetum	Arnoldo et al., J Cell Biochem, Resumen No. Y101, 204, 1992
genes expresables en la raíz	raíces	Tingey et al., EMBO J 6: 1, 1987
gen inducible por la auxina del tabaco	punta de la raíz	Van der Zaal et al., Plant Mol Biol 16: 983, 1991
β -tubulina	raíz	Oppenheimer et al., Gene 63: 87, 1988

(continuación)

I: PROMOTORES ESPECÍFICOS DE LA CÉLULA, ESPECÍFICOS DEL TEJIDO Y ESPECÍFICOS DE UN ÓRGANO		
FUENTE DEL GEN	PATRÓN DE EXPRESIÓN	REFERENCIA
genes específicos de la raíz de tabaco	raíz	Conkling et al, Plant Physiol 93:1203, 1990
gen G1-3b de B. napus	raíz	Patente de los Estados Unidos No 5401836
SbPRP1	raíces	Suzuki et al, Plant Mol Biol 21: 109 - 119, 1993
AtPRP1; AtPRP3	raíces; pelos radiculares	http://salus.medium.edu/mmg/ tierney/html
gen RD2	cortex de la raíz	http://www2.cnsu.edu/ncsu/research
gen TobRB7	vasculatura de la raíz	http://wwwcortex.edu/ncsu/research
AtPRP4	hojas; flores; primordios lateral de la raíz	http://salus.medium.edu/mmg/ terney/html
gens específicos de la semilla	semilla	Simon et al., Plant Mol Biol 5: 191, 1985; Scofield et al., J Biol Chem 262: 12202, 1987; Baszczynski et al., Plant Mol Biol 14:633, 1990
albúmina de la nuez del Brasil	semilla	Pearson et al., Plant Mol Biol 18: 235 - 245, 1992
legúmina	semilla	Ellis et al., Plant Mol Biol 10: 203 - 214, 1988
glutelina (arroz)	semilla	Takaiwa et al., Mol Gen Genet 208: 15 - 22, 1986; Takaiwa et al., FEBS Lett 221: 43 - 47, 1987
zeína	semilla	Matzke et al., Plant Mol Biol 14: 323 - 32, 1990
napA	semilla	Stalberg et al., Planta 199: 515 - 519, 1996
glutenina-1 de LMW y HMW del trigo	endospermo	Mol Gen Genet 216: 81 - 90, 1989; Nucl Acids Res 17: 461 - 462, 1989
SPA del trigo	semilla	Albani et al., Plant Cell 9: 171 - 184, 1997
zeína de 19 kDa del maíz, cZ19B1	semilla	WO0011177
mioinositol-1-Pi sintasa del maíz mi1ps	semilla	WO0011177
α , β , γ -gliadinas del trigo	endospermo	EMBO J 3: 1409 - 1415, 1984
promotor ltr1 de la cebada	endospermo	
hordeína B1, C, D, de la cebada	endospermo	Theor Appl Gen 98: 1253 - 1262, 1999; Plant J 4: 343 - 355, 1993; Mol Gen Genet 250: 750 - 60, 1996
DOF de la cebada	endospermo	Mena et al., Plant J 116: 53 - 62, 1998
blz2	endospermo	EP99106056.7
promotor sintético	endospermo	Vicente-Carbajosa et al., Plant J 13: 629 - 640, 1998
prolamina NRP33 del arroz	endospermo	Wu et al, Plant Cell Physiol 39: 885 - 889, 1998
α -globulina G1b-1 del arroz	endospermo	Wu et al, Plant Cell Physiol 39: 885 - 889, 1998

ES 2 391 765 T3

genes END del maíz	endospermo	WO0012733
END1 de cebada	endospermo	WO9808961
NUC1 de cebada	nucela	WO9808961
OSH1 del arroz	embrión	Sato et al, Proc Natl Acad Sci USA 93: 8117 - 8122, 1996
α -globulina REB/OHP-1 del arroz	endospermo	Nakase et al, Plant Mol Biol 33: 513 - 522, 1997
ADP-glucosa PP del arroz	endospermo	Trans Res 6: 157 - 168, 1997
familia de genes ESR del maíz	endospermo	Plant J 12: 235 - 246, 1997
α -kafirina del sorgo	endospermo	Plant Mol Biol 32: 1029 - 1035, 1996
KNOX	embrión	Postma-Haarsma et al., Plant Mol Biol 39: 257 - 271, 1999
oleosina del arroz	embrión y aleurona	Wu et al., J Biochem 123: 386, 1998
oleosina de girasol	semilla (embrión y semilla seca)	Cummins et al., Plant Mol Biol 19: 873 - 876, 1992
LEAFY	meristemo de brote	Weigel et al., Cell 69: 843 - 859, 1992
knat1 de Arabidopsis thaliana	meristemo de brote	Número de acceso AJ131822
kn1 de Malus domestica	meristemo de brote	Número de acceso Z71981
CLAVATA1	meristemo de brote	Número de acceso AF049870
genes específicos del estigma	estigma	Nasrallah et al., Proc Natl Acad Sci USA 85: 5551, 1988; Trick et al., Plant Mol Biol 15: 203, 1990
Gen de la patatina clase I	tubérculo	Liu et al., Plant Mol Biol 153: 386 - 395, 1991
arroz PCNA	meristemo	Kosugi et al., Nucl Acids Res 19: 1571 - 1576, 1991; Kosugi y Ohashi, Plant Cell 9: 1607 - 1619, 1997
tubulina TubA1 del guisante	células en división	Stotz y Long, Plant Mol Biol 41: 601 - 614, 1999
cdc2a de Arabidopsis	Células que se ciclizan	Chung y Parish, FEBS Lett 362: 215 - 219, 1995
Rop1A de Arabidopsis	Anteras; polen maduro + tubos de polen	Li et al., Plant Physiol 118: 407 - 417, 1998
AtDMC1 de Arabidopsis	Asociado de meiosis	Klimyuk y Jones, Plant J 11: 1 - 14, 1997
PS-IAA4/5 y PS-IAA6 de guisante	Inducible por auxina	Wong et al., Plant J 9: 587 - 599, 1996
Farnesiltransferasa de guisante	Tejidos meristemáticos; floema cercano a los tejidos en crecimiento; reprimido por azúcar y luz	Zhou et al., Plant J 12: 921 - 930, 1997
ciclina B1;1 (N. sylvestris) de tabaco	Células en división / tejido meristemático	Trehin et al., Plant Mol Biol. 35: 667 - 672, 1997
Ciclinas mitóticas CYS (tipo A) y CYM (tipo B) de Catharanthus roseus	Células en división / tejido meristemático	Ito et al., Plant J 11: 983 - 992, 1997
cyc1 At (= cyc B1;1) y cyc3aAt (tipo A) de Arabidopsis	Células en división / tejido meristemático	Shaul et al., Proc Natl Acad Sci USA 93: 4868 - 4872, 1996

ES 2 391 765 T3

Caja del promotor tef1 de Arabidopsis	Células en división / tejido meristemático	Regad et al., Mol Gen Genet 248: 703 - 711, 1995
cyc07 de Catharanthus roseus	Células en división / tejido meristemático	Ito et al., Plant Mol Biol 24: 863 - 878, 1994
II: EJEMPLOS DE PROMOTORES CONSTITUTIVOS		
FUENTE DEL GEN	PATRÓN DE EXPRESIÓN	REFERENCIA
Actina	constitutivo	McElroy et al., Plant Cell 2: 163 - 171, 1990
35S del CAMV	constitutivo	Odell et al., Nature 313: 810 - 812, 1985
19S del CaMV	constitutivo	Nilsson et al., Physiol Plant 100: 456 - 462, 1997
GOS2	constitutivo	de Pater et al, Plant J 2:837-844, 1992
ubiquitina	constitutivo	Christensen et al., Plant Mol Biol 18: 675 - 689, 1992
ciclofilina del arroz	constitutivo	Buchholz et al., Plant Mol Biol 25: 837 - 843, 1994
histona H3 del maíz	constitutivo	Lepetit et al., Mol Gen Genet 231: 276 - 285, 1992
histona H3 de alfalfa	constitutivo	Wu et al., Nucleic Acids Res 17: 3057 - 3063, 1989; Wu et al., Plant Mol Biol 11: 641 - 649, 1988
actina 2	constitutivo	An et al., Plant J 10: 107 - 121, 1996
III: EJEMPLOS DE PROMOTORES INDUCIBLES POR ESTRÉS		
NOMBRE	ESTRÉS	REFERENCIA
P5CS (delta(1)-pirrolina-5-carboxilato sintasa)	sal, agua	Zhang et al., Plant Sci 129: 81- 89, 1997
cor15a	frío	Hajela et al., Plant Physiol 93: 1246 - 1252, 1990
cor15b	frío	Wlihelm et al., Plant Mol Biol 23: 1073 - 1077, 1993
cor15a (-305 a +78 nt)	frío, sequía	Baker et al., Plant Mol Biol 24: 01 - 713, 1994
rd29	sal, sequía, frío	Kasuga et al., Nature Biotechnol 18: 287 - 291, 1999
Proteínas de choque por calor, incluyendo promotores artificiales que contienen el elemento de choque por calor (HSE)	calor	Barros et al., Plant Mol Biol 19 665 - 75, 1992. Marrs et al., Dev Genet 14: 27 - 41, 1993. Schoffl et al., Mol Gen Genet 217: 246 - 53, 1989.
smHSP (proteínas pequeñas de choque por calor)	calor	Waters et al., J Exp Bot 47: 325 - 338, 1996

(continuación)

III: EJEMPLOS DE PROMOTORES INDUCIBLES POR ESTRÉS		
NOMBRE	ESTRÉS	REFERENCIA
wcs120	frío	Ouellete et al., FEBS Lett 423: 324 - 328, 1998
ci7	frío	Kirch et al, Plant Mol Biol 33: 897 - 909, 1997
Adh	frío, sequía, hipoxia	Dolferus et al., Plant Physiol 105: 1075 - 87, 1994
pws18	sal y sequía	Joshee et al., Plant Cell Physiol 39: 64 - 72, 1998
ci21A	frío	Schneider et al., Plant Physiol 113: 335 - 45, 1997
Trg-31	sequía	Chaudhary et al., Plant Mol Biol 30: 1247 - 57, 1996
osmotina	osmótico	Raghothama et al., Plant Mol Biol 23: 1117 - 28, 1993
lapA	lesiones, ambiente	WO99/03977 University of California/ INRA
IV: EJEMPLOS DE PROMOTORES INDUCIBLES POR PATÓGENOS		
NOMBRE	PATÓGENO	REFERENCIA
RB7	Nemátodos de los nudos de la raíz (<i>Meloidogyne</i> spp.)	US5760386 - North Carolina State University; Opperman et al, Science 263: 221 - 23, 1994
PR-1, 2, 3, 4, 5, 8, 11	hongos, virus, bacterias	Ward et al, Plant Cell 3: 1085 - 1094, 1991; Reiss et al., 1996; Lebel et al, Plant J 16: 223 - 233, 1998; Melchers et al, Plant J 5: 469 - 480, 1994; Lawton et al, Plant Mol Biol, 19: 735 - 743, 1992
HMG2	nemátodos	WO9503690 - Virginia Tech Intellectual Properties Inc.
Abi3	Nemátodos de quistes (<i>Heterodera</i> spp.)	No publicada
ARM1	nemátodos	Barthels et al, Plant Cell 9: 2119 - 2134, 1997 WO 98/31822 - Plant Genetic Systems
Att0728	nemátodos	Barthels et al, Plant Cell 9: 2119 - 2134, 1997 PCT/EP98/07761
Att1712	nemátodos	Barthels et al, Plant Cell 9, 2119 - 2134, 1997 PCT/EP98/07761
Gst1	Diferentes tipos de patógenos	Strittmatter et al, Mol Plant-Microbe Interact 9: 68 - 73, 1996
LEMMI	nemátodos	WO 92/21757 - Plant Genetic Systems
CLE	geminivirus	PCT/EP99/03445 - CINESTAV
PDF1.2	Hongos incluyendo <i>Alternaria brassicicola</i> y <i>Botrytis cinerea</i>	Manners et al., Plant Mol Biol, 38: 1071 - 1080, 1998

Thi2.1	Hongos - <i>Fusarium oxysporum f sp. matthiolar</i>	Vignutelli et al, Plant J 14: 285 - 295, 1998
DB#226	nemátodos	Bird and Wilson, Mol Plant-Microbe Interact 7:419-442, 1994 WO 95.322888
DB#280	nemátodos	Bird and Wilson, Mol Plant-Microbe Interact 7:419-442, 1994 WO 95.322888
Cat2	nemátodos	Niebel et al, Mol Plant-Microbe Interact 8: 371-378, 1995
uTub	nemátodos	Aristizabal et al (1996), 8th International Congress on Plant - Microbe Interaction, Knoxville US B- 29
sHSP	nemátodos	Fenoll et al (1997) En: Cellular and molecular aspects of plant-nematode interactions. Kluwer Academic, C. Fenoll, F. M. W. Grundler y S.A. Ohl (Eds.),
Tsw12	nemátodos	Fenoll et al (1997) En: Cellular and molecular aspects of plant-nematode interactions. Kluwer Academic, C. Fenoll, F. M. W. Grundler y S.A. Ohl (Eds.)
Hs1(pro1)	nemátodos	WO 98/122335 – Jung
nsLTP	viral, hongos, bacterias	Molina y Garcia-Olmedo FEBS Lett, 316: 119 - 122, 1993
RIP	viral, hongos	Tumer et al., Proc Natl Acad Sci USA 94: 3866 - 3871,1997

Preferiblemente, la secuencia del promotor descrita aquí está operativamente enlazada a una secuencia de codificación o marco de lectura abierto (ORF) que codifica un factor DBF1 de enlazamiento de DRE o un homólogo, derivado y/o un fragmento inmunológicamente activo del mismo como se definió más arriba.

5 "Versión negativa dominante o variante" se refiere a una proteína mutante, que interfiere con la actividad de la correspondiente proteína de tipo silvestre.

10 "Reducción de la expresión" como se usa aquí, significa la disminución de los niveles de expresión génica y/o de los niveles de producto génico activo y/o de los niveles de actividad del producto génico. La disminución en la expresión puede llevarse a cabo por ejemplo por medio de la adición de secuencias de codificación o partes de las mismas en una orientación sentido (si resulta en supresión conjunta), o en una orientación antisentido con respecto a una secuencia del promotor y, además, por ejemplo, por medio de mutagénesis de inserción (por ejemplo, inserción de ADN-T o inserción de un transposón) o por medio de estrategias de silenciamiento de genes como describen por ejemplo Angell y Baulcombe 1998 (W09836083), Lowe et al. 1989 (W09853083), Lederer et al. 1999 (W09915682) o Wang et al. 1999 (W09953050). Las construcciones genéticas destinadas a silenciar la expresión génica pueden tener la secuencia de nucleótidos de dicho gen (o una o más partes del mismo) contenida en la misma en una orientación sentido y/o antisentido con respecto a la secuencia del promotor. Otro método para reducir la expresión génica comprende el uso de ribozimas, por ejemplo como se describe en Atkins et al. 1994 (W09400012), Lenee et al. 1995 (W09503404), Lutziger et al. 2000 (WO0000619), Prinsen et al. 1997 (W09713865) y Scott et al. 1997 (W09738116).

25 La modulación, incluyendo la disminución, del nivel de productos génicos activos o de actividad del producto génico se puede lograr mediante la administración o la exposición de células, tejidos, órganos u organismos a dicho producto génico, un homólogo, análogo, derivado y/o fragmento inmunológicamente activo del mismo. La inmunomodulación es otro ejemplo de una técnica capaz de reducir los niveles de producto génico activo y/o la actividad del producto génico y comprende la administración de o la exposición a, o de anticuerpos que se expresan a dicho producto génico o en células, tejidos, órganos u organismos en donde los niveles de dicho producto génico y/o actividad del producto génico van a ser modulados. Tales anticuerpos comprenden "planticuerpos", anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos IgG y anticuerpos de camello de cadena pesada así como fragmentos de los mismos.

La modulación, incluyendo la disminución, del nivel de productos génicos activos o de actividad del producto génico se puede lograr adicionalmente mediante la administración o la exposición de células, tejidos, órganos u organismos a un inhibidor o activador de dicho producto génico o la actividad del mismo. Tales inhibidores o activadores incluyen proteínas (que incluyen por ejemplo, proteinasas y quinasas) y compuestos químicos.

5 En el contexto de la memoria descriptiva, el término "agonista" se refiere a una sustancia que puede ser o bien un protagonista o un antagonista, es decir, puede tener efectos positivos o negativos, puede ser un potenciador o un inhibidor o también un modulador.

10 Por "destino de la célula y/o desarrollo de la planta y/o morfología de la planta y/o bioquímica y/o fisiología" se entiende que una o más de las características de desarrollo y/o morfológicas y/o bioquímicas y/o fisiológicas de una planta se ven alteradas por la realización de una o más etapas relacionadas con la invención descrita en la presente memoria.

15 El "destino de la célula" se refiere al tipo de célula o a las características celulares de una célula particular que se produce durante el desarrollo de la planta o de un proceso celular para la misma. El "desarrollo de la planta" o el término "característica de desarrollo de la planta" o términos similares, cuando se usa en este documento, deberá entenderse que significa cualquier proceso celular de una planta que está involucrado en la determinación del destino de desarrollo de una célula vegetal, en particular el tipo específico de tejido u órgano dentro del cual se desarrollará una célula progenitora. Los procesos celulares relevantes para el desarrollo de las plantas serán conocidos por aquellos capacitados en la técnica. Tales procesos incluyen, por ejemplo, morfogénesis, fotomorfogénesis, desarrollo de brotes, desarrollo de la raíz, desarrollo vegetativo, desarrollo reproductivo, alargamiento del tallo, floración, y mecanismos reguladores involucrados en la determinación del destino celular, en particular un proceso o un proceso regulador que involucra el ciclo celular.

20 "Morfología de la planta" o el término "característica morfológica de la planta" o un término similar, cuando se usa aquí, será entendido por las personas capacitadas en la técnica para referirse a la apariencia externa de una planta, incluyendo una o más características estructurales o combinación de características estructurales de la misma. Tales características estructurales incluyen la forma, tamaño, número, posición, color, textura, disposición, y formación de patrones de cualquier tipo de célula, tejido u órganos o grupos de células, tejidos u órganos de una planta, incluyendo la raíz, tallo, hoja, brote, pecíolo, tricoma, flor, pétalo, estigma, estilo, estambre, polen, óvulo, semilla, embrión, endospermo, recubrimiento de la semilla, aleurona, fibra, fruto, cambium, madera, pulpa, parénquima, aerénquima, elemento de tamizaje, floema o tejido vascular, entre otros.

25 "Bioquímica de la planta" o el término "característica bioquímica de la planta" o un término similar, cuando se usa aquí, se entenderá por parte de las personas capacitadas en la técnica que se refiere a los procesos metabólicos y catalíticos de una planta, incluido el metabolismo primario y secundario y los productos de los mismos, incluyendo cualquiera de las moléculas pequeñas, macromoléculas o compuestos químicos, tales como, pero sin limitarse a almidones, azúcares, proteínas, péptidos, enzimas, hormonas, factores de crecimiento, moléculas de ácido nucleico, celulosas, hemicelulosas, polímeros de glucosa, lectinas, fibras, pigmentos tales como antocianinas, vitaminas, minerales, micronutrientes, o macronutrientes, que son producidos por las plantas.

30 "Fisiología vegetal" o el término "característica fisiológica vegetal" o un término similar, cuando se usan en este documento, se entenderá que se refieren a los procesos funcionales de una planta, incluyendo procesos de desarrollo, tales como crecimiento, expansión y diferenciación, desarrollo sexual, reproducción sexual, conjunto de semillas, desarrollo de semillas, llenado del grano, reproducción asexual, división celular, latencia, germinación, adaptación a la luz, fotosíntesis, expansión de la hoja, producción de fibra, crecimiento secundario o producción de madera, entre otros; las respuestas de una planta a factores aplicados externamente, tales como metales, compuestos químicos, hormonas, factores de crecimiento, el medio ambiente y factores de estrés ambiental (por ejemplo, anoxia, hipoxia, alta temperatura, baja temperatura, deshidratación, luz, duración del día, inundaciones, salinidad, metales pesados, entre otros), incluyendo respuestas adaptativas de las plantas a dichos factores aplicados externamente.

35 "Estrés ambiental" es una circunstancia provocada por los elementos presentes en el entorno que pueden incluir pero no se limitan a estrés por sequía, sal, deshidratación, calor, frío, congelación, anegamiento, lesiones, mecánico, estrés oxidativo, ozono, luz alta, metales pesados, privación de nutrientes, productos químicos tóxicos, patógenos (incluyendo virus, bacterias, hongos, insectos y nemátodos) y combinaciones de éstos.

40 El término "estrés ambiental" ha sido definido de diferentes maneras en el estado del arte y coincide en gran medida con el término "estrés osmótico". (Holmberg y Bülow, 1998, Trends plant sci. 3, 61 - 66), por ejemplo define diferentes factores de estrés ambiental que dan lugar a estrés abiótico. Salinidad, sequía, calor, enfriamiento y congelación son todos descritos como ejemplos de condiciones que inducen estrés osmótico. El término "estrés ambiental" tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva se refiere a cualquier efecto adverso sobre el metabolismo, el crecimiento o la viabilidad de la célula, tejido, semilla, órgano o planta completa que se produce por un factor de estrés ambiental no viviente o no biológico. Más particularmente, también abarca factores ambientales

tales como estrés hídrico (inundaciones, anegamiento, sequía, deshidratación), estrés anaeróbico (bajo nivel de oxígeno, CO₂, etc.), estrés aeróbico, estrés osmótico, estrés por salinidad, estrés por temperatura (calor / calor abrasador, frío, congelación, heladas) o la privación de nutrientes, estrés por contaminantes (metales pesados, productos químicos tóxicos), ozono, luz alta, patógenos (incluyendo virus, bacterias, hongos, insectos y nematodos) y combinaciones de los mismos.

El término "estrés anaeróbico" significa cualquier reducción en los niveles de oxígeno suficiente para producir un estrés como se definió aquí anteriormente, incluyendo hipoxia y anoxia.

El término "estrés por inundación" se refiere a cualquier estrés que está asociado con o inducido por inmersión prolongada o transitoria de una planta, parte de una planta, tejido o célula aislada en un medio líquido tal como ocurre durante el monzón, una estación húmeda, inundaciones repentinas o riego excesivo de las plantas, etc.

"Estrés por frío" y "estrés por calor" son estreses inducidos por temperaturas que están, respectivamente, por debajo o por encima del intervalo óptimo de temperaturas para el crecimiento de una especie vegetal particular. Tales rangos óptimos de temperatura de crecimiento se determinan fácilmente o son conocidas por aquellos capacitados en la técnica.

"Estrés por deshidratación" es cualquier estrés que está asociado con o inducido por la pérdida de agua, turgencia reducida o contenido reducido de agua de una célula, tejido, órgano o planta entera. El "estrés por sequía" se refiere a cualquier estrés, que es inducido por o está asociado con la privación de agua o el suministro reducido de agua a una célula, tejido, órgano u organismo. "Estrés oxidativo" se refiere a cualquier estrés, que aumenta el nivel intracelular de especies reactivas de oxígeno.

Los términos "estrés inducido por salinidad", "estrés salino" o un término similar se refieren a cualquier estrés que está asociado con o es inducido por concentraciones elevadas de sal y que da lugar a una perturbación en el potencial osmótico del medio ambiente intracelular o extracelular de un célula.

Las plantas transgénicas obtenidas de acuerdo con el método de la presente invención, en presencia del ácido polinucleico y/o la secuencia reguladora introducida en dicha planta, alcanzan una resistencia, tolerancia o tolerancia o resistencia mejoradas contra el estrés ambiental con respecto a la correspondiente planta de tipo.

Los términos "tolerancia" y "resistencia" cubren el rango de protección desde un retraso hasta una inhibición completa de la alteración en el metabolismo celular, crecimiento celular reducido y/o muerte celular causados por las condiciones de estrés ambiental definidas aquí anteriormente. Preferiblemente, la planta transgénica obtenida de acuerdo con el método descrito aquí es tolerante o resistente a las condiciones de estrés ambiental en el sentido de que dicha planta es capaz de crecer sustancialmente en forma normal bajo condiciones ambientales, donde la correspondiente planta de tipo silvestre muestra una reducción en el crecimiento, metabolismo, viabilidad, productividad y/o esterilidad de tipo masculino o femenino. Como se usa en la presente memoria, "tolerancia al estrés" se refiere a la capacidad de crecer y producir biomasa durante el estrés, la capacidad de reiniciar el crecimiento y la producción de biomasa después del estrés, y la capacidad de sobrevivir al estrés. El término "tolerancia al estrés" también abarca la capacidad de la planta para experimentar su programa de desarrollo durante el estrés de manera similar a bajo condiciones sin estrés, por ejemplo, para cambiar de estado de latencia a la germinación y de fase vegetativa a reproductiva bajo condiciones de estrés de manera similar que bajo condiciones no estresadas. Las metodologías para determinar el crecimiento de la planta o la respuesta al estrés incluyen, pero no se limitan a las mediciones de altura, área foliar, relaciones planta - agua, capacidad de florecer, capacidad de generar progenie y rendimiento o cualquier otra metodología conocida por aquellos capacitados en la técnica.

"Crecimiento" se refiere a la capacidad de la planta o de partes de la planta para crecer y el aumento de la biomasa mientras que "rendimiento" se refiere a la biomasa cosechable de plantas o partes de plantas, en particular las partes de valor comercial. "El crecimiento y/o rendimiento bajo condiciones estresadas y no estresadas" se refiere al hecho de que las plantas cultivadas en el campo casi siempre experimentarán alguna forma de estrés, aunque leve. Se prefiere por lo tanto no distinguir entre condiciones no estresadas estresadas en forma leve. Como se espera que ocurran ciertos efectos beneficiosos de la invención sobre el crecimiento y el rendimiento tanto bajo condiciones severas de estrés como leves, se describen por lo tanto como un aumento del crecimiento y/o del rendimiento bajo condiciones estresadas y no estresadas.

Los medios para introducir ADN recombinante en el tejido o células de la planta incluyen, pero no se limitan a, transformación utilizando CaCl₂ y variaciones del mismo, en particular el método descrito anteriormente (Hanahan 1983), absorción directa de ADN en los protoplastos (Krens et al. 1982; Paszkowski et al. 1984), captación mediada por PEG a los protoplastos (Armstrong et al. 1990) bombardeo de micropartículas, electroporación (Fromm et al. 1985), microinyección de ADN (Crossway et al. 1986; Fromm et al. 1985), bombardeo de micropartículas de explantes de tejido o de células (Christou et al. 1988), infiltración al vacío de tejido con ácido nucleico, o en el caso de las plantas, transferencia mediada por ADN-T por la transferencia de Agrobacterium al tejido de la planta como se describe esencialmente en (An et al. 1985; Dodds, 1985; Herrera-Estrella et al. 1983a; Herrera-Estrella et al. 1983b).

Los métodos para la transformación de plantas monocotiledóneas son bien conocidos en la técnica e incluyen transformación mediada por *Agrobacterium* (Cheng et al. 1997 - W09748814; Hansen 1998 - W09854961, Hiei et al. 1994 - W09400977; Hiei et al. 1998 - W09817813; Rikiishi et al. 1999 - W09904618; Saito et al. 1995 - W09506722), bombardeo con microproyectiles (Adams et al. 1999 - US5969213; Bowen et al. 1998 - US5736369; Chang et al. 1994 - W09413822; Lundquist et al. 1999 - US5874265/US5990390; Vasil y Vasil 1995 - US5405765; Walker et al. 1999 - US5955362), captación de ADN (Eyal et al. 1993 - W09318168), microinyección de células de *Agrobacterium* (von Holt 1994 - DE4309203) y sonicación (Finer et al. 1997 - US5693512).

Para el bombardeo de células con micropartículas, se propulsa una micropartícula dentro de una célula para producir una célula transformada. Cualquier metodología adecuada de transformación balística de la célula y los aparatos se puede utilizar en la realización de la presente invención. Un ejemplo de un aparato y de los procedimientos es descrito por Stomp et al. (Patente de los Estados Unidos No. 5.122.466) y Sanford y Wolf (Patente de los Estados Unidos No. 4.945.050). Cuando se utilizan procedimientos balísticos de transformación, la construcción génica puede incorporar un plásmido capaz de replicarse en la célula que va a ser transformada. Los ejemplos de micropartículas adecuadas para uso en tales sistemas incluyen esferas de oro de 1 a 5 µm. La construcción de ADN puede ser depositada sobre la micropartícula por medio de cualquier técnica adecuada, tal como por medio de precipitación.

Una planta entera puede ser regenerada a partir de la célula transformada o transfectada, de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. El tejido vegetal capaz de propagación clonal posterior, ya sea por organogénesis o por embriogénesis, puede ser transformado con una construcción génica de la presente invención y una planta entera regenerada a partir de la misma. El tejido particular escogido variará dependiendo de los sistemas de propagación clonal disponibles para, y más adecuados para, las especies particulares que van a ser transformadas. Los ejemplos de tejidos objetivo incluyen discos de hojas, polen, embriones, cotiledones, hipocotilos, megagametofitos, tejido de callo, tejido meristemático existente (por ejemplo, meristemo apical, yemas axilares, y meristemas de la raíz), y tejido de meristemo inducido (por ejemplo, meristemo de cotiledón y meristemo del hipocotilo).

El término "organogénesis", como se usa aquí, significa un proceso mediante el cual brotes y raíces se desarrollan secuencialmente a partir de centros meristemáticos.

El término "embriogénesis", como se usa aquí, significa un proceso mediante el cual brotes y raíces se desarrollan juntos de una forma concertada (no secuencial), ya sea a partir de células somáticas o de gametos.

Preferiblemente, la planta se produce de acuerdo con el método descrito aquí, es transfectada o transformada con una secuencia genética, o es susceptible a la introducción de una proteína, por medio de cualquier medio reconocido en el arte, tal como bombardeo de microproyectiles, microinyección, transformación mediada por *Agrobacterium* (incluido el método de transformación de 'inmersión de la flor'; (Bechtold & Pelletier 1998; Trieu et al. 2000)), fusión de protoplastos, o electroporación, entre otros. Más preferiblemente dicha planta es producida por transformación mediada por *Agrobacterium*.

La "plántula" es la planta juvenil que surge del embrión maduro después de la germinación de la semilla.

Por "diferenciación de una célula" se entiende que la célula desarrolla características únicas que se relacionan con una función específica. Generalmente la diferenciación es irreversible.

La transformación mediada por *Agrobacterium* o la transformación agrolística de plantas, levaduras, mohos u hongos filamentosos se basa en la transferencia de parte de las secuencias del vector de transformación, llamadas ADN-T, al núcleo y en la integración de dicho ADN-T en el genoma de dicha eucariota.

Por "*Agrobacterium*" se entiende un miembro de la *Agrobacteriaceae*, más preferiblemente *Agrobacterium* o *Rhizobacterium* y más preferiblemente *Agrobacterium tumefaciens*.

Por "ADN-T", o ADN transferido, se entiende que parte del vector de transformación flanqueado por los bordes del ADN-T que es, después de la activación de los genes vir de *Agrobacterium*, amallado en los bordes del ADN-T y transferido como un ADN monocatenario al núcleo de una célula eucariota.

Cuando se usa en este documento, con "bordes ADN-T", "región fronteriza del ADN-T", o "región fronteriza" se entiende ya sea el borde derecho del ADN-T (RB) o del borde izquierdo del ADN-T (LB). Tal borde comprende una secuencia central flanqueada por un borde de la región interior como parte del ADN-T que flanquea el borde y/o una región externa del borde como parte de la columna vertebral del vector que flanquea el borde. Las secuencias centrales comprenden 22 pb en el caso de los vectores tipo octopina y 25 pb en el caso de vectores tipo nopalina. Las secuencias centrales de la región del borde derecho y de la región del borde izquierdo forman repeticiones imperfectas. Secuencias centrales del borde son indispensables para el reconocimiento y el procesamiento por parte del complejo de amallado de *Agrobacterium* que consiste de al menos VirD1 y VirD2. Las secuencias centrales que

flanquean un ADN-T son suficientes para promover la transferencia de dicho ADN-T. Sin embargo, la eficiencia de la transformación usando vectores de transformación que transportan dicho ADN-T únicamente flanqueado por dichas secuencias centrales es baja. Se sabe que las regiones fronterizas interior y exterior modulan la eficiencia de la transferencia del ADN-T (Wang et al. 1987). Un elemento que mejora la transferencia del ADN-T ha sido
 5 caracterizado y reside en la región del borde exterior derecho y es llamado de sobrecarga (Peralta et al. 1986; van Haaren et al. 1987).

Por "vector de transformación de ADN-T" o "vector de ADN-T" se entiende cualquier vector que abarca una secuencia de ADN-T flanqueada por un borde derecho e izquierdo del ADN-T que consiste de al menos las
 10 secuencias centrales del borde derecho e izquierdo, respectivamente, y utilizado para la transformación de cualquier célula eucariota.

Por "secuencia de la columna vertebral del vector de ADN-T" o "secuencias de la columna vertebral del vector de ADN-T" se entiende todo ADN de un vector que contiene ADN-T que se encuentra fuera de los bordes del ADN-T y,
 15 más específicamente, fuera de los sitios de amellamiento de las repeticiones imperfectas centrales del borde.

La presente invención incluye vectores optimizados del ADN-T de tal manera que la integración de la columna vertebral del vector en el genoma de una célula eucariota se reduce al mínimo o está ausente. Por "vector optimizado de ADN-T" se entiende un vector de ADN-T diseñados ya sea para disminuir o para abolir la
 20 transferencia de secuencias de la columna vertebral del vector al genoma de una célula eucariota. Tales vectores de ADN-T son conocidos por alguien familiarizado con la técnica e incluyen aquellos descritos previamente (Hanson et al. 1999), Stuver et al. (1999 - W09901563).

La presente invención considera claramente la inclusión de una secuencia de ADN de la presente invención que codifica un factor DBF1 de enlazamiento de DRE o un fragmento del mismo como se definió anteriormente, en cualquier vector de ADN-T que comprende vectores de transformación binarios, vectores de transformación
 25 superbinarios, vectores de transformación cointegrados, vectores de transformación derivados de Ri, así como en vectores que transportan ADN-T utilizados en transformación agrolística.

Por "vector de transformación binario" se entiende un vector de transformación de ADN-T que comprende: una región de ADN-T que contiene por lo menos un gen de interés y/o al menos un marcador seleccionable activo en la célula eucariota que va a ser transformada, y una región de la columna vertebral del vector que comprende al menos
 30 orígenes de replicación activos en *E. coli* y en *Agrobacterium* y marcadores para selección en *E. coli* y en *Agrobacterium*. Alternativamente, la replicación del vector de transformación binario en *Agrobacterium* depende de la presencia de un plásmido auxiliar separado. El vector binario pGreen y el plásmido auxiliar pSoup forman un ejemplo de tal sistema como se describe, por ejemplo en (Hellens et al. 2000) o como se encuentra disponible en el sitio web
 35 <http://www.pgreen.ac.uk>.

Los bordes del ADN-T de un vector de transformación binario se pueden derivar de plásmidos Ti de tipo octopina o de tipo nopalina o de ambos. El ADN-T de un vector binario sólo se transfiere a una célula eucariota junto con un plásmido auxiliar. También se conocen en la técnica múltiples cepas de *Agrobacterium* del vector binario para la eficiente cotransformación de plantas (Bidney y Scelonge 2000 - W00018939).
 40

Por "plásmido auxiliar" se entiende un plásmido que se mantiene de manera estable en *Agrobacterium* y porta al menos el conjunto de genes vir necesarios para permitir la transferencia del ADN-T. Dicho conjunto de genes vir puede derivarse de cualquiera de los plásmidos Ti de tipo octopina o de tipo nopalina o de ambos.
 45

Por "vector de transformación superbinario" se entiende un vector de transformación binario que porta adicionalmente en la región de la columna vertebral del vector una región vir del plásmido Ti, pTiBo542, de la cepa súper virulenta A281 de *A. tumefaciens* (Hiei et al. 1994 - EP0604662, Hiei et al. 1995 - EP0687730). Los vectores de transformación superbinarios se utilizan junto con un plásmido auxiliar.
 50

Por "vector de transformación cointegrado" se entiende un vector ADN-T que comprende por lo menos:
 55 una región de ADN-T que contiene al menos un gen de interés y/o al menos un marcador seleccionable activo en plantas; y
 una región de la columna vertebral del vector que comprende al menos orígenes de replicación activos en *Escherichia coli* y *Agrobacterium*, y marcadores para la selección en *E. coli* y *Agrobacterium*, y un conjunto de genes vir necesarios para permitir la transferencia del ADN-T.

Los bordes del ADN-T y dicho conjunto de genes vir de dicho vector de ADN-T se pueden derivar de cualquiera de los plásmidos Ti de tipo octopina o de tipo nopalina o de ambos.
 60

Por "vector de transformación de una planta derivado de Ri" se entiende un vector de transformación binario en el que los bordes del ADN-T se derivan de un plásmido Ti y dicho vector de transformación binario se utiliza junto con un plásmido 'auxiliar' Ri que porta el conjunto necesario de genes vir.
 65

Tal como se utiliza aquí, el término "gen marcador seleccionable" o "marcador seleccionable" o "marcador de selección" incluye a cualquier gen que confiera un fenotipo sobre una célula en la cual se expresa para facilitar la identificación y/o selección de células que se transfectan o transforman con una construcción génica de la invención o un derivado de la misma. Los genes marcadores seleccionables adecuados contemplados aquí incluyen al gen de resistencia a la ampicilina (Amp^r), al gen de resistencia a la tetraciclina (Tcr), al gen bacteriano de resistencia a la kanamicina (Kan^r), al gen de resistencia a la fosfomicina, al gen de la neomicina fosfotransferasa (nptII), al gen de resistencia a la higromicina, al gen de la β -glucuronidasa (GUS), al gen de la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), al gen de la proteína fluorescente verde (gfp) (Haseloff et al. 1997), y al gen de la luciferasa, entre otros.

Por "agrolísticos", "transformación agrolística" o "transferencia agrolística" se entiende aquí un método de transformación que combina las características de la transformación mediada por *Agrobacterium* y de suministro de ADN biolístico. Como tal, un plásmido objetivo que contiene ADN-T se suministra conjuntamente con ADN / ARN permitiendo la producción in planta de VirD1 y VirD2 con o sin VirE2 (Hansen y Chilton 1996; Hansen et al. 1997), (Hansen y Chilton 1997 - W09712046). La presente invención describe además una aproximación para remover de las células transformadas una secuencia de ADN foráneo integrada de manera estable por medio de recombinación que implica una recombinasa y lugares de recombinación.

Por "ADN foráneo" se entiende cualquier secuencia de ADN que se introduce en el genoma del huésped por medio de técnicas recombinantes. Dicho ADN foráneo incluye por ejemplo una secuencia de ADN-T o una parte de la misma tal como la secuencia de ADN-T que comprende el marcador seleccionable en un formato expresable. El ADN foráneo incluye, además, la intervención de secuencias de ADN como se define más arriba. Por "evento de recombinación" se entiende tanto un evento de recombinación específico del sitio como un evento de recombinación efectuado por medio del 'salto' de un transposón.

Por "recombinasa" se entiende tanto una recombinasa específica del sitio como una transposasa.

Por "sitio de recombinación" se entiende ya sea sitios de recombinación específicos del sitio o secuencias del borde del transposón.

Por "evento de recombinación específico del sitio" se entiende un evento catalizado por un sistema que consiste generalmente de tres elementos: un par de secuencias de ADN (las secuencias o los sitios de recombinación específicos del sitio) y una enzima específica (la recombinasa específica de sitio). La recombinasa específica del sitio cataliza una reacción de recombinación únicamente entre dos secuencias de recombinación específicas de sitio que dependen de la orientación de las secuencias de recombinación específicas de sitio. Las secuencias que intervienen entre dos sitios de recombinación específicos del sitio se invertirán en presencia de la recombinasa específica del sitio cuando las secuencias de recombinación específicas del sitio están orientadas en direcciones opuestas una con respecto a la otra (es decir, repeticiones invertidas). Si las secuencias de recombinación específicas de sitio están orientadas en la misma dirección una con respecto a la otra (es decir, repeticiones directas), entonces cualquiera de las secuencias que intervienen será eliminada tras la interacción con la recombinasa específica del sitio. Por lo tanto, si las secuencias de recombinación específicas del sitio están presentes como repeticiones directas en ambos extremos de una secuencia de ADN foráneo integrado en un genoma eucariótico, tal integración de dichas secuencias se puede revertir posteriormente mediante la interacción de las secuencias de recombinación específicas del sitio con la correspondiente recombinasa específica del sitio. Se pueden utilizar una cantidad de sistemas diferentes de recombinasa específica del sitio, incluyendo pero sin limitarse al sistema Cre/lox del bacteriófago P1, al sistema FLP/FRT de levadura, a la recombinasa Gin del fago Mu, a la recombinasa Pin de *E. coli*, a la PinB, PinD y PinF de *Shigella*, y al sistema R/RS de *Zygosaccharomyces rouxii*. Recombinasas generalmente son integrasas, resolvasas o flipasas. También pueden ser utilizadas recombinasas específicas duales conjuntamente con repeticiones directas o indirectas de dos sitios diferentes de recombinación específicos del sitio correspondientes a la recombinasa específica dual (Baszczynski et al. 1999 - W09925840). Los sistemas preferidos de recombinasa específicos del sitio son los sistemas Cre/lox del bacteriófago P1, el FLP / FRT de levadura y el R / RS de *Z. rouxii*. En estos sistemas una recombinasa (Cre, FLP o R) interactúa específicamente con su respectiva secuencia de recombinación específica del sitio (lox, FRT, o RS, respectivamente) para invertir o eliminar las secuencias que intervienen. Las secuencias de recombinación específicas del sitio para cada uno de estos dos sistemas son relativamente cortas (34 pb para lox y 47 pb para FRT). Algunos de estos sistemas ya han sido utilizados con gran eficiencia en plantas tales como tabaco (Dale & Ow 1990; Onouchi et al. 1991; Sugita et al. 2000) y *Arabidopsis* (Onouchi et al. 1995; Osborne et al. 1995). Los sistemas de recombinación específicos del sitio tienen muchas aplicaciones en biología molecular de plantas, incluyendo métodos para el control de la recombinación homóloga (por ejemplo, Hodges et al. 1996 - US5527695), para inserción dirigida, apilamiento de genes, etc. (Baszczynski et al. 1999 - W09925821) y para la resolución de patrones de integración complejos de ADN-T o para la escisión de un marcador seleccionable (Ow et al. 1999 - W09923202).

Aunque las secuencias de recombinación específicas del sitio deben estar enlazadas a los extremos del ADN para ser cortadas o para ser invertidas, el gen que codifica la recombinasa específica del sitio puede estar situado en otro lugar. Por ejemplo, el gen de la recombinasa podría estar presente ya en el ADN de eucariota o podría ser suministrado por un fragmento de ADN introducido más tarde, ya sea introducido directamente en las células, a

través de cruzamiento o a través de polinización cruzada. Alternativamente, una proteína recombinasa sustancialmente purificada podría ser introducida directamente en la célula eucariota, por ejemplo, mediante microinyección o bombardeo de partículas. Típicamente, la región de codificación de la recombinasa específica del sitio estará operativamente enlazada a secuencias reguladoras que permitan la expresión de la recombinasa específica de sitio en la célula eucariota.

Por "evento de recombinación efectuado por salto de transposón" o "recombinación mediada por transposasa" se entiende un evento de recombinación catalizado por un sistema que consta de tres elementos: un par de secuencias de ADN (las secuencias del borde del transposón) y una enzima específica (la transposasa). La transposasa cataliza una reacción de recombinación solamente entre dos secuencias del borde del transposón que están dispuestas como repeticiones invertidas. Se pueden utilizar una cantidad de sistemas diferentes transposón / transposasa, incluyendo pero sin limitarse al sistema Ds / Ac, al sistema Spm y al sistema Mu. Estos sistemas se originan a partir del maíz, pero se ha demostrado que al menos el sistema Ds / Ac y el sistema Spm también funcionan en otras plantas (Fedoroff & Smith 1993; Schlappi et al. 1993; Van Sluys et al. 1987). Se prefieren los transposones del tipo Ds y SPM que son delineados por secuencias de borde de 11 pb y 13 pb, respectivamente.

Aunque las secuencias del borde del transposón deben estar enlazadas a los extremos del ADN que va a ser cortado, el gen que codifica la transposasa puede estar localizado en otra parte. Por ejemplo, el gen de la recombinasa podría ya estar presente en el ADN del eucariota o podría ser suministrado por un fragmento de ADN introducido más tarde ya sea introducido directamente en las células, a través de cruzamiento o a través de polinización cruzada. Alternativamente, una proteína transposasa sustancialmente purificada podría ser introducida directamente en las células, por ejemplo, por medio de microinyección o por bombardeo de partículas.

Como parte de la presente invención, las secuencias del borde del transposón se incluyen en una secuencia de ADN foráneo de tal manera que se encuentran fuera de dicha secuencia de ADN y transformen dicho ADN en una entidad tipo transposón que pueda moverse por la acción de una transposasa.

Como los transposones a menudo se reintegran en otro locus del genoma del huésped, puede ser necesario la segregación de la progenie de los huéspedes en los cuales se permitió actuar a la transposasa para separar los huéspedes transformados que contienen por ejemplo sólo la huella del transposón y los huéspedes transformados que aún contienen el ADN foráneo.

En la realización de la presente invención, se induce preferiblemente el elemento genético para movilización, tal como, por ejemplo, mediante la expresión de una proteína recombinasa en la célula que contacta el sitio de integración del elemento genético y facilita allí un evento de recombinación, escindiendo completamente el elemento genético, o alternativamente, dejando una "huella", generalmente de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud o mayor, en el sitio de integración original. Aquellos huéspedes y partes de los huéspedes que han sido producidos de acuerdo con el método de la invención se pueden identificar por medio de técnicas estándar de hibridación de ácido nucleico y/o de amplificación para detectar la presencia del elemento genético que puede ser movilizado o una construcción génica que contiene al mismo. Alternativamente, en el caso de las células huésped transformadas, tejidos, y huéspedes en donde el elemento genético que puede ser movilizado ha sido escindido, es posible detectar una huella en el genoma del huésped que ha sido dejada después del evento de escisión, utilizando tales técnicas. Tal como se utiliza aquí, el término "huella" se entenderá que se refiere a cualquier derivado de un elemento genético que puede ser movilizado o construcción génica que lo contiene como se describe aquí que es producido mediante la escisión, supresión u otro tipo de remoción del elemento genético que puede ser movilizado del genoma de una célula previamente transformada con dicha construcción génica. Una huella generalmente comprende al menos una sola copia de los loci de recombinación o del transposón utilizado para promover la escisión. Sin embargo, una huella puede comprender secuencias adicionales derivadas de la construcción génica, por ejemplo secuencias de nucleótidos derivadas de la secuencia de borde izquierdo, de la secuencia del borde derecho, del origen de replicación, de la secuencia que codifica la recombinasa o que codifica la transposasa, si se utiliza, u otras secuencias de nucleótidos derivadas del vector. En consecuencia, una huella puede ser identificada de acuerdo con la secuencia de nucleótidos del locus de recombinación o del transposón o de la construcción genética utilizada, tal como, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos correspondiente o complementaria a un sitio lox, a un sitio frt o a un sitio RS.

Por "patógeno" se entiende aquellos organismos que tienen un efecto negativo sobre el estado fisiológico de la planta o una parte de la misma. Algunos patógenos son por ejemplo virus, bacterias, hongos, y plantas parásitas. Por "plagas" de las plantas se entiende el grupo de nematodos así como de insectos, que son capaces de ejercer un efecto negativo sobre el estado fisiológico de la planta o de una parte de la misma.

"Célula vegetal" comprende cualquier célula derivada de cualquier planta y que existe en cultivo como una única célula, un grupo de células o un callo. Una célula vegetal puede ser también cualquier célula en una planta en desarrollo o madura en cultivo o que crece en la naturaleza.

"Plantas" comprende todas las plantas, incluyendo plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. "Cereal" comprende

plantas de cultivo de grano comestible por ejemplo plantas que pertenecen a la familia de las gramíneas que se cultiva por sus granos nutritivos tales como avena, cebada, centeno, trigo, arroz y maíz, etc.

5 Por "ensayo de doble híbrido en levadura" se entiende un ensayo que se basa en la observación de que muchos factores de transcripción eucariotas contienen dos dominios, un dominio de enlace de ADN (DB) y un dominio de activación (AD) que, cuando están físicamente separados (es decir, ruptura del enlace covalente) no efectúan la expresión del gen objetivo. Dos proteínas capaces de interactuar físicamente con una de dichas proteínas fusionadas a DB y la otra de dichas proteínas fusionadas a AD volverán a reunir a los dominios DB y AD del factor de transcripción resultando en la expresión del gen objetivo. El gen objetivo en el ensayo de doble híbridos en levadura es usualmente un gen reportero tal como el gen de la β -galactosidasa. La interacción entre proteínas socias en el ensayo de doble híbrido en levadura puede por lo tanto ser cuantificada midiendo la actividad del producto del gen reportero (Bartel & Fields, 1997). Alternativamente, se puede utilizar un sistema de doble híbrido en mamífero, que incluye por ejemplo un gen reportero que codifica una proteína fluorescente verde quimérica (Shioda et al. 2000). Incluso otra alternativa consiste en un sistema de doble híbrido en bacterias utilizando por ejemplo HIS como gen reportero (Joung et al. 2000).

20 El término "fragmento de una secuencia" o "parte de una secuencia" significa una secuencia truncada de la secuencia original en referencia. La secuencia truncada (secuencia de ácido nucleico o de proteína) puede variar ampliamente en longitud; el tamaño mínimo es el de una secuencia de tamaño suficiente para proporcionar una secuencia con al menos una función y/o actividad comparables o la secuencia original de referencia, en tanto que el tamaño máximo no es crítico. En algunas aplicaciones, el tamaño máximo por lo general no es sustancialmente mayor que el requerido para proporcionar la actividad y/o la función(es) deseada(s) de la secuencia original. Típicamente, la secuencia truncada de nucleótidos o de aminoácidos variará en el rango aproximadamente de 5 hasta aproximadamente 60 aminoácidos de longitud. Más típicamente, sin embargo, la secuencia será al menos aproximadamente de 50 aminoácidos de longitud, preferiblemente un máximo de (o al menos) aproximadamente 60, 80, 100, 120, 150, 200 o 220 aminoácidos. Normalmente es deseable seleccionar secuencias de al menos aproximadamente 10, 12 o 15 aminoácidos, hasta un máximo de aproximadamente 20 o 25 aminoácidos.

30 "Parte de una secuencia de ácido nucleico" se refiere a una secuencia que tiene al menos aproximadamente 20 nucleótidos en longitud, preferiblemente un máximo de (o al menos) aproximadamente 25, 50, 60, 80, 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 750, 800, 900, 1000 nucleótidos.

35 Además, se pueden llevar a cabo simulaciones de plegamiento y rediseño por ordenador de motivos estructurales de la proteína de la invención utilizando programas informáticos apropiados (Hoffman et al. 1995; Oiszewski et al. 1996). El modelamiento por ordenador del plegamiento de proteínas puede utilizarse para el análisis conformacional y energético del péptido detallado y de modelos de proteínas (Monge et al. 1995; Renouf & Hounsell 1995). En particular, se pueden utilizar programas apropiados para la identificación de sitios interactivos de la proteína de enlace de DRE (DBF1) de la presente invención por medio de búsquedas asistidas por ordenador para secuencias complementarias de péptidos (Fassina & Melli 1994). En el estado del arte se describen otros sistemas informáticos apropiados para el diseño de proteínas y de péptidos por ejemplo en (Berry & Brenner, 1994; Pabo & Suchanek 1986; Wodak 1987). Los resultados obtenidos a partir del análisis por ordenador anteriormente descrito pueden ser utilizados, por ejemplo, para la preparación de peptidomiméticos. Tales análogos pseudopeptídicos de la secuencia natural de aminoácidos de la proteína pueden imitar muy eficientemente la proteína original (Benkirane et al. 1996). Por ejemplo, la incorporación de residuos de aminoácidos ω acirales fácilmente disponibles en una proteína o un fragmento de la misma da como resultado la sustitución de enlaces amino por unidades de polimetileno de cadena alifática, proporcionando así una estrategia conveniente para la construcción de un peptidomimético (Banerjee et al. 1996). Los análogos peptidomiméticos superactivos de hormonas peptídicas pequeñas en otros sistemas están descritos en el estado de la técnica (Zhang et al. 1996). Los peptidomiméticos apropiados también pueden ser identificados por medio de la síntesis de bibliotecas combinatorias de peptidomiméticos mediante la alquilación sucesiva de amina y analizando los compuestos resultantes, por ejemplo, por sus propiedades de enlace, inhibitorias de quinasa y/o inmunológicas. Los métodos para la generación y uso de bibliotecas de combinación peptidomiméticas están descritas en el estado de arte por ejemplo (Dorner et al. 1996; Ostresh et al. 1996).

55 Además, se pueden utilizar una estructura tridimensional y/o cristalográfica de una proteína para el diseño de inhibidores peptidomiméticos de la actividad biológica de una proteína (Rose et al. 1996; Rutenber et al 1996).

60 Los compuestos que van a ser obtenidos o identificados pueden ser compuestos que son capaces de enlazarse a cualquiera de los ácidos nucleicos, péptidos o proteínas descritos aquí. Otros compuestos de interés para ser identificados son los compuestos que modulan la expresión de los genes o las proteínas de tal manera que, o bien se mejora la expresión de dicho gen o proteína o disminuye por la acción de dicho compuesto. Alternativamente, el compuesto puede ejercer su acción mejorando directa o indirectamente o disminuyendo la actividad de cualquiera de las proteínas de la invención.

65 Dicho compuesto o pluralidad de compuestos pueden estar comprendidos, por ejemplo, en muestras, por ejemplo,

extractos celulares, por ejemplo, de plantas, animales o microorganismos. Además, dicho(s) compuesto(s) puede(n) ser conocido(s) en la técnica pero hasta ahora no conocido(s) por ser capaz(es) de suprimir o activar proteínas que interactúan en el ciclo celular. La mezcla de reacción puede ser un extracto libre de células que puede comprender una cultivo de células o de tejidos. Las configuraciones adecuadas para el método de la invención son conocidas por la persona capacitada en la técnica y han sido, por ejemplo, generalmente descritas previamente (Alberts et al. 1994), en particular el Capítulo 17. La pluralidad de compuestos puede ser, por ejemplo, añadida a la mezcla de reacción, medio de cultivo o inyectados dentro de la célula.

Si una muestra que contiene un compuesto o una pluralidad de compuestos es identificada en el método de la invención, entonces es posible o bien aislar el compuesto de la muestra original identificada por que contiene el compuesto capaz de actuar como un agonista, o se puede subdividir aún más la muestra original, por ejemplo, si consiste de una pluralidad de compuestos diferentes, con el fin de reducir el número de sustancias diferentes por muestra y repetir el método con las subdivisiones de la muestra original. Dependiendo de la complejidad de las muestras, las etapas descritas anteriormente se puede realizar varias veces, preferiblemente hasta que la muestra identificada de acuerdo con el método de la invención sólo contenga un número limitado de sólo una sustancia(s). Preferiblemente dicha muestra contiene sustancias o propiedades químicas y/o físicas similares, y lo más preferible, dichas sustancias son idénticas. Preferiblemente, el compuesto identificado de acuerdo con el método descrito anteriormente o su derivado es formulada además en una forma adecuada para la aplicación en fitomejoramiento vegetal o cultivo de células y tejidos de plantas.

El factor de transcripción que contiene el dominio AP2/EREBP es la denominación ampliamente aceptada de una familia de proteínas de enlazamiento de ADN que contienen un dominio de enlazamiento de ADN de aproximadamente 60 aminoácidos que está bastante bien conservado en la secuencia entre los diferentes miembros de la familia. Los ejemplos de tales secuencias son descritos en Ohme-Takagi y Shinshi (Plant Cell 1995; 7: 173 - 182), Weigel (Plant Cell 1995; 7: 388 - 389), y Mushegian y Koonin (Genética 1996, 144: 817 - 828). Este dominio se denomina generalmente como dominio apetala, AP2, EREBP o AP2/EREBP. Aquellos capacitados en la técnica pueden identificar fácilmente la presencia de un dominio AP2/EREBP en secuencias de polipéptidos y de proteínas, por ejemplo a través de sitios en Internet públicamente accesibles. Por ejemplo, el programa Pfam 5.5 de la Universidad de Washington en San Louis permite detectar dominios AP2/EREBP en secuencias dadas de polipéptidos o de proteínas (<http://pfam.wustl.edu/cgi-bin/getdesc?name=AP2-domain>).

La expresión del "elemento DRE" como se utiliza aquí se refiere a un "elemento sensible a la sequía". Este es un elemento que actúa sobre cis conocido en la técnica, con la secuencia general de consenso DRE: TACCGACAT (Busk et al., The Plant Journal (1997) 11 (6), 1285 - 1295). Elementos DRE son frecuentemente encontrados en los promotores de genes que están involucrados en la tolerancia al estrés. Los términos DRE1 y DRE2 como se usan aquí, se refieren a los elementos DRE que se encuentran en el promotor rab17 de maíz que tienen las secuencias de "ACCGA" y "ACCGAC", respectivamente (véase también Busk et al., 1997).

También han sido reportados motivos relacionados con DRE en las regiones promotoras de los genes inducibles por frío y sequía, tales como lin1, cor6.6, rd17 (revisado en Liu et al., The Plant Cell (1998) 10,1391 - 1406). Un motivo similar también fue reportado (repetición C; "TGGCCGAC" en las regiones promotoras de la cor 15 a inducible por frío. La secuencia central "CCGAC" fue encontrada en las regiones promotoras del gen BN115 de colza inducible por frío designado como el elemento sensible a la baja temperatura.

La expresión "elementos DRE" como se utiliza aquí se refiere a las secuencias de elemento particular DRE como se mencionó anteriormente, así como a aquellos elementos en el contexto de un promotor natural, por ejemplo, en el contexto de al menos una parte del promotor rab17 de maíz. También, cuando se utiliza la expresión "elemento DRE" en este documento nos referimos a un elemento DRE en el contexto de un promotor sintético o un promotor quimérico, a una copia del elemento DRE o a múltiples copias del elemento DRE (tal como en la SEQ ID NO 1).

La presente invención es descrita adicionalmente por referencia a las siguientes figuras y ejemplos no limitantes.

Breve descripción de las figuras

Figura 1:

A. Representación en forma de árbol de las similitudes de secuencia entre diferentes miembros de la superfamilia que contiene el dominio AP2 de factores de transcripción putativos. Tenga en cuenta que no todas las secuencias con dominios AP2 fueron incorporadas. Las alineaciones se realizaron con el programa CLUSTALW (serie Blosum 32, penalización por apertura de brecha 10,00 y por extensión de la brecha 0,05). Los nombres en el lado derecho del árbol se refieren a las proteínas del dominio AP2 de función conocida que son representativas para cada clase de proteínas del dominio AP2.

B. Alineación parcial de aminoácidos de DBF1 y de las secuencias más estrechamente relacionadas, que muestra la conservación de la secuencia fuera del dominio AP2. Las secuencias DREB1A y CBF1 se presentan para ilustrar la especificidad de la conservación de la secuencia de DBF1 y de las secuencias estrechamente relacionadas. Una

secuencia de consenso tentativa se presenta en negrita. Los números en la parte superior de la figura se refieren a la posición del aminoácido en la secuencia de DBF1.

Figura 2:

5
10
Análisis tipo Northern que muestra la inducción de la expresión de DBF1 por estrés por deshidratación y tratamiento con ABA. Se utilizaron los ADN de rab17 y de la subunidad a de tubulina como control positivo y constitutivo, respectivamente. Los ADNc totales se utilizaron como sondas para todas las hibridaciones. Los extractos de ARN total se obtuvieron de plantas de 5 días de edad, y se indican como sigue. C: control, plantas de 5 días de edad sin tratamiento adicional. D: plantas estresadas por agua. S: plantas estresadas en un medio líquido de NaCl 250 mM. A: plantas tratadas con 100 μ M de ABA. 4: plantas estresadas con frío (4° C). 37: plantas estresadas con calor (37° C).

Figura 3:

15
20
Estudio de las cinéticas de inducción de DBF1 en tejidos vegetativos durante el tratamiento de estrés por agua de plántulas de maíz. Se utilizaron como control los ADNc de rab17 y de la subunidad a de tubulina. El ARN total se obtuvo en diferentes momentos indica como sigue. Los números por encima de cada carril indican el tiempo en minutos de tratamiento de estrés por agua que se aplicó a las plantas.

Figura 4:

25
Análisis de transferencias tipo Western utilizando anticuerpos de proteína total anti-DBF1 y de proteína parcial anti-DBF1 con extractos de proteína de diferentes partes de plántulas de maíz de 5 días de edad tratadas con diversos tipos de estrés, y en embriones de maíz. C: control, plantas de 5 días de edad sin tratamiento adicional. D: plantas estresadas por agua. S: plantas estresadas en un medio líquido de NaCl 250 mM. A: plantas tratadas con ABA 100 μ M. 4: plantas estresadas con frío (4° C). 37: plantas estresadas con calor (37° C). I: proteína total de DBF1 sobreexpresada en E. coli. Los números 14, 20, 40 y 60 indican los días después de la polinización.

Figura 5:

30
35
Valores e histograma de la expresión relativa de GUS / LUC, que muestran la inducción de la actividad del promotor Rab17 en células de callo de maíz por expresión transitoria de DBF1. El gen GUS está bajo el control del promotor rab 17 de tipo silvestre de 350 pb (r17 +) o de una forma mutante que trasporta un elemento que actúa sobre cis modificado DRE2 (r17 m). La mutación en DRE2 es la misma que en la sonda de oligonucleótido usada para EMSA (ver materiales y métodos). El plásmido efector consiste del ADNc de DBF1 bajo el control de un promotor 35S doble del CaMV (DBF1) DBF1. Un vector vacío se utiliza como control (vector). Barras blancas: sin ABA 100 μ M. Barras a rayas: con ABA 100 μ M.

Figura 6:

Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) de DBF1 total y parcial.

45
50
55
a) EMSA de la proteína total DBF1 utilizando oligonucleótidos que contienen el elemento que actúa sobre cis de DRE2 de tipo silvestre (carriles 1 - 4) y mutante (carril 5) como sondas. Carril 1: sonda libre solamente. Carriles 2 - 5: + 200 ng de proteína total DBF1. Carril 3: 1 competencia 100x con el elemento que actúa sobre cis en peso de DRE2. 4: competencia 1000x con el elemento que actúa sobre cis en peso de DRE2.
b) Igual que a), pero utilizando la proteína parcial de DBF1 que carece del dominio AP2, para todas las reacciones.
c) EMSA de la proteína total de DBF1 con sondas de oligonucleótidos diferentes.
Carril 1: sonda libre que contiene solamente el elemento que actúa sobre cis en peso de DRE2. Carriles 2 - 5: + 200 ng de proteína total de DBF1. 2 y 7: sonda que contiene el elemento que actúa sobre cis en peso de DRE2. 3: sonda que contiene el elemento que actúa sobre cis en peso de DRE1. 4: sonda que contiene el elemento que actúa sobre cis en peso de GRA. 5: sonda que contiene el elemento que actúa sobre cis en peso de DRE1/ABRE1. 6: sonda que contiene el elemento que actúa sobre cis de ABRE A del promotor del gen rab28.

Figura 7:

60
65
A. Representación en forma de árbol de las similitudes de secuencias entre distintos miembros de la familia que contiene al dominio AP-2 de arroz en comparación con otras proteínas AP2 de diversas especies de plantas tal como Tabaco y Arabidopsis. Las alineaciones se realizaron con el programa CLUSTALW (serie Blosum 32, penalización por apertura de brecha 10,00 y por extensión de la brecha 0,05). Se incluyen las proteínas de enlazamiento de DRE anteriormente descritas, tales como CBF1 o DREB2A de Arabidopsis, así como otras proteínas AP2 funcionalmente diferentes tales como ABI4, EREBP o aintegumenta.
B. Comparación por pares de ZmDBF1 con proteína CAC39058 de Oryza sativa (OsDBF1, SEQ ID NO 16). La alineación por pares se realizó con el programa CLUSTALW como se describe en A.

Figura 8: Listado de secuencias y de las correspondientes SEQ ID NOs.

EJEMPLOS

5 Ejemplo 1: Aislamiento de los ADNc que codifican las proteínas de enlazamiento de DRE2 utilizando la detección de un híbrido en levadura.

10 Se utilizó el sistema de selección de un híbrido en levadura (Clontech®) con el fin de aislar clones de ADNc que codifican proteínas de enlazamiento de ADN que interactúan con el elemento que actúa en cis DRE2 del promotor rab17. Para este fin, se generó una cepa de levadura reportera dual. Se clonó un oligonucleótido sintético que contiene tres repeticiones en tándem del elemento que actúa en cis DRE2 a partir del promotor rab17 (Busk et al., Plant J. 11: 1285 - 1295, 1997) con sitios de restricción EcoRI y XbaI o EcoRI y Sall en sus extremos 3' y 5' en los sitios de las enzimas de restricción correspondientes en los multienlazadores de los plásmidos pHISi-1 y pLacZi respectivamente. La cepa de levadura reportera doble se obtuvo mediante la transformación de la cepa de levadura YM4271 con las construcciones de los plásmidos placZi y pHISi-1 anteriores en forma secuencial. Los transformantes de levadura se sometieron a pruebas de control de β-galactosidasa y 3-AT para la determinación de la actividad de la expresión de fondo. Los transformantes de levadura que no mostraron actividad de lacZ y no fueron capaces de crecer en presencia de 3-aminotriazol (3-AT) 40 mM fueron seleccionados para su uso posterior en la selección de la biblioteca de ADNc con el sistema de un solo híbrido.

25 Se construyó una biblioteca de fusión de ADNc de expresión a partir de hojas de plántulas de maíz de cinco días de edad que fueron previamente sometidas a estrés hídrico durante tres horas. Se extrajo el ARN total como se describió previamente (Vilardell et al., Plant Mol Biol 17: 985 - 993, 1991). Se obtuvo ARNm con una cola de poli (A)+ mediante el uso del kit de ARNm polyAtract® (Promega). Se preparó el ADNc usando el kit de síntesis de ADNc de Stratagene y se clonó posteriormente con el vector fagémido HybriZap (Stratagene). La biblioteca de ADNc fue transformada en la cepa de levadura reportera dual y se seleccionaron aproximadamente 1,4 x 10⁶ transformantes de levadura en presencia de 3-AT 40 mM. Se seleccionó una gran cantidad de clones resistentes a 3-AT y posteriormente fueron analizados por la actividad de lacZ pero utilizando un ensayo de filtro X-gal. Catorce de los clones indujeron actividad de lacZ y formaron colonias azules. Los ADNc correspondientes se analizaron adicionalmente mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación del ADN, resultando en dos grupos que consistían de seis y ocho clones con insertos de ADNc de 1 y 1,2 kb respectivamente.

35 Ejemplo 2: Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de una proteína de enlazamiento de DRE2 de acuerdo con la invención

40 DBF1 es un ejemplo de ADNc que codifica una proteína que se enlaza con el elemento que actúa en cis DRE2. La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de DBF1 se presentan como la SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3, respectivamente. El ADNc de DBF1 contiene un marco de lectura abierto de 222 aminoácidos y codifica una proteína putativa con una masa molecular teórica de 24 kD.

Ejemplo 3: Análisis por BLAST de la base de datos con la secuencia de aminoácidos de DBF1

45 La secuencia de aminoácidos de DBF1 fue sometida a BLAST contra las bases de datos nr (Todas las traducciones de la CDS no redundante del GenBank + PDB + SwissProt + PIR) (utilizando el programa BLASTP) y GPT_DNA (Rijksuniversiteit Gent - Vlaams Interuniversitair Instituut voor Biotechnologie, K. L. Ledegenkstraat 35, B-9000 Gent; (<http://aivwww.rug.ac.be/Onderzoeksbeleid/techno2002/EN/WE/WE09V13.htm>) (utilizando el programa TBLASTN). Los resultados de ambas búsquedas por BLAST mostraron esencialmente la misma imagen, a saber:

- 50 1. DBF1 muestra la mayor similitud con una clase de proteínas que contienen el dominio AP2 de función desconocida. Los valores E de DBF1 con esta clase de proteínas están en el rango entre e-39 y e-46. Ejemplos son las proteínas codificadas por las secuencias con números de acceso AC009243, AC024228, AC021666, AC006228, AC012680, AL161595, AC007168 y AB013395.
- 55 2. DBF1 muestra una alta similitud con una clase de proteínas que contienen el dominio AP2 de función desconocida. Los valores E de DBF1 con esta clase de proteínas están en el rango entre e-27 y e-29. Ejemplos son las proteínas con números de acceso AC066689, AL161537, y AC006234.
3. DBF1 muestra menos homología con las proteínas que contienen al dominio AP2 de función conocida tales como AB14, CBF1, DREB1A, las proteínas de la familia EREB, aintegumenta, y AP2. Los valores E de DBF1 con estas proteínas que contienen AP2 de función conocida son en todos los casos mayores que e-20.

60 Se concluye por lo tanto que DBF1 representa una clase separada de proteínas que contienen el dominio AP2, cuya función era desconocida hasta ahora.

65 Los mejores éxitos con el programa TBLASTN contra la base de datos GPT-DNA se muestran a continuación:

ES 2 391 765 T3

Secuencias que producen alineaciones significativas:	Puntuación (bits)	Valor E
AC009243_gen25cadena+ L = 1 005 UTR = 30 pb (108054..109058)	179	2e-45
AC024228_gen3cadena- L = 786 UTR = 30 pb (7956..8741)	176	2e-44
5 AC021666_gen4cadena+ L = 945 UTR = 30 pb (19304..20248)	174	9e-44
AC006998_gen4cadena- L = 945 UTR = 30 pb (15461..16405)	174	9e-44
AC012680_gen1cadena+ CDS incompleta L= 547 UTR = 30 pb (12....	165	4e-41
AL161595_gen48cadena- L = 819 UTR = 30 pb (178386..179204)	163	2e-40
AC007168_gen13cadena+ L = 786 UTR = 30 pb (48835..49620)	161	5e-40
10 AB013395_gen5cadena+ L = 834 UTR = 30 pb (15366..16199)	161	5e-40
AC066689_gen10cadena+ L = 1008 UTR = 30 pb (56636..57643)	127	1 e-29
AL161537_gen5cadena+ L = 1032 UTR = 30 pb (24381..25412)	120	1 e-27
AC006234_gen16cadena- L = 1011 UTR = 30 pb (44635..45645)	118	5e-27
AL161572_gen26cadena- L = 879 UTR = 30 pb (90388..91266)	107	1 e-23
15 AL049803_gen2cadena- L = 879 UTR = 30 pb (1668...2546)	107	1 e-23
AB025637_gen7cadena+ L = 966 UTR = 30 pb (28869..29097,29900....	103	2e-22
AB013388_gen9cadena- L = 1065 UTR = 30 pb (32150..33214)	98	1 e-20
AB018117_gen7cadena- L = 732 UTR = 30 pb (20365..21096)	98	1 e-20
AL163912_gen4cadena+ L = 792 UTR = 30 pb (20853..21105,21291....	97	2e-20
20 AF085279_gen10cadena- L = 987 UTR = 30 pb (41637..42623)	96	2e-20
AB022212_gen1cadena- L = 2266 UTR = 30 pb (915..1325,1685..19...	95	6e-20
AC016163_gen16cadena- L = 552 UTR = 30 pb (48434..48985)	94	9e-20
AC016162_gen8cadena- L = 552 UTR = 30 pb (15218..15769)	94	9e-20
U78721_gen3cadena- L = 660 UTR = 30 pb (12017..12091,12359..1...	94	1 e-19
25 (continuación)		

Secuencias que producen alineaciones significativas:	Puntuación (bits)	Valor E
AB026650_gen8cadena+ L = 1170 UTR = 30 pb (23043..23094,24382...	94	1 e-19
30 AB022217_gen21cadena+ L = 747 UTR = 30 pb (71834..71993,72232...	94	2e-19
AC005405_gen4cadena- L = 657 UTR = 30 pb (19886..20542)	94	2e-19
AC004260_gen8cadena- L = 657 UTR = 30 pb (32878..32944,33023....	93	3e-19
AL161560_gen6cadena+ L = 1032 UTR = 30 pb (36135..37166)	93	3e-19
AL163491_gen13cadena+ L = 2430 UTR = 30 pb (65703..65986,6607...	92	4e-19
35 AC025813_gen6cadena+ L = 558 UTR = 30 pb (22457..23014)	92	4e-19
AB022220_gen1 cadena- L = 1125 UTR = 30 pb (1520..1570,1768..2...	92	6e-19
AC007591_gen29cadena+ L = 1176 UTR = 30 pb (99139..99218,9951...	92	6e-19

AL163815_gen18cadena- L = 711 UTR = 30 pb (89595..90305) 91 8e-19
 AL163814_gen1cadena- L = 711 UTR = 30 pb (6771..7481) 91 8e-19

Este hallazgo fue confirmado cuando se hizo una alineación de secuencias con el programa CLUSTALW (serie Blosum 32, penalización por apertura de brecha 10,00 y por extensión de la brecha 0,05). Una representación en forma de árbol de esta alineación se muestra en la Figura 1A. Esta representación en forma de árbol ilustra nuevamente muy bien que DBF1 representa una nueva clase de factores de transcripción del dominio AP2, que es diferente de la clase DREB / CBF de secuencias, la clase EREBP de secuencias, la clase TINY de secuencias y las secuencias de tipo apetala2 e integumenta.

Además, la alineación de secuencias muestra una alta conservación de secuencias entre DBF1 y sus familiares más cercanos, secuencia abajo del dominio AP2 (véase la Figura 1B). Esta secuencia se conserva entre DBF1, T05015, AAF76898, y AAF87854, pero no con PZ02_LUPPO, lo que puede indicar que este último ya pertenece a una clase diferente de proteínas del dominio AP2 (véase también la Figura 1A).

Se obtienen resultados similares con similitud de secuencia total calculada con el programa GAP. El programa GAP alinea dos secuencias en forma global (matriz de sustitución de aminoácidos BLOSUM62, Peso de la Brecha: 8, Peso por Longitud: 2, Referencia: Henikoff, S. y Henikoff, JG (1992). Matrices de sustitución de aminoácidos de los bloques de proteína. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 - 10919). Esto se ilustra en la Tabla 4, donde también están incluidos los homólogos más cercanos de DBF 1. La secuencia AB013395 (proteína correspondiente BAB11649) se muestra como un ejemplo de una clase de secuencias con un valor E de 5e-4 o menos, mientras que la secuencia AC006234 (proteína correspondiente AAD20907) fue tomada como ejemplo de una clase de secuencia con valor E de aproximadamente e-27. CBF1 se toma como ejemplo de una secuencia con valor E de aproximadamente e-20 o más. Como se mencionó anteriormente, todas las proteínas AP2/EREBP de función conocida muestran valores E de aproximadamente e-20 o más. También se aisló un homólogo de DBF1 recientemente identificado de *Oryza sativa* (véase el ejemplo 8) y se alineó con ZmDBF1.

Tabla 4: % de identidad de secuencia de aminoácidos y similitud entre DBF1 y otras proteínas AP2/EREBP

	% de Identidad con ZmDBF1	% de similitud con ZmDBF1
BAB11649 (AB013395)	49,8	58,2
AAD20907 (AC006234)	40,3	48,9
CBF1	33,5	38,5
PZ02 LUPPO	37,9	44,4
T05015	52,4	58,4
AAF76898,	45,8	51,8
AAF87854	50	55,8
OsDBF1	35,3	38,4

A partir de este análisis de similitud, se puede deducir que las secuencias con 35%, 37%, 40%, y preferentemente 50% de identidad de secuencia de aminoácidos están estrechamente relacionadas con DBF1, mientras que las secuencias con 33,5% de identidad ácido amino o menos son pertenecientes a diferentes clases de proteínas AP2/EREBP. La cantidad mínima de identidad de secuencia que es discriminatoria para secuencias relacionadas con DBF1 está por lo tanto entre 33,5% y 35%. De acuerdo con esto, la proteína OsDBF1 y la proteína PZ02 LUPPO, que están en la misma clase que DBF1 en una representación tipo árbol (véase la Figura 1A y la Figura 7A), pero situadas en una rama distante, muestran 35,3% y 37,9% de identidad de aminoácidos con DBF1 respectivamente.

Ejemplo 4: ARNm de DBF1 y la expresión de proteína es inducible por ABA y estrés por deshidratación

Se realizaron hibridaciones de transferencias tipo Northern para estudiar el patrón de expresión de ARNm de la DBF1 en tejidos vegetativos de plántulas de maíz de cinco días de edad sometidos a ABA y diversos tratamientos de estrés abiótico, así como durante la embriogénesis del maíz. El ARN total se preparó como se describió previamente (Vilardell et al., Plant Mol Biol 17: 985 - 993, 1991). Los ADNc totales se utilizaron como sondas para todas las hibridaciones de transferencia tipo Northern. Las hibridaciones para este experimento en particular se realizaron a 42° C con lavados a 65° C como se describió previamente (Amasino et al., Anal Biochem 152: 304 - 307, 1986).

El gen para DBF1 fue fuertemente inducido después del estrés por deshidratación en todas las partes vegetativas y también fue inducido por la sal y ABA, que muestra un nivel excepcionalmente alto de expresión en las raíces (Figura 2). Los tratamientos de choque por frío y por calor parecieron tener un efecto muy bajo o ningún efecto sobre la abundancia de ARNm del gen para DBF1 mientras que se detectó un nivel basal de transcripción en plantas de control no tratadas en todos los casos.

Las cinéticas de acumulación de ARNm de DBF1 y Rab17 fueron seguidas durante las primeras horas de estrés por deshidratación (Figura 3). Ya existe un aumento en los niveles del ARNm para DBF1 durante la primera hora de tratamiento del estrés por agua seguido por un incremento adicional posterior.

En embriones de maíz, se detectó ARNm para DBF1 en todas las etapas de la embriogénesis y fue inducida adicionalmente por tratamiento con ABA en embriones jóvenes. No se observó ARNm de rab17 en embriones jóvenes; sin embargo, se acumuló hasta niveles altos en los embriones en etapas posteriores de la embriogénesis, así como en embriones jóvenes después del tratamiento con ABA. Estos resultados indican que el gen para DBF1 es altamente transcrito en todos los tejidos vegetativos después del estrés con agua, sal o tratamiento con ABA, así como en embriones de maíz durante todas las etapas de la embriogénesis y después de la aplicación de ABA.

Se elevaron los anticuerpos policlonales contra las proteínas totales y parciales de la DBF1 que fueron expresados y purificados a partir de *E. coli*. El ADNc total, así como un fragmento parcial del ADNc para DBF1 excluyendo el fragmento que contenía el dominio AP2, fueron clonados como fragmentos EcoRI, XhoI en los vectores pET28a y pET28b del sistema de sobreexpresión pET (Promega). La sobreexpresión y purificación de las proteínas correspondientes se realizó de acuerdo a lo descrito por los fabricantes. La inmunización de conejos se llevó a cabo mediante tres inyecciones sucesivas de 100 µg de proteína purificada en 500 µl de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) emulsionados en un volumen igual de adyuvante incompleto de Freund, como ha sido descrito (Goday et al., *Electrophoresis* 9: 738 - 741, 1988).

Estos anticuerpos fueron utilizados para la detección de DBF1 por medio de análisis de transferencias tipo Western de una planta de maíz y de extractos de proteína de embriones. Los extractos de proteína se obtuvieron a partir de plántulas de cinco días de edad que fueron tratadas previamente de manera similar a la descrita para el análisis tipo Northern, y de embriones de maíz en diferentes etapas de la embriogénesis. Las proteínas se extrajeron mediante trituración de las muestras en nitrógeno líquido y resuspensión del polvo en un amortiguador de Tris-HCl 100 mM pH 7,4, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, fluoruro de fenilmetanosulfonilo 1 mM (PMSF). La concentración para cada extracto se determinó usando el ensayo de Bradford. Volúmenes relevantes que contenían 7 µg de proteína se mezclaron con amortiguador de carga 2x (Tris-HCl 100 mM pH 6,8, 2% de SDS, 10% de glicerol, 0,003% de azul de bromofenol, 10% de mercaptoetanol) y se cargó en un gel de acrilamida-bis acrilamida al 15%. Se hicieron hibridaciones de transferencias tipo Western como se describe (Niogret et al., *Plant J* 9: 549 - 557, 1996). Se incubaron dos grupos de transferencias tipo Western por separado con el anti-DBF1 obtenido contra la proteína total (anti-DBF1) o el anti-DBF1 obtenido contra los anticuerpos de proteína parcial (anti-DBF1). La Figura 4 muestra que el anticuerpo anti-DBF1 detectó una banda con un peso molecular aproximado de 35 kD en todos los tejidos de plantas estresadas por agua. Además se detectaron dos bandas de la misma masa molecular en extractos de raíz de las plantas tratadas con sal y ABA. Las mismas bandas, pero con una intensidad mucho menor, fueron detectadas en extractos de proteína de hojas y tallo de las plantas tratadas con sal y ABA. La masa molecular de las bandas se correlaciona con la masa molecular predicha de la proteína de DBF1 y es ligeramente más baja que la proteína expresada en *E. coli* debido a la etiqueta adicional de 31 aminoácidos fusionada a él. Otra banda con una masa molecular estimada de 70 - 75 kD fue detectada como constitutiva en extractos de proteína de todos los tejidos vegetativos. Sin embargo, esta proteína tiene una masa molecular mucho más alta que la proteína DBF1. El anticuerpo contra el DBF1 parcial exhibió una mayor especificidad, ya que no reconoce estas proteínas de mayor peso molecular.

En los embriones, la proteína se detecta durante las últimas etapas de la embriogénesis y con una menor intensidad en las primeras etapas de la formación del embrión y en embriones jóvenes tratados con ABA. Nuestros resultados también mostraron la expresión de la DBF1 en todos los tejidos vegetativos después del tratamiento de desecación, con sal o con ABA.

Ejemplo 5: La expresión transitoria de DBF1 en callo de maíz mejora la actividad básica e inducible por ABA del promotor Rab17

Para determinar la función de la interacción DRE - DBF1 en la inducción in vivo de los promotores regulados por ABA, tales como rab17, se monitoreó la actividad del promotor rab17 en las células de callo de maíz a través de la expresión transitoria de una proteína reportera, beta-glucuronidasa (GUS), bajo control del promotor rab17. El callo fue elaborado a partir de la línea de maíz Black Mexican Sweet y fue mantenido como se describe (Vilardell et al., *Plant Mol Biol* 14: 423 - 432, 1990) con 3 mg / ml de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en el medio. Aproximadamente 1 g de callo fue esparcido sobre papel de filtro un día antes de bombardeo e incubado durante la noche a 26° C en la oscuridad. Cuatro horas antes del bombardeo, se trasladó el callo a un medio con manitol 200 mM. El callo fue transformado por medio de bombardeo de partículas con 2 µg del plásmido rab17prom-GUS, 1,5 µg de pRT-ex/s-

int/s-LUC como estándar interno y 1 µg ya sea de pJIT-2x 35S-DBF1-nosT o la misma construcción sin inserto como se describe (Klein et al., Nature 327: 70 - 73, 1987). Cada muestra se dividió en dos después de la transformación y se incubaron en medio con o sin ABA 100 µM durante 22 horas en la oscuridad a 26° C antes de la congelación en nitrógeno líquido. Los ensayos de luciferasa y GUS se hicieron como se describió previamente (Busk et al., Plant J. 11: 1285 - 1295, 1997). La actividad relativa de GUS es la lectura del ensayo de GUS dividida por la lectura del ensayo de la luciferasa. Las construcciones utilizadas consistieron ya sea del gen reportero de GUS bajo el control del promotor rab17 de tipo silvestre (fragmento del promotor -350/+30 en relación con el inicio de la transcripción) o de un promotor con el elemento DRE2 mutado. Estas construcciones reporteras fueron cotransformadas con un plásmido efector, que consiste del ADNc de DBF1 bajo el control del promotor 35S doble. Cada combinación de plásmido efector con el plásmido reportero mutante o de tipo silvestre fue transformado a través de bombardeo de microproyectiles en células de callo de maíz. Después del bombardeo se incubaron la mitad de las muestras con ABA y la otra mitad se mantuvo en medio MS.

Como se observa en la figura 5, la proteína DBF1 fue capaz de inducir la expresión del promotor rab 17, resultando en un aumento de dos veces de la actividad de GUS. El tratamiento con ABA tuvo un efecto adicional sobre la expresión de GUS ya que resultó en un aumento de casi tres veces de la actividad relativa de GUS. La mutación sobre el elemento de cis en DRE2 redujo significativamente la capacidad del promotor rab 17 para inducir la expresión en las condiciones de control, así como después del tratamiento con ABA.

Ejemplo 6: DBF1 interactúa con DRE2, pero no con elementos que actúan sobre cis en DRE1 y ABRE

DBF1 se expresó en E. coli usando el sistema de sobreexpresión pET con el fin de estudiar sus propiedades de enlazamiento de ADN. La proteína purificada DBF1 fue utilizada en ensayos de cambio de movilidad electroforética con el fin de determinar su capacidad para enlazarse con diferentes sondas de oligonucleótidos. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos de ADN en ensayos de cambio de movilidad electroforética: DRE2 (SEQ ID NOs 4 y 5), DRE2m (SEQ ID NOs 6 y 7), DRE1 (SEQ ID NOs 8 y 9), DRE1/ABRE1 (SEQ ID NOs 10 y 11), ABRE A (SEQ ID NOs 12 y 13). Los oligonucleótidos de longitud completa fueron purificados por medio de PAGE desnaturante. Los oligonucleótidos complementarios se hibridaron y purificaron en gel de poli(acrilamida) no desnaturante. Los oligonucleótidos bicatenarios fueron marcados con α³²P-dATP (3000 Ci/mmol, Amersham), rellenando con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I (Sambrook et al., 1989) y se purificó en una columna NAP5 (Pharmacia), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN competidor no marcado se rellenó con nucleótidos no radiactivos. La sonda radiactiva se incubó con 400 ng de proteína en 20 µl de amortiguador de enlazamiento 1x (HEPES 25 mM, pH 7,8, KCl 75 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 0,5 mM, DTT 0,2 mM y glicerol al 10%) y 700 ng de poli (dl-dC) durante 20 min sobre hielo antes de cargar sobre Tris-borato-EDTA 1x, (30:0,8 de bis-acrilamida) gel de poli(acrilamida) al 5%. La electroforesis se realizó a 10 V/cm a 4° C. En los ensayos de competición se incubó la proteína con oligonucleótidos no radiactivos en amortiguador de enlazamiento 1x, en hielo durante 10 min antes de la adición de la sonda radiactiva y continuando con la incubación durante 20 min más.

DBF1 se enlazó exitosamente con el oligonucleótido que contenía el elemento que actúa sobre cis en DRE2 de tipo silvestre pero no con el oligonucleótido que alberga la versión mutante de DRE2 (figura 6). La especificidad del enlazamiento DBF1 - DRE2 se confirmó mediante ensayos de competición, así como con el uso de diferentes sondas de oligonucleótidos. En el promotor del gen rab17 el elemento que actúa sobre cis en DRE1 y ABRE1 son objetivos putativos para los factores de transcripción. La DRE1 se superpone parcialmente con la ABRE1 y contiene un motivo de secuencia que difiere sólo en un nucleótido en comparación con la secuencia de DRE2. Como se muestra en la figura 6, DBF1 fue incapaz de enlazarse con cualquiera de estos elementos o con su combinación. Además, no se detectó cambio de movilidad cuando se utilizó una proteína parcial DBF1 que carece del dominio de enlazamiento de ADN ya sea con oligonucleótidos DRE2 de tipo silvestre o mutados. Estos resultados indican que DBF1 se enlaza específicamente con el elemento que actúa sobre cis en DRE2.

Ejemplo 7: Plantas transgénicas que expresan DBF1 bajo el control de un promotor constitutivo o regulable que muestra mayor tolerancia al estrés por deshidratación

El ADNc para DBF1 de maíz se clona en un vector de transformación de la planta, una vez bajo el control del promotor constitutivo GOS2 y una vez bajo el control del promotor rab 17, que es inducido en las hojas y las semillas por ABA y el estrés por deshidratación. Los vectores vacíos (es decir, sin DBF1) se utilizan como controles. Todos los cuatro constructos se introducen en el arroz mediante transformación mediada por Agrobacterium (Hiei et al., Plant J: 6 271 - 282, 1994). Las líneas transgénicas se seleccionan en un medio de cultivo de tejidos suplementado con el antibiótico apropiado. Las líneas seleccionadas se transfieren a macetas en el invernadero y la presencia de la construcción de ADN-T en estas líneas se confirmó mediante amplificación por PCR sobre el ADN genómico de un fragmento de la construcción de ADN-T. La expresión del transgén DBF1 se analiza en hojas y semillas bajo condiciones sin estrés así como después de tratamiento por sequía y ABA, tanto a nivel del ARNm (análisis tipo Northern y RT-PCR) y a nivel de la proteína (análisis tipo Western usando anticuerpos anti-DBF1). Las líneas transgénicas con diferentes niveles de expresión de DBF1 se seleccionan por autopolinización y la producción de semillas. La expresión del transgén DBF1 se analiza de nuevo en la progenie. Además, se analiza la funcionalidad del transgén DBF1: se compara la expresión de rab 17 y de otro elemento DRE2 que contiene genes en las plantas

con y sin el transgén DBF1 por medio del análisis tipo Northern, tanto en plantas tratadas por sequía como no estresadas. Las plantas con transgenes funcionales DBF1 son posteriormente comparadas por la tolerancia al estrés por sequía y por sal contra las plantas que no contienen al transgén DBF1 transgén. Los parámetros para la tolerancia al estrés son el crecimiento y el rendimiento de semilla durante un estrés suave, regeneración y rendimiento de semilla después de la liberación del estrés leve, el crecimiento y rendimiento de semillas y la supervivencia durante el estrés severo, la regeneración y el rendimiento de semilla después de la liberación del estrés severo. Las plantas que expresan DBF1 transgénico son más tolerantes al estrés por deshidratación que las plantas sin un transgén DBF1.

10

Ejemplo 8 de referencia: Identificación del homólogo de arroz ZmDBF1

15

Los inventores seleccionaron la base de datos TIGR (<http://www.tigr.org/>), la base de datos del GenBank y las secuencias del genoma del Arroz Índico publicados por El Instituto de Genómica de Beijing, un brazo operativo de la Academia China de Ciencias. Una predicción de los ORF putativos correspondientes a las secuencias de ADN en esta base de datos estaba disponible para los inventores. Esta selección de las 3 bases de datos se realizó con la secuencia de la proteína de ZmDBF1 utilizando el programa TBLASTN. Los inventores identificaron un gen del arroz que fue anotado en la base de datos del GenBank como un factor de transcripción putativo relacionado con AP2 (número de acceso del Genbank CAC39058), pero los inventores demostraron por primera vez que esta proteína se agrupa perfectamente en el grupo de la proteína DBF1, al hacer una alineación con el programa ClustalW (serie Blosum 32, penalización por apertura de brecha de 10,00 y por extensión de la brecha de 0,05, véase la figura 7A). Esta secuencia de ADN de arroz se identifica en la presente memoria como SEQ ID NO 15 y el aminoácido correspondiente como SEQ ID NO 16. Esta secuencia de arroz no incluye la SEQ ID NO 14 (PZ02_LUPPO no contiene tampoco la SEQ ID NO: 14), pero este es el homólogo más cercano de ZmDBF1 en el genoma del arroz Nipponbare de *Oryza sativa*. Otros genes del arroz que se recuperan en esta búsqueda por TBLASTN se agrupan en un grupo separado que diverge de DBF1 antes que el otro homólogo de la SEQ ID NO 15. La relación con la proteína DBF1 se ilustra adicionalmente en la figura 7. La figura muestra que sólo una de las secuencias de arroz (correspondiente a la proteína CAC39058) se agrupa con DBF1 y con otras secuencias relacionadas de *Arabidopsis* (AAF87854) y *Atriplex* (AAF76898).

20

25

En la figura 7B se muestra una alineación por pares entre la proteína ZmDBF1 y la proteína OsDBF1. El porcentaje de similitud entre las dos secuencias se calculó con el programa GAP y se determinó que era 38,4% y el porcentaje de identidad: 35,3% (véase también la Tabla 4). El programa GAP alinea dos secuencias en forma global (matriz de sustitución de aminoácidos BLOSUM62, Peso de la Brecha: 8, Peso por Longitud: 2, Referencia: Henikoff, S. y Henikoff, J. G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915 - 10919).

30

REFERENCIAS

35

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., & Watson J. D. (1994) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc.

An G., Watson B. D., Stachel S., Gordon M. P., & Nester E. W. (1985) New cloning vehicles for transformation of higher plants. *EMBO J.* 4, 277 - 284.

40

Armstrong C. L., Petersen W. P., Buchholz W. G., Bowen B. A., & Sulc S. L. (1990) Factors affecting PEG-mediated stable transformation of maize protoplasts. *Plant Cell Reports* 9, 335 - 339.

Banerjee A., Pramanik A., Bhattacharjya S., & Balaram P. (1996) Omega amino acids in peptide design: incorporation into helices. *Biopolymers* 39, 769 - 777.

Baron M. H. & Baltimore D. (1982) Antibodies against the chemically synthesized genome-linked protein of poliovirus react with native virus-specific proteins. *Cell* 28, 395 - 404.

45

Bartel P. L. & Fields S. (1997) *The Yeast Two-Hybrid System*. Oxford University Press.

Bechtold N. & Pelletier G. (1998) In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol.Biol.* 82, 259 - 266.

Bell M. H., Halford N. G., Ormrod J. C., & Francis D. (1993) Tobacco plants transformed with *cdc25*, a mitotic inducer gene from fission yeast. *Plant Mol.Biol.* 23, 445 - 451.

50

Benkirane N., Guichard G., Briand J. P., & Muller S. (1996) Exploration of requirements for peptidomimetic immune recognition. Antigenic and immunogenic properties of reduced peptide bond pseudopeptide analogues of a histone hexapeptide. *J.Biol Chem.* 271, 33218 - 33224.

- Berry A. & Brenner S. E. (1994) A prototype computer system for de novo protein design. *Biochem. Soc. Trans.* 22, 1033 - 1036.
- Binarova P., Dolezel J., Draber P., Heberle-Bors E., Strnad M., & Bogre L. (1998) Treatment of *Vicia faba* raíz tip cells with specific inhibitors to cyclin-dependent kinases leads to abnormal spindle formation. *Plant J.* 16, 697 - 707.
- 5 Bogre L., Zwerger K., Meskiene I., Binarova P., Csizmadia V., Planck C., Wagner E., Hirt H., & Heberle-Bors E. (1997) The cdc2Ms kinase is differently regulated in the cytoplasm and in the nucleus. *Plant Physiol* 113, 841 - 852.
- Bögge L., Calderini O., Binarova P., Mattauch M., Till S., Kiegerl S., Jonak C., Pollaschek C., Barker P., Huskisson N. S., Hirt H., & Heberle-Bors E. (1999) A MAP Kinase Is Activated Late in Plant Mitosis and Becomes Localized to the Plane of Cell Division. *Plant Cell* 11, 101 - 114.
- 10 Calderini O., Bogre L., Vicente O., Binarova P., Heberle-Bors E., & Wilson C. (1998) A cell cycle regulated MAP kinase with a possible role in cytokinesis in tobacco cells. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 20), 3091 - 3100.
- Christou P., McCabe D.E., & Swain W. F. (1988) Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles. *Plant Physiol.* 87, 671 - 674.
- Cohen-Fix O. & Koshland D. (1997) The metaphase-to-anaphase transition: avoiding a mid-life crisis. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9, 800 - 806.
- 15 Colasanti J., Tyers M., & Sundaresan V. (1991) Isolation and characterization of cDNA clones encoding a functional p34cdc2 homologue from *Zea mays*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88, 3377 - 3381.
- Crossway A., Oakes J. V., Irvine J. M., Ward B., Knauf V. C., & Shewmaker C. K. (1986) Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 202, 179 - 185.
- 20 Dale E. C. & Ow D. W. (1990) Intra- and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. *Gene* 91, 79 - 85.
- De Veylder L., Segers G., Glab N., Casteels P., Van Montagu M., & Inze D. (1997) The Arabidopsis Cks1At protein binds the cyclin-dependent kinases Cdc2aAt and Cdc2bAt. *FEBS Lett.* 412, 446 - 452.
- Dodds J. H. (1985) *Plant genetic engineering*. Cambridge University Press.
- 25 Doerner P., Jorgensen J. E., You R., Steppuhn J., & Lamb C. (1996) Control of raíz growth and development by cyclin expression [véanse los comentarios]. *Nature* 380, 520 - 523.
- Dorner B., Husar G. M., Ostresh J. M., & Houghten R. A. (1996) The synthesis of peptidomimetic combinatorial libraries through successive amide alkylations. *Bioorg.Med.Chem.* 4, 709 - 715.
- Elledge S. J. (1996) Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274, 1664 - 1672.
- 30 Ellis J. G., Liewellyn D. J., Dennis E. S., & Peacock W. J. (1987) Maize Adh-1 promoter sequences control anaerobic regulation: addition of upstream promoter elements from constitutive genes is necessary for expression in tobacco. *EMBO J.* 6, 11 - 16.
- Evans T., Rosenthal E. T., Youngblom J., Distel D., & Hunt T. (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33, 389 - 396.
- 35 Fantes P. (1989) Yeast cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1, 250 - 255.
- Fassina G. & Melli M. (1994) Identification of interactive sites of proteins and protein receptors by computer-assisted searches for complementary peptide sequences. *Immunomethods.* 5, 114 - 120.
- Fedoroff N. V. & Smith D. L. (1993) A versatile system for detecting transposition in Arabidopsis. *Plant J.* 3, 273 - 289.
- 40 Feiler H. S. & Jacobs T. W. (1990a) Cell division in higher plants: a cdc2 gene, its 34-kDa product, and histone H1 kinase activity in pea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 87, 5397 - 5401.
- Feiler H. S. & Jacobs T. W. (1990b) Cell division in higher plants: a cdc2 gene, its 34-kDa product, and histone H1 kinase activity in pea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 87, 5397 - 5401.
- 45 Fesquet D., Labbe J. C., Derancourt J., Capony J. P., Galas S., Girard F., Lorca T., Shuttleworth J., Doree M., & Cavadore J. C. (1993) The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues. *EMBO J.* 12, 3111 - 3121.

- Francis D., Dudits D. d., & Inzé D. (1998) Plant cell division. Portland, London.
- Francis D. & Halford N. G. (1995) The plant cell cycle. *Physiol.Plant.* 93, 365 - 374.
- 5 Fromm M., Taylor L. P., & Walbot V. (1985) Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 82, 5824 - 5828.
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol* 166, 557 - 580.
- Hansen G. & Chilton M. D. (1996) "Agrolistic" transformation of plant cells: integration of T-strands generated in planta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93, 14978 - 14983.
- 10 Hansen G., Shillito R. D., & Chilton M. D. (1997) T-strand integration in maize protoplasts after codelivery of a T-DNA substrate and virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94, 11726 - 11730.
- Hanson B., Engler D., Moy Y., Newman B., Ralston E., & Gutterson N. (1999) A simple method to enrich an *Agrobacterium*-transformed population for plants containing only T-DNA sequences. *Plant J.* 19, 727 - 734.
- Harlow E. & Lane D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Frío Spring Harbor Laboratory Press.
- 15 Haseloff J., Siemerling K. R., Prasher D. C., & Hodge S. (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94, 2122 - 2127.
- Hayles J. & Nurse P. (1986) Cell cycle regulation in yeast. *J. Cell Sci. Suppl* 4, 155 - 170.
- Hellens R. P., Edwards E. A., Leyland N. R., Bean S., & Mullineaux P. M. (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*- mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 42, 819 - 832.
- 20 Hemerly A. S., Ferreira P., de Almeida E. J., Van Montagu M., Engler G., & Inze D. (1993) *cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell* 5, 1711 - 1723.
- Herrera-Estrella L., De Block M., Messens E. H. J. P., Van Montagu M., & Schell J. (1983a) Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.* 2, 987 - 995.
- 25 Herrera-Estrella L., Depicker A., Van Montagu M., & Schell J. (1983b) Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303, 209 - 213.
- Hirt H., Pay A., Bogre L., Meskiene I., & Heberle-Bors E. (1993) *cdc2MsB*, a cognate *cdc2* gene from alfalfa, complements the G1/S but not the G2/M transition of budding yeast *cdc28* mutants. *Plant J.* 4, 61 - 69.
- 30 Hirt H., Pay A., Gyorgyey J., Bako L., Nemeth K., Bogre L., Schweyen R. J., Heberle-Bors E., & Dudits D. (1991) Complementation of a yeast cell cycle mutant by an alfalfa cDNA encoding a protein kinase homologous to p34cdc2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88, 1636 - 1640.
- Hochstrasser M. (1998) There's the rub: a novel ubiquitin-like modification linked to cell cycle regulation. *Genes Dev.* 12, 901 - 907.
- Hoffman D. L., Laiter S., Singh R. K., Vaisman I. I., & Tropsha A. (1995) Rapid protein structure classification using one-dimensional structure profiles on the bioSCAN parallel computer. *Comput. Appl. Biosci.* 11, 675 - 679.
- 35 Huntley R., Healy S., Freeman D., Lavender P., de Jager S., Greenwood J., Makker J., Walker E., Jackman M., Xie Q., Bannister A. J., Kouzarides T., Gutierrez C., Doonan J. H. & Murray J. A. (1998) The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb-1 is regulated during hoja development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins. *Plant Mol. Biol.* 37, 155 - 169.
- 40 John P. C., Sek F. J., & Lee M. G. (1989) A homolog of the cell cycle control protein p34cdc2 participates in the division cycle of *Chlamydomonas*, and a similar protein is detectable in higher plants and remote taxa. *Plant Cell* 1, 1185 - 1193.
- John P. C. L. (1981) *The Cell cycle*. Cambridge University Press, Cambridge Cambridgeshire.
- Joung J. K., Ramm E. I., & Pabo C. O. (2000) A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97, 7382 - 7387.
- 45 Krek W. (1998) Proteolysis and the G1-S transition: the SCF connection. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 36 - 42.

- Krens F. A., Molendijk L., Wullems G. J., & Schilperoort R. A. (1982) In vitro transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. *Nature* 296, 72 - 74.
- Kumagai A. & Dunphy W. G. (1991) The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. *Cell* 64, 903 - 914.
- 5 Labbe J. C., Capony J. P., Caput D., Cavadore J. C., Derancourt J., Kaghad M., Lelias J. M., Picard A., & Doree M. (1989) MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *EMBO J.* 8, 3053 - 3058.
- Lake R. S. & Salzman N. P. (1972) Occurrence and properties of a chromatin-associated F1-histone phosphokinase in mitotic Chinese hamster cells. *Biochemistry* 11, 4817 - 4826.
- 10 Langan T. A. (1978) Methods for the assessment of site-specific histone phosphorylation. *Methods Cell Biol.* 19, 127 - 142.
- Lee M. G. & Nurse P. (1987) Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene cdc2. *Nature* 327; 31 - 35.
- 15 Lerner R. A. (1982) Tapping the immunological repertoire to produce antibodies of predetermined specificity. *Nature* 299, 593 - 596.
- Lerner R. A., Green N., Alexander H., Liu F. T., Sutcliffe J. G., & Shinnick T. M. (1981) Chemically synthesized peptides predicted from the nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome elicit antibodies reactive with the native envelope protein of Dane particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 78, 3403 - 3407.
- Liddle J. E. & Cryer A. (1991) *A Practical Guide to Monoclonal Antibodies*. Wiley New York.
- 20 Lisztwan J., Marti A., Sutterluty H., Gstaiger M., Wirbelauer C., & Krek W. (1998) Association of human CUL-1 and ubiquitin-conjugating enzyme CDC34 with the F-box protein p45(SKP2): evidence for evolutionary conservation in the subunit composition of the CDC34-SCF pathway. *EMBO J.* 17, 368 - 383.
- Loffler J., Langui D., Probst A., & Huber G. (1994) Accumulation of a 50 kDa N-terminal fragment of beta-APP695 in Alzheimer's disease hippocampus and neocortex. *Neurochem.Int.* 24, 281 - 288.
- 25 Lundgren K., Walworth N., Booher R., Dembski M., Kirschner M., & Beach D. (1991) mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell* 64, 1111 - 1122.
- Magyar Z., Meszaros T., Miskolczi P., Deak M., Feher A., Brown S., Kondorosi E., Athanasiadis A., Pongor S., Bilgin M., Bako L., Koncz C., & Dudits D. (1997) Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell* 9, 223 - 235.
- 30 Merrifield R. B. (1963) Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 2149 - 2154.
- Mironov V., De Veylder L., Van Montagu M., & Inze D. (1999) Cyclin-dependent kinases and cell division in plants-The Nexus. *Plant Cell* 11, 509 - 522.
- 35 Monge A., Lathrop E. J., Gunn J. R., Shenkin P. S., & Friesner R. A. (1995) Computer modeling of protein folding: conformational and energetic analysis of reduced and detailed protein models. *J.Mol.Biol* 247, 995 - 1012.
- Murakami T., Simonds W.F., & Spiegel A. M. (1992) Site-specific antibodies directed against G protein beta and gamma subunits: effects on alpha and beta gamma subunit interaction. *Biochemistry* 31, 2905 - 2911.
- Murray A. W. & Kirschner M. W. (1989) Dominoes and clocks: the union of two views of the cell cycle. *Science* 246, 614 - 621.
- 40 Nasmyth K. (1993) Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase. *Curr. Opin. Cell Biol* 5, 166 - 179.
- Norbury C. & Nurse P. (1992) Animal cell cycles and their control. *Annu.Rev.Biochem.* 61, 441 - 470.
- Nurse P. (1990) Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344, 503 - 508.
- Nurse P. & Bissett Y. (1981) Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature* 292, 558 - 560.
- 45 Olszewski K. A., Kolinski A., & Skolnick J. (1996) Folding simulations and computer redesign of protein A three-helix bundle motifs. *Proteins* 25, 286 - 299.

- Onouchi H., Nishihama R., Kudo M., Machida Y., & Machida C. (1995) Visualization of site-specific recombination catalyzed by a recombinase from *Zygosaccharomyces rouxii* in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 247, 653 - 660.
- 5 Onouchi H., Yokoi K., Machida C., Matsuzaki H., Oshima Y., Matsuoka K., Nakamura K., & Machida Y. (1991) Operation of an efficient site-specific recombination system of *Zygosaccharomyces rouxii* in tobacco cells. *Nucleic Acids Res.* 19, 6373 - 6378.
- Ormrod & Francis (1993b) *Molecular and cell biology of the plant cell cycle proceedings of a meeting held at Lancaster University, 9 - 10 April 1992.* Kluwer Academic, Dordrecht.
- 10 Ormrod & Francis (1993a) *Molecular and cell biology of the plant cell cycle proceedings of a meeting held at Lancaster University, 9 - 10 April 1992.* Kluwer Academic, Dordrecht.
- Osborne B. I., Wirtz U., & Baker B. (1995) A system for insertional mutagenesis and chromosomal rearrangement using the Ds transposon and Cre-lox. *Plant.* 7, 687 - 701.
- 15 Ostresh J. M., Blondelle S. E., Dorner B., & Houghten R. A. (1996) Generation and use of nonsupport-bound peptide and peptidomimetic combinatorial libraries. *Methods Enzymol.* 267, 220 - 234.
- Pabo C. O. & Suchanek E. G. (1986) Computer-aided model-building strategies for protein design. *Biochemistry* 25, 5987 - 5991.
- Palmgren G. (1997) Transgenic plants: environmentally safe factories of the future. *Trends Genet.* 13, 348.
- 20 Paszkowski J., Shillito R.D., Saul M., Mandak V., & Hohn T. H. B. P. I. (1984) Direct gene transfer to plants. *EMBO J.* 3, 2717 - 2722.
- Peralta E. G., Hellmiss R., & Ream W. (1986) Overdrive, a T-DNA transmission enhancer on the *A. tumefaciens* tumour-inducing plasmid. *EMBO J.* 5, 1137 - 1142.
- Pines J. (1995) Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem.J.* 308 (Pt 3), 697 - 711.
- 25 Poon R. Y., Yamashita K., Adamczewski J. P., Hunt T., & Shuttleworth J. (1993) The cdc2-related protein p40MO15 is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33cdk2 and p34cdc2. *EMBO J.* 12, 3123 - 3132.
- Reed S. I., Hadwiger J. A., & Lorincz A. T. (1985) Protein kinase activity associated with the product of the yeast cell division cycle gene CDC28. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 82, 4055 - 4059.
- 30 Renaudin J. P., Doonan J. H., Freeman D., Hashimoto J., Hirt H., Inze D., Jacobs T., Kouchi H., Rouze P., Sauter M., Savoure A., Sorrell D.A., Sundaresan V., & Murray J.A. (1996) Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Mol.Biol.* 32, 1003 - 1018.
- Renouf D. V. & Hounsell E. F. (1995) Molecular modelling of glycoproteins by homology with non-glycosylated protein domains, computer simulated glycosylation and molecular dynamics. *Adv. Exp. Mecl. Biol* 376, 37 - 45.
- Rose R. B., Craik C. S., Douglas N. L., & Stroud R. M. (1996) Three-dimensional structures of HIV-1 and SIV protease product complexes. *Biochemistry* 35, 12933 - 12944.
- 35 Russell P. & Nurse P. (1986) cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* 45, 145 - 153.
- Russell P. & Nurse P. (1987a) Negative regulation of mitosis by wee1+, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell* 49, 559 - 567.
- Russell P. & Nurse P. (1987b) The mitotic inducer nim1+ functions in a regulatory network of protein kinase homologs controlling the initiation of mitosis. *Cell* 49, 569 - 576.
- 40 Rutenber E. E., McPhee F., Kaplan A. P., Gallion S. L., Hogan J. C., Jr., Craik C. S., & Stroud R. M. (1996) A new class of HIV-1 protease inhibitor: the crystallographic structure, inhibition and chemical synthesis of an aminimide peptide isostere. *Bioorg.Med.Chem.* 4, 1545 - 1558.
- Sambrook J., Fritsch E. F., & Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Frio Spring Harbor Laboratory Press.
- 45 Schlappi M., Smith D., & Fedoroff N. (1993) TnpA trans-activates methylated maize Suppressor-mutator transposable elements in transgenic tobacco. *Genetics* 133, 1009-1021.

- Semler B. L., Anderson C. W., Hanecak R., Dorner L. F., & Wimmer E. (1982) A membrane-associated precursor to poliovirus VPg identified by immunoprecipitation with antibodies directed against a synthetic heptapeptide. *Cell* 28, 405 - 412.
- 5 Shioda T., Andriole S., Yahata T., & Isselbacher K. J. (2000) A green fluorescent protein-reporter mammalian twohybrid system with extrachromosomal maintenance of a prey expression plasmid: Application to interaction screening. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 5220 - 5224.
- 10 Soni R., Carmichael J. P., Shah Z. H., & Murray J. A. (1995) A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* 7, 85 - 103.
- Sorrell D. A., Combettes B., Chaubet-Gigot N., Gigot C., & Murray J. A. (1999) Distinct cyclin D genes show mitotic accumulation or constant levels of transcripts in tobacco bright yellow-2 cells. *Plant Physiol* 119, 343 - 352.
- 15 Sugita K., Kasahara T., Matsunaga E., & Ebinuma H. (2000) Technical advance: A transformation vector for the production of marker- free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency [In Process Citations. *Plant J.* 22, 461 - 469.
- Sun Y., Dilkes B. P., Zhang C., Dante R. A.; Carneiro N. P., Lowe K. S., Jung R., Gordon-Kamm W. J., & Larkins B. A. (1999) Characterization of maize (*Zea mays* L.) *Wee1* and its activity in developing endosperma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96, 4180 - 4185.
- 20 Swenson K. I., Farrell K. M., & Ruderman J. V. (1986) The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell* 47, 861 - 870.
- Tamura R. N., Cooper H. M., Collo G., & Quaranta V. (1991) Cell type-specific integrin variants with alternative alpha chain cytoplasmic domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88, 10183 - 10187.
- 25 Trieu A. T., Burleigh S. H., Kardailsky I. V., Maldonado-Mendoza I. E., Versaw W. K., Blaylock L. A., Shin H., Chiou T. J., Katagi H., Dewbre G. R., Weigel D., & Harrison M. J. (2000) Technical Advance: Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. *Plant J.* 22, 531 - 541.
- van Haaren M. J., Sedee N. J., Schilperoort R. A., & Hooykaas P. J. (1987) Overdrive is a T-region transfer enhancer which stimulates T-strand production in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nucleic Acids Res.* 15, 8983 - 8997.
- 30 Van Sluys M. A., Tempe J., & Fedoroff N. (1987) Studies on the introduction and mobility of the maize Activator element in *Arabidopsis thaliana* and *Daucus carota*. *EMBO J.* 6, 3881 - 3889.
- Wang K., Genetello C., Van Montagu M., & Zambryski P. C. (1987) Sequence context of the T-DNA border repeat element determines its relative activity during T-DNA transfer to plant cells. *Mol. Gen. Genet.* 210, 338 - 346.
- 35 Wang Y., Dimitrov K., Garrity L. K., Sazer S., & Beverley S. M. (1998) Stage-specific activity of the *Leishmania major* CRK3 kinase and functional rescue of a *Schizosaccharomyces pombe* *cdc2* mutant. *Mol. Blochem. Parasitol.* 96, 139 - 150.
- Wilson A., Pfosser M., Jonak C., Hirt H., Heberle-Bors E., & Vicente O. (1999) Evidence for the activation of a MAP kinase upon phosphate-induced cell cycle re-entry in tobacco cells. *Physiol.Plant* 102, 532 - 538.
- Wodak S. J. (1987) Computer-aided design in protein engineering. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 501, 1 - 13.
- 40 Woulfe J., Lafortune L., de Nadai F., Kitabgi P., & Beaudet A. (1994) Post-translational processing of the neurotensin/neuromedin N precursor in the central nervous system of the rat--II. Immunohistochemical localization of maturation products. *Neuroscience* 60, 167 - 181.
- Xie Q., Sanz-Burgos A. P., Hannon G. J., & Gutierrez C. (1996) Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. *EMBO J.* 15, 4900 - 4908.
- 45 Yoon K., Cole-Strauss A., & Kmiec E. B. (1996) Targeted gene correction of episomal DNA in mammalian cells mediated by a chimeric RNA. DNA oligonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93, 2071 - 2076.
- Zeng Y., Forbes K. C., Wu Z., Moreno S., Piwnicka-Worms H., & Enoch T. (1998) Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1. *Nature* 395, 507 - 510.

Zhang Y. L., Dawe A. L., Jiang Y., Becker J. M., & Naider F. (1996) A superactive peptidomimetic analog of a farnesylated dodecapeptide yeast pheromone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 327 - 331.

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico que codifica una proteína DBF1 de una planta o un fragmento de la misma capaz de enlazarse con una secuencia de ADN reguladora de cis en DRE seleccionada del grupo de:
- (a) ácido nucleico que contiene la secuencia de ADN como la presentada en la SEQ ID NO 2,
- 5 (b) ácido nucleico que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos como la presentada en la SEQ ID NO 3,
- (c) un fragmento del ácido nucleico de (a), que codifica una proteína de al menos 50 aminoácidos de longitud capaz de enlazarse con una secuencia de ADN reguladora de cis en DRE, y
- 10 (d) un fragmento del ácido nucleico de (b) que codifica una proteína de al menos 50 aminoácidos de longitud capaz de enlazarse con una secuencia de ADN reguladora de cis en DRE.
2. El ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 1, que es ADNc, ADN, ADN genómico o ADN sintético, o ARN en donde T es reemplazado por U.
3. El ácido nucleico aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que se deriva de una planta monocotiledónea.
- 15 4. Un polipéptido codificado por un ácido nucleico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
6. El vector de la reivindicación 5, que es un vector de expresión, en donde dicha secuencia de ácido nucleico está operativamente enlazada a una o más secuencias de control que permite la expresión en células huésped procariotas y/o eucariotas.
- 20 7. Una célula huésped que contiene un transgén DBF1 que contiene una molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un vector de acuerdo con la reivindicación 5 o 6.
8. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 7 seleccionada del grupo que consiste de una célula bacteriana, de insecto, de hongo, de una planta o animal.
- 25 9. Una célula de una planta transgénica que comprende un transgén DBF1 que contiene un ácido nucleico de las reivindicaciones 1 a 3 o un vector de acuerdo con la reivindicación 5 o 6.
10. La célula de una planta transgénica de la reivindicación 9 en donde dicha secuencia de ácido nucleico o dicho vector se integra en forma estable en el genoma de la célula de la planta.
- 30 11. Una planta transgénica, un tejido de una planta o una parte de una planta que comprende una célula de una planta de la reivindicación 9 o 10.
12. Un método para la producción de una planta transgénica, célula de una planta, parte de una planta o tejido de una planta que comprende la introducción de un ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un vector de acuerdo con la reivindicación 5 o 6 en una planta, célula de una planta, parte de una planta o tejido de una planta.
- 35 13. El método de la reivindicación 12 comprende además la regeneración de una planta a partir de dicha célula de la planta, parte de la planta o tejido de la planta.
14. Un método para incrementar el crecimiento y/o el rendimiento de una planta bajo condiciones estresadas y/o no estresadas, dicho método comprendiendo la introducción de un ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un vector de acuerdo con la reivindicación 5 o 6 en una célula de una planta, parte de una planta o tejido de una planta.
- 40 15. La planta, tejido de la planta o parte de la planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicha planta es una planta monocotiledónea o una planta dicotiledónea.
16. Una parte cosechable o propágulo derivados de una planta o tejido de una planta de cualquiera de las reivindicaciones 11 o 15, dicha parte cosechable o propágulo comprendiendo un transgén DBF1 que contiene un ácido nucleico de las reivindicaciones 1 a 3 o un vector de acuerdo con la reivindicación 5 o 6.
- 45 17. La parte cosechable de acuerdo con la reivindicación 16, que se selecciona del grupo que consiste de semillas,

hojas, raíces, flores, frutos, tallos, rizomas, tubérculos y bulbos, dicha parte cosechable comprendiendo un transgén DBF1 que contiene un ácido nucleico de las reivindicaciones 1 a 3 o un vector de acuerdo con la reivindicación 5 o 6.

5 18. La progenie derivada de cualquiera de las plantas, tejidos de las plantas o partes de las plantas de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 o las reivindicaciones 15 a 17, dicha progenie comprendiendo un transgén DBF1 que contiene un ácido nucleico de las reivindicaciones 1 a 3 o un vector de acuerdo con la reivindicación 5 o 6.

19. Un método para identificar polipéptidos que interactúan con un polipéptido de la reivindicación 4, que comprende un ensayo de selección de doble híbrido en donde al menos un polipéptido de la reivindicación 4 se usa como cebo y en donde una biblioteca de ADNc de una planta o parte de una planta se usa como presa.

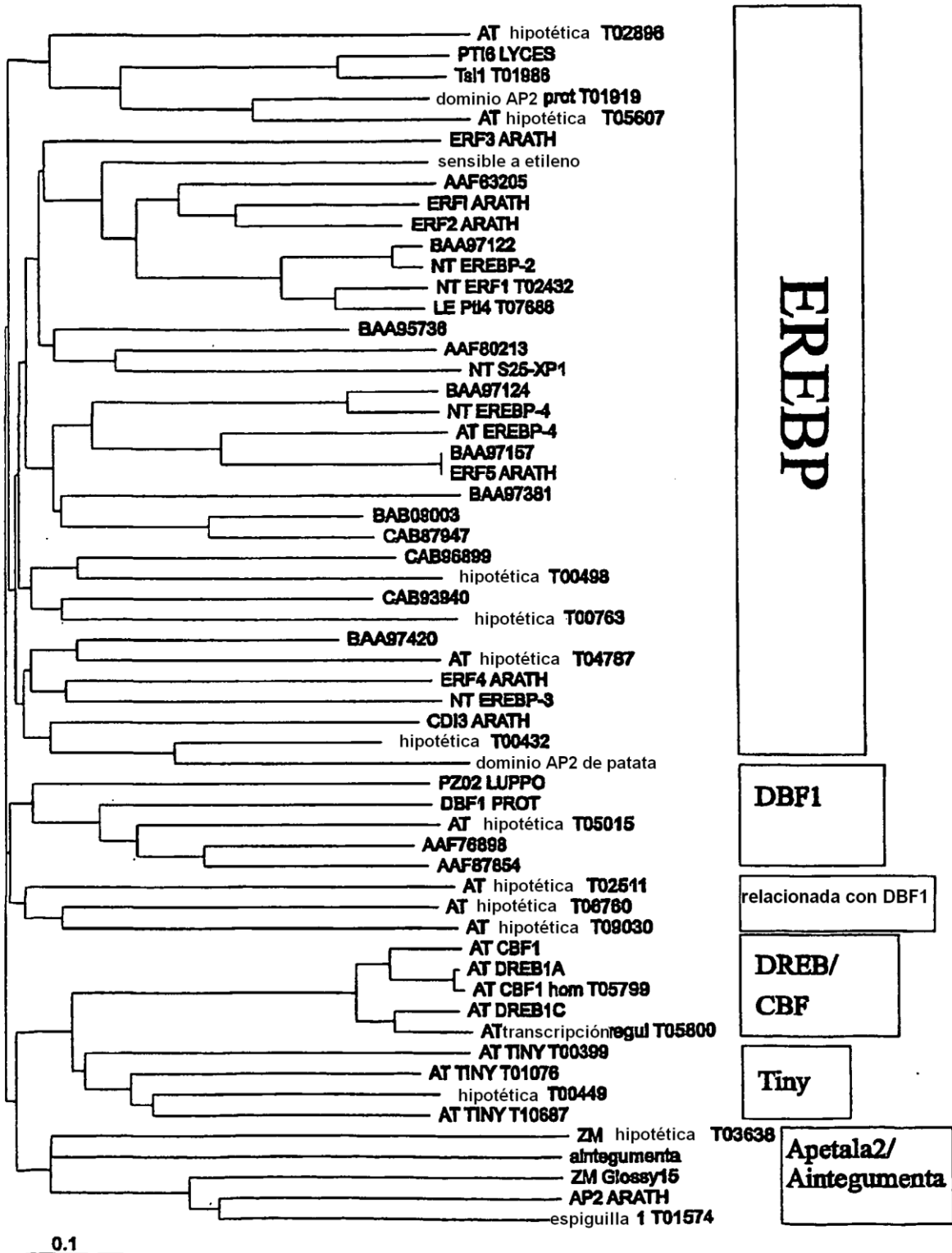


FIGURA 1A

119

I C
I C
I C
I C

A
A
A
E

V D A K L Q
V N A K L E
V D A K L E
V D A K L Q

A
P S
D H

S S
S S
Q H

P L
P L
P L
P L

104

R A
Y K
Y Q
F N

DBF1
AAF76898
AAF87854
T05015

I C

V D A K L Q

P L

CONSENSO

N E

I C

I A K L

Q S S S K L L S

PZ02_LUPPO

A K A

D I Q K A

R L R I P E S T C

DREB1A

A K A

D I Q K A

R L R I P E S T C

CBF1

FIGURA 1B

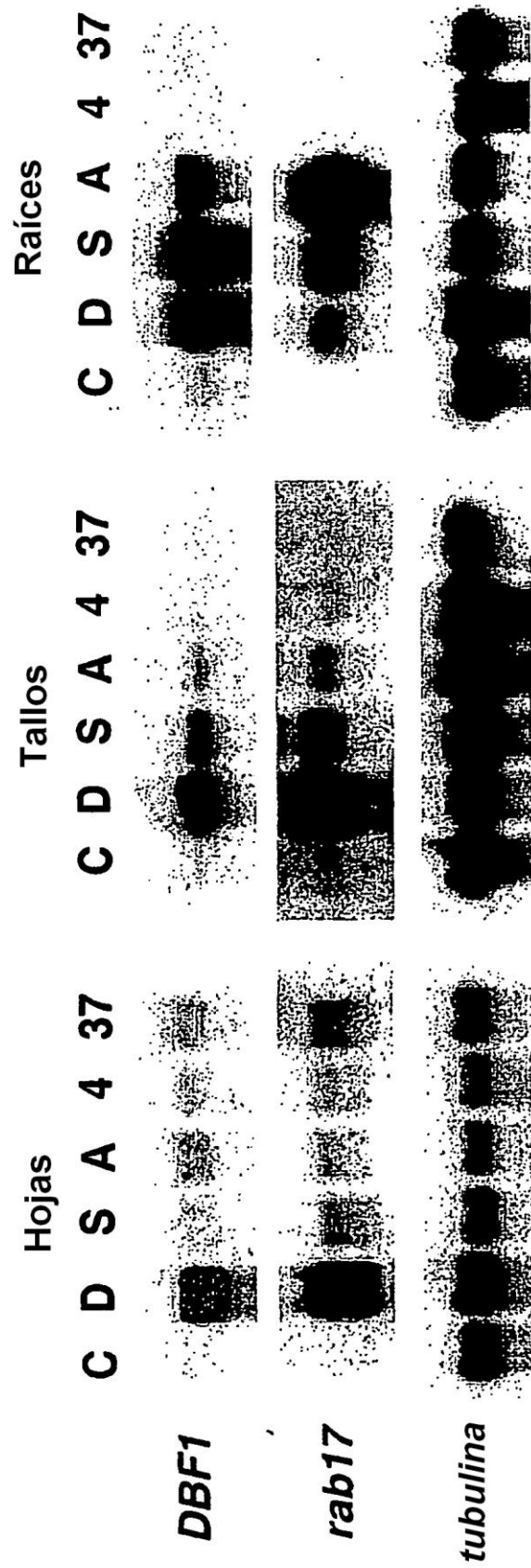


FIGURA 2

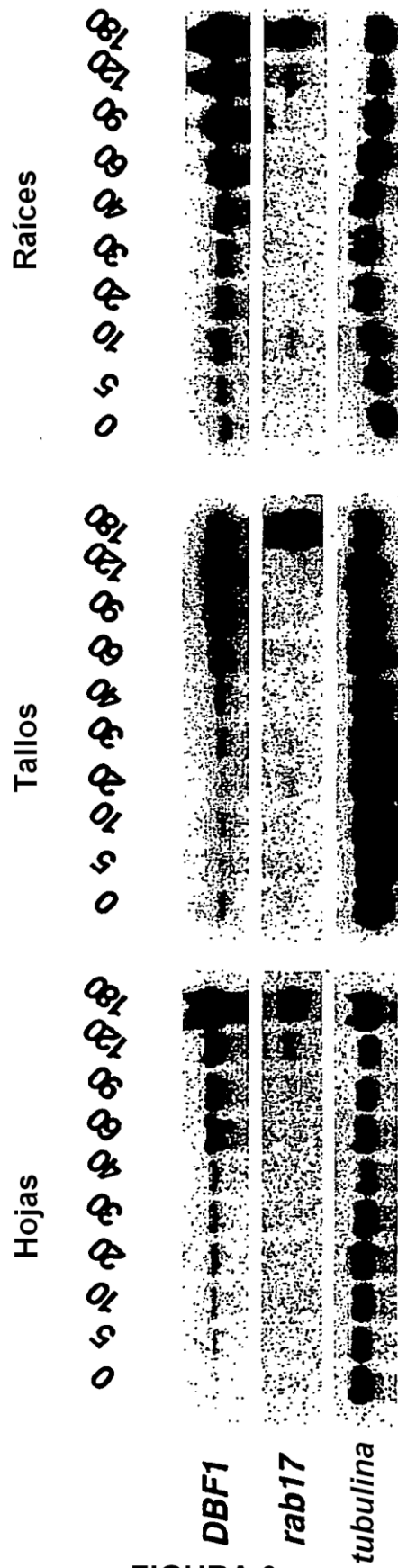


FIGURA 3

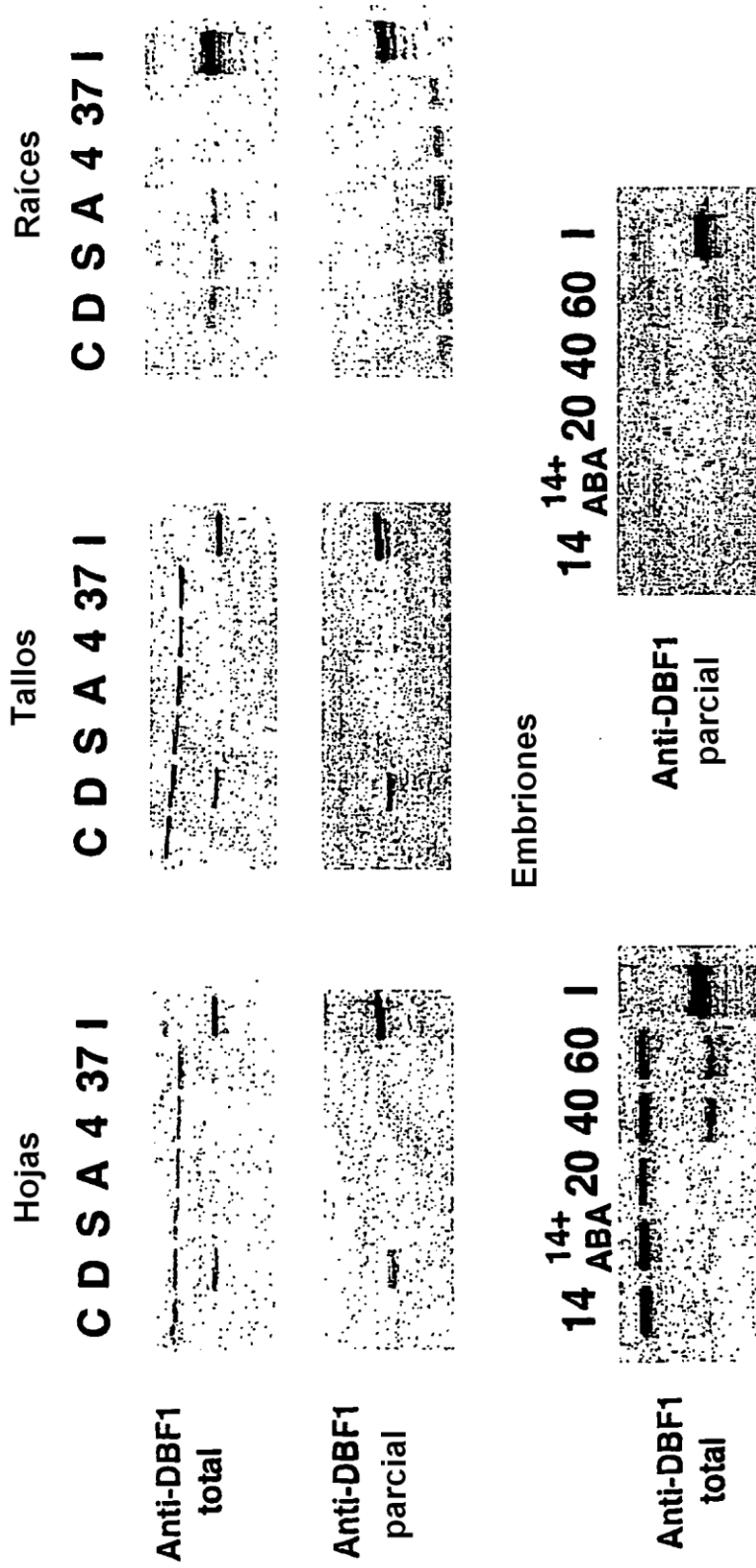


FIGURA 4

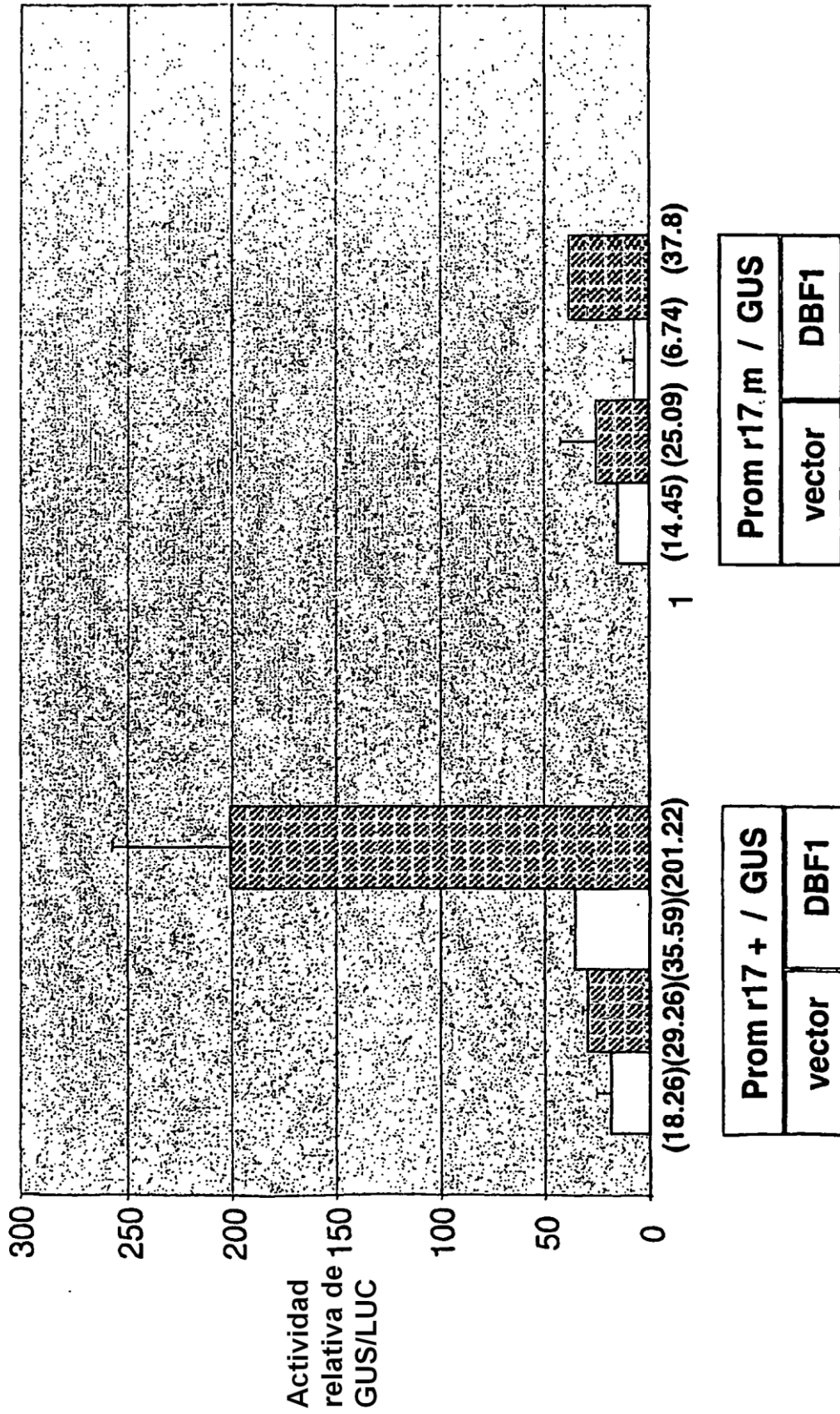


FIGURA 5

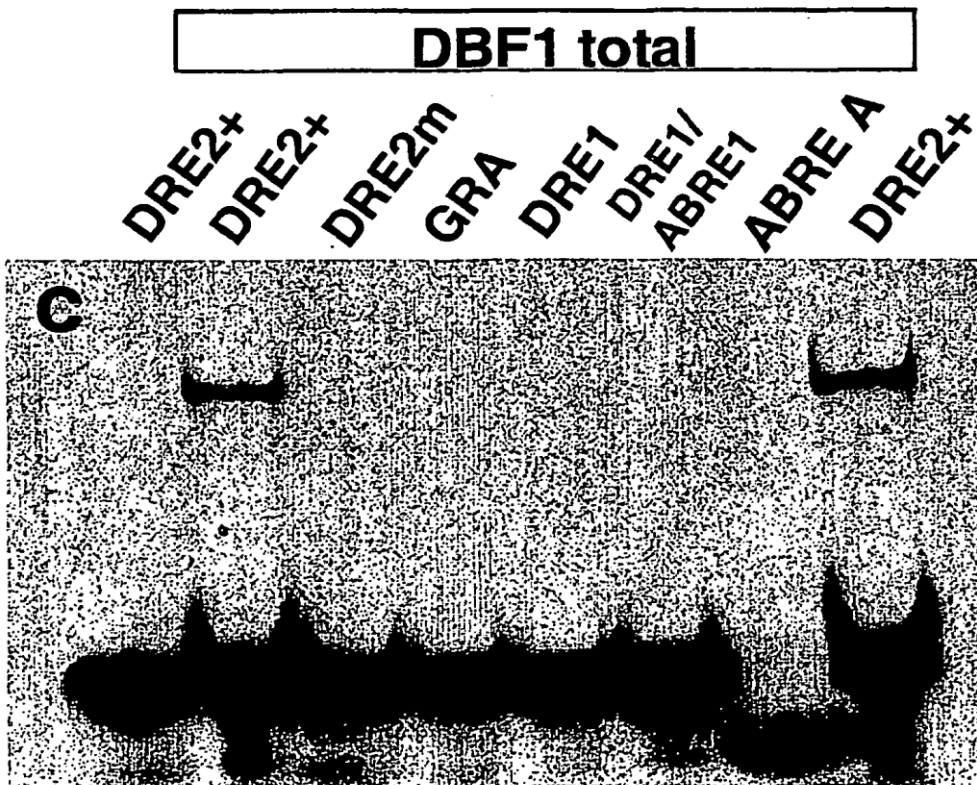
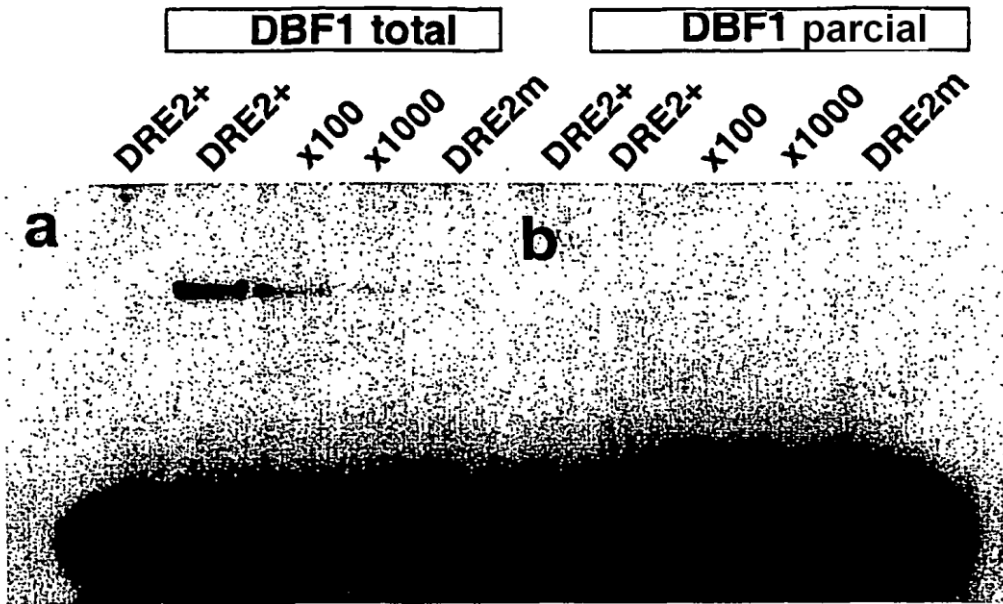


FIGURA 6

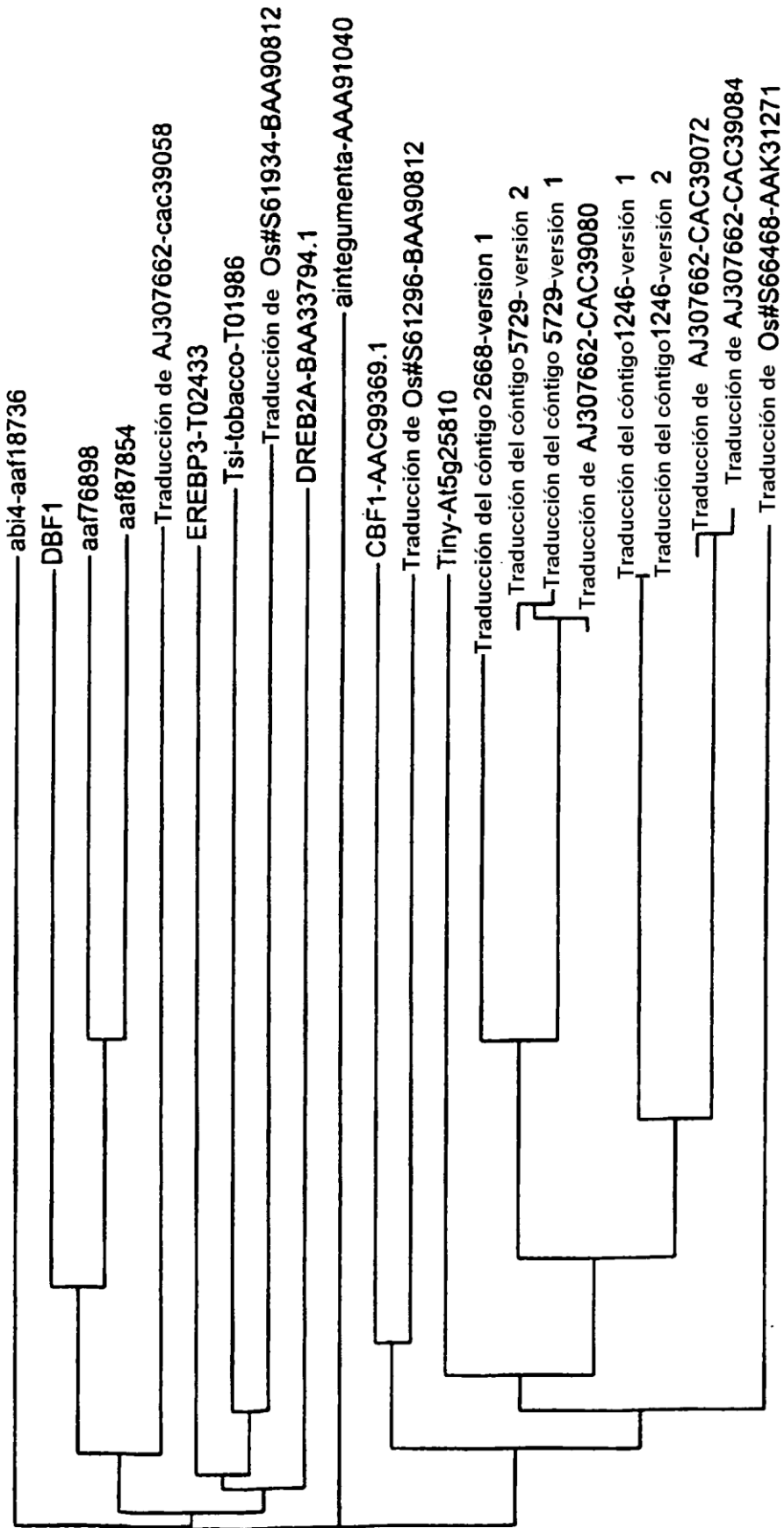


FIGURA 7A

	1		50
	(1)	DBF1	-----
Traducción de AJ307662-cac39058	(1)	DBF1	MLLNPAAREVAALDSIRHLLLEEEETPATAPATRRPVYCRSSSFGSLV
Consenso	(1)		-----
	51		100
	(1)	DBF1	-----
Traducción de AJ307662-cac39058	(51)	DBF1	ADQWSESLPFRPND AEDM VVYGA LRDA FSSGWL PDGSFAAVKPE SQDSYD
Consenso	(51)		-----
	101		150
	(1)	DBF1	MQP LQAQTHLQRN PGLG PRAQPMKPA VVPPAPAP-----Q--RPVKLYR
Traducción de AJ307662-cac39058	(101)	DBF1	GSSGSGFFAASSSEAGTGEVTS TEATVTRGIREGEGEAVAVASRGKHYR
Consenso	(101)		I A L A P A P A P K Y R
	151		200
	(44)	DBF1	GVROHWCKWVAEPLR RNRTRLWIGTHTATQAALAYDQAAAYRLRGDA
Traducción de AJ307662-cac39058	(151)	DBF1	GVROHWCKWVAEPLR RNRTRLWIGTHTATQAALAYDQAAAYRLRGDA
Consenso	(151)		GVROHWCKWVAEPLR RNRTRLWIGTHTATQAALAYDQAAAYRLRGDA
	201		250
	(93)	DBF1	ARINRDNAEERAPLDPAVDAKLQALCAITIAAASSSKNSKAKSKAMPIN
Traducción de AJ307662-cac39058	(201)	DBF1	ARINRDNAEERAPLDPAVDAKLQALCAITIAAASSSKNSKAKSKAMPIN
Consenso	(201)		ARINRDNAEERAPLDPAVDAKLQALCAITIAAASSSKNSKAKSKAMPIN
	251		300
	(143)	DBF1	ASVLEAAASPSMSSDEGSGSGFGSDDEMSSSPTPVVAPVADMGQLD
Traducción de AJ307662-cac39058	(232)	DBF1	ASVLEAAASPSMSSDEGSGSGFGSDDEMSSSPTPVVAPVADMGQLD
Consenso	(251)		ASVLEAAASPSMSSDEGSGSGFGSDDEMSSSPTPVVAPVADMGQLD
	301		331
	(193)	DBF1	FSEVWDEDESFVIRKYPSEIDWDALISN-
Traducción de AJ307662-cac39058	(274)	DBF1	PPPPAQAPVQLAIPAOQWFAAGPIQQLVS-
Consenso	(301)		P L P F L AP MA L

FIGURA 7B

SEQ ID NO 1

Contiene tres repeticiones en tándem del elemento DRE2 (subrayado) usado como cebo en la selección de un híbrido

(Ejemplo 1; Busk et al. 1997)

AATTCCCGGGCCACCGACGCACGGCCGCACCGACGCACGGCCGGGCCACCGAC**
GCACGG**

SEQ ID NO 2

Secuencia de nucleótidos de DBF1

1043 nucleótidos

Secuencia de ADN

Zea mays

GCACGAGCAATCCCCTTCAACAAACGCACCGCACTCCACGGCAGCCAGAAAAC
ACATCCCACGGGGCCAGACCCGGCGACCCACCTGAGCCCGGCGCAGATGCAG
TTCATCCAGGCCAGCTCCACCTGCAGCGGAACCCGGGGCTGGGCCCGCGGGC
GCAGCCCATGAAGCCCGCCGTCCAGTGCCGCCGGCGCCGGCGCCGCAGCGGC
CTGTGAAGCTGTACCGCGGCGTGCGGCAGCGTCACTGGGGCAAGTGGGTGGCC
GAGATCCGGCTCCCCGGAACCGCACCCGCCTGTGGCTCGGGACCTTCGACAC
CGCCGAGCAGGCAGCGCTGGCCTACGACCAGGCGGCGTACCGCCTCCGCGGGG
ACGCGGCGCGGCTCAACTTCCCCGACAACGCGGAGTCCAGGGCGCCGCTCGAC
CCCGCCGTGGACGCCAAGCTGCAGGCCATCTGCGCCACCATCGCCGCCGCGTC
GTCGTCAATCAAGAATTCCAAGGCCAAGAGCAAGGCGATGCCAATCAACGCGT
CCGTTCTGGAAGCGGCAGCGGCGTCTCCGAGCAACAGCTCCTCCGACGAAGGT
TCCGGCTCCGGGTTCGGGTCGGACGACGAGATGTCCTCGTCTTCCCCGACGCC
GGTGGTGGCGCCGCCGGTGGCGGACATGGGACAGTTGGATTTTCAGCGAGGTTTC
CGTGGGACGAGGACGAGAGCTTCGTGCTCCGCAAGTACCCGTCCTACGAGATC
GACTGGGACGCGCTGCTCTCCAAC TAGTCGCCCTTCGCCGACAGATGTGCTGT
TG TAGTT CAGTAGTGGCAGTATCTCTGGCCGCCGACAGATGAGGTTTTAGGCAA
TCTGCAGGCCGCCGGCCCATGTGTATTAAGTAGGTTTTGCTCAGTTGTTGGCC
CCGACTTCGCCGGCGTTTTTTGTGACCGGCGTCCCCGAGTGCACTGCATTGGT
GTA CTGGTCTGTCTGTAAAAAAAATGGATCTGTGTACTTCTATAGTGTGTAT
TCAACCATTTGTTCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

FIGURA 8

SEQ ID NO 3
 SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE DBF1
 222 AMINOÁCIDOS
 SECUENCIA DE PROTEÍNA
 Zea mays

MQFIQAQLHLQARNPGLGPRAQPMKPAVPVPPAPAPQRPVKLYRGVQRHWGKW
 VAEIRLPRNRTRLWLGTFTAEQAALAYDQAAYRLRGDAARLNFPDNAESRAP
 LDPAVDAKLQAICATIAAASSSSKNSKAKSKAMPINASVLEAAAASPSNSSSD
 EGSQSGFGSDDEMSSSSPTPVVAPPVADMGQLDFSEVPWDEDESFVLRKYPSY
 EIDWDALLSN*

SEQ ID 4: 5'-ggggTCGACCGGGCCACCGACGCACCGGCTCGAG-3'

SEQ ID 5: 5'-ggggCTCGAGCCGTGCGTCCGGTGGCCCGGTCGA-3'

SEQ ID 6: 5'-ggggTCGACCGGGCCAGAATTCACCGGCTCGAG-3'

SEQ ID 7: 5'-ggggCTCGAGCCGTGGAATTCGGCCCGGTCGA-3'

SEQ ID 8: 5'-ggggTCGAGAAGAACCGAGACGAAGCGGTCGAG-3'

SEQ ID 9: 5'-ggggCTCGACCGCTTCGTCTCGGTTCTTCTCGA-3'

SEQ ID 10: 5'-ggggTCGAGAAGAACCGACGTGGCGGTCGAG-3'

SEQ ID 11: 5'-ggggCTCGACCGCCACGTCTCGGTTCTTCTCGA-3'

SEQ ID 12: 5'-tggaagcttCGCGCCACGTGGGCATGagatct-3'

SEQ ID 13: 5'-tggaagcttCATGCCACGTGGCGCGaagctt-3'

SEQ ID 14:

SECUENCIA CONSERVADA DE PÉPTIDOS ENTRE DBF1 Y

PROTEÍNAS RELACIONADAS

PLXXXVD/NAKLQ/EXIC

(X = CUALQUIER AMINOÁCIDO NATURAL)

FIGURA 8 (continuación)

SEQ ID NO 15:

OSDBF1

ATGCTGCTTAATCCGGCGTTCGAGAGAGGTGGCCGCGCTGGACAGCATCCGGCA
CCACCTCCTGGAGGAGGAGGAGACGCCGGCGACGGCGCCGGCGCCGACGC
GGCGGCCGGTGTACTGCCGGAGCTCAAGCTTCGGCAGCCTCGTGGCCGACCAG
TGGAGCGAGTCGCTGCCGTTCCGGCCCAACGACGCCGAGGACATGGTTCGTGTA
CGGCGCCCTCCGCGACGCCTTCTCCTCCGGCTGGCTCCCCGACGGCTCATTCG
CCGCCGTCAAGCCGGAGTCGCAGGACTCCTACGACGGGTCTCCATCGGCAGC
TTCCTCGCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCG
GGAGGCGACGGTGACGCCGGGGATCAGGGAGGGCGAGGGCGAGGCCGTGGCGG
TGGCGTCGAGGGGGAAGCACTACCGCGGGGTGAGGCAGCGGCCGTGGGGCAAG
TTCGCGGCGGAGATCAGGGACCCGGCCAAGAACGGCGCGCGCGTGTGGCTCGG
CACGTTGACTCCGCCGAGGAGGCCCGCGTGGCGTACGACCGCGCCGCCTACC
GCATGCGCGGCTCCCGCGCGCTCCTCAACTTCCCGCTCCGCATCGGCTCCGAG
ATCGCCGCCGCGGCCCGCCGCGCCGCGCGGGCAACAAGCGGCCATATCCCGA
CCCGGCGAGCTCCGGCTCTTCTTCCCTTCATCCTCTTCTCCTCCTCGTCGTCGT
CTTCCTCCTCCGGGTACCGAAGCGGAGGAAGAGAGGGCGAGGCCGCGCCCGCG
TCCATGGCCATGGCACTGGTTCACCACCGCCACCACCGGCGCAGGCACCGGT
GCAGCTCGCCCTCCCGGCCAGCCATGTTTCGCCCGCCGGTCCGATCCAGCAGC
TGGTGAGCTAA

SEQ ID NO 16:

OSDBF1

MLLNPA SREVAALDSIRHLL EEEEEETPATAPAPTRRPVYCRSSSFGLVADQ
WSESLPFRPNDAEDMVVYGALRDAFSSGWLPDGSFAAVKPE SQDSYDGSSIGS
FLASSSSEAGTPGEVTSTEATVTPGIREGEGEAVAVASRGKHYRGVRQRPWGK
FAAEIRDPAKNGARVWLGTFDSEAAVAYDRAAYRMRGSRALLNFPLRIGSE
IAAAAAAAAAAGNKRYPDPASSGSSSPSSSSSSSSSSSSSGSPKRRKRGEAAPA
SMAMALVPPPPPPAQA PVQLALPAQPWFAAGPIQQLVS

FIGURA 8 (continuación)