



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 355 966**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02016942 .1**

96 Fecha de presentación : **07.12.1995**

97 Número de publicación de la solicitud: **1273662**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.01.2003**

54 Título: **Sistema nuclear genético reversible para la esterilidad masculina en plantas transgénicas.**

30 Prioridad: **08.12.1994 US 351899**
07.06.1995 US 474556

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2011

73 Titular/es:
PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, Inc.
7100 Nw 62nd Avenue P.O. Box 1014
Johnston, Iowa 50131-1014, US

72 Inventor/es: **Cigan, Andrew, M. y**
Albertsen, Marc, C.

74 Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

ES 2 355 966 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

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 5 El desarrollo de las plantas se puede alterar, según la presente invención, transformando una planta con una construcción genética que incluye elementos reguladores y genes estructurales capaces de actuar en forma de cascada para producir un efecto reversible en un fenotipo de planta. Una construcción adecuada incluye un promotor específico de tejido, un gen dominante negativo, y una secuencia de nucleótidos que codifica un activador transcripcional unido a una proteína de unión a ADN. En particular, la presente invención se refiere a la utilización de un gen de DAM-metilasa como gen dominante negativo y un promotor específico de anteras para producir plantas transgénicas que son reversiblemente masculinas-estériles.
- 10 Existe la necesidad de un sistema genético reversible para producir plantas estériles macho, en particular para plantas autógamias. La producción de semillas híbridas para su venta comercial es una industria amplia e importante. Las plantas híbridas desarrolladas a partir de semillas híbridas se benefician de los efectos heteróticos de cruzar dos líneas de cultivo genéticamente distintas. La acción agronómica comercialmente deseable del descendiente híbrido es superior a ambos padres, habitualmente en vigor, rendimiento y uniformidad. La acción óptima de las variedades de semillas híbridas en comparación con las variedades de polinización abierta hace que la semilla híbrida sea más atractiva para los granjeros para plantar y, por lo tanto, generen un precio alto en el mercado.
- 15 A efectos de producir semillas híbridas no contaminadas por la propia semilla ("self seed"), se deben llevar a cabo métodos de control de polinización para asegurar la polinización cruzada y proteger contra la auto-polinización. Entre los mecanismos de control de la polinización se incluyen medios mecánicos, químicos y genéticos.
- 20 Se puede utilizar un medio mecánico para la producción de semillas híbridas si la planta de interés tiene flores masculinas y femeninas espacialmente separadas o plantas macho y hembra separadas. Por ejemplo, una planta de maíz tiene flores masculinas productoras de polen en una inflorescencia en la parte superior de la planta, y las flores femeninas en la parte axial de las hojas a lo largo del pedúnculo. El cruzamiento del maíz se asegura mediante el despanojado de la hembra original para evitar la autofecundación. A pesar de que el despanojado se utiliza actualmente
- 25 en la producción de semillas híbridas para plantas, tales como el maíz, el proceso es muy laborioso y costoso, ambos en términos del coste de despanojado real y la pérdida de rendimiento como resultado del despanojado de la hembra original.
- Sin embargo, la mayoría de las plantas de cultivo de interés tienen ambos órganos funcionales masculinos y femeninos dentro de la misma flor y, por lo tanto, la emasculación no es un proceso sencillo. Aunque es posible extraer a mano los órganos que forman el polen antes de verter el polen, esta forma de producción de híbridos es extremadamente laboriosa y cara. La semilla se produce de esta manera sólo si el valor y la cantidad de semilla recuperada justifican el esfuerzo.
- 30 Un segundo medio general de producción de semillas híbridas es utilizar productos químicos que matan o bloquean la formación viable de polen. Estos productos químicos, denominados gametocidas, se utilizan para producir una esterilidad masculina transitoria. La producción comercial de semilla híbrida mediante la utilización de gametocidas está limitada por el gasto y la disponibilidad de los productos químicos y la fiabilidad y longitud de acción de las aplicaciones. Una limitación seria de los gametocidas es que tienen efectos fitotóxicos, la gravedad de los cuales depende del genotipo. Entre otras limitaciones se incluyen que estos productos químicos pueden no ser eficaces para cultivos con un periodo de floración amplio porque las nuevas flores producidas pueden no estar afectadas. Consecuentemente, se
- 35 requiere la aplicación repetitiva de productos químicos.
- Muchos sistemas comerciales actuales de producción de semilla híbrida para cultivos agrícolas dependen de un medio genético de control de polinización. Las plantas que se utilizan como hembras no consiguen fabricar polen, no consiguen verter el polen o producen polen que es bioquímicamente incapaz de realizar una autofecundación. Las plantas que son incapaces de autofecundarse se dice que son "autoincompatibles" (SI). Entre las dificultades asociadas
- 45 con la utilización de un sistema de auto-incompatibilidad se incluyen la disponibilidad y propagación de la línea hembra auto-incompatible, y la estabilidad de la auto-incompatibilidad. En algunos casos, la auto-incompatibilidad se puede superar químicamente, o se pueden polinizar capullos inmaduros a mano antes de que se active el mecanismo bioquímico que bloquea el polen. Los sistemas auto-incompatibles que se pueden desactivar son frecuentemente muy vulnerables a las condiciones climáticas intensas que detienen o reducen la efectividad del bloqueo bioquímico a la auto-polinización.
- 50 Entre los sistemas que han despertado un mayor interés para la producción de semillas comerciales están los sistemas de mecanismos genéticos basados en el control del polen que provocan la esterilidad masculina. Estos sistemas son de dos tipos generales: (a) esterilidad masculina génica, que es la falta de formación del polen a causa de uno o más genes nucleares o (b) esterilidad masculina genética citoplasmática, habitualmente denominada "esterilidad masculina citoplasmática" (CMS), en la que la formación del polen es bloqueada o abortada a causa de una alteración en un orgánulo citoplasmático, que generalmente es una mitocondria.
- 55 A pesar de que existen esquemas de hibridación que implican la utilización de CMS, existen limitaciones para su valor comercial. Un ejemplo de un sistema de CMS es una mutación específica en la mitocondria localizada

5 citoplasmáticamente que puede conducir, cuando está en el antecedente nuclear más cercano, a la falta de formación del polen maduro. En algunos casos, el antecedente nuclear puede compensar la mutación citoplasmática y tiene lugar la formación normal de polen. Los “genes restauradores” nucleares específicos permiten la formación del polen en plantas con mitocondrias con CMS. Generalmente, la utilización de CMS para la producción comercial de semillas implica la utilización de tres líneas de reproducción; una línea estéril masculina (origen hembra), una línea de mantenimiento que es isogénica respecto a la línea estéril masculina, pero que contiene la mitocondria totalmente funcional, y una línea de origen masculino. La línea de origen masculino puede transportar los genes restauradores específicos y, por lo tanto, se designa habitualmente como “línea restauradora”, que transmite fertilidad a la semilla híbrida.

10 Para cultivos, tales como cultivos de vegetales para los que la recuperación de semillas a partir del híbrido no es importante, se puede utilizar un sistema CMS sin restauración. Para cultivos en los que la fruta o la semilla del híbrido es el producto comercial, la fertilidad de la semilla híbrida se debe restaurar mediante genes restauradores específicos en el macho original o se debe polinizar el híbrido estéril masculino. La polinización de híbridos no restaurados se puede conseguir incluyendo con los híbridos un pequeño porcentaje de plantas fértiles masculinas para realizar la polinización.

15 En la mayoría de las especies, el rasgo CMS se hereda maternalmente, ya que todos los orgánulos citoplasmáticos se heredan sólo de las células del óvulo, y esto restringe la utilización del sistema.

20 Los sistemas CMS poseen limitaciones que los excluyen como una única solución a la producción de plantas estériles masculinas. Por ejemplo, un tipo particular de CMS en maíz (citoplasma T) confiere sensibilidad a la toxina producida por infección por un hongo particular. Aunque aún se utiliza para un conjunto de cultivos, los sistemas CMS pueden fracasar bajo ciertas condiciones del medio.

25 La esterilidad nuclear (génica) puede ser dominante o recesiva. La esterilidad dominante sólo se puede utilizar para la formación de semillas híbridas si la propagación de la línea femenina es posible (por ejemplo, a través de una propagación clonal *in vitro*). La esterilidad recesiva se puede utilizar si las plantas estériles y fértiles se discriminan fácilmente. Sin embargo, la utilidad comercial de sistemas de esterilidad génicos está limitada por el costo de la propagación clonal y el raleo de filas femeninas de plantas autofertilizantes.

El descubrimiento de genes que alterarían el desarrollo de las plantas sería particularmente útil en el desarrollo de métodos genéticos para inducir la esterilidad masculina ya que otros métodos actualmente disponibles, incluyendo el despanojado, la CMS y SI tienen defectos.

30 Una búsqueda de métodos de alteración en el desarrollo en plantas mediante la utilización de métodos genéticos condujo a genes de metilasa de la presente invención. Los cambios en el patrón de metilación del ADN de genes o promotores específicos han registrado cambios en la expresión génica. La metilación del ADN es un factor en la regulación de genes durante el desarrollo de plantas y animales.

35 Los patrones de metilación se establecen mediante métodos tales como la utilización de promotores (genes) que contienen CpG sensibles a metilo. En general, las secuencias transcritas activamente están metiladas. En los animales, los sitios de metilación están modificados en los sitios CpG (residuos). El control genético de metilación de adenina (A) y citosina (C) (nucleótidos presentes en el ADN) está afectado por genes en especies bacterianas y de mamíferos. En las plantas, sin embargo, los grupos metilo existen en la secuencia CXG, en la que X puede ser A, C o T, donde C es el residuo metilado. La inactivación debido a la metilación de A no es conocida en plantas, particularmente en los sitios GATC conocidos por estar metilados en otros sistemas.

40 A pesar de que no hay sugerencias en la técnica de que la metilación podría inducirse específicamente en tejidos o bien, conseguir un extremo deseado en una planta transgénica, en la técnica se conocía que la metilación del promotor puede causar la inactivación génica y alterar el fenotipo en organismos transgénicos.

45 La idea de una metilación dirigida como medio para el control del desarrollo de plantas, por ejemplo, para llevar a cabo la esterilidad masculina, sería disuasoria por las dificultades anticipadas en la utilización de la expresión de un gen que tiene un efecto inactivador generalizado en una diana ubicua, por ejemplo, un gen de metilasa, tal como la adenina metilasa (DAM) de ADN de *E. coli* para la que GATC es una diana, como medio para controlar una etapa de desarrollo específico sin afectar de forma perjudicial a la planta. La diana DAM existe en muchos promotores y, por tanto, se esperaría un problema de mantenimiento de la viabilidad de la planta de los promotores y/o genes activadores que son vitales para la viabilidad celular. A menos de que exista una forma de “compartimentalizar” la metilación introducida en un sistema huésped por un vector exógeno, no se esperaría que la metilación como una aproximación de producir esterilidad masculina mediante medios genéticos tuviera éxito. La presente invención da a conocer métodos y composiciones para compartimentalizar y manipular genes, tales como DAM, para realizar cambios en el desarrollo de plantas.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

55 La presente invención se refiere a un método de fabricación de una planta estéril masculina que comprende (a) proporcionar una planta que comprende una molécula de ADN recombinante que comprende (i) una secuencia de ADN que codifica un producto génico que, cuando se expresa en una planta, inhibe la formación o la función del polen, y (ii) un promotor; y (b) desarrollar dicha planta bajo condiciones de manera que se consiga la esterilidad masculina como

5 resultado de la expresión de dicha secuencia de ADN, en el que dicho promotor es capaz de regular la expresión de una
 10 secuencia de ADN en tejido de antera cuando el promotor es parte de una construcción de ADN recombinante y en el
 que dicho promotor comprende una secuencia de nucleótidos que se extiende, como mínimo, 503 pares de bases en
 dirección ascendente en relación con el codón de inicio en la posición de nucleótido 1488 de la figura 1; una secuencia
 de nucleótidos que se extiende desde la posición -503 hasta la posición -1 en dirección ascendente en relación con el
 codón de inicio en la posición de nucleótido 1488 de la figura 1; una secuencia de nucleótidos que se extiende desde la
 posición -587 hasta la posición -1 en dirección ascendente en relación con el codón de inicio en la posición de
 nucleótido 1488 de la figura 1; una secuencia de nucleótidos que se extiende desde la posición -890 hasta la posición -
 1 en dirección ascendente en relación con el codón de inicio en la posición de nucleótido 1488 de la figura 1; o una
 secuencia de nucleótidos que se extiende desde la posición -503 hasta la posición -134 en dirección ascendente en
 relación con el codón de inicio en la posición de nucleótido 1488 de la figura 1.

15 La presente invención se refiere además a una construcción de ADN recombinante que comprende: (a) un operador
 lexA insertado en un promotor específico de tejido que está unido operativamente a un gen dominante negativo que,
 cuando se expresa en una planta, inhibe la formación o la función del polen, en el que dicho promotor específico de
 tejido dirige la transcripción de ADN en células o tejidos críticos con la formación o la función del polen y en el que dicho
 promotor específico de tejido es un promotor tal como se ha definido anteriormente; y (b) una secuencia de ADN que
 codifica una proteína lexA unida operativamente a un promotor inducible.

20 La presente invención también se refiere a una construcción de ADN recombinante que comprende (i) una secuencia de
 ADN que codifica un producto génico que, cuando se expresa en una planta, inhibe la formación o la función del polen, y
 (ii) un promotor, tal como se ha definido anteriormente, que dirige la transcripción de ADN en células o tejidos críticos
 con la formación o la función del polen que está unido operativamente con dicha secuencia de ADN que codifica dicho
 producto génico.

25 La construcción de ADN recombinante de la presente invención también puede comprender una secuencia de ADN que
 codifica un producto génico que cuando se expresa en una planta inhibe la formación o la función del polen; un operador
 que controla la expresión de dicha secuencia de ADN; y un promotor específico de células críticas con la formación o la
 función del polen unido operativamente a dicha secuencia de ADN. En realizaciones adicionales, la construcción de
 ADN recombinante puede comprender además un gen marcador seleccionable, una secuencia de ADN que codifica una
 región de unión a ADN, o una secuencia de ADN que codifica un dominio activador.

30 En una realización, el producto génico codificado por la secuencia de ADN de la construcción de ADN recombinante de
 la presente invención puede ser una citotoxina. En otra realización, el promotor puede ser un promotor específico de
 anteras tal como se ha definido anteriormente, y la construcción puede comprender las construcciones DP5814,
 DP6509, PHP8036, PHP8037 o PHP6520. En aún otra realización adicional, el operador puede ser un operador lexA. Y,
 en aún otra realización, la construcción de ADN recombinante puede comprender además un gen marcador
 seleccionable.

35 En otra realización de la presente invención, la construcción de ADN recombinante comprende una secuencia de ADN
 que codifica una proteína de unión a ADN, capaz de unirse al operador de la construcción de ADN recombinante tal y
 como se ha definido anteriormente, y un promotor que controla la expresión de dicha secuencia de ADN. Esta
 construcción de ADN recombinante puede comprender además un gen marcador seleccionable. En una realización, la
 proteína de unión a ADN de la construcción de ADN recombinante puede ser una proteína lexA. En otra realización, el
 40 promotor puede ser específico de células críticas con la formación o la función del polen. En aún otra realización, el
 promotor puede ser un promotor específico de anteras que puede comprender el promotor tal como se ha definido
 anteriormente. Además, el promotor de esta construcción puede ser un promotor inducible o un promotor constitutivo
 que puede ser un promotor de ubiquitina de maíz como promotor constitutivo. La construcción de ADN recombinante
 puede ser PHP6522 o PHP6555.

45 La construcción de ADN recombinante de la presente invención puede estar comprendida en un vector de expresión. El
 vector de expresión comprende además una secuencia de ADN que codifica un producto génico, en el que la secuencia
 de ADN está unida operativamente al promotor. En una realización, el producto génico del vector de expresión
 interrumpe la función o la formación del polen. En aún otra realización, la secuencia de ADN del vector de expresión es
 heteróloga con respecto al promotor. La descripción también se refiere a una planta transgénica que comprende el
 50 vector de expresión.

Las realizaciones de la presente invención incluyen la utilización de un promotor específico de anteras que comprende
 una secuencia de nucleótidos del promotor 5126f que muestra la capacidad de controlar la expresión de una secuencia
 de ADN que codifica un producto génico. En una realización de la presente invención, el producto génico inhibe la
 función o la formación del polen. En otra realización, el producto génico comprende una citotoxina.

55 Aún otro aspecto de la descripción se refiere a un método para producir esterilidad masculina reversible en plantas. El
 método comprende las etapas de (a) transformación de una primera planta con una construcción de ADN recombinante
 de manera que la planta muestre la esterilidad masculina, comprendiendo la construcción (i) un operador lexA que
 controla la expresión de una secuencia de ADN que codifica un producto génico que inhibe la función o la formación del
 polen, el operador insertado en un promotor específico de tejido que está unido operativamente a la secuencia de ADN,

y (ii) una secuencia de ADN que codifica un represor de *lexA*, la secuencia de ADN unida operativamente a un promotor inducible; y (b) la exposición de la planta a un inductor para invertir el efecto de esterilidad masculina de la construcción. En realizaciones adicionales, el promotor específico de tejido puede ser un promotor específico de anteras.

5 El promotor específico de anteras puede comprender una secuencia de nucleótidos de promotor 5126 que muestra la capacidad de controlar la expresión de una secuencia de ADN que codifica un producto génico.

El producto génico puede ser un gen dominante negativo, el cual puede ser DAM-metilasa.

10 Además, la presente descripción se refiere a una planta estéril masculina y a un método de producción de una planta estéril masculina que comprende: (a) la introducción de una molécula de ADN recombinante en el genoma de una planta productora de polen capaz de ser genéticamente transformada, que comprende (i) una secuencia de ADN que codifica un producto génico que cuando se expresa en una planta inhibe la formación o la función del polen, (ii) un operador que controla la expresión de la secuencia de ADN, y (iii) un promotor específico de células críticas a la formación o la función del polen unido operativamente a la secuencia de ADN que codifica un producto génico; y (b) el crecimiento de dicha planta productora de polen en condiciones tales que se consigue la esterilidad masculina como resultado de la expresión de la secuencia de ADN.

15 El producto génico puede ser una citotoxina. El promotor de la presente invención puede ser un promotor específico de anteras.

El promotor específico de anteras puede comprender una secuencia de nucleótidos del promotor 5126 que muestra la capacidad de controlar la expresión de una secuencia de ADN que codifica un producto génico.

20 El operador puede ser un operador *lexA*. El método de producción de una planta estéril masculina puede comprender además un gen marcador seleccionable.

25 La descripción se refiere además a una semilla híbrida y a un método de producción de una semilla híbrida a partir de una planta estéril masculina que comprende (a) la introducción de una molécula de ADN recombinante en el genoma de una planta productora de polen capaz de ser genéticamente transformada, que comprende (i) una secuencia de ADN que codifica un producto génico que cuando se expresa en una planta inhibe la formación o la función del polen, (ii) un operador que controla la expresión de la secuencia de ADN, y (iii) un promotor específico de células críticas a la formación o la función del polen unido operativamente a la secuencia de ADN que codifica un producto génico; (b) el crecimiento de la planta productora de polen en condiciones tales que se consigue la esterilidad masculina como resultado de la expresión de las secuencias de ADN; (c) el cruzamiento de la planta estéril masculina con el polen derivado de una línea fértil masculina, teniendo el polen integrado en su genoma una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN que codifica una proteína de unión a ADN y un promotor que controla la expresión de la secuencia de ADN, la proteína capaz de unirse al operador del ADN recombinante de la planta estéril masculina; y (d) la recogida de la semilla híbrida con la fertilidad restaurada.

30 El producto génico puede ser citotoxina.

El promotor puede ser un promotor específico de anteras.

35 El promotor específico de anteras puede comprender una secuencia de nucleótidos del promotor 5126 que muestra la capacidad de controlar la expresión de una secuencia de ADN que codifica un producto génico. El operador puede ser un operador *lexA*. El método de producción de una planta estéril masculina puede comprender además un gen marcador seleccionable.

40 Un aspecto adicional de la presente invención es un método de producción de esterilidad masculina reversible en una planta que comprende: (a) la introducción de una primera molécula de ADN recombinante en el genoma de una planta productora de polen capaz de ser genéticamente transformada, que comprende (i) una secuencia de ADN que codifica un producto génico que cuando se expresa en una planta inhibe la formación o la función del polen, (ii) un operador que controla la expresión de la secuencia de ADN, y (iii) un promotor específico de células críticas a la formación o la función del polen unido operativamente a la secuencia de ADN que codifica un producto génico; y (b) el crecimiento de la planta productora de polen en condiciones tales que se consigue la esterilidad masculina como resultado de la expresión de las secuencias de ADN; (c) el cruzamiento de la planta estéril masculina con el polen derivado de una línea fértil masculina para formar una planta híbrida que es fértil masculina, teniendo el polen integrado en su genoma una segunda molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN que codifica una proteína de unión a ADN y un promotor que controla la expresión de la secuencia de ADN, la proteína capaz de unirse al operador del ADN recombinante de la planta estéril masculina.

45 El producto génico puede ser citotoxina.

El promotor puede ser un promotor específico de anteras.

50 El promotor específico de anteras puede comprender una secuencia de nucleótidos del promotor 5126 que muestra la capacidad de controlar la expresión de una secuencia de ADN que codifica un producto génico. El operador puede ser

un operador *lexA*. La primera molécula recombinante o la segunda molécula de ADN recombinante pueden comprender además un gen marcador seleccionable.

5 La proteína de unión a ADN puede ser una proteína *lexA*. El promotor de la segunda molécula de ADN recombinante es un promotor específico de células críticas a la formación o la función del polen y puede ser un promotor específico de anteras. El promotor específico de anteras puede comprender una molécula de ADN aislada que comprende una secuencia de nucleótidos capaz de regular la expresión de una secuencia de ADN en tejido de antera cuando la molécula de ADN es parte de una construcción de ADN recombinante operativa. El promotor de la segunda molécula de ADN recombinante puede ser un promotor inducible o un promotor constitutivo, que puede ser un promotor de ubiquitina de maíz.

10 Otro aspecto de la presente descripción es una célula vegetal transformada y una planta regenerada a partir de dicha célula vegetal, que contiene un vector de expresión que comprende una molécula de ADN aislada que comprende una secuencia de nucleótidos capaz de regular la expresión de una secuencia de ADN en tejido de anteras cuando la molécula de ADN es parte de una construcción de ADN recombinante operable. El vector de expresión puede comprender además una secuencia de ADN que codifica un producto génico, estando la secuencia operativa unida al promotor. La presente descripción también se refiere a una semilla híbrida y plantas masculinas estériles producidas mediante los métodos de la presente invención.

20 Según la presente invención, se han combinado dos tipos de sistemas genéticos en una construcción genética transformadora para crear un mecanismo en cascada que afecte al desarrollo de la planta. Un sistema pone de manifiesto un promotor específico de tejido que controla la expresión génica, por ejemplo, la expresión de un activador transcripcional. El segundo sistema incluye una secuencia de ADN que codifica un producto génico que inhibe la formación o la función del polen, por ejemplo, un gen dominante negativo, tal como un gen de metilasa, cuyo producto de expresión interrumpe la formación y la función del polen.

25 Un componente específico de la presente invención es una construcción genética transformadora, que incorpora elementos de ambos sistemas, que incluye elementos reguladores y genes estructurales capaces de interactuar para causar un fenotipo particular, dependiendo de los reguladores específicos y genes presentes. A causa de la presencia de esta construcción en una planta original, surgen diversas ventajas de la presente invención. Por ejemplo, se implementa una estrategia de una etapa para conseguir la esterilidad masculina. Por ejemplo, la presente invención contempla la utilización, en la producción de esterilidad masculina reversible en plantas, de una construcción genética que contiene un promotor específico de tejido, un gen dominante negativo y un tramo específico de ADN que incluye un activador transcripcional que es capaz de activar el gen dominante negativo. De este modo, la presente invención da a conocer, en un aspecto, una base nuclear nueva para manipular la fertilidad masculina.

30 Más específicamente, una construcción genética adecuada para la presente invención comprende un gen dominante negativo y un tramo específico de ADN que, cuando está situado en dirección ascendente del gen dominante negativo, controla la expresión del gen dominante negativo en asociación con un gen de unión a ADN y un promotor, tal como se ha definido anteriormente, que controla la expresión en un punto o puntos específicos del desarrollo.

35 Un gen dominante negativo es uno que, cuando se expresa, produce un fenotipo dominante en la planta. Herskowitz (1987) utilizó el término "dominante negativo" para indicar un gen que codifica un polipéptido mutante que, cuando se sobreexpresa, interrumpe la actividad del gen de tipo salvaje. Un gen de tipo salvaje es uno del que se deriva el mutante. En la presente descripción, la frase "gen dominante negativo" se aplica a un gen que codifica un producto que interrumpe un proceso genético endógeno de una célula huésped que recibe el gen, y que es eficaz en una copia única o puede producir un efecto debido a la sobreexpresión del gen mediante la producción aumentada del producto génico o bien, mediante la coexpresión de múltiples copias del gen. Entre los ejemplos de la clase de genes negativos dominantes se incluyen genes citotóxicos, genes de metilasa y genes inhibidores del crecimiento. Entre los genes negativos dominantes se incluyen el gen de la cadena A de la toxina de la difteria (Czako y An, 1991), mutantes de la división del ciclo celular, tales como CDC en maíz (Colasanti y otros, 1991), el gen WT (Farmer y otros, 1994) y P68 (Chen y otros, 1991). Los genes candidatos para un gen dominante negativo en las construcciones genéticas de la presente invención también se ejemplifican por un gen de DAM-metilasa, tal como el gen aislado de *E. coli*. Un gen candidato puede ser o no perjudicial para la fuente de la que deriva. De hecho, un gen candidato puede cumplir una función esencial en su fuente.

40 En una realización ilustrativa, un gen dominante negativo candidato que aprovecha la metilación genética para alterar el desarrollo de tejidos específicos de plantas es un gen DAM-metilasa. Este gen se utiliza para inactivar una región genética crítica para la formación o la función del polen provocando así la formación de una planta estéril masculina.

En particular, los componentes de una primera construcción genética para utilizar en el método de la presente invención son tal y como se indica a continuación:

55 Un activador transcripcional, tal como el gen C1 de maíz, se fusiona a una proteína de unión a ADN bacteriano, tal como *lexA*. (Brent y Ptashne, 1985). Esta fusión del gen, denominada "*lexA*-C1" se coloca bajo el control de un promotor específico de anteras, tal como el promotor 5126. La construcción genética se denomina como:

5126::*lexA*-C1

El gen de DAM-metilasa se coloca detrás de un promotor 35S mínimo que contiene el sitio de unión a *lexA* (Lex), tal como se simboliza a continuación:

35S-*lexAop*::DAM

5 35S-*lexAop*::DAM y 5126::*lexA*-C1 son dos unidades de transcripción separadas en el mismo plásmido, incluyendo el plásmido preferentemente un gen marcador seleccionable.

Una planta transgénica que contiene una construcción de la presente invención se puede regenerar a partir de un cultivo transformado con esa misma construcción, siempre y cuando las especies de plantas implicadas sean susceptibles de regeneración.

10 Una planta se regenera a partir de una célula o cultivo transformado, o a partir de un explante, mediante métodos descritos en la presente patente y conocidos por los técnicos en la materia. "Cultivo" en este contexto comprende un agregado de células, tejido calloso, o derivados de los mismos que son adecuados para el cultivo. Los métodos varían según las especies de plantas. La semilla se obtiene a partir de la planta regenerada o a partir de un cruzamiento entre la planta regenerada y una planta adecuada de la misma especie utilizando métodos de reproducción conocidos por los técnicos en la materia.

15 Cuando una primera construcción, tal como la descrita anteriormente, se transforma en plantas, el resultado es el aumento de la expresión en comparación con la situación en la que la transcripción se controla sólo mediante el promotor específico de anteras del gen de DAM-metilasa. El aumento de la expresión es debido a la producción del activador transcripcional *lexA*-C1, que se une específicamente al operador Lex y controla la expresión del gen de DAM-metilasa, llevando a cabo la esterilidad masculina. Los métodos dados a conocer en la presente invención son particularmente atractivos para la expresión de genes, tales como los de maíz, que cuando mutan confieren un fenotipo dominante negativo. Los productos génicos codificados por dichos genes requieren generalmente una expresión elevada para interferir con la función de la proteína de tipo salvaje, por ejemplo, el gen CDC21 de maíz.

20 Para invertir este efecto, una primera planta que tiene la primera construcción se aparea con una segunda planta que contiene una segunda construcción que incluye el promotor 5126 u otro promotor adecuado, incluyendo otros promotores específicos de anteras, tales como los promotores de mutación de delección o promotores constitutivos de 5126, fusionados al gen *lexA* que únicamente expresa la proteína de unión a ADN, *lexA*. Esta proteína se une específicamente al operador *lexA* pero no activa la expresión del gen. En cambio, reprime la expresión, evitando así la expresión del gen de DAM-metilasa y obteniendo una planta que tiene una primera y una segunda construcciones genéticas, masculinas fértiles.

30 Según la presente invención, una manera de utilizar los componentes de este sistema es insertar un sitio de unión a ADN de *lexA* (es decir, operador *lexA*) en el promotor específico de tejido 5126 y acoplar la expresión del represor de *lexA* a un promotor inducible. Cualquier gen que se expresa debido a la transcripción del promotor 5126 deja de funcionar (reprime) mediante la aplicación de una sustancia química que induce la expresión de *lexA*. La proteína represora de *lexA* se une a *lexAop* situada en el promotor 5126 y, como consecuencia de la unión a esta región de ADN, se evita la expresión del gen informador. Si, por ejemplo, este sistema se utiliza con el gen de DAM-metilasa, la aplicación de un inductor químico invierte el fenotipo estéril y se obtiene la planta masculina fértil.

A modo de ejemplo, una construcción genética adecuada contiene los siguientes componentes:

1. 5126::*lexAop*::DAM-metilasa;

2. [un promotor que es inducible por una hormona (auxina, ácido salicílico), safener químico y similares>::*lexA*; y

40 3. un marcador seleccionable, por ejemplo, que transmite resistencia herbicida o antibiótica, o que realiza la complementación de auxótrofos de aminoácidos o ácidos nucleicos. Cuando esta construcción se transforma en plantas, el fenotipo resultante es masculino-estéril en ausencia de un inductor químico. Sin embargo, la aplicación de un agente inductor en el momento adecuado da lugar a plantas masculinas fértiles, eliminando la necesidad de plantas genéticamente cruzadas que contienen las construcciones de esterilidad con plantas que contienen construcciones de represor con el fin de restaurar la fertilidad, (Véase el documento U.S. Ser. No. 07/848.465). Entre los ejemplos de genes de resistencia herbicida se incluyen BAR y PAT para resistencia a glufosinato (bialfos).

50 Cuando una construcción de la presente invención se une con un marcador seleccionable, tal como un gen de resistencia herbicida, la construcción resultante permite tener un método para destruir plantas masculinas fértiles segregantes mediante la aplicación de un herbicida a las plantas generadas a partir de plantas masculinas estériles cruzadas con polen de plantas masculinas fértiles. Sólo las plantas masculinas fértiles sobrevivirán.

55 Otra manera de utilizar los componentes de este sistema en una construcción de ADN recombinante utilizada para transformar una planta es insertar un operador capaz de controlar la expresión de una secuencia de ADN (por ejemplo, un operador *lexA*), en un promotor específico de tejido (por ejemplo, el promotor específico de anteras 5126); el promotor específico de tejido unido operativamente a una secuencia de ADN que produce un producto génico que inhibe la formación o la función del polen, por ejemplo, un gen dominante negativo, tal como DAM-metilasa. Insertar

dicho operador incluye colocarlo (según los métodos conocidos para un técnico en la materia) en el interior, en dirección ascendente o dirección descendente de la secuencia de nucleótidos de los promotores de la presente invención.

5 Para invertir este efecto, una planta transformada con dicha construcción se aparea con una segunda planta que contiene una segunda construcción que comprende el promotor 5126 u otro promotor adecuado, incluyendo otros
 10 promotores específicos de anteras, tales como promotores de mutación de delección o promotores constitutivos de 5126, controlando la expresión de un gen que codifica una proteína de unión a ADN, por ejemplo, el gen de *lexA* que expresa la proteína de unión a ADN *lexA*, que es capaz de unirse al operador de la primera construcción. Específicamente, la proteína de unión a ADN se une al operador de la primera construcción y reprime la expresión, evitando así la expresión del ADN que codifica un producto génico que inhibe la función o la formación del polen y obteniendo una planta que tiene una primera y una segunda construcciones genéticas, masculinas fértiles.

En una realización específica, la proteína represora *LexA* producida por la segunda construcción se une al operador *lexA* insertado en el promotor 5126 en la primera construcción y, como consecuencia de la unión a esta región de ADN, se evita la expresión del gen que inhibe la formación o la función del polen, por ejemplo, un gen dominante negativo, tal como DAM-metilasa, y se obtiene la planta masculina fértil transformada.

15 Cuando una construcción de la presente invención se une con un gen marcador seleccionable, tal como un gen de resistencia herbicida, la construcción resultante permite tener un método para destruir plantas masculinas fértiles segregantes mediante la aplicación de un herbicida a las plantas generadas a partir de plantas masculinas estériles cruzadas con polen de plantas masculinas fértiles. Sólo las plantas masculinas fértiles sobrevivirán.

20 Según otra realización de la presente invención, una construcción genética que tiene un gen de metilasa como gen dominante negativo unido operativamente a un promotor específico de tejido, tal como se ha definido anteriormente, tal como el promotor específico de anteras 5126, es adecuado para la práctica de la presente invención. Un método para alterar el desarrollo de una planta representa un aspecto de la presente invención. Dicho método comprende preferentemente las etapas de:

25 (a) transformar una planta con una construcción genética que comprende un gen de metilasa y un promotor adecuado; y

(b) desarrollar la planta en un medio en el que se expresa el gen de metilasa, alterando así la expresión de un gen, o genes, esenciales para un proceso de desarrollo mediante la metilación de su promotor.

30 Para producir una planta estéril masculina, el promotor permite la expresión del gen sólo en un tejido específico, preferentemente un tejido crítico para la formación o la función del polen, tal como en el tapetum, en la antera o en microesporas tempranas. La construcción también puede incluir un gen de metilasa como la secuencia de ADN que codifica un producto génico capaz de inhibir la formación o la función del polen. Un gen de metilasa adecuado es un gen DAM (ADN adenina metilante) bacteriano. Las fuentes bacterianas incluyen *E. coli*. La clase DAM de genes metila una posición N6 de adenina en la secuencia de nucleótidos GATC. La construcción incluye un ADN diana y es dominante negativo porque reprime la síntesis de ARNm por el ADN diana.

35 Un promotor específico de tejido es un promotor capaz de controlar la expresión de una secuencia de ADN, por ejemplo, un gen, en un tejido específico. Para provocar la esterilidad masculina reversible en plantas, los promotores que son activos en tejidos que afectan de forma directa o indirecta a la estructura y/o la función del polen, son particularmente adecuados.

40 La búsqueda de promotores específicos de tejido se benefició del concepto novedoso en la genética de plantas, de sustraer el mutante del ARNm de la planta normal para dar lugar a ARNm que se diferencia del normal en áreas del genoma relacionadas específicamente con las funciones de interés en la presente invención, el desarrollo de anteras. Las realizaciones de la presente invención utilizan un promotor específico de anteras, tal como se ha definido anteriormente, por ejemplo, las secuencias de ADN activas del promotor de plantas novedoso designado como 5126.

45 A continuación, se describen métodos y composiciones para la producción de líneas masculinas estériles mediante la utilización de construcciones genéticas que incluyen un gen de metilasa y un promotor adecuado.

Para correlacionar la inserción de una construcción genética de la presente invención en un genoma nuclear de la planta, con el fenotipo estéril masculino de la planta, se analizaron transferencias Southern de ADN de las plantas. Mediante este análisis, se encontró que la esterilidad masculina se correlacionaba con la presencia de una construcción genética de la presente invención.

50 Según la presente descripción, para destruir las plantas masculinas fértiles segregantes de manera que no crezcan en el campo, se une un promotor constitutivo a un marcador seleccionable y se introduce en una planta con una construcción genética que comprende un gen de metilación regulado por un promotor. Este sistema es útil cuando se mantiene una línea endogámica estéril en la que una planta endogámica masculina fértil se desarrolla a una planta estéril masculina del mismo tipo. La semilla recogida de la planta estéril masculina hembra segregará 1:1 para la
 55 resistencia a un agente selectivo. Las plantas se pueden pulverizar con el agente selectivo; consecuentemente, sólo las plantas que han mantenido el gen marcador seleccionable sobreviven. Estas plantas son aquéllas que se transformaron

con la construcción metilante.

La presente descripción también se refiere a una planta estéril masculina producida mediante métodos de la presente invención, y a la semilla de dichas plantas.

- 5 Según la presente invención, se han combinado dos tipos de sistemas genéticos en una construcción genética transformante para crear un mecanismo en cascada que afecta el desarrollo de las plantas. En un sistema se pone de manifiesto un promotor específico de tejido que controla la expresión del gen, por ejemplo, la expresión de un activador transcripcional. El segundo sistema incluye una secuencia de ADN que codifica un producto génico que inhibe la formación o la función del polen, por ejemplo, un gen dominante negativo, tal como un gen de metilasa, cuyo producto de expresión interrumpe la formación y la función del polen.
- 10 Un componente específico de la presente invención es una construcción genética transformante, que incorpora elementos de ambos sistemas, que incluye elementos reguladores y genes estructurales capaces de interactuar para causar un fenotipo concreto, dependiendo de los reguladores específicos y genes presentes. A causa de la presencia de esta construcción en una planta original, surgen diversas ventajas de la presente invención. Por ejemplo, se lleva a cabo una aproximación de una etapa para conseguir esterilidad masculina. Por ejemplo, la presente invención contempla la utilización, en la producción de esterilidad masculina reversible en plantas, de una construcción genética que contiene un promotor específico de tejido, un gen dominante negativo y un tramo específico de ADN que incluye un activador transcripcional que es capaz de activar el gen dominante negativo. La presente invención en un aspecto proporciona así una base nuclear nueva para manipular la fertilidad masculina.
- 15 Más específicamente, una construcción genética adecuada para la presente invención comprende un gen dominante negativo y un tramo específico de ADN que, cuando se sitúa en dirección ascendente del gen dominante negativo, controla la expresión del gen dominante negativo en asociación con un gen de unión a ADN y un promotor, tal como se ha definido anteriormente, que controla la expresión en un punto o puntos específicos del desarrollo.
- 20 Un gen dominante negativo es uno que, cuando se expresa, produce un fenotipo dominante en la planta. Herskowitz (1987) utilizó el término “dominante negativo” para indicar un gen que codifica un polipéptido mutante que, cuando se sobreexpresa, inhibe la actividad del gen de tipo salvaje. Un gen de tipo salvaje es uno del que se deriva el mutante. En la presente descripción la frase “gen dominante negativo” se aplica a un gen que codifica un producto que inhibe un proceso genético endógeno de una célula huésped que recibe el gen, y que es eficaz en una copia única o puede producir un efecto debido a la sobreexpresión del gen mediante el aumento de la producción del producto génico o bien, mediante la coexpresión de copias múltiples del gen. Algunos ejemplos de la clase de genes dominantes negativos son genes citotóxicos, genes de metilasa, y genes inhibidores de crecimiento. Entre los genes dominantes negativos se incluyen el gen de la cadena A de la toxina de la difteria (Czako y An, 1991), mutantes de la división del ciclo celular, tales como CDC en maíz (Colasanti y otros, 1991), el gen WT (Farmer y otros, 1994) y P68 (Chen, y otros, 1991). Los genes candidatos para un gen dominante negativo en las construcciones genéticas de la presente invención también se ejemplifican con un gen de DAM-metilasa, tal como el gen aislado de *E. coli*. Un gen candidato puede ser o no perjudicial para la fuente de la que deriva. De hecho, un gen candidato puede realizar una función esencial en su fuente.
- 25 En una realización ilustrativa, un gen dominante negativo candidato que aprovecha la metilación genética para alterar el desarrollo de tejidos de plantas específicos es un gen de DAM-metilasa. Este gen se utiliza para inactivar una región genética crítica para la formación o la función del polen provocando así la formación de una planta estéril masculina.
- 30 En particular, los componentes de una primera construcción genética para su utilización en relación con la presente invención son los que se indican a continuación:
- 35 Un activador transcripcional, tal como el gen C1 de maíz, se fusiona a una proteína de unión a ADN bacteriana, tal como *lexA*. (Brent y Ptashne, 1985). Esta fusión del gen, denominada “*lexA-C1*”, se sitúa bajo el control de un promotor específico de anteras, tal como el promotor 5126. La construcción genética se denomina como:
- 5126::*lexA-C1*
- 45 El gen de DAM-metilasa se coloca por detrás de un promotor 35S mínimo que contiene el sitio de unión de *lexA* (*Lex*), según se simboliza a continuación:
- 35S-*lexAop*::DAM
- 35S-*lexAop*::DAM y 5126::*lexA-C1* son dos unidades de transcripción separadas en el mismo plásmido, incluyendo el plásmido preferentemente un gen marcador seleccionable.
- 50 Una planta transgénica que contiene una construcción de la presente invención se puede regenerar a partir de un cultivo transformado con esa misma construcción, siempre y cuando las especies de plantas implicadas sean susceptibles de regeneración.

Una planta se regenera a partir de una célula o cultivo transformado, o a partir de un explante, mediante métodos descritos en la presente patente y conocidos por los técnicos en la materia. “Cultivo” en este contexto comprende un

agregado de células, tejido calloso, o derivados de los mismos que son adecuados para el cultivo. Los métodos varían según las especies de plantas. La semilla se obtiene a partir de la planta regenerada o a partir de un cruzamiento entre la planta regenerada y una planta adecuada de la misma especie utilizando métodos de reproducción conocidos por los técnicos en la materia.

5 Cuando una primera construcción, tal como la descrita anteriormente, se transforma en plantas, el resultado es el aumento de la expresión en comparación con la situación en la que la transcripción se controla sólo mediante el promotor específico de anteras del gen de DAM-metilasa. El aumento de la expresión es debido a la producción del activador transcripcional *lexA-C1*, que se une específicamente al operador *Lex* y controla la expresión del gen de DAM-metilasa, llevando a cabo la esterilidad masculina. Los métodos dados a conocer en la presente invención son particularmente atractivos para la expresión de genes, tales como los de maíz, que cuando mutan confieren un fenotipo dominante negativo. Los productos génicos codificados por dichos genes requieren generalmente una expresión elevada para interferir con la función de la proteína de tipo salvaje, por ejemplo, el gen *CDC21* de maíz.

10 Para invertir este efecto, una primera planta que tiene la primera construcción se aparea con una segunda planta que contiene una segunda construcción que incluye el promotor 5126 u otro promotor adecuado, incluyendo otros promotores específicos de anteras, tales como los promotores de mutación de delección o promotores constitutivos de 5126, fusionados al gen *lexA* que únicamente expresa la proteína de unión a ADN, *lexA*. Esta proteína se une específicamente al operador *lexA* pero no activa la expresión del gen. En cambio, reprime la expresión, evitando así la expresión del gen de DAM-metilasa y obteniendo una planta que tiene una primera y una segunda construcciones genéticas, masculinas fértiles.

15 Según la presente descripción, una manera de utilizar los componentes de este sistema es insertar un sitio de unión a ADN de *lexA* (es decir, operador *lexA*) en el promotor específico de tejido 5126 y acoplar la expresión del represor de *lexA* a un promotor inducible. Cualquier gen que se expresa debido a la transcripción del promotor 5126 deja de funcionar (reprime) mediante la aplicación de una sustancia química que induce la expresión de *lexA*. La proteína represora de *lexA* se une a *lexAop* situada en el promotor 5126 y, como consecuencia de la unión a esta región de ADN, se evita la expresión del gen informador. Si, por ejemplo, este sistema se utiliza con el gen de DAM-metilasa, la aplicación de un inductor químico invierte el fenotipo estéril y se obtiene la planta masculina fértil.

A modo de ejemplo, una construcción genética adecuada contiene los siguientes componentes:

1. 5126::*lexAop*::DAM-metilasa;
2. [un promotor que es inducible por una hormona (auxina, ácido salicílico), "safener" químico y similares>::*lexA*;
3. un marcador seleccionable, por ejemplo, que transmite resistencia herbicida o antibiótica, o que realiza la complementación de auxótrofos de aminoácidos o ácidos nucleicos. Cuando esta construcción se transforma en plantas, el fenotipo resultante es masculino-estéril en ausencia de un inductor químico. Sin embargo, la aplicación de un agente inductor en el momento adecuado da lugar a plantas masculinas fértiles, eliminando la necesidad de plantas genéticamente cruzadas que contienen las construcciones de esterilidad con plantas que contienen construcciones de represor con el fin de restaurar la fertilidad, (Véase el documento U.S. Ser. No. 07/848.465). Entre los ejemplos de genes de resistencia herbicida se incluyen *BAR* y *PAT* para resistencia a glufosinato (bialfos).

40 Cuando una construcción de la presente invención se une con un marcador seleccionable, tal como un gen de resistencia herbicida, la construcción resultante permite tener un método para destruir plantas masculinas fértiles segregantes mediante la aplicación de un herbicida a las plantas generadas a partir de plantas masculinas estériles cruzadas con polen de plantas masculinas fértiles. Sólo las plantas masculinas fértiles sobrevivirán.

45 Otra manera de utilizar los componentes de este sistema en una construcción de ADN recombinante utilizada para transformar una planta es insertar un operador capaz de controlar la expresión de una secuencia de ADN (por ejemplo, un operador *lexA*), en un promotor específico de tejido (por ejemplo, el promotor específico de anteras 5126); el promotor específico de tejido unido operativamente a una secuencia de ADN que produce un producto génico que inhibe la formación o la función del polen, por ejemplo, un gen dominante negativo, tal como DAM-metilasa. Insertar dicho operador incluye colocarlo (según los métodos conocidos por un técnico en la materia) en el interior, en dirección ascendente o dirección descendente de la secuencia de nucleótidos de los promotores de la presente invención.

50 Para invertir este efecto, una planta transformada con dicha construcción se aparea con una segunda planta que contiene una segunda construcción que comprende el promotor 5126 u otro promotor adecuado, incluyendo otros promotores específicos de anteras, tales como promotores de mutación de delección o promotores constitutivos de 5126, controlando la expresión de un gen que codifica una proteína de unión a ADN, por ejemplo, el gen de *lexA* que expresa la proteína de unión a ADN *lexA*, que es capaz de unirse al operador de la primera construcción. Específicamente, la proteína de unión a ADN se une al operador de la primera construcción y reprime la expresión, evitando así la expresión del ADN que codifica un producto génico que inhibe la función o la formación del polen y obteniendo una planta que tiene una primera y una segunda construcciones genéticas, masculinas fértiles.

En una realización específica, la proteína represora *LexA* producida por la segunda construcción se une al operador

lexA insertado en el promotor 5126 en la primera construcción y, como consecuencia de la unión a esta región de ADN, se evita la expresión del gen que inhibe la formación o la función del polen, por ejemplo, un gen dominante negativo, tal como DAM-metilasa, y se obtiene la planta masculina fértil transformada.

5 Cuando una construcción de la presente invención se une con un gen marcador seleccionable, tal como un gen de resistencia herbicida, la construcción resultante permite tener un método para destruir plantas masculinas fértiles segregantes mediante la aplicación de un herbicida a las plantas generadas a partir de plantas masculinas estériles cruzadas con polen de plantas masculinas fértiles. Sólo las plantas masculinas estériles sobrevivirán.

10 Según otra realización de la presente invención, una construcción genética que tiene un gen de metilasa como gen dominante negativo unido operativamente a un promotor específico de tejido, tal como se ha definido anteriormente, tal como el promotor específico de anteras 5126, es adecuada para la práctica de la presente invención. Un método para alterar el desarrollo de una planta representa un aspecto de la presente invención. Dicho método comprende preferentemente las etapas de:

(a) transformar una planta con una construcción genética que comprende un gen de metilasa y un promotor adecuado; y

15 (b) desarrollar la planta en un medio en el que se expresa el gen de metilasa, alterando así la expresión de un gen, o genes, esenciales para un proceso de desarrollo mediante la metilación de su promotor.

20 Para producir una planta estéril masculina, el promotor permite la expresión del gen sólo en un tejido específico, preferentemente un tejido crítico para la formación o la función del polen, tal como en el tapetum, en la antera o en microesporas tempranas. La construcción también puede incluir un gen de metilasa como la secuencia de ADN que codifica un producto génico capaz de inhibir la formación o la función del polen. Un gen de metilasa adecuado es un gen DAM (ADN adenina metilante) bacteriano. Las fuentes bacterianas incluyen *E. coli*. La clase DAM de genes metila una posición N6 de adenina en la secuencia de nucleótidos GATC. La construcción incluye un ADN diana y es dominante negativo porque reprime la síntesis de ARNm por el ADN diana.

25 Un promotor específico de tejido es un promotor capaz de controlar la expresión de una secuencia de ADN, por ejemplo, un gen, en un tejido específico. Para provocar la esterilidad masculina reversible en plantas, los promotores que son activos en tejidos que afectan de forma directa o indirecta a la estructura y/o la función del polen, son particularmente adecuados.

30 La búsqueda de promotores específicos de tejido se benefició del concepto novedoso en la genética de plantas, de sustraer el mutante del ARNm de la planta normal para dar lugar a ARNm que se diferencia del normal en áreas del genoma relacionadas específicamente con las funciones de interés en la presente invención, el desarrollo de anteras. Las realizaciones de la presente invención utilizan un promotor específico de anteras, tal como se ha definido anteriormente, por ejemplo, las secuencias de ADN activas del promotor de plantas novedoso designado como 5126.

Los métodos y composiciones se describen a continuación para la producción de líneas masculinas estériles mediante la utilización de construcciones genéticas que incluyen un gen de metilasa y un promotor adecuado.

35 Para correlacionar la inserción de una construcción genética de la presente invención en un genoma nuclear de la planta, con el fenotipo estéril masculino de la planta, se analizaron transferencias Southern de ADN de las plantas. Mediante este análisis, se encontró que la esterilidad masculina se correlacionaba con la presencia de una construcción genética de la presente invención.

40 Según la presente descripción, a efectos de destruir las plantas masculinas fértiles segregantes de manera que no crezcan en el campo, se une un promotor constitutivo a un marcador seleccionable y se introduce en una planta con una construcción genética que comprende un gen de metilación regulado por un promotor. Este sistema es útil cuando se mantiene una línea endogámica estéril en la que una planta endogámica masculina fértil se desarrolla a una planta estéril masculina del mismo tipo. La semilla recogida de la planta estéril masculina hembra segregará 1:1 para la resistencia a un agente selectivo. Las plantas se pueden pulverizar con el agente selectivo; consecuentemente, sólo las plantas que han mantenido el gen marcador seleccionable sobreviven. Estas plantas son aquéllas que se transformaron con la construcción metilante.

45 La presente descripción también se refiere a una planta estéril masculina producida mediante métodos de la presente invención, y a la semilla de dichas plantas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

50 La figura 1 (SEC ID No: 1) enumera una secuencia de nucleótidos que comprende la región en dirección ascendente desde la región de codificación del clon genómico para 5126, conteniendo la secuencia de nucleótidos las secuencias de los elementos del promotor 5126. La secuencia codificante para el clon 5126 empieza con el codón de inicio ATG en la posición 1488.

La figura 2 presenta un mapa del plásmido DP5130 que muestra la delección NheI del promotor 5126 de maíz fusionada al gen de luciferasa de luciérnaga.

La figura 3 muestra la actividad relativa de delecciones P5126. Las coordenadas mostradas se refieren al codón de inicio traduccional.

5 La figura 4 proporciona información sobre la especificidad del tejido del promotor 5126 y los fragmentos eliminados del promotor.

La figura 5 es una representación gráfica de la especificidad de etapa de la delección -503 P5126 utilizada en el plásmido DP5814: Pre=Premeiótico; Mei1=Meiosis I; Mei2=Meiosis II; Q=Cuarteto; QR=Liberación de Cuarteto; EU=Uninucleado Temprano; EMU=Uninucleado Temprano-Medio; LMU=Uninucleado Tardío-Medio.

10 La figura 6 presenta un mapa del plásmido DP5814, que contiene un promotor de delección 5126 fusionado a DAM metilasa de *E. coli* y también contiene el promotor doble CaMV 35S, intrón ADHI fusionado al gen BAR y al terminador pinII.

La figura 7 presenta un mapa del plásmido L87BspHI que incluye el gen *lexA202* de *E. coli* que contiene un codón ATG mutagenizado en el interior de un sitio de restricción nuevo *BspHI*.

15 La figura 8 presenta un mapa del plásmido L121 que contiene el promotor doble CaMV 35S, intrón ADH1 fusionado al híbrido de gen C1 de maíz y *lexA202*, y al terminador pinII.

La figura 9 presenta un mapa del plásmido DP5817 que contiene el promotor doble CaMV 35S, intrón ADH1 fusionado al gen *lexA202* y al terminador pinII.

20 La figura 10 presenta un mapa del plásmido DP6232 que contiene un promotor mínimo CaMV 35S (-33) que contiene el sitio de unión a *lexA*, intrón ADH1, luciferasa de luciérnaga y terminador pinII.

La figura 11 presenta un mapa del plásmido DP6509 que contiene un sitio de unión a *lexA* con un promotor mínimo CaMV 35S -33, intrón *Adh1*, DAM-metilasa y terminador pinII, y que también contiene el promotor 5126 fusionado a *lexA202-C1* y una construcción de marcador seleccionable, CaMV 35S::BAR.

25 La figura 12 es un gráfico de barras que ilustra la activación de *lexA202-C1* y la represión mediada por *lexA* en células en suspensión embriogénicas de maíz, en varias dosis de ADN (los números mostrados identifican las cantidades relativas de ADN).

La figura 13 presenta un mapa del plásmido PHP6522 que contiene el promotor de delección 5126 fusionado al gen *lexA* de *E. coli* y también contiene el promotor doble CaMV 35S, intrón ADH1 de maíz fusionado al gen BAR y al terminador pinII.

30 La figura 14 presenta un mapa del plásmido PHP6555 que contiene el promotor de ubiquitina de maíz y el intrón fusionado al gen *lexA* de *E. coli* y también contiene el promotor doble CaMV 35S, intrón ADH1 de maíz fusionado al gen BAR y al terminador pinII.

35 La figura 15 presenta un mapa del plásmido PHP6520 que contiene un sitio de unión a *lexA* con un promotor mínimo CaMV -33, intrón *Adh1*, una subunidad de toxina A de difteria de *Cornibacteriófago* y terminador 7 del gen, y que también contiene el promotor 5126 fusionado a *lexA202-c1* y la construcción marcadora seleccionable CAMV 35S::BAR.

La figura 16 presenta un mapa del plásmido PHP8036 que contiene el promotor de delección 5126, un sitio de unión a *lexA* con un promotor mínimo CaMV -33, intrón *Adh1*, Dam metilasa de *E. coli* y terminador pinII que también contiene la construcción marcadora seleccionable Ubiquitina: PAT.

40 La figura 17 presenta un mapa del plásmido PHP8037 que contiene el promotor de delección 5126, un sitio de unión a *lexA* con un promotor mínimo CaMV -33, Dam metilasa de *E. coli* y terminador pinII que también contiene la construcción marcadora seleccionable Ubiquitina: PAT.

La figura 18 (SEC ID No: 23) enumera la secuencia de ADN del ADNc de 5126. El inicio putativo de la traducción de la secuencia de ADNc está en la posición 73 del nucleótido.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES PREFERENTES

45 La presente invención se refiere a la utilización de una construcción genética que puede incluir un activador transcripcional y un gen capaz de actuar sobre el sitio de unión a ADN para activar un gen dominante negativo, y que incluye un gen dominante negativo, y promotores adecuados, tal como se ha definido anteriormente, que son promotores específicos de tejido que controlan un gen que actúa sobre el sitio de unión a ADN, para afectar al desarrollo de plantas, por ejemplo, para provocar la esterilidad masculina. En plantas transgénicas, entre los genes dominantes negativos adecuados se incluyen genes de citotoxina, genes de metilasa, genes inhibidores del crecimiento.

50 Entre los genes dominantes negativos se incluyen el gen de la cadena A de la toxina de la difteria (Czako y An, 1991),

- mutantes de la división del ciclo celular, tales como CDC en maíz (Colasanti y otros, 1991), el gen WT (Farmer y otros, 1994) y P68 (Chen y otros, 1991). En una realización ilustrativa, se utiliza el gen de DAM-metilasa, el producto de expresión del cual cataliza la metilación de residuos de adenina en el ADN de la planta. Las adeninas metiladas no afectarán a la viabilidad celular y se hallarán sólo en tejidos en los que se expresa el gen de DAM-metilasa, ya que dichos residuos metilados no se encuentran endógenamente en el ADN de la planta. Un sistema adecuado para la unión a ADN es el sistema *lexA-C1*. Generalmente, la construcción es exógena e incluye promotores adecuados.
- La alteración del desarrollo es particularmente útil para producir una planta estéril masculina. Un método para producir una planta estéril masculina es transformar una célula vegetal con una molécula recombinante (construcción genética) que comprende el gen de sentido para la proteína metilasa. Se selecciona un promotor adecuado dependiendo de la estrategia para el control del desarrollo. Según la presente invención, la estrategia es expresar el gen de metilasa selectivamente en otro tejido utilizando un promotor específico de anteras, tal como se ha definido anteriormente. Para producir una planta estéril masculina, la célula transformada se regeneraría en una planta, según la metodología convencional (véase Materiales y Métodos).
- En otra realización de la presente invención, una planta estéril masculina se produce mediante la colocación de un gen de metilasa bajo el control de un promotor, tal como se ha definido anteriormente, que se expresa selectivamente en células críticas con la formación y/o la función del polen.
- “Exógeno” tal como se utiliza en la presente invención indica algo que es extraño a su entorno, y en particular se aplica en la presente invención a una clase de construcciones genéticas que no se hallan en el complemento genético normal de la planta huésped o se expresa en niveles superiores que en el estado endógeno.
- Un “promotor adecuado” incluye un promotor específico de tejido o de célula que controla la expresión génica en células que son críticas a la formación o la función del polen, incluyendo células tapetales, células madre de polen, y microesporas tempranas.
- En una realización diseñada para afectar células de forma selectiva que son críticas al desarrollo o la función del polen, un promotor que regula la expresión génica en una célula o tejido específico, tal como una célula tapetal, se utiliza para controlar un gen que codifica una proteína de unión a ADN o un gen de sentido de metilación.
- Un promotor adecuado en este contexto es un elemento regulador específico de tejido que realiza la expresión sólo en tejido tapetal. Entre dichos promotores adecuados está el promotor 5126 mencionado anteriormente, derivado del clon 5126, que restringe la expresión de una secuencia de ADN a tejido de antera. El promotor 5126 incluye secuencias de nucleótidos en dirección ascendente de la región codificante del clon genómico para 5126, tal como se muestra en la figura 1, que son capaces de controlar o regular la expresión de una secuencia de ADN en tejido de antera. Los mutantes de delección del promotor 5126, tal como los caracterizados en la Sección (B), véase posteriormente, son también adecuados para la utilización en la presente invención adicionalmente a las regiones específicas de la secuencia de nucleótidos del promotor 5126 que muestran la expresión selectiva deseada en tejido de anteras. Dichas regiones específicas del promotor 5126 se han caracterizado y se establecen en la Sección (B), véase posteriormente.
- Para la presente invención, la condición “esterilidad masculina en una planta” significa el 100% de esterilidad, sin verter el polen viable. La condición se puede establecer mediante la metodología conocida por los técnicos en la materia, incluyendo aquellos métodos que determinan el polen que se vierte y las pruebas de germinación.
- Un “promotor específico de anteras” es una secuencia de ADN que dirige un nivel más elevado de transcripción de un gen asociado en tejido de antera que en algunos o todos los tejidos de una planta. Preferentemente, el promotor sólo dirige la expresión en anteras. Por ejemplo, el promotor 5126 se expresa en células de anteras. El promotor específico de anteras de un gen dirige la expresión de un gen en tejido de antera pero no en otros tejidos, tal como raíz y coleóptilo. Los promotores de esta especificidad se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente europea publicada EP-A1 578611.
- Un “operador” (o “sitio de unión a ADN”) es una molécula de ADN que está situada hacia el extremo 5’ de un gen estructural y que contiene una secuencia de nucleótidos que es reconocida y unida por proteínas de unión a ADN que tiene la función de activación o represión. La unión de una proteína represora con su operador cognato da lugar a la inhibición de la transcripción del gen estructural. Por ejemplo, el gen *lexA* codifica una proteína represora que se une al operador *lexA*.
- Una “molécula de ADN aislada” es un fragmento de ADN que no está integrado en el ADN genómico de un organismo. Las moléculas de ADN aisladas se pueden sintetizar químicamente.
- El término “expresión” se refiere a la biosíntesis de productos génicos. Por ejemplo, en el caso de un gen estructural, la expresión implica la transcripción del gen estructural en ARNm y la traducción de ARNm en uno o más polipéptidos.
- Un “vector de clonación” es una molécula de ADN, tal como un plásmido cósmido, o bacteriófago, que tiene la capacidad de replicarse de forma autónoma en una célula huésped. Los vectores de clonación contienen habitualmente uno o un número pequeño de sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción en los que, las secuencias de ADN foráneo se pueden insertar de una forma determinada sin pérdida de función biológica esencial del vector, así

como un gen marcador que es adecuado para la utilización en la identificación y selección de células transformadas con el vector de clonación. Entre los genes marcadores se incluyen habitualmente genes que proporcionan resistencia a tetraciclina o resistencia a ampicilina.

5 Un “vector de expresión” es una molécula de ADN que comprende un gen que se expresa en una célula huésped. Habitualmente, la expresión génica se sitúa bajo el control de ciertos elementos reguladores, incluyendo promotores constitutivos o inducibles, elementos reguladores específicos de tejido, y potenciadores. Se dice que dicho gen está “unido operativamente” a los elementos reguladores.

10 Los siguientes ejemplos se establecen como representativos de realizaciones específicas y preferentes de la presente invención. Estos ejemplos no se interpretan de ningún modo como limitantes del alcance de la presente invención. Debe entenderse que pueden realizarse muchas variaciones y modificaciones manteniendo el espíritu y alcance de la presente invención.

Ejemplo 1. Aislamiento y caracterización del promotor 5126

(A) METODOLOGÍA

15 Los métodos utilizados para el aislamiento de un promotor específico de antera eran novedosos para el maíz. El método de sustracción del aislamiento génico sólo era útil después de la determinación del tiempo en el desarrollo en el que se expresaría un gen específico de antera adecuado, de manera que el ARNm se podría recoger antes y después de ese umbral de desarrollo, para aislar un gen adecuado.

20 Extensas comparaciones de desarrollo de anteras de maíz masculino fértil con anteras de maíz masculino estéril sugirieron que la sustracción de ARNm de antera en un punto justo antes de la degeneración de microesporas produciría ARNm únicos específicos de anteras. Se aisló el ARN total de anteras de plantas masculinas estériles justo antes de la rotura de las microesporas. Con el mutante masculino estéril dominante *Ms44*, esto significó la recogida de anteras que estaban en la etapa de cuarteto de la microesporogénesis o alrededor de la misma. Las anteras de plantas hermanas fértiles también se recogieron en esta etapa. Las plantas masculinas fértiles y masculinas estériles se recogieron como fuente de ARNm.

25 (1) Aislamiento de ARN: se realizó mediante el método de isotiocianato de guanidina conocido por los técnicos en la materia.

(2) Aislamiento de ARNm: se llevó a cabo mediante una columna de oligo dT por Invitrogen.

30 (3) Construcción de la biblioteca de ADNc: Las bibliotecas se realizaron a partir de ARNm de espiguilla de maíz de una mutación estéril masculina dominante (*Ms44*) y sus hermanos fértiles masculinos (*ms44*) (disponible de Maize Stock Centre, Universidad de Illinois). Las bibliotecas fueron realizadas por Invitrogen que utilizó el método de clonación bidireccional con el vector pCDNII y la clonación en los sitios BstXI.

35 (4) Sustracción: La sustracción se realizó tal como se describe en el manual de instrucciones “The Subtractor I” (“El Sustractor I”) de Invitrogen versión 2.3 utilizando ADNc marcado de la biblioteca estéril masculina dominante como conductor, y biblioteca masculina fértil no marcada como probador (véase Materiales y Métodos). Esta nueva biblioteca se marcó #5 y se esperaba que contuviera ADNc masculinos fértiles únicos.

(5) Clones únicos: Los clones se aislaron de forma aleatoria de la librería #5 y los insertos se purificaron por gel y el hexámero aleatorio se marcó con P32 y se sometió a transferencia slot (“slot blot”) sobre nitrocelulosa. Los clones duplicados se evitaron mediante hibridación cruzada. 5126 fue un clon seleccionado de la biblioteca #5 sustraída. Se hibridó con ADNc sin espiguillas para asegurar la especificidad de anteras del clon.

40 (6) Aislamiento de ADNc de longitud completa: Para obtener un ADNc de 5126 de longitud completa, se aisló un clon de ADNc de 5126 parcial y se secuenció utilizando el cebador universal m13 5'TGTAAAACGACGGCCAGT3' (M13 UP) (SEC ID No: 2) y el cebador inverso de m13 5'CAGGAAACAGCTATGACC3' (M13 RP). Este clon de ADNc de 5126 parcial contiene un inserto de 594 bases que incluye una cola poliA+ de 27 nucleótidos. El ARN y ARNm total se aislaron para la construcción de la biblioteca. La biblioteca de ADNc se realizó por Stratagene utilizando el sistema de clonación direccional uni-Zap XR (EcoRI a XhoI). Se cribaron 1×10^6 PFU con un fragmento EagI del ADNc de 5126 parcial para obtener un ADNc de 5126 de longitud completa. Se utilizó ER 1647 (NEB) como bacteria huésped. Se purificaron diez clones positivos hasta la homogeneidad. Los plásmidos se realizaron mediante la escisión *in vivo* del fagémido pBluescript SK(-) del vector Uni-Zap XR (Stratagene Lambda Zap Instruction Manual (“Manual de Instrucciones de Stratagene Lambda Zap”), página 14). La secuenciación se llevó a cabo por la United States Biochemical Company sobre el clon p5126-5; la secuencia se establece en la figura 18. Ambas hebras se secuenciaron de forma completa y concordaban con la secuencia del ADNc parcial. Se realizó una transferencia Northern con el ADNc parcial que indicó una longitud de transcrito de, aproximadamente, 1,5 kb. p5126-5 tiene una longitud de 1,485 kb, que indica que representa un ADNc de longitud completa o casi completa.

55

(7) Aislamiento genómico: Se construyó una biblioteca genómica a partir de una línea endogámica de maíz B73. Se digirió parcialmente ADN con Sau3A1 y se clonó en el sitio BamHI de DASH II λ (Stratagene). Se criaron 1×10^6 PFU con un fragmento EagI del ADNc de 5126 parcial. Se utilizó ER 1647 (NEB) como bacteria huésped. Se aislaron tres clones hasta homogeneidad después de tres rondas de cribado. El ADN de estos clones X se aislaron utilizando el método descrito por Bellomy y Record (1989) y se localizaron los sitios de restricción. Los tres clones eran idénticos, abarcando aproximadamente 18 kb.

(B) CARACTERIZACIÓN DEL PROMOTOR 5126

(1) Análisis Northern:

Se utilizó un fragmento EagI derivado del ADNc de 5126 parcial para sondear una membrana de Northern que contenía ARNm de poliA+ de maíz de hojas etioladas, raíces y hojas verdes de cultivos de 6 días, espiguillas con anteras en la etapa premeiótica, espiguillas con anteras en la etapa meiótica, espiguillas con cuarteto a través de anteras en la etapa de las microesporas uninucleadas y yemas de mazorcas. El fragmento EagI se marcó con peroxidasa de rábano picante utilizando el sistema de Quimioluminiscencia Mejorado (ECL) de Amersham. La hibridación de la sonda y los lavados de membrana siguieron el protocolo del fabricante del sistema ECL. La sonda de ADNc se hibridó a transcritos de aproximadamente 1,6 kb, presentes sólo en ARNm de espiguillas con anteras en las etapas de las microesporas de cuarteto a uninucleada.

(2) Análisis de secuencia:

Se aislaron tres clones genómicos en DASHII lambda que se hibridaron a la sonda de ADNc de 5126. Estos clones son 5125.4, 5126.5 y 5126.8. De uno de los clones genómicos, 5126.8, se aisló un fragmento HindIII de aproximadamente 5 kb y se subclonó en el sitio HindIII del vector, BluescriptII KS+ (Stratagene). Se generaron dos plásmidos, DP4769 y DP4770, que contenían el fragmento HindIII insertado en dos orientaciones diferentes. Los plásmidos DP4769 y DP4770 se secuenciaron parcialmente para una hebra utilizando el cebador universal m13, el cebador inverso de m13 y con el oligonucleótido 5'CCTTCATCAGCTTCTGGCAG3' (D0776) (SEC ID No: 4). La secuencia de D0776 se derivó de la secuencia de la parte 5' del inserto de ADNc de 5126. Se obtuvo una secuencia de doble cadena de DP4770 mediante "pasada con cebador" ("primer walking") con los siguientes oligonucleótidos (SEC ID Nos: 5-8, respectivamente), 5'AGATCTCGGCCAGGCCCTTG3' (D0990), 5'GAGTTGATGAAGTGA3' (CWG4770), 5'GAGATCAATCAGCTAGAGG3' (PG2-2) y 5'TAAACCTAAGGCC3' (PG2-3). La secuencia de DP4770 del sitio HindIII hasta la región inmediatamente adyacente a la secuencia de D0990 es de 1594 bases.

Se aisló un fragmento *SacI* de aproximadamente 6 kb de largo del clon 5126.8 genómico y se insertó en el sitio *SacI* del vector Bluescript KS+ (Stratagene). Se generaron dos plásmidos, DP5053 y DP5054, con el fragmento *SacI* insertado en dos orientaciones diferentes. El fragmento *SacI* solapa en 1207 pares de bases con el fragmento *HindIII* utilizado para DP4769 y DP4770. Este solapamiento es el 5' de la región de DP4769 y DP4770 con homología con el inserto de ADNc de 5126. La secuencia de 2106 bases para DP5053 se obtuvo mediante pasada con cebador con los mismos oligonucleótidos utilizados para secuenciar DP4770 y también con el oligonucleótido 5'AATAGCCTAATTTATTAG3' (PG2-4), el oligonucleótido 5'ACATGTTTCAAGTTCAA3' (PG2-5), el oligonucleótido 5'CTTGTCAGAAGTTGTC3' (PG2-5C) y el oligonucleótido 5'CAACCATTACCGATGAA3' (PG2-6C) (SEC ID Nos: 9-12, respectivamente).

Se utilizó 5'RACE para obtener secuencias de codificación adicionales para el gen 5126. La extensión del cebador de 5'RACE se realizó utilizando el sistema 5'RACE (Gibco BRL) con el oligonucleótido 5'ACGAGCGGACGCACGACAG3' (D01168) (SEC ID No: 13), derivado de la secuencia de DP4770, para la extensión del cebador con ARN de poliA de espiguillas de maíz. El cebador anidado 5'TCCGTGCGCCATCTGCGTCAC3', también de la secuencia de DP4770 (SEC ID No: 14) y el cebador ancla 5'CACGCGTGCAGTACTACGGGIIIGGGIIIG3' (SEC ID No: 15) (D0805) (modificado del cebador ancla incluido en el sistema 5'RACE) se utilizaron para la amplificación por PCR con TaqI ADN polimerasa (Perkin Elmer). El producto de 5'RACE se subclonó en el vector pT7Blue(R) (obtenido de Novagen). Un clon que contenía el producto de la PCR se denominó CGR3B. Este plásmido se secuenció utilizando los cebadores universales D0805, D01398 y m13. El inserto de PCR 5'RACE es de 412 bases. Existen polimorfismos entre el ADNc de longitud casi completa de la nueva biblioteca A632, en comparación con el clon genómico de la biblioteca B73 y el clon original.

La secuencia de CGR3B aparece 586 bases de DP4770 con un intrón de 123 bases presentes en la secuencia genómica. El intrón contiene los motivos del sitio de corte del intrón altamente conservados (5' GT y 3' AG). Se observa que un codón de inicio putativo está en el marco con el resto de la secuencia. Este codón de inicio tiene un motivo de codón de inicio razonable (CGATGG). Inmediatamente en dirección ascendente de este codón de inicio putativo, la secuencia de CGR3B es relativamente rica en AT que es característico de las secuencias de ADNc 5' no traducidas. Existen 90 nucleótidos en la dirección ascendente de CGR3B del codón de inicio putativo que es una longitud razonable para regiones 5' no traducidas en plantas. Además, el extremo 5' de la homología de secuencia de CGR3B en DP4770 está 35 bases en dirección descendente de una caja TATA razonable (TATATA). La secuencia 5126-5 solapa la secuencia de CG3RB, teniendo CGR3B una dirección ascendente de 43 bases.

Este tamaño se correlaciona razonablemente bien con el tamaño de transcrito estimado a partir de hibridación "northern" de aproximadamente 1,6 kb.

(3) Mutagénesis dirigida de sitio

La mutagénesis dirigida de sitio (Su y El-Gewely, 1988) se utilizó para crear un sitio *NcoI* en DP5053 en el codón de inicio traduccional putativo con el oligonucleótido 5'-GCTGCTCACCATGGCAAAGCAAC3' (DO1398) (SEC ID No: 16) para crear DP5055.

5 (4) Construcciones informadoras

De DP5055 se aisló un fragmento *SmaI-NcoI* de aproximadamente 4 kb, 5' de la región codificante 5126, y se combinó con un fragmento *SmaI-NcoI* de DP6172 que contiene el vector, la región de luciferasa de luciérnaga y la región no traducida del gen de la proteinasa II (*pinII*), para fabricar la construcción informadora DP5062. Las deleciones en el extremo 5' del fragmento del promotor 5126 de DP5062 se prepararon eliminando las secuencias del sitio *HindIII* en la región de policlonación hasta 587 bases en dirección ascendente del sitio *HindIII* del codón de inicio ATG (DP5121), o eliminando la secuencia del sitio *PstI* en la región de policlonación hasta 170 bases en dirección ascendente del sitio *PstI* del codón de inicio ATG (DP5122). Las deleciones adicionales del extremo 5' del fragmento del promotor se generaron utilizando las 855 pb en dirección ascendente del sitio *SphI* del codón de inicio traduccional, las 503 pb en dirección ascendente del sitio *NdeI* del codón de inicio, o las 216 pb en dirección ascendente del sitio *KpnI* del codón de inicio. Se digirió DO5062 con *SphI* o *NdeI*, se cortó con T4 ADN polimerasa, y se digirió con *NcoI* después de inactivar la polimerasa. Los fragmentos del promotor resultante se clonaron al fragmento *SmaI/NcoI* de DP1672, que contenía el vector del informador de luciferasa fusionado a la región *PinII* 3'. Esto dio lugar a DP5131 (deleción *SphI*) y DP5130 (deleción *NdeI*) (figura 2). La deleción *KpnI* (DP5164) se obtuvo mediante una unión de tres piezas de (1) el fragmento *KpnI/CIAI* que contiene la unión promotor/luciferasa, (2) el fragmento *CIAI/AlwNI* luciferasa/*PinII*-3'/vector, y (3) el fragmento *AlwNI/KpnI* de la pieza de vector restante de DP5062.

20 (5) Ensayos transitorios

La figura 3 muestra la actividad específica de luciferasa obtenida en anteras en la etapa del cuarteto al uninucleado temprano, cuando se transforma con la construcción de promotor 5126 de longitud completa-luciferasa (DP5062) o derivados de deleción del promotor. Esencialmente, se observa una actividad completa en deleciones hasta las 503 pb en dirección ascendente del sitio *NdeI* del codón de inicio traduccional, pero se pierde casi toda la actividad tras la deleción hasta las 216 pb en dirección ascendente del sitio *KpnI* del codón de inicio. Tras la deleción hasta las 170 pb en dirección ascendente del sitio *KpnI* del codón de inicio no quedaba actividad. De este modo, es probable que aparezca un elemento crítico entre pb 170 y 503 en dirección ascendente del codón de inicio traduccional.

La figura 4 muestra la actividad específica de luciferasa obtenida en anteras, coleóptilos, raíces y células de cultivo en suspensión embrionarias para la construcción del informador del fragmento del promotor 5126 original (DP5062) y las dos deleciones clave (DP5130 y DP5164) en comparación con los controles positivos y específicos de tejido (DP1528, que contiene un gen informador de luciferasa dirigido por un promotor "constitutivo" CaMV 35S, y DP2516, que contiene un informador de luciferasa dirigido por un promotor específico de antera SGB6). La especificidad del tejido, observada para el fragmento del promotor de longitud completa, se mantuvo en la deleción *NdeI*.

35 La figura 5 muestra la regulación de la actividad de antera del promotor 5126(-503). Este promotor de deleción es el más activo en las etapas de uninucleado temprano de microesporas, a pesar de que la actividad comprende las etapas meióticas a través de la etapa de uninucleado medio de microesporas.

Ejemplo 2. Construcción de plásmidos de DAM-metilasa

Se obtuvo un gen de DAM-metilasa de *E. coli*. También es adecuado un gen de metilasa derivado de cualquier planta.

40 El gen de DAM-metilasa (nucleótidos 195-1132 de Brooks y otros, 1983) se modificó mediante mutagénesis dirigida de sitio (Su y El-Gewely, 1988) y se introdujo un sitio *SmaI* en el nucleótido 186, nueve nucleótidos 5' hasta el codón de iniciación ATG. DP5814 (figura 6) es un plásmido utilizado en la transformación de maíz que contiene el gen de DAM-metilasa específico de antera en cis con un gen BAR expresado constitutivamente. Este plásmido se construyó uniendo el fragmento *XhoI/NcoI* de 500 pb que contenía la deleción *NdeI-NcoI* de la región del promotor específico de anteras 5126 desde DP5130 (figura 2) hasta un fragmento de *SmaI/BamHI* de 1,0 kb que contenía las secuencias de DAM-metilasa modificadas descritas anteriormente. El sitio *NcoI* contenido en el fragmento del promotor 5126, *XhoI/NcoI*, se rellenó con dNTPs utilizando T4 ADN polimerasa (Boehringer-Mannheim) según los protocolos establecidos (Sambrook y otros, 1989) para generar un extremo romo para la clonación. La unión promotor/gen dio lugar a la adición de 3 residuos N-terminal codificados por la siguiente secuencia (el MET iniciador del gen de DAM-metilasa nativo está subrayado y corresponde a los nucleótidos 195-197 en Brooks y otros, 1983):

50 5'CCATGGGGACAATG3' (SEC ID No: 17)

La expresión de DAM-metilasa se termina mediante la unión del fragmento *BamHI-NotI* de 320 pb que contiene las secuencias 3' *PinII* del gen del inhibidor II de la proteinasa de la patata (nucleótidos 2-310 de An y otros, 1989). Este gen quimérico contenido en un fragmento de ADN *XhoI-NotI* de 1,6 kb se clonó en el sitio de restricción de *XhoI-NotI* en un plásmido de expresión de monocotiledóneas que contiene el promotor 35S del virus mosaico de coliflor potenciado (nucleótidos -421 a +2, repitiendo -421 a -90 en tándem, Gardner y otros, 1981), el líder del virus mosaico del tabaco

5 (TMV) (fragmento hindIII-Sall de 79 pb, según describen Gallie y otros, 1987), un fragmento de 579 pb que contiene el intrón 1 del alelo Adh-S del gen de alcohol deshidrogenasa del maíz (Dennis y otros, 1984), el gen BAR que codifica el enzima fosfinotricin acetil-transferasa (nucleótidos 160-704 de Thompson y otros, 1987, donde el nucleótido 160 se cambió de una G a una A para generar un codón de iniciación MET) y las secuencias de terminación del gen del inhibidor II de la proteinasa de la patata (nucleótidos 2-310 de An y otros, 1989) en un esqueleto de pBluescript (Stratagene).

Ejemplo 3. Producción de una planta estéril masculina

10 Las plantas se transformaron con DP5814. DP5814 contiene el derivado de delección NdeI del promotor 5126 fusionado al gen DAM-metilasa de *E. coli* y el terminador PINII. Este plásmido también contiene el promotor 355 doble del virus mosaico de coliflor fusionado al gen BAR (Thompson y otros, 1987).

La construcción PHP6522 (figura 13) es idéntica a la descrita para DP5814 con la excepción de que las secuencias de codificación del gen de DAM-metilasa se sustituyeron por la región de codificación de *lexA* desde el aminoácido 1 hasta 202 (Golemis, 1992).

15 La construcción PHP6555 (figura 14) es idéntica a la descrita para PHP6522 con la excepción de que el promotor 5126 se sustituyó por el promotor de ubiquitina de maíz y el intrón contenido en un fragmento de ADN PstI de 1,9 kb.

DP5814 se bombardeó en líneas celulares de tejido calloso Hi Tipo II (B73 x A188) (Armstrong, 1991) desde las que se regeneraron las plantas resistentes a Bialofos. Para actuar como controles de la fertilidad masculina, también se generaron plantas no transformadas. Los tejidos callosos transgénicos y de control se analizaron por PCR.

20 Una planta transgénica que contiene una construcción de gen de metilasa se puede regenerar a partir de un cultivo transformado con esa misma construcción, siempre y cuando las especies de las plantas implicadas y el tipo de cultivo utilizado sean susceptibles de regeneración. "Cultivo" en este contexto comprende un agregado de células, un tejido calloso, o derivados de los mismos que son adecuados para el cultivo.

25 Una planta se regenera a partir de una célula o cultivo transformado, o a partir de un explante, mediante métodos descritos en la presente invención que son conocidos por los técnicos en la materia. Los métodos varían según las especies de las plantas. La semilla se obtiene a partir de la planta regenerada o a partir de un cruzamiento entre la planta regenerada y una planta adecuada de la misma especie utilizando métodos de reproducción conocidos por los técnicos en la materia.

Ejemplo 4. Efecto de 5126::DAM-metilasa sobre la fertilidad de plantas de maíz.

30 Las plantas de maíz regeneradas transformadas con la construcción DP5814 se analizaron por PCR para conocer la presencia o ausencia de la región de codificación de DAM-metilasa y valorar la capacidad de generar polen fértil.

Se utilizó la reacción de cadena de la polimerasa (PCR), que es bien conocida por los técnicos en la materia, para determinar la presencia del gen de DAM-metilasa de *E. coli*. Los oligonucleótidos utilizados fueron DO1266 y DO1267.

Los oligonucleótidos tienen las siguientes secuencias:

DO1266 (SEC ID No: 18)

35 5'-ATG AAG AAA AAT CGC GCT TTT TTG AAG TGG GC-3'

DO1267 (SEC ID No: 19)

5'-TCA CCC AGG CGG GCA AAA TCA GCC GAC A-3'

Estos oligonucleótidos se utilizaron como cebadores en la PCR para amplificar específicamente el gen de DAM-metilasa de *E. coli*.

40 Se analizaron veinticinco plantas de maíz transgénicas primarias independientes que dieron resultado positivo en la PCR para el gen de DAM-metilasa. Veintidós de estas plantas con resultado positivo de la PCR para DAM-metilasa eran masculinas estériles. El análisis Southern realizado sobre estas plantas detectó la presencia de sucesos de inserción de copia única a copia múltiple. El examen microscópico del desarrollo de polen en estas plantas masculinas estériles en comparación con plantas con resultado negativo en la PCR o no transformadas revelaron que se pueden observar microesporas premeióticas y meióticas en todas las plantas, aunque no se observaron microesporas de cuarteto en ninguna de las anteras derivadas de plantas que dieron un resultado positivo en la PCR para el gen de DAM-metilasa y son masculinas estériles. Esta interrupción en el desarrollo de microesporas es consistente con la observación de que la actividad de luciferasa se puede detectar en primer lugar en una etapa similar del desarrollo cuando se expresa bajo el control del promotor de delección 5126 NdeI, sugiriendo que la expresión del gen de DAM-metilasa durante el desarrollo temprano de microesporas interfiere con la formación normal de polen.

50

5 Las plantas masculinas estériles se polinizaron con polen derivado de plantas de maíz no transformadas, la semilla se germinó y las plantas resultantes se analizaron para la cosegregación de plantas masculinas estériles resistentes a herbicida con la presencia de la construcción 35S: Bar – 5126:DAM-metilasa para establecer una correlación entre la presencia del gen de metilasa y la esterilidad masculina. El análisis Southern de poblaciones T1 derivadas de 13 genes T0 masculinos estériles independientes revelaron que todas las plantas masculinas estériles resistentes a bialofos contenían los genes de DAM-metilasa y BAR de *E. coli*, mientras que los segregantes masculinos fértiles sensibles a bialofos no contenían estos genes.

De forma similar a las observaciones realizadas en las plantas T0, apareció la interrupción del desarrollo de microesporas entre las etapas de meiosis I y cuarteto.

10 Ejemplo 5. Transferencia Southern para correlacionar el fenotipo masculino estéril en una planta con la inserción de una construcción genética capaz de la metilación.

15 Se añadieron nueve ml de tampón de extracción CTAB (100 mM Tris pH 7,5), bromuro de hexadecil trimetil amonio al 1%, cloruro sódico 0,7 M, EDTA, 10 mM a 300 mg de tejido de hoja liofilizado, se centrifugaron y se incubaron a 65°C durante 1 hora. Se añadieron cinco ml de una solución de cloroformo/octanol (24:1) y se mezclaron durante 5 minutos. Los extractos se centrifugaron durante 30 minutos a 2500 rpm. Se extrajo la capa superior y se colocó en un tubo nuevo, y se añadieron 11 ml de tampón de precipitación CTAB (igual que el tampón de extracción CTAB menos el cloruro sódico), se invirtió y se dejó reposar durante 30 minutos. La muestra se centrifugó durante 10 minutos a 2000 rpm. Para resuspender el sedimento, se añadieron 2 ml de Tris 100 mM (pH 7,5), EDTA 10 mM, NaCl 0,7 M y se calentó durante 15 minutos a 60°C. Se añadieron 10 µl de ARNsaA (10 mg/ml) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Se añadieron cinco ml de EtOH al 100% frío al tubo y se mezcló suavemente, el ADN se extrajo utilizando una pipeta Pasteur con punta curvada de 9 pulgadas, se colocó en un tubo que contenía EtOH al 76%, acetato sódico 0,2 M y se dejó sedimentar durante 20 minutos. El ADN se transfirió a un nuevo tubo que contenía EtOH al 76%, acetato amónico 0,2 M durante 1 minuto, se secó y se resuspendió en 300 µl de TE (Tris 10 mM [pH 7,5], EDTA 1 mM). 5 µg de ADN genómico digeridos con endonucleasas de restricción se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0,8% que contenían tampón Tris-acetato; el gel se preparó para la transferencia a la membrana mediante la incubación durante 20 minutos en 500 ml de HCl 0,25 mM, 40 minutos en 500 ml de NaOH 0,4 M, NaCl 0,6 M y 30 minutos en Tris 0,5 M (pH 7,5), NaCl 1,5 M. La transferencia se realizó utilizando tampón de fosfato sódico 25 mM, pH 6,5 sobre membrana Amersham Nylon FP. Después de la transferencia la membrana se coció a 80°C al vacío. Antes de la primera utilización de la membrana, se incubaba a 65°C en una solución que contenía 0,1 X SCP (1 X SCP; NaCl 0,1 M, fosfato sódico 16 mM, pH 7,0) y SDS al 0,1% durante 30 minutos. Se generaron sondas de ADN marcadas con P32-dCTP con un equipo de marcado de cebadores aleatorio suministrado por Amersham según las instrucciones del fabricante. Para generar la sonda específica de DAM-metilasa, se aisló un fragmento de ADN, BamHI, de 635 pb del DP5814 y se marcó. Para generar una sonda específica de BAR, se aisló un fragmento de ADN, *NcoI-BamHI*, de 560 pb del DP5814 y se marcó. La sonda marcada se desnaturalizó durante 10 minutos a 95°C, se añadió al filtro en 20 ml de tampón de hibridación (0,1 X SCP que contenía 0,1 X sulfato de dextrano) y se incubó a 65°C durante toda la noche. El filtro se lavó tres veces con 0,1 X SCP que contenía SDS al 0,1% a 65°C. El filtro se expuso a una película de rayos X con una pantalla (Dupont) a -70°C.

Ejemplo 6. Construcción de plásmidos de ensayo transitorio

40 Se clonó un fragmento HindIII/XhoI que contenía el gen LexA202 (nucleótidos 734-1406 en pEG202 en Golem y Brent, 1992) en pBluescriptSK+ (Stratagene) para generar el plásmido L87. La mutagénesis dirigida de sitio (Su y El Gewley, 1988) de este plásmido utilizando el oligonucleótido DO2326 (SEC ID No: 20):

5'CCGTTAACGCTTTCATGACGCCCGGAATTAAGC3'

45 dio lugar a la introducción de un sitio BspHI en el codón ATG de iniciación del marco de lectura de LexA-202 (nucleótido 754, Golem y Brent, 1992) generando el plásmido L87BspHI (figura 7). Se fusionó en el marco un gen quimérico que contenía las secuencias que codifican los residuos 1-202 de LexA sobre el fragmento BspHI/EcoRI de L87BspHI con los residuos 144-273 del fragmento EcoRI/HpaI del C1 de maíz descrito anteriormente en un plásmido de expresión de monocotiledonias que contiene el promotor 35S del virus mosaico de coliflor potenciado (nucleótidos -421 a +2, repitiendo -421 a -90 en tándem, Gardner y otros, 1981), el líder del virus mosaico del tabaco (TMV) (fragmento HindIII-Sall de 79 pb, según describen Gallie y otros, 1987), un fragmento de 579 pb que contiene el intrón 1 del alelo Adh-S del gen de alcohol deshidrogenasa del maíz (Dennis y otros, 1984), y las secuencias de terminación del gen del inhibidor II de la proteinasa de la patata (nucleótidos 2-310 de An y otros, 1989) en un esqueleto de pBluescript que genera el plásmido L121 (figura 8).

55 La construcción DP5817 (figura 9) contiene el promotor CaMV potenciado, líder de TMV, intrón de Adh y las secuencias de terminación de PinII descritos anteriormente. Las secuencias que codifican los residuos 1-202 de la proteína LexA transportadas en un fragmento BspHI/SmaI de L87BspHI (nucleótidos 754-1382 en pEG202 en Golem y Brent, 1992) se clonaron en dirección descendente del intrón de Adh que sustituye el gen quimérico LexA-C1 encontrado en L121.

El plásmido informador DP6232 (figura 10) contiene tres sitios de unión a ADN de *lexA* repetido en forma de tándem transportado en los oligonucleótidos complementarios, DO2448 y DO2449, con las siguientes secuencias de nucleótidos.

DO2448 (SEC ID No: 21):

5' GATCTACTGCTGTATATAAAACCAGTGGTTATATGTACAGTACTGCTGTATAT
AAAACCAGTGGTTATATGTACAGTACGGATG3'

DO2449 (SEC ID No: 22):

3' ACGACATATATTTTGGTCCACCAATATACATGTCATGACGACATATATTTTGGT
CACCAATATACATGTCATGCCGATG5'

10 Los oligonucleótidos se hibridaron y clonaron como un fragmento BglII/NdeI en dirección ascendente de un promotor CaMV truncado (nucleótidos -33 a +2; véase Gardner y otros, 1981), el líder de TMV, intrón de ADH, la región codificante del gen de luciferasa de luciérnaga (+53 a +1708, de Wet y otros, 1987) y las secuencias de terminación de PinII en un esqueleto de pBluescript.

15 La construcción DP6509 (figura 11) es un plásmido que contiene tres genes quiméricos diseñados para la expresión en plantas de maíz. El plásmido también contiene los sitios de unión a *lexA* en dirección ascendente de un promotor CaMV truncado, el líder de TMV e intrón de ADH y terminador PinII tal como se describió para DP6232 con el gen de DAM-metilasa, manteniendo la adición de 9 pb tal como se ha descrito anteriormente en lugar de las secuencias de codificación de luciferasa. Las secuencias del gen que codifica el activador transcripcional específico de anteras 5126::LexA-C1 se localizan inmediatamente en dirección descendente del gen informador de DAM-metilasa descrito anteriormente. Este gen contiene el fragmento XhoI/NcoI que transporta las secuencias del promotor 5126 de DP5130, la quimera LexA202-C1 y las secuencias de PinII descritas para L121. El tercer gen codificado por este plásmido contiene el promotor CaMV potenciado, el líder de TMV, el intrón de Adh, las secuencias de codificación de BAR y el terminador PinII en un esqueleto de pBluescript tal como se describe para DP5814.

20 La construcción PHP6520 (figura 15) es la misma que la descrita para PHP6509 con la excepción de que las secuencias de codificación del gen de DAM Metilasa y el terminador pinII se sustituyeron por la región de codificación de la toxina de la difteria y el terminador 7 del gen (Czako y An, 1990).

25 La construcción PHP8036 (figura 16) contiene el promotor 5126 desde las posiciones -503 a -134, fusionado al sitio de unión a *lexA* en dirección ascendente del promotor mínimo CaMV -33, el líder de TMV, el intrón de ADH1, la región codificante de Dam metilasa y el terminador PinII tal como se describe para DP6509. El plásmido también contiene la construcción del marcador seleccionable Ubi-Pat, que se construyó mediante la fusión de un promotor de ubiquitina de maíz de 1,9 kb e intrón al gen de fosfinotricin N-acetil-transferasa (Pat) de *Streptomyces viridocromagenes* y el gen de nopalina-sintetasa (Droge y otros).

30 La construcción PHP8037 (figura 17) es idéntica a PHP8036 con la excepción de que el intrón de Adh1 de maíz contenida dentro del fragmento de ADN Sall/BamHI de 650 pb se extrajo de la parte de 5126::lexA:Dam metilasa del plásmido.

35 EJEMPLO 7. Expresión de un informador de luciferasa que contiene el sitio de unión a *lexA* después de la coexpresión transitoria de *lexA*-C1, *lexA* o ambos.

40 Los experimentos se realizaron dirigidos a dos preguntas. En primer lugar, ¿puede la proteína de unión a ADN bacteriano, *lexA*, promover y aumentar la expresión genética en las células vegetales? En segundo lugar, la coexpresión de la proteína *lexA* con el activador transcripcional *lexA*-C1 da lugar a la represión de la expresión genética mediada por el activador.

45 La proteína *lexA* se unirá a una región de ADN que contiene el sitio de unión a ADN de *lexA* ("operador *lexA*") pero no podría reclutar los componentes transcripcionales necesarios derivados de la planta para el inicio de la síntesis del ARNm. Sin embargo, se ha demostrado que la yuxtaposición de regiones proteicas que pueden actuar como activadores transcripcionales para las proteínas de unión a ADN dará lugar a una expresión incrementada del gen informador (Ruden y otros, 1991). Para evaluar la capacidad del gen de *lexA* para promover la expresión de un gen informador en células de maíz, una región del gen C1 del maíz (Goff y otros, 1991) que codifica un dominio de activación transcripcional, se fusionó enmarcado con la región de ADN que se corresponde con la proteína de unión a ADN, *lexA*, para generar el gen híbrido, LexA202-C1. El gen híbrido se colocó bajo el control transcripcional del promotor constitutivo 35S para generar el plásmido L121 tal como se muestra en la figura 8.

50 Esta construcción se cobombardeó en cantidades variables en células embriogénicas de maíz en suspensión con una cantidad constante de un gen informador de luciferasa que contiene el sitio de unión a *lexA*, plásmido DP6232. Tal como se muestra en la figura 12, el informador solo produce muy poca actividad de luciferasa (catorce unidades de luz por microgramo de proteína total (14 lu/μg), no obstante se detecta una alta actividad de luciferasa (>9000 lu/μg) cuando el transactivador *lexA*-C1 se cobombardea en cantidades mayores a 5 ng por disparo.

55

5 Para determinar si la proteína *lexA* reprimirá el alto nivel de expresión de la luciferasa, el plásmido DP5817 que contiene una construcción 35S:*lexA* tal como se muestra en la figura 9 se cobombardeó con DP6232 y L121, variando las cantidades de L121 o DP5817. Tal como se muestra en la figura 12, la adición de DP5817 a los tratamientos que contienen la construcción *lexA*-C1 y el informador dan lugar a una actividad de la luciferasa reducida. Todos estos datos juntos sugieren que en células embriogénicas de maíz en suspensión la expresión aumentada de un gen que contiene un sitio de unión a ADN de *lexA* se detecta cuando la proteína de fusión *lexA*-C1 se coexpresa y que esa expresión puede ser reprimida por la proteína *lexA*.

Ejemplo 8. Reversión a una planta masculina fértil

10 Según la presente invención, existen diversas estrategias para producir la reversión de una planta estéril masculina a una masculina fértil. Un efecto en cascada donde un promotor, tal como el promotor específico del tapetum 5126, se fusiona al gen activador transcripcional *LexA*-C1 (en la presente invención llamado 5126::*LEXA*-C1) donde el fragmento *LexA* del gen codifica la proteína *LexA* bacteriana que se une a una región de ADN llamada el operador de *LexA* (*LexAop*) y el fragmento C1 del gen codifica la proteína C1 del maíz que interacciona con la maquinaria transcripcional del maíz para promover la activación transcripcional de los genes que contienen el *LexAop* en el contexto de un elemento promotor mínimo, por ejemplo el promotor mínimo 35S.

15 Para generar una planta estéril masculina de maíz, el gen de DAM-metilasa se coloca bajo el control de *LexAop* fusionado con el promotor mínimo CAMV 35S. En el mismo plásmido se encuentra la región 5126::*LexA*-C1 y un marcador seleccionable, 35S:BAR (figura 11, DP6509). La introducción de esta construcción hace las plantas masculinas estériles debido a la expresión del gen de DAM-metilasa en la antera. *LexA*-C1 se regula mediante el promotor 5126.

20 A efectos de restablecer la fertilidad en plantas masculinas estériles que contienen 5126:*LexA*-C1, *LexAop*::DAM-metilasa, dichas plantas se cruzan con plantas que contienen el promotor 5126 u otros promotores apropiados fusionados sólo con el fragmento de ADN de *LexA*. La presencia de una construcción genética que incluye 5126:*LexA* concuerda con la fertilidad masculina. En presencia de un gen que expresa una proteína que se une al *LexAop* pero no activa la transcripción del gen de DAM-metilasa, la síntesis de una proteína DAM-metilasa es reprimida de manera que la planta es masculina fértil.

25 Las plantas de maíz transgénicas se generaron tal como se describe en la presente invención para contener los plásmidos PHP6522, PHP6555 y PHP6520. De entre los casos de transgénicos que generaron plantas de maíz transgénicas que contenían la construcción de esterilidad masculina, PHP6520, se determinó que 5 casos eran plantas masculinas estériles en la generación T0 y 3 casos eran masculinas fértiles. 3 de los casos de masculinas estériles se analizaron en la generación T1 para la cosegregación del fenotipo del masculino-estéril con resistencia a Ignite. Los resultados se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1

Caso	Plantas masculinas estériles con resistencia a Ignite	Plantas masculinas fértiles sensibles a Ignite
937.59.35.2	17	13
937.63.25.1	2	28
937.59.35.1	1	0

35 Los casos masculinos estériles 937.59.35.2 y 937.63.25.1 se cruzaron utilizando polen derivado de plantas que contenían el gen de *lexA* bajo el control del promotor de Ubiquitina (PHP6555) o el promotor específico de la antera (PHP6522), respectivamente. El resultado es que las plantas que contenían la construcción de esterilidad (PHP6520) y la construcción represora (PHP6522 ó 6555) serán masculinas fértiles, mientras que las plantas que contenían sólo la construcción de esterilidad PHP6520 serán masculinas estériles.

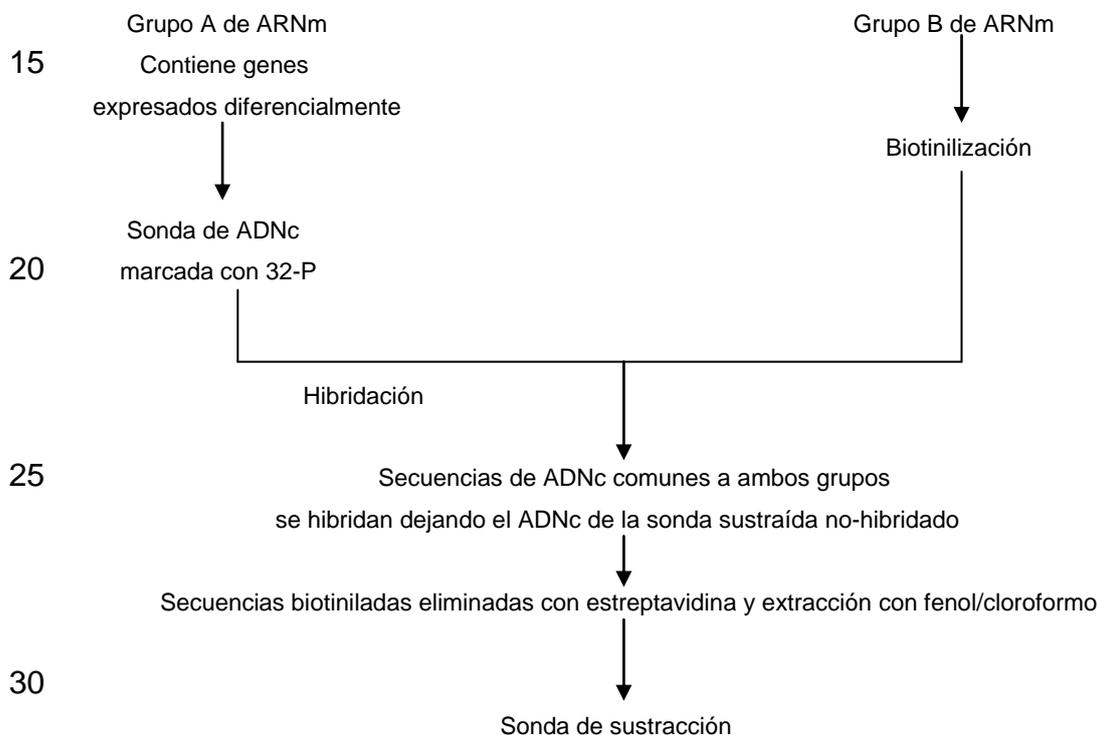
40 Los casos transgénicos se generaron tal como se ha descrito anteriormente utilizando construcciones que contenían una versión modificada del promotor 5126 (la secuencia de nucleótidos desde la posición -503 hasta la -134 en relación con el codón de inicio en la posición 1488, tal como se muestra en la figura 1) que ha insertado el sitio de unión de *lexA* yuxtapuesto al promotor mínimo de CaMV (PHP8036 y PHP8037). La introducción de estas construcciones hace que las plantas resultantes sean masculinas estériles debido a la expresión del gen de DAM-metilasa. Dichas plantas masculinas estériles que contienen PHP8036 o bien PHP8037 se cruzan con plantas que expresan el represor de *lexA* de manera constitutiva (PHP6555) o específica de tejido (PHP6522). El resultado es que las plantas que contienen la construcción de esterilidad (PHP8036 o PHP8037) y la construcción represora (PHP6522 o PHP6555) serán masculinas fértiles, mientras que las plantas que contienen sólo las construcciones de esterilidad PHP8036 o PHP8037 serán masculinas estériles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimiento de la sonda de sustracción (de Invitrogen):

La generación de una sonda de sustracción de ADNc se logró de manera similar al método para la generación de una biblioteca de sustracción. A continuación se muestra un perfil diagramático del método. En este esquema, el ADNc marcado se sintetiza en primer lugar a partir de un grupo inducido (mensaje +) de ARNm. El híbrido de ADNc-ARN resultante se trata con álcali para eliminar el ARNm plantilla y, a continuación, se hibrida a un exceso de ARNm fotobiotinilado del grupo B (mensaje -). Los híbridos ARN/ADNc fotobiotinilados resultantes se complejan con estreptavidina libre y se eliminan de la mezcla de hibridación mediante la extracción selectiva con fenol/cloroformo. Al igual que en el procedimiento de biblioteca de sustracción, el complejo estreptavidina-ácido nucleico fotobiotinilado se extrae dejando atrás los ADNc no-hibridados (inducidos). La sonda de ADNc sustraída resultante puede ser utilizada directamente en las transferencias de hibridación o para cribar bibliotecas.

Procedimiento de la sonda de sustracción



La utilización de una sonda de sustracción de ADNc mejora las opciones de identificar clones de ADNc que corresponden al tejido específico, transcritos raros. En una sonda de ADNc habitual, la representación es proporcional a la abundancia de ARNm. Enriqueciendo la sonda de ADNc para secuencias específicas a genes expresados diferencialmente, la sonda se vuelve más específica para el clon previsto, lo cual simplifica el cribado de bibliotecas. Una biblioteca de ADNc de sustracción puede ser utilizada junto con una sonda sustraída para identificar clones de ADNc que representan una baja presencia de ARNm únicos para un tejido particular o un estado celular inducido. La ventaja de utilizar una biblioteca de ADNc sustraído en lugar de una biblioteca de ADNc no sustraído es que se tienen que cribar menos clones.

Métodos para el ensayo transitorio:

Los cultivos de células embriogénicas en suspensión de maíz se derivaron de embriones inmaduros, se mantuvieron en suspensión líquida tal como se describe (Bowen, 1992) y se subcultivaron cada 3 ó 4 días. Las células se recogieron 2 días después del subcultivo y, antes del bombardeo, se trataron durante toda la noche en un medio de crecimiento que contenía manitol 0,25 M a una densidad de 50 mg/ml. Para cada bombardeo, se colocaron 25 mg de células sobre papel de filtro prehumedecido con 1 ml de medio de crecimiento. Se precipitaron 3 µg de ADN de plásmido informador (DP6232) y cantidades variantes de DP5817 y/o L121 (0,01-3 µg) sobre 0,75 mg de partículas de tungsteno de 1,8 µm y las células se bombardearon con un sexto de esta mezcla utilizando una pistola de helio PDS1000, según las instrucciones del fabricante (DuPont). Después de 24 horas, las células se recogieron y se transfirieron a tubos de microcentrifugación de tapa enroscable de 1,5 ml y se mantuvieron a 4°C a lo largo del resto de procedimientos. Las muestras se homogeneizaron en tampón de lisis GUS 0,ml (Rao y Flynn, 1990: modificado por la omisión de todos los

- detergentes) y se aclaró mediante centrifugación. Los ensayos de luciferasa se realizaron tal como describen Callis y otros, (1987) utilizando un tiempo de integración de 10 segundos en un luminómetro (Modelo 2010; Analytical Lumenescence, San Diego, CA). La concentración de proteína se determinó utilizando un kit de ensayo para proteínas BioRad. Los extractos eran generalmente de 0,75-1,5 µg de proteína por extracto. La actividad específica de luciferasa (1 µ/µg) se calculó midiendo las unidades de luz de luciferasa en 25 µl de extracto y el valor corregido para la correspondiente concentración de proteína por µl de extracto. Las actividades de luciferasa mostradas en la Tabla 1 se expresan como un promedio de tres bombardeos de cada tratamiento.
- 5
- Aislamiento de clones genómicos de TA39 que comprenden secuencias homólogas con el ARNm específico de microspora; promotores de TA39
- 10 Este ejemplo proporciona métodos de aislamiento de clones de ADN genómicos que comprenden secuencias homólogas con cualquier ARNm específico de microspora para el que se encuentra disponible una sonda de ácido nucleico. La estrategia descrita es útil para aislar las secuencias reguladoras específicas de microesporas de cualquier especie de planta que tenga ARNm específico de microspora que sea homólogo con dicha sonda disponible.
- 15 Se obtuvo un clon de ADNc específico de antera de tabaco, TA39, del Dr. Robert Goldberg de UCLA. TA39 se hibrida al ARNm de las anteras en un patrón temporal similar al observado en diversos transcritos específicos de tapetum (Kultunow y otros, 1990). Las hibridaciones in situ demostraron que TA39 está presente en las microesporas a niveles bajos y en el tejido conectivo durante la etapa -1 a +1 y, a continuación, a niveles más elevados en el tapetum desde la etapa 1 a la 6 (Goldberg y otros, 1993).
- 20 Se cribó para buscar clones que tenían homología con el clon de ADNc de TA39, una biblioteca genómica de una planta seleccionada, por ejemplo una biblioteca disponible comercialmente de un fragmento de ADN de *N. tabacum*, var. NK326 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, California; catálogo FL1070D), parcialmente digerido con *Mbol* y clonado en el plásmido EMBL-3. Se utilizaron métodos estándar de hibridación, tales como los descritos en Sambrook y otros, 1989. Los clones candidatos se purificaron mediante tres o más ciclos de placas de selección, replacadas, y resonadas con un inserto de ADNc de TA39, hasta que consistentemente las placas de hibridación fueran purificadas o demostraran no estar presentes.
- 25 Se identificaron dos familias distinguibles de clones de ADN genómico de tabaco relacionados con el clon de ADNc de TA39, cada uno representado por dos clones solapantes dentro de cada familia. Se seleccionó un clon de cada familia para una caracterización detallada, designados como los clones 8B3 y 14B1. La región de homología con TA39 en cada uno de los clones genómicos, así como las regiones inmediatamente en dirección ascendente y descendente de estas regiones de homología, se describieron mediante el análisis de división con enzimas de restricción e hibridación de ADN.
- 30 Estas secuencias codificantes y regiones reguladoras presuntamente asociadas a 5' se aislaron como subclones y, a continuación, se subclonaron para la secuenciación. De esta manera, las series anidadas de delecciones de cada clon genómico se produjeron mediante la utilización de *exIII* y nucleasas de habichuela mungo ("mung bean") suministradas en un kit por Stratagene. Las delecciones anidadas se secuenciaron mediante el método de Sanger de terminación de cadena de dideoxi con un secuenciador de ADN automatizado (Applied Biosystems 373A) en la Nucleic Acids Facility de la Iowa State University. El inserto de ADNc de TA39 también se secuenció por comparación. Dentro de la región de homología con el ADNc de TA39 de un ARNm específico de microspora, el clon genómico 8B3 es completamente homólogo a TA39, mientras que el fragmento comparable del clon genómico 14B1 tiene, aproximadamente, un 90% de homología con TA39.
- 35 Los puntos de partida de la transcripción de los clones genómicos 14B1 y 8B3 se localizaron mediante experimentos de extensión del cebador para un único nucleótido, 83 bases en dirección ascendente del sitio de inicio traduccional putativo. Una caja TATA perfecta apareció a 31 pares de bases en dirección ascendente del inicio localizado de la transcripción en cada clon, y un mayor marco de lectura abierto de 110 aminoácidos está intacto en dirección descendente del inicio localizado de la transcripción en ambos clones (es decir, en la posición designada como "+83" relativa al sitio del inicio de la transcripción). Ambos clones tienen también un sitio de reconocimiento de poliadenilación, 29 pares de bases y 37 pares de bases en dirección descendente de un codón de parada traduccional en los clones 14B1 y 8B3, respectivamente.
- 40 Métodos de transformación. Los métodos de transformación para dicotiledóneas incluyen un número de métodos diferentes conocidos para la administración directa de ADN. El preferido es el bombardeo biolístico en partículas de explantes de hoja. Otros métodos incluyen la administración de *Agrobacterium* a los explantes; el cocultivo de protoplastos de *Agrobacterium*; la electroporación; la captura de PEG u otra administración directa de ADN a protoplastos o similares. Un método preferido para las monocotiledóneas, tales como el maíz, es la administración de ADN a las células tratadas por bombardeo, pero también pueden utilizarse otros métodos tal como la electroporación.
- 45
- 50 Las células de una planta se transforman con la secuencia de ADN foránea de la presente invención de manera convencional. Si la planta a transformar es susceptible de sufrir infecciones de *Agrobacterium*, es preferente utilizar un vector que contiene la secuencia de ADN foráneo, que es un Ti-plásmido desarmado. La transformación se puede llevar a cabo utilizando procedimientos descritos, por ejemplo, en los documentos EP 0 116 718 y EP 0 270 822. Los vectores
- 55

- preferentes de Ti-plásmido contienen una secuencia de ADN foráneo entre las secuencias limitantes o, como mínimo, localizado en dirección ascendente de la secuencia límite derecha. Se pueden utilizar otros tipos de vectores para transformar la célula vegetal, utilizando procedimientos, tales como la transferencia directa de genes (ver, por ejemplo, los documentos EP 0 237 356, publicación de PCT WO/85/01856 y EP 0 275 069); transformación de protoplastos *in vitro* tal como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense no. 4.684.611; transformación de la planta mediada por virus tal como se da a conocer en el documento EP 0 067 553 y la patente estadounidense no. 4.407.956, por ejemplo; y la transformación mediada por liposomas tal como se describe en la patente estadounidense no. 4.536.475, entre otras.
- 5
- Si la planta a transformar es maíz, los métodos de transformación recientemente desarrollados son adecuados, tales como los métodos descritos para ciertas líneas de maíz por Fromm y otros, 1990, y Gordon-Kamm y otros, 1990.
- 10
- Si la planta a transformar es arroz, se pueden utilizar los métodos de transformación recientemente desarrollados tales como los métodos descritos para ciertas líneas de arroz por Shimamoto y otros, 1990, Datta y otros, 1990, Christou y otros, 1991, y Lee y otros, 1990.
- 15
- Si la planta a transformar es trigo, se puede utilizar un método análogo a los descritos anteriormente para el maíz o el arroz. Preferentemente, para la transformación de una planta monocotiledónea, particularmente un cereal tal como arroz, maíz o trigo, se utiliza un método de transferencia directa de ADN, tal como un método de transformación biolística o electroporación. Cuando se utiliza dicho método de transferencia directa, es preferente minimizar el ADN que se transfiere, de modo que esencialmente sólo la secuencia de ADN de la presente invención, el gen del maíz QM y las regiones reguladoras asociadas, están integradas en el genoma de la planta. En ese aspecto, cuando una secuencia de ADN de la presente invención se construye y multiplica en un plásmido de un organismo bacteriano huésped, es preferente que, previamente a la transformación de una planta con la secuencia de ADN, las secuencias de plásmido que son necesarias para la propagación en el organismo bacteriano huésped, tales como el origen de replicación, un gen resistente a antibiótico para la selección del organismo huésped, y similares, estén separados de las partes del plásmido que contiene la secuencia de ADN foráneo.
- 20
- 25
- PROTOCOLO DE TUNGSTENO/ADN PARA LA PISTOLA DE HELIO DuPONT (MÉTODO DE TRANSFORMACIÓN POR BOMBARDEO BIOLÍSTICO DE PARTÍCULAS)
- Pesar 60 mg de tungsteno de 1,8 μm : ponerlo en un tubo de centrifugación de 15 ml.
- Añadir 2 ml HNO_3 0,1 M: Someter a ultrasonidos en hielo durante 20 minutos.
- 30
- Extraer el HNO_3 : Añadir 1 ml de agua desionizada estéril y transferir la muestra a un tubo Sarstedt de 2 ml. Someter a ultrasonidos brevemente. Centrifugar para que las partículas sedimenten.
- Extraer el H_2O : Añadir 1 ml de EtOH 100% - Someter a ultrasonidos brevemente. Centrifugar para que las partículas sedimenten.
- Extraer el H_2O : Añadir 1 ml de EtOH 100% - Someter a ultrasonidos brevemente. Centrifugar para que las partículas sedimenten.
- 35
- Extraer el EtOH: Añadir 1 ml de agua desionizada estéril. Someter a ultrasonidos.
- Pipetear 250 μl de suspensión en 4 tubos de 2 ml.
- Añadir 750 μl de agua desionizada estéril a cada tubo.
- Congelar la muestra de tungsteno entre su utilización.
- Pipetear 50 μl de suspensión tungsteno/agua en un tubo de 1,5 ml (someter a ultrasonidos en primer lugar).
- 40
- Añadir 10 μg de ADN. Mezclar.
- Añadir 50 μl de CaCl_2 2,5 M. Mezclar.
- Añadir 20 μl de Espermidina 0,1 M. Mezclar.
- Someter a ultrasonidos brevemente. Centrifugar durante 10 segundos a 10.000 RPM.
- Extraer el sobrenadante. Añadir 250 μl de EtOH 100%. Someter a ultrasonidos brevemente.
- 45
- Centrifugar a 10.000 RPM durante 10 segundos.
- Extraer el sobrenadante. Añadir 60 μl de EtOH 100%.
- Transformación del maíz:

- 5 El tejido calloso embriogénico de Tipo II (Armstrong, 1991) se inició a partir de los embriones cigóticos de 1-2 mm aislados de plantas A188 polinizadas con B73, y se mantuvieron tal como se describe en Register y otros, 1994. El tejido calloso se cultivó bisemanalmente durante 4-6 meses con anterioridad a su transformación. Para la transformación, el tejido calloso se suspendió en un medio de cultivo líquido y se tamizó a través de una malla de filtro de 710 µm, se resuspendió a una densidad de 40 mg/ml. 200 mg de células de tejido calloso se distribuyeron a partes iguales en un filtro de fibra de vidrio y se utilizaron para el bombardeo de partículas tal como se describe en Register y otros, 1994, a excepción de que se utilizaron partículas de tungsteno de 1,0 µm en lugar de oro. La selección transformante y la regeneración de la planta se llevaron a cabo tal como se describe en Register y otros; no obstante, la concentración de bialofos fue elevada a 3 mg/l en todos los medios de cultivo apropiados.
- 10 Protocolo para la transformación de maíz para la recuperación de plantas transgénicas estables
- Día – 1 Las células se colocan en un medio líquido y se filtran (710µm). Se recogen 100-200 mg de células en un filtro de fibra de vidrio de 5,5 cm sobre un área de 3,5 cm. Las células se transfieren al medio y se incuban durante toda la noche.
- 15 Día – 8 Se saca el filtro y las células del medio, se secan y se bombardean. El filtro y las células se colocan de nuevo en el medio.
- Día - 5 Las células del filtro se transfieren al medio de selección (3 mg de bialofos).
- Día - 12 Las células del filtro se transfieren a un nuevo medio de selección.
- 20 Día – 19 Las células se separan del filtro y se dispersan en 5 ml de medio de selección que contiene un 8,6% de agarosa de mar con punto de fusión bajo. Las células y el medio se expanden sobre la superficie de dos placas de 100 mm x 15 mm que contienen 20 ml de medio solidificado de gel-rite.
- Día – 40 Los transformantes putativos se recogen de la placa.
- Día – 60 Se revisan las placas para nuevas colonias.
- DOCUMENTOS MENCIONADOS
- 25 An, G., Mitra, A., Choi, H.K., Costa, M.A., An, K., Thornburg, R.W., y Ryan, C.A. (1989). Functional analysis of the 3' control region of the potato wound-inducible proteinase inhibitor II gene. *Plant Cell* 1:115-122.
- Armstrong, C.L., Green C.E., y Phillips, R.L., (1991). Development and availability of germplasm with high type II culture formation response. *Maize Genetics Cooperative Newsletter*. 65:92.
- Bellomy, G. y Record, M. Jr. (1989) *Biotechniques* 7:1.
- 30 Brooks, J.E., Blumenthal, R.M., y Gingeras, T.R., (1993). The isolation and characterization of the *Escherichia coli* DNA adenine methylase (DAM) gene. *Nucl Acids Res.* 11:837-851.
- Bowen, B. (1992). Anthocyanin genes as visual markers in transformed maize tissues. In *GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Plant Gene Expression*, S.R. Gallagher, ed. (New York: Academic Press, Inc.), pág. 163-177.
- Brent, R. y Ptashne, M. (1985) A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor, *Cell* 43; 729-736.
- 35 Chen, J.J., Pal, J.K., Petryshyn, R., Kuo, I., Yang, J.M., Throop, M.S., Gehrke, L. y London, I.M. (1991). Eukaryotic translation initiation kinases. *PNAs* 88, 315-319.
- Colasanti, J., Tyers, M. y Sundaresan, V., 1991. Isolation and Characterization of cDNA clones encoding a functional P34 cdc2 homologue from *Zca mags* PNA's 88, 3377-3381.
- 40 Czako, M. y An, G. (1991) Expression of DNA coding for Diptheria toxin Chain A is toxic to plant cells. *Plant Physiol.* 95 687-692.
- Dennis, E., Gerlach W., Pryor, A., Bennetzen, J., Inglis, A., Llewellyn, D., Sachs, M., Ferl, R., y Peacock, W. (1994). Molecular characterization of the maize Adh1 gene. *Nucl. Acids Res.* 12:3983-3990.
- DeWet, J.R., Wood, K.V., DeLuca, M., Helinski, D.R., y Subramani, S. (1987). Firefly luciferase gene: Structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 7:25-737.
- 45 Droge, W., Broer, I., y Puhler, A. (1992) Transgenic plants containing the phosphinothricin-N-acetyltransferase gene metabolize the herbicide L-phosphinothricin (glufosinate) differently from untransformed plants. *Planta* 187: 142-151.
- Farmer, A.A., Loftus, T.M., Mills, A.A., Sato, K.V., Neill, J., Yang, M., Tron, T., Trumpower, B.L. y Stanbridge, E.G. (1994) *Hum. Mol. Genet.* 3, 723-728.

- Fromm y otros (1990). *BioTechnology* 8:833.
- Gallie, D.R., Sleat, D.E., Watts J.W., Turner P.C., y Wilson, T.M.A. (1987). The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts *in vitro* and *in vivo*. *Nucl. Acids Res.* 15:3257-3273.
- 5 Gardner, R.C., Howarth, A.J., Hahn, P., Brow-Luedi, M., Shepherd R.J., y Messing, J.C. (1981). The complete nucleotide sequence of an infectious clone of cauliflower mosaic virus by M13mp7 shotgun sequencing. *Nucl. Acids Res.* 9:2871-2888.
- Goff, S.A., Cone, K.C., y Fromm, M.E., (1991). Identification of functional domains in the maize transcriptional activator C1: Comparison of wild-type and dominant inhibitor proteins. *Genes Dev.* 5,289-309.
- 10 Goldberg, R.B., Beals, T.P. y Sanders, P.M., (1993). Anther development: basic principles and practical applications. *Plant Cell* 5:1217-1229.
- Golemis, E.A., y Brent, R. (1992). Fused protein domains inhibits DNA binding by LexA. *Mol. & Cell Biol.* 12:3006-3014.
- Gordon-Kamm y otros (1990). Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants, *The Plant Cell* 2:603-618.
- Herskowitz, J. (1987). Functional inactivation of genes by dominant negative mutations, *Nature* 329:219-222.
- 15 Invitrogen, *Subtractor™ / Subtraction Kit for cDNA Probe Generation, Instruction Manual*, version 2.3.
- Koltunow y otros (1990). "Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development." *Plant Cell* 2:1201-1224.
- Register, J.C., Peterson, D.J., Bell, P.J., Bullock, W.P., Evans, I.J., Frame, B., Greenland, A.J., Higgs, N.S., Jepson, I., Jiao, S., Lewnau, C.J., Sillick, J.M., y Wilson, H.M. (1994). Structure and function of selectable and nonselectable transgenes in maize after introduction by particle bombardment. *Plant Mol. Biol.* 25:951-961.
- 20 Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press.
- Shimamoto y otros (1990). Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts, *Nature* 338:274.
- Su, T. Z., y E1-Gewely, M.R., (1988). A multisite-directed mutagenesis procedure using T7 DNA polymerase: Application for reconstructing a mammalian gene. *Gene* 69:81-89.
- 25 Thompson, C.J., Movva, N.R., Tizard, R., Cramer R., Davies, J.E., Lauwereys, M., y Botterman, J. (1987). Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J.* 6:2519-2523.
- EP 0 116 718
- EP 0 270 822
- EP 0 237 356
- 30 EP 0 275 069
- EP 0 067 553
- WO/85/01856
- Patente estadounidense nº 4.684.611
- Patente estadounidense nº 4.407.956
- 35 Patente estadounidense nº 4.536.475

LISTADO DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

- 5 (A) NOMBRE: PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.
- (B) CALLE: CAPITAL SQUARE, 700; LOCUST STREET, 400
- (C) LOCALIDAD: DES MOINES
- (D) ESTADO: IOWA
- (E) PAÍS: ESTADOS UNIDOS
- (F) CÓDIGO POSTAL: 50309

10 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Sistema Genético Nuclear Reversible Para La Esterilización Masculina En Plantas Transgénicas

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 23

(iv) DIRECCIÓN PARA LA CORRESPONDENCIA:

- 15 (A) DESTINATARIO: Foley & Lardner
- (B) CALLE: N.W., K Street, 3000, Suite 500
- (C) CIUDAD: Washington
- (D) ESTADO: D.C.
- (E) PAÍS: Estados Unidos
- (F) CP: 20007-5109

20 (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

- (A) TIPO DE MEDIO: disquete
- (B) ORDENADOR: PC compatible de IBM
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

25 (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: AÚN NO ASIGNADO
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:

(vii) DATOS DE LA SOLICITUD PREVIA:

- 30 (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/351.899
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 08-Dic-1994

(viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:

- (A) NOMBRE: BENT, Stephen A.
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 29.768
- (C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 33229/377/PIHI

35 (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES:

- (A) TELÉFONO: (202) 672-5300
- (B) FAX: (202) 672-5399
- (C) TELEX: 904136

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 1:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1490 pares de bases
- (B) TIPO: Ácido nucleico
- (C) HEBRA: Doble
- (D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 1:

TTTTTATCTT TCTGATTTCA ACCATTACCG ATGAATTTCT ATTTGGATTA GTTCATTTTC	60
GTCTTCCCTG TCTGATCCTG TTTTCGACAA TTCTGATCCC GAATCCGTTT TTGAATTAAA	120
ATATAAAAAA TAAAAACAAG AAATGGTTTA TCTCGGTCAA TTTCGTTTTT CGCGAGGAAC	180
ATATTCGGTG TACATGAGCC TTTGGTGAC ATGAACTAAC AAAGTTCACA AAAAATTCTG	240
AAAAAAAATC ATACATATTC TTTGCATCGC TACTCCTATT ATATATAAAA TTTCATGTTC	300
AAATTTGTTA TATTTTAGCT GTAATAAAAA GAGTATTTTT AGCCGATTTT CTAATTTAAA	360
CTTGTCAGAA GTTGTCTTTT TTTATTACAA CTAAGTTTAA TGAATTTGAA CTTGAAACAT	420
GTATATAATT AGAGTAAGAT GAAAAGAATA TGTATGGATT TTTTCAAAAA AATTGTA AAC	480
CTTTTTTAGT TCATGTGCAC CATATGTGAA TCAAAGGTTT ATATACACCG GATATGTTC	540
CTTTTTACAG AACCTAATCT GGCCTAGCCA GTATGTTGTG GACTTGGCTC CTAAGTGTGA	600
ACCTGGCAGT GATGGGCAAC AAAGCAGGCA TGCCTTATGT GTGATGAATA ATTGACACAT	660
GTACCGAGAG GTTTGGGGTT TTTTGTATT GCATAGCAAA ACATGGTGAA ATTCTTAGGG	720
TATTTTTGAG ATTACATTTA GGGCATGTTT GTTTCCCTTC ATTTTGAGGA ATTGGAATCT	780
AAC TAATAAA TTAGGCTATT TTTTAGAAT GTGACATTCC CACTTTCTA AAGTGTACAT	840
ATAAGTCTAT CTAAATAAT TTATAGGGTG GAAGATGTAA ATTGATTATA TAGATTTATA	900
AGCTTCTTTT CTAATGTA AAATTAAGCT CACTCTTCTA CTTGCTTCTC TATAACATAA	960
TATAGTTTAT AACTACCTCT CTCATATGAT TTAGAATAAT ATACAAATAT ATTACATAAA	1020
AAATATATTA ATTGAATTAG TGTGTCTAA TTTATAATTA TTAGAATGTA ATTCAATTCC	1080
AACGAAACAA CGGGGCCTTA GGTTTAATAT CTTCTTACA CTGCGAAAAT GTTGTACAC	1140
TTGCCAAAAA AAATCAATCG CATATTTACC TTACAAGGAC ATATTTTAGC AAAATGCTAT	1200
AGACATGAAT CCAACGTAAT CAATAGAGTG AGATTTACTG GTAAACTACC AATTGCTCAT	1260
CTGCTCGGTA CCAACCAGCC TTTCTATTA CCATGCACAT GTTGCTCTC AACTGCAGCA	1320
TCTTTCAAGC CGTGAGCAGA CATGTTGCAG ATCGAAGTAA GGTATATATG TGCATAGTCT	1380
CCTAATCTT CATCTCAAC CTCTAGCTGA TTGATCTCTG GTATTTACCA CTCCTTCCTT	1440
CCTTCCTTCC TTCAATTCTA AATACCACAA ATCAAAGTTG CTTTGCATG	1490

30 (2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) HEBRA: Única

35 (D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 2:

TGTA AACGA CGGCCAGT 18

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) HEBRA: Única

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 3:

CAGGAAACAG CTATGACC 18

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) HEBRA: Única

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 4:

CCTTCATCAG CTTCTGGCAG 20

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) HEBRA: Única

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 5:

AGATCTCGGC CAGGCCCTTG 20

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) HEBRA: Única

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 6:

GAGTTGATGA AGTGA 15

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 19 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) HEBRA: Única

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 7:

GAGATCAATC AGCTAGAGG 19

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 13 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) HEBRA: Única

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 8:

TAAACCTAAG GCC 13

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

- (B) TIPO: Ácido nucleico
 (C) HEBRA: Única
 (D) TOPOLOGÍA: Lineal
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 9:
 5 AATAGCCTAA TTTATTAG 18
- (2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 10:
 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 17 pares de bases
 (B) TIPO: Ácido nucleico
 10 (C) HEBRA: Única
 (D) TOPOLOGÍA: Lineal
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 10:
 ACATGTTTCA AGTTCAA 17
- (2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 11:
 15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 16 pares de bases
 (B) TIPO: Ácido nucleico
 (C) HEBRA: Única
 (D) TOPOLOGÍA: Lineal
 20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 11:
 CTTGTCAGAA GTTGTC 16
- (2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 12:
 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 17 pares de bases
 25 (B) TIPO: Ácido nucleico
 (C) HEBRA: Única
 (D) TOPOLOGÍA: Lineal
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 12:
 CAACCATTAC CGATGAA 17
- (2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 13:
 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 19 pares de bases
 (B) TIPO: Ácido nucleico
 (C) HEBRA: Única
 35 (D) TOPOLOGÍA: Lineal
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 13:
 ACGAGCGGAC GCACGACAG 19
- (2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 14:
 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 40 (A) LONGITUD: 20 pares de bases
 (B) TIPO: Ácido nucleico
 (C) HEBRA: Única
 (D) TOPOLOGÍA: Lineal
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 14:

TCCGTCGCCA TCTGCGTCAC 20

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) HEBRA: Única

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_feature

(B) LOCALIZACIÓN: (21..22, 26..27, 31..32)

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= "N representa I"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 15:

CACGCGTCGA CTAGTACGGG NNGGGNNGGG NNG 33

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) HEBRA: Única

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 16:

GCTGCTCACC ATGGCAAAGC AAC 23

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 14 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) HEBRA: Única

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 17:

CCATGGGGAC AATG 14

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 32 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) HEBRA: Única

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 18:

ATGAAGAAAA ATCGCGCTTT TTTGAAGTGG GC 32

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 28 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) HEBRA: Única

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 19:

TCACCCAGGC GGGCAAAATC AGCCGACA 28

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) HEBRA: Única

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 20:

CCGTTAACGC TTTCATGACG CCCGGAATTA AGC 33

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 84 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) HEBRA: Única

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO: 21:

GATCTACTGC TGTATATAAA ACCAGTGGTT ATATGTACAG TACTGCTGTA TATAAAACCA 60

GTGGTTATAT GTACAGTACG GATG 84

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 78 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) HEBRA: Única

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iv) ANTI-SENTIDO: SÍ

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 22:

GTAGCCGTAC TGTACATATA ACCACTGCTT TTATATACAG CAGTACTGTA CATATAACCA 60

CTGGTTTTAT ATACAGCA 78

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1485 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) HEBRA: Única

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 23:

GGAATTCGGC	ACGAGCTCGG	TGCCGCCTTC	CTTCCTTCAA	TTCTAAATAC	CACAAATCAA	60
AGTTGCTTTG	CGATGGTGAG	CAGCAGCATG	GACACGACGA	GTGACAAGCG	TGCGTCATCC	120
ATGCTGGCCC	CTAACCCTGG	CAAGGCCACG	ATCCTCGCCC	TTGGCCACGC	CTTCCCGCAG	180
CAGCTTGTC	TGCAGGACTA	CGTCGTCGAC	GGCTTCATGA	AGAACACCAA	CTGTGACGAC	240
CCGGAGCTCA	AGGAGAAGCT	CACCAGACTC	TGCAAGACGA	CGACCGTGAG	GACTCGGTAC	300
GTGGTGATGT	CGGATGAGAT	CCTCAAGAAC	TACCCGGAGC	TGGCCCAGGA	GGGGCTGCCG	360
ACGATGAACC	AGCGTCTGGA	CATCTCGAAC	GCGGCGGTGA	CGCAGATGGC	GACGGAGGCG	420
TCCCTGTCGT	GCGTCCGCTC	GTGGGGCGGC	GCGCTCTCGT	CCATTACCCA	CCTGGTGTAC	480
GTCTCGTCGA	GCGAGGCGCG	CTTCCCGGGC	GGCGACCTGC	ACCTGGCGCG	CGCGCTGGGG	540
CTGAGCCCGG	ACGTCCGCCG	CGTCATGCTG	GCCTTCACCG	GCTGCTCGGG	CGGCGTGGCG	600
GGGCTCCGCG	TGGCCAAGGG	CCTGGCCGAG	AGCTGCCCCG	GCGCGCGCGT	GCTGTGGGCC	660
ACCTCCGAGA	CCACCATCGT	GGGGTTCCGC	CCGCCAGCC	CCGACCGCCC	CTACGACCTC	720
GTGGGCGTGG	CGCTCTTCGG	CGACGGCGCG	GGCGCCGCGG	TCATCGGCAC	CGACCCCGCC	780
CCCGCCGAGC	GCCCGCTCTT	CGAGCTCCAC	TCGGCGCTCC	AGCGCTTCCT	CCCGGACACG	840
GAGAGGACCA	TCGAGGGCCG	GCTGACGGAG	GAAGGCATCA	AGTTCCAGCT	GGGGCGGGAG	900
CTGCCCCACA	TCATCGAGGC	GCACGTGGAG	GACTTCTGCC	AGAAGCTGAT	GAAGGAGCGG	960
CAGAGCGGCG	AGGACGCCGA	CGGTGGCGGC	CCCAGCCGA	TGAGCTACGG	GGACATGTTC	1020
TGGGCGGTCC	ACCCCGGCGG	GCCGGCCATC	CTAACCAAGA	TGGAGGGGCG	CCTGGGCCTC	1080
GGCGCCGACA	AGCTCCGCGC	CAGCCGGTGC	GCGCTCCGGG	ACTTCGGCAA	CGCCAGCAGC	1140
AACACCATCG	TGTACGTGCT	GGAGAACATG	GTGGAGGACA	CCCGGCGGAG	GAGGCTGCTG	1200
GCTGCTGACG	ACGGTGGAGA	GGACTGCGAG	TGGGGTCTCA	TCCTCGCGTT	CGGGCCGGGG	1260
ATCACGTTTC	AGGGCATCCT	AGCCAGGAAC	TTGCAGGCAA	CCGCGCGCGC	CTCAGCCCAG	1320
CTCTGATCAC	CTCTTGCTGT	GTTGCTTTTC	TGCTTGCTCT	GCACCTCTGC	TTCCGTGTGA	1380
TTGCTGCTTT	GAGGGAGAAT	GCTGAGCATC	AACATTGCTC	ATGAGCATCA	ATGAAATAAG	1440
GGGCCCCGAA	ATTCACTGCT	CAAAAAAAAA	AAAAAAAAAC	TCGAG		1485

REIVINDICACIONES

1. Método de fabricación de una planta estéril masculina que comprende
- (a) proporcionar una planta que comprende una molécula de ADN recombinante que comprende
- 5 (i) una secuencia de ADN que codifica un producto génico que, cuando se expresa en una planta, inhibe la formación o la función del polen, y
- (ii) un promotor que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en
- (a) una secuencia de nucleótidos de la secuencia de nucleótidos establecida en la figura 1 que muestra la capacidad de controlar la expresión de una secuencia de ADN en tejido de antera;
- (b) la secuencia de nucleótidos establecida en la figura 1;
- 10 (c) una secuencia de nucleótidos que se extiende, como mínimo, 503 pares de bases en dirección ascendente en relación con el codón de inicio en la posición de nucleótido 1488 de la figura 1;
- (d) una secuencia de nucleótidos que se extiende desde la posición -503 hasta la posición -1 en dirección ascendente en relación con el codón de inicio en la posición de nucleótido 1488 de la figura 1;
- 15 (e) una secuencia de nucleótidos que se extiende desde la posición -587 hasta la posición -1 en dirección ascendente en relación con el codón de inicio en la posición de nucleótido 1488 de la figura 1;
- (f) una secuencia de nucleótidos que se extiende desde la posición -890 hasta la posición -1 en dirección ascendente en relación con el codón de inicio en la posición de nucleótido 1488 de la figura 1; y
- (g) una secuencia de nucleótidos que se extiende desde la posición -503 hasta la posición -134 en dirección ascendente en relación con el codón de inicio en la posición de nucleótido 1488 de la figura 1;
- 20 en la que dicho promotor está unido operativamente con dicha secuencia de ADN que codifica un producto génico; y
- (b) desarrollar dicha planta bajo condiciones de manera que se consiga la esterilidad masculina como resultado de la expresión de dicha secuencia de ADN.
2. Método, según la reivindicación 1, en el que dicho producto génico es un gen de metilasa exógeno.
- 25 3. Método, según la reivindicación 2, en el que dicho gen de metilasa exógeno es el gen de la DAM metilasa.
4. Construcción de ADN recombinante que comprende
- (a) un operador *lexA* insertado en un promotor específico de tejido que está unido operativamente a un gen dominante negativo que, cuando se expresa en una planta, inhibe la formación o la función del polen, en el que el promotor específico de tejido dirige la transcripción de ADN en células o tejidos críticos con la formación o la función del polen y en el que dicho promotor específico de tejido es un promotor tal como se define en la reivindicación 1; y
- 30 (b) una secuencia de ADN que codifica una proteína *lexA* unida de manera funcional a un promotor inducible.
5. Construcción de ADN recombinante que comprende
- (a) una secuencia de ADN que codifica un producto génico que, cuando se expresa en una planta, inhibe la formación o la función del polen, y
- 35 (b) un promotor, tal como se define en la reivindicación 1, que dirige la transcripción de ADN en células o tejidos críticos con la formación o la función del polen que está unido operativamente con dicha secuencia de ADN que codifica dicho producto génico.
6. Construcción de ADN recombinante, según la reivindicación 5, en la que dicho producto génico es un gen de metilasa exógeno.

FIG. 1

1 TTTTATCTT TCTGATTCA ACCATTACCG ATGAAATTTCT ATTTGGATTA
 51 GTTCATTTTC GTCTTCCCTG TCTGATCCCTG TTTTCGACAA TTCGTGATCCC
 101 GAATCCGTTT TTGAATTAAA ATATAAAAAA TAAAAACAAG AAATGGTTTA
 151 TCTCGGTCAA TTTCCGTTTTT CGCGAGGAAC ATATTCGGTG TACATGAGCC
 201 TTTGGTGCAC ATGAACATAA AAGTTTACA AAAAAATCTG AAAAAAATC
 251 ATACATATTC TTTGCATCCG TACTCCTATT ATATATAAAA TTTTCATGTTT
 301 AAATTTGTTA TATTTAGCT GTAATAAAAA GAGTATTTT AGCCGATTTT
 351 CTAATTTAAA CTTGTCAGAA GTTGTCTTTT TTTATTACAA CTAAGTTTAA
 401 TGAATTTGAA CTTGAAACAT GTATATAATT AGAGTAAGAT GAAAAGAATA
 451 TGTATGGATT TTTTCAAAAA AATTGTAAC CTTTTTAGT TCATGTGCAC
 501 CATATGTGAA TCAAAGGTTT ATATACACCG GATATGTTTC CTTTTTCACG
 551 AACCTAATCT GGCTAGCCA GTATGTTGTG GACTTGGCTC CTAAGTGTGA
 601 ACCTGGCAGT GATGGCAAC AAAGCAGGCA TGCCTTATGT GTGATGAATA
 651 ATGACACAT GTACCGAGAG GTTTGGGTT TTTTGTATT GCATAGCAAA
 701 ACATGGTGAA ATCTTAGGG TATTTTGAG ATTACATTA GGGCATGTTT
 751 GTTCCCTTC ATTTGAGGA ATTTGAACTT AACTAATAAA TTAGGCTATT
 801 TTTTLAGAAT GTGACATTCC CAACTTTCTA AAGTGTACAT ATAAGTCTAT
 851 CTTAAATAAT TTATAGGGTG GAAAGTGTAA ATTGATTATA TAGATTTATA
 901 AGCTTCTTTT CTAATGTAAA ATTTAAAGCT CACTCTTCTA CTTGCTTCTC
 951 TATAACATAA TATAGTTTAT AACTACCTCT CTCATATGAT TTAGAATAAT
 1001 ATACAAATAT ATTACATAAA AAATATATTA ATTGAAATTAG TGTGTCTAA
 1051 TTTATAATTA TTAGAAATGTA ATTCAATTCC AACGAAACAA CGGGCCCTTA
 1101 GGTTTAAATAT CTTCCCTTACA CTGCGAAAAT GTTGTACAC TTGCCAAAAA
 1151 AAATCAATCG CATATTTACC TTACAAGGAC ATATTTTAGC AAAATGCTAT
 1201 AGACATGAAT CCAACGTAAT CAATAGAGTG AGATTTACTG GTAACACTACC
 1251 AATTGCTCAT CTGCTCGGTA CCAACCAGCC TTTCTATTA CCATGCACAT
 1301 GTGGCTCTC AACTGCAGCA TCTTTCAAGC CGTGAGCAGA CATGTTGCAG
 1351 ATCGAAAGTAA GGTAATATATG TGCAATAGTCT CCTAATCTT CATCTTCAAC
 1401 CTCTAGCTGA TTGATCTCTG GTATTTACCA CTTTTCCTT CCTTCTTCC
 1451 TTCAAATTCTA AATACCACAA ATCAAAGTTG CTTTGGGATG

FIG. 2

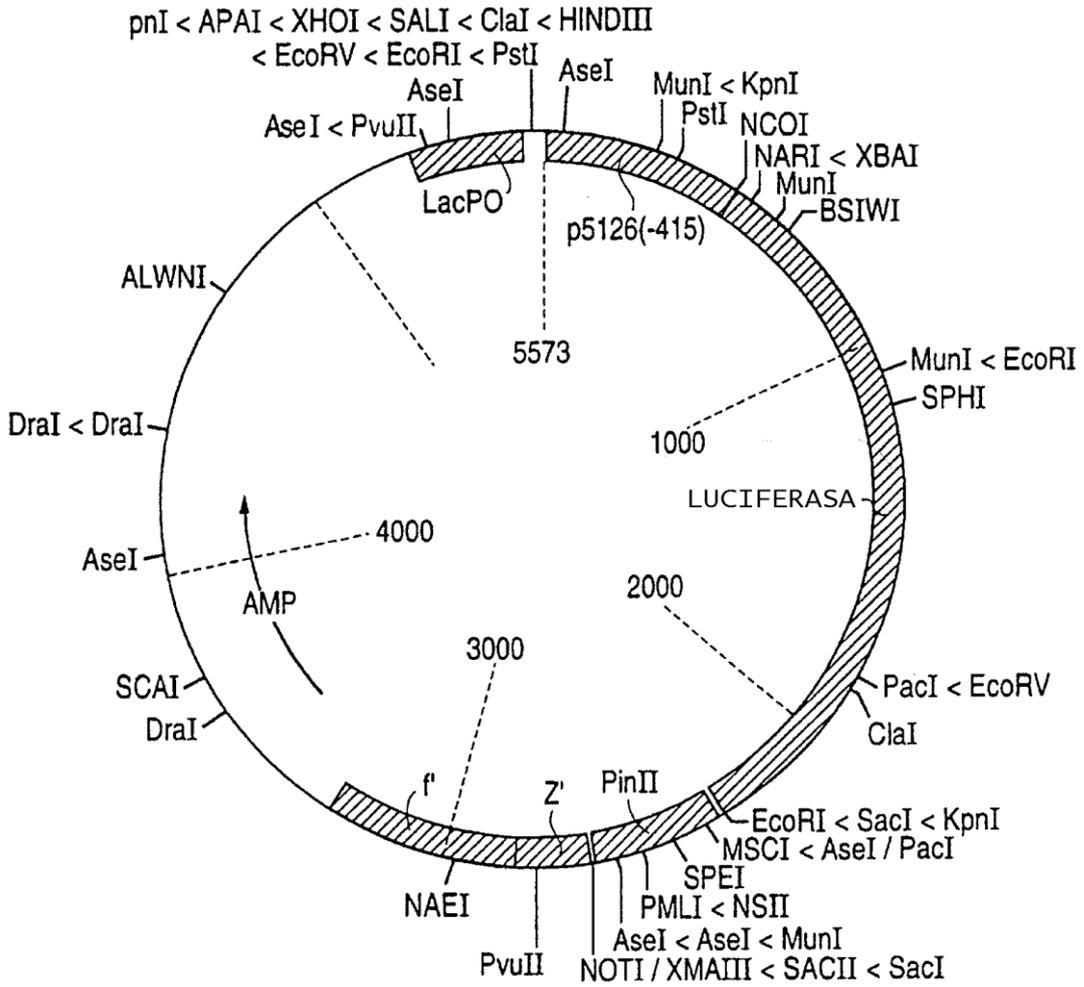


FIG. 3

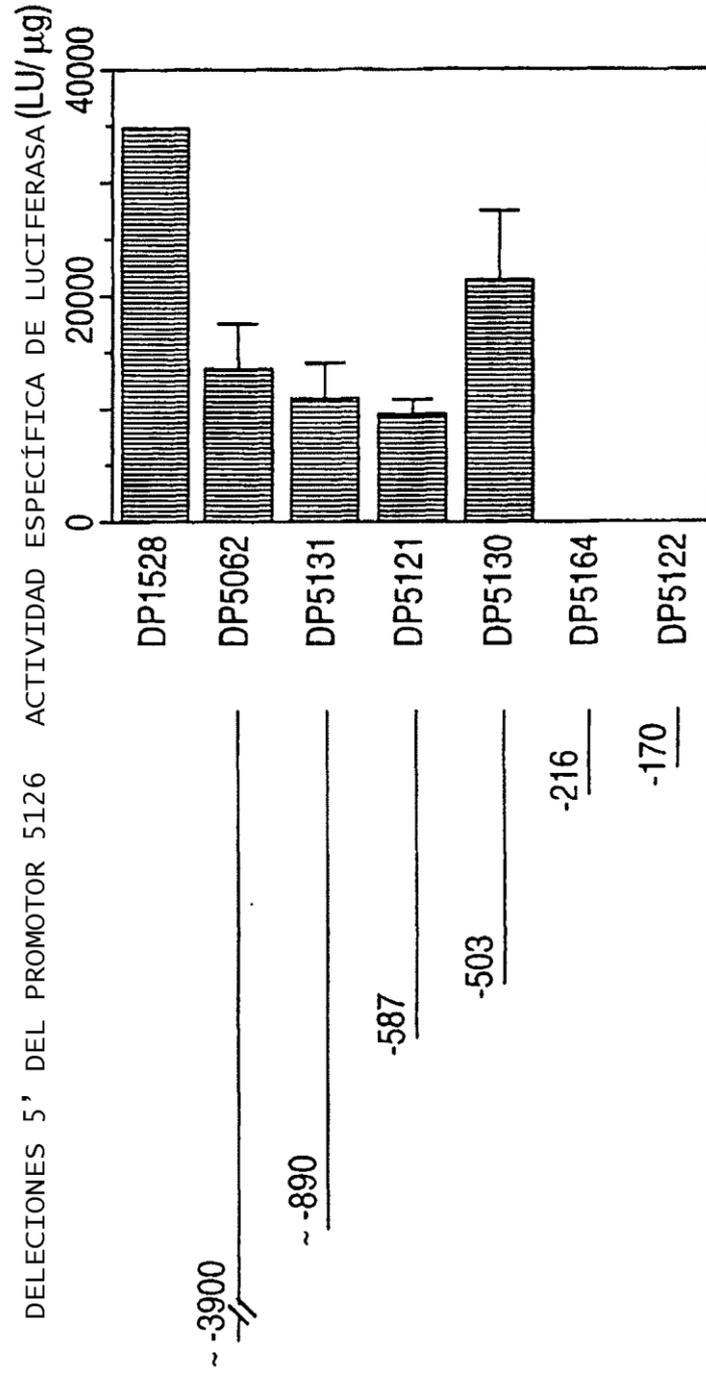


FIG. 4

DELECCIONES 5' DEL PROMOTOR 5126
(SE COORDINA EN RELACIÓN CON EL
CODÓN DE INICIO TRADUCCIONAL)



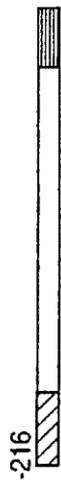
-3900



-503



-216



DP2516

▨ pCaMV35S (DIRECCIÓN ASCENDENTE DOBLADO)

▧ TMV Ω'

▩ INTRÓN #1 DE ADHI DE MAÍZ

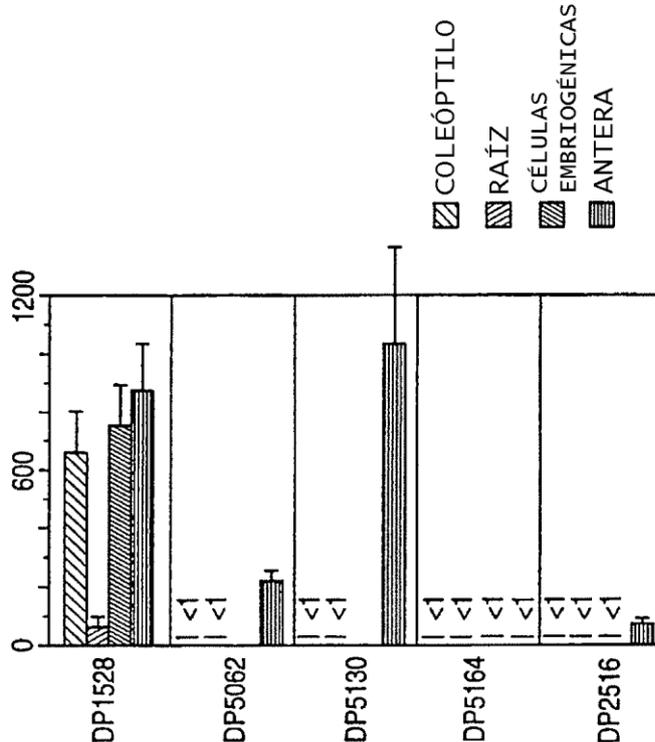
▤ p5126

▥ pSGB6

□ LUCIFERASA

▨ REGIÓN DE PINII 3' DE LA PATATA

ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LUCIFERASA



▨ COLEÓPTILO
▩ RAÍZ
▤ CÉLULAS EMBRIOGÉNICAS
▥ ANTERA

FIG. 5

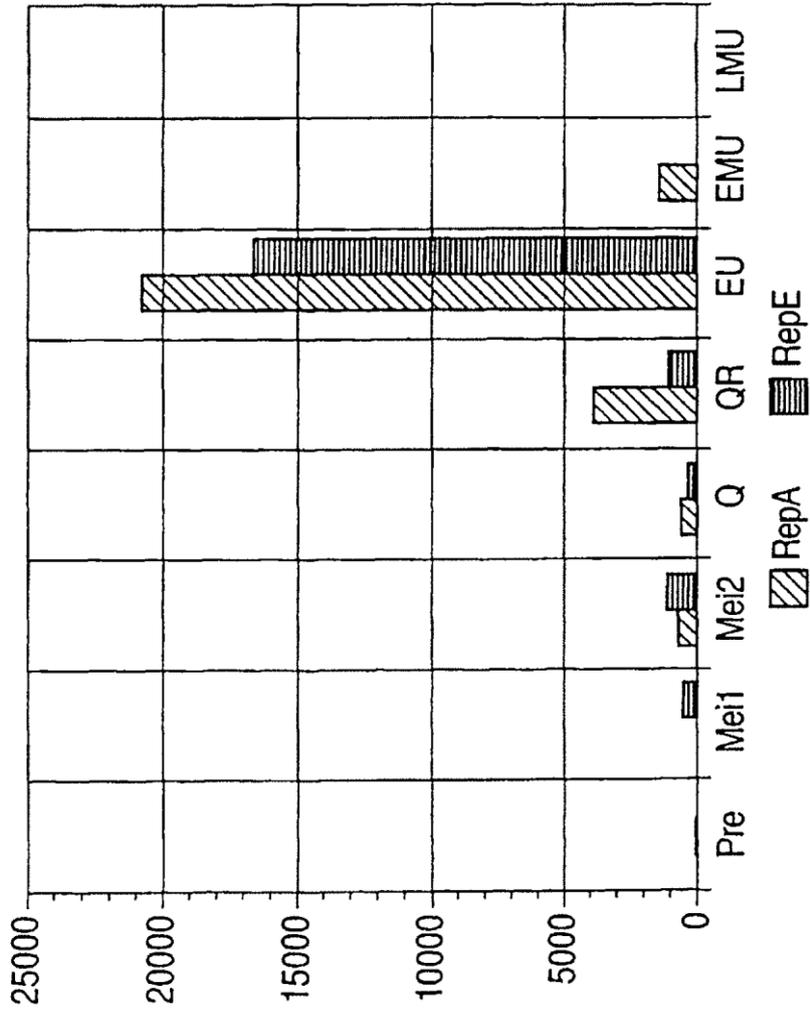


FIG. 7

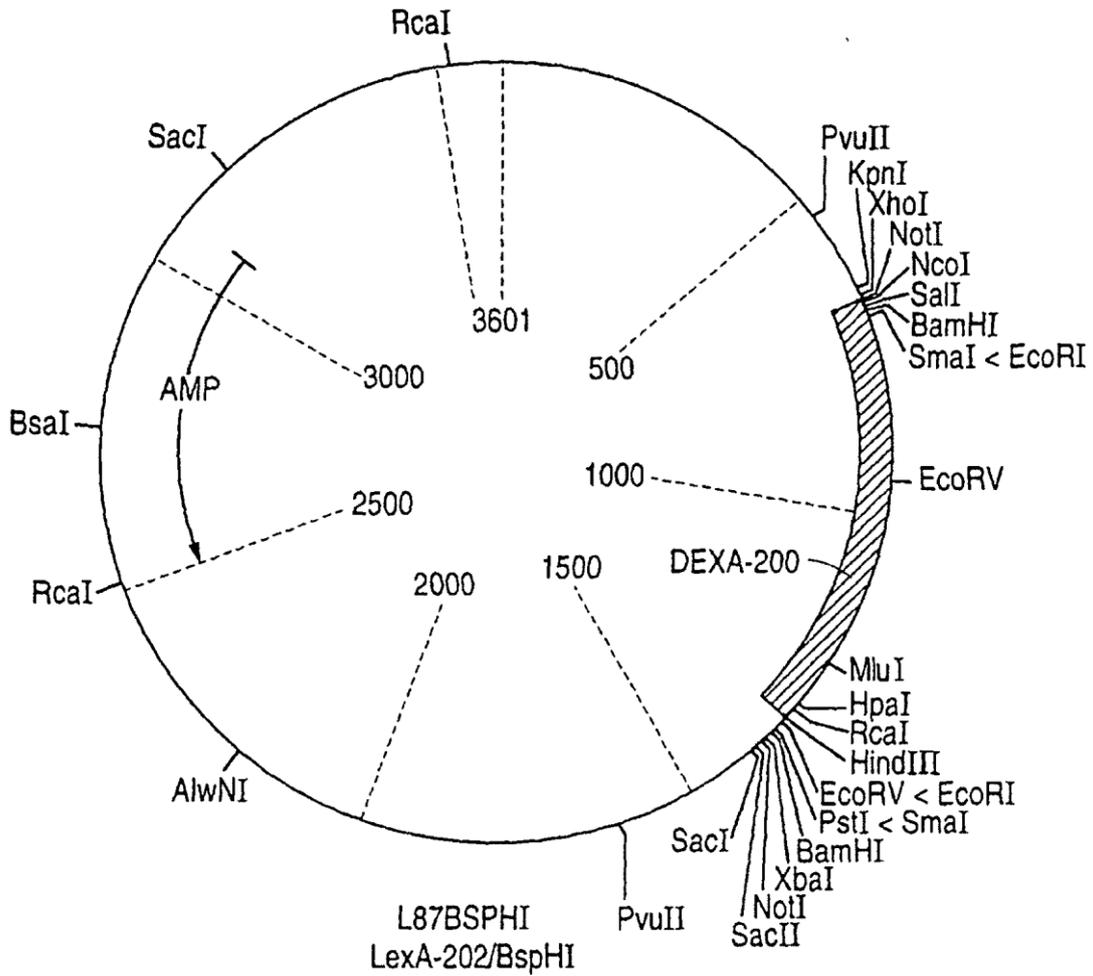


FIG. 8

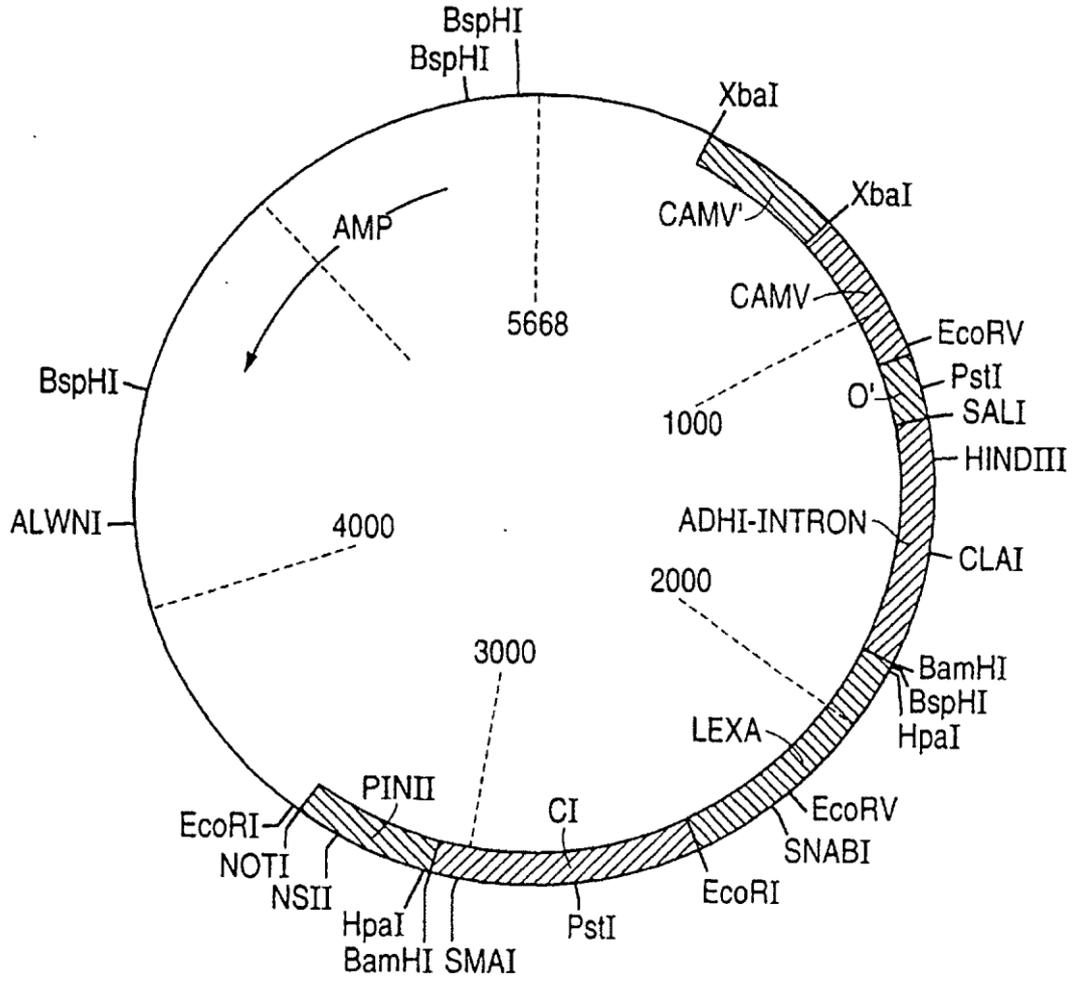


FIG. 9

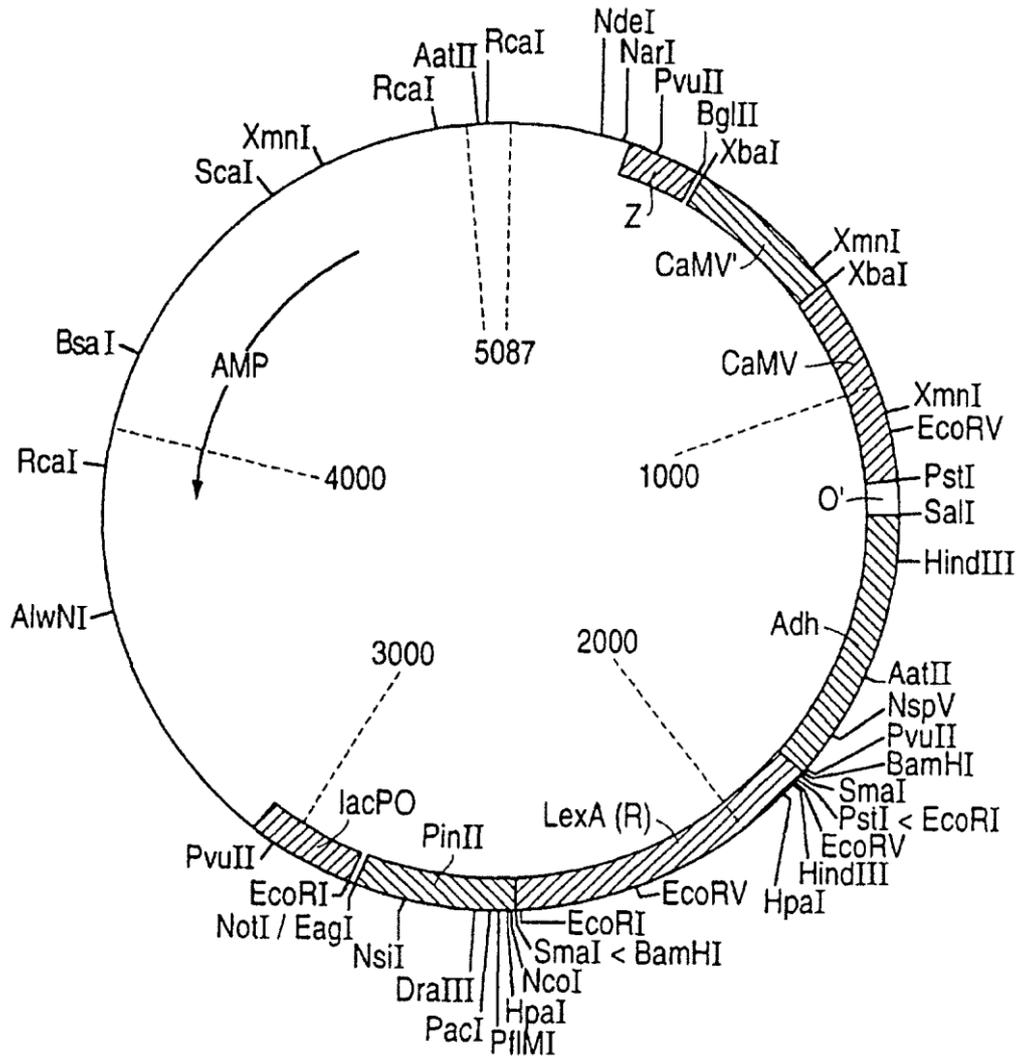


FIG. 10

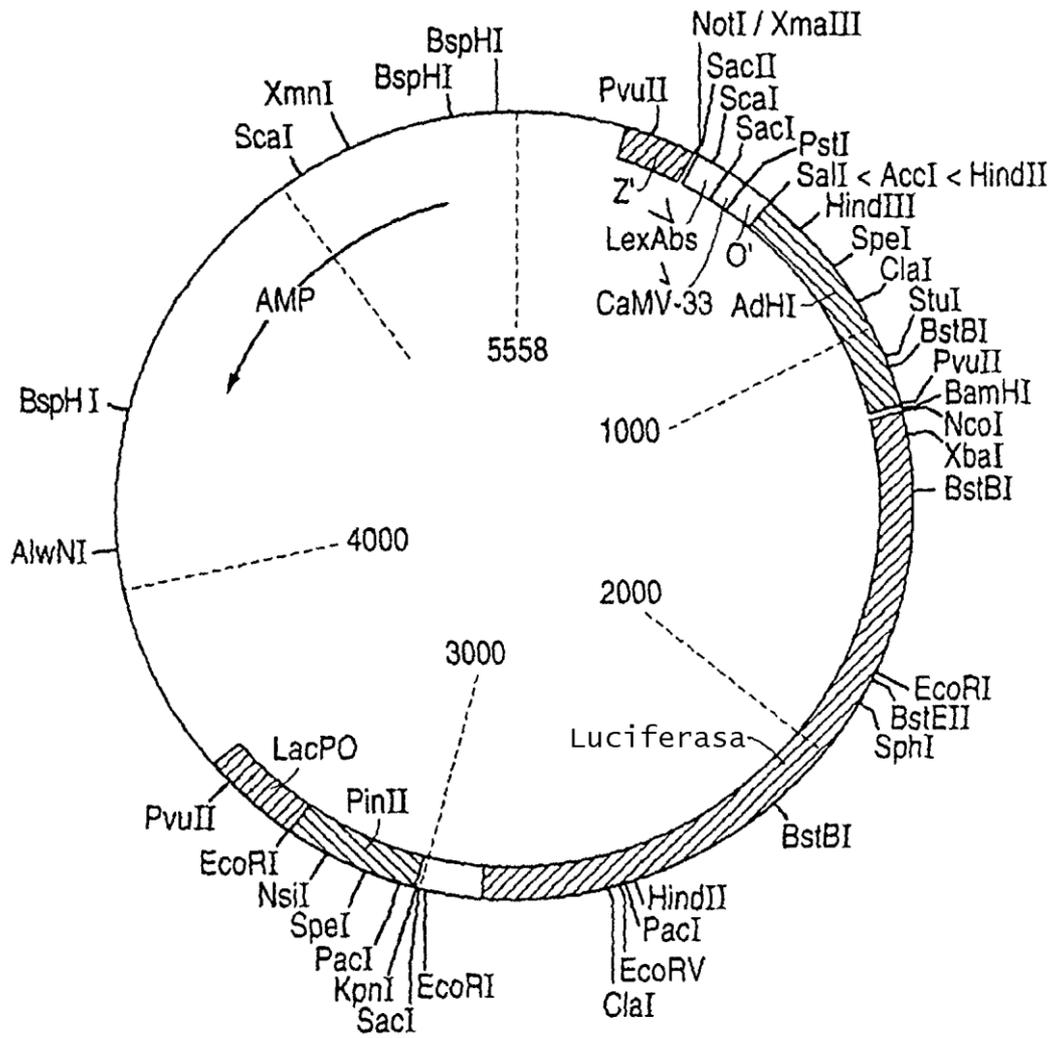


FIG. 12

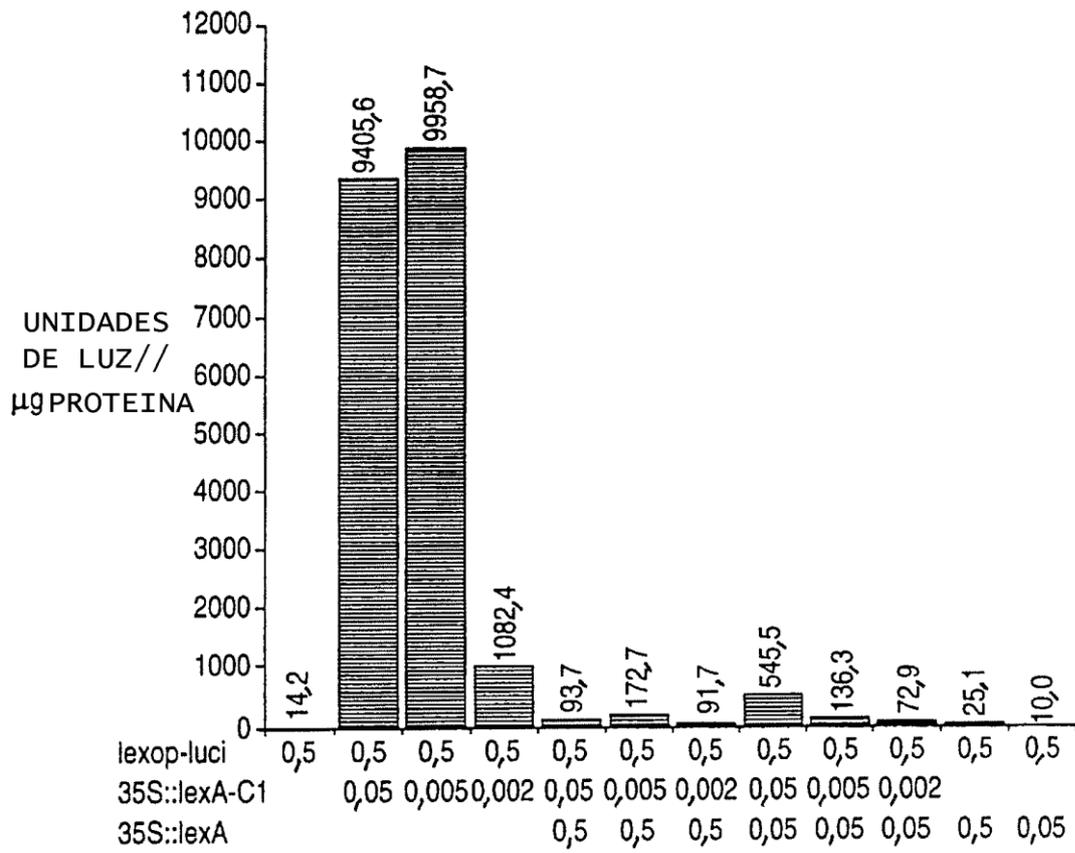


FIG. 13

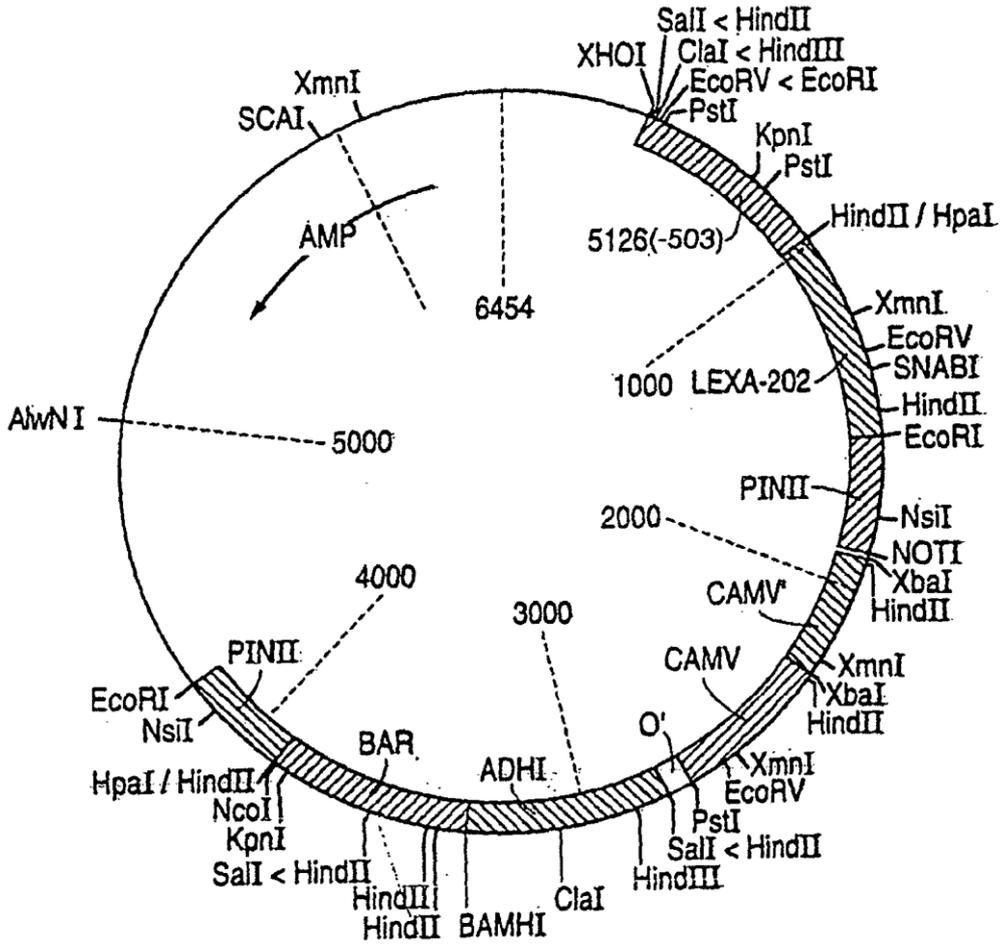


FIG. 15

