

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 645**

51 Int. Cl.:
C12N 15/29
C12N 15/64

(2006.01)

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04737025 .9**
96 Fecha de presentación: **18.06.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1639110**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.03.2006**

54 Título: **PROMOTORES ESPECÍFICOS DEL POLEN DE RIGRÁS Y LAS CONSTRUCCIONES DE EXPRESIÓN.**

30 Prioridad:
20.06.2003 AU 2003903132

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.01.2012

73 Titular/es:
MOLECULAR PLANT BREEDING NOMINEES LTD
1 PARK DRIVE
BUNDOORA 3083 VICTORIA, AU

72 Inventor/es:
SPANGENBERG, German;
LIDGETT, Angela, Jane y
PETROVSKA, Natasha

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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).

ES 2 371 645 T3

DESCRIPCIÓN

Promotores específicos del polen de rigrás y las construcciones de expresión

La presente invención se relaciona por lo general con una molécula de ácido nucleico aislado capaz de modificar la expresión específica de tejido, preferiblemente de una segunda molécula de ácido nucleico ligada operativamente a esta. Más particularmente, la presente invención se dirige a una molécula de ácido nucleico aislada, capaz de modificar la expresión específica del polen, preferiblemente de una segunda molécula de ácido nucleico ligada operativamente. La presente invención además contempla las construcciones que incluyen la molécula y los métodos de uso de la molécula, que incluyen por ejemplo, la modificación de la expresión del gen en polen, tal como vía reducción o inducción de la expresión, y la introducción en el polen de los fenotipos deseados.

Las gramíneas forrajeras son el esqueleto de la agricultura sostenible y contribuyen grandemente a la economía mundial. Dos géneros relacionados, *Festuca* (fescues) y *Lolium* (raigrás) son de gran valor en los pastizales templados. Estos géneros contienen malezas, muy productivas, bien adaptadas ampliamente distribuidas en temperatura y climas fríos en el Norte y Sur de América, Europa, Asia, Australia y Nueva Zelanda, donde se utilizan para la agricultura y propósitos recreacionales (Jauhar 1993). El más importante comercialmente raigrás en climas de temperatura fría a lo largo del mundo son el raigrás Italiano o el anual. En Nueva Zelanda y Australia, el raigrás perenne se cultiva en más de 10 millones ha proporcionado forraje de alta calidad para soportar sobre 60 millones de ovejas y ganado (Siegel *et al.* 1985). Sin embargo, el raigrás y otras especies de forraje también son responsables de una gran porción de alergias del polen de la hierba en el mundo entero. La alergia al polen, en particular alergia al polen de hierba, es una enfermedad ambiental importante que aflige aproximadamente al 20% de la población en climas de temperatura fría.

En consecuencia, existe una necesidad de un medio para la generación de plantas agronómicas útiles que tengan expresión del gen específico del polen modificado, por ejemplo plantas que son *inter alia* estériles masculinas y/o que produzcan polen alérgico bajo.

En un aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que incluye una secuencia de nucleótidos seleccionada a partir del grupo que consiste de (a) una secuencia de nucleótidos publicada en SEQ ID NO: 3; (b) una secuencia que hibridiza a la SEQ ID O: 3 bajo condiciones muy estrictas; (c) un complemento de (a) o (b); y (d) un fragmento o variante de (a), (b) o (c); que tiene un tamaño de al menos 100 nucleótidos y al menos 95% de identidad con la SEQ ID NO: 3; en donde dicha molécula es capaz de modificar la expresión específica del polen de una segunda molécula de ácido nucleico ligada operativamente, dando lugar a la expresión de dicha segunda molécula de ácido nucleico.

La molécula de ácido nucleico se puede obtener de la especie raigrás (*Lolium*). Estas especies pueden ser de cualquier tipo apropiado, incluyendo raigrás Italiano o anual, raigrás perenne y raigrás híbrido. Preferiblemente la especie es un raigrás, más preferiblemente raigrás perenne (*L. perenne*). La molécula de ácido nucleico también puede ser una molécula sintética.

Un promotor específico del polen se ha aislado de *Lolium perenne*, promotor que muestra propiedades útiles para expresión dirigida específica del polen. Tales promotores son particularmente útiles en la producción de plantas transgénicas de bajo alérgeno del polen, para la contención del transgen y/o para la reducción de la expresión de los genes que se involucran en el desarrollo del polen para producir, por ejemplo, plantas estériles masculinas o infértiles.

La modificación de la expresión del gen específico del polen tiene muchos usos en desarrollo y mejoramiento de la planta. Por ejemplo, mientras que el potencial de biotecnología en el desarrollo de cultivos de plantas mejoradas es ahora bien reconocido, la posibilidad de escapar los transgenes a especies salvajes y no-transformadas plantea preocupaciones comerciales y ecológicas. En consecuencia, un posible uso está en el desarrollo de mecanismos por los cuales las plantas transgénicas se obliguen a ser estériles masculinas, lo que reduce el potencial de polinización cruzada entre ellas, plantas no-transgénicas. La regulación de la fertilidad masculina en las plantas también tiene otras aplicaciones; por ejemplo, en el mantenimiento de la uniformidad y vigor híbrido de plantas híbridas F1, asegurando que la auto-polinización se minimiza durante la producción de semillas.

En otros casos, puede ser deseable modificar la expresión del gen específico del polen con el fin de revertir la esterilidad.

En incluso otros casos, puede ser deseable generar híbridos, por ejemplo cruzando una planta, que ha sido hecha para ser masculina infértil, con otra planta fértil, sobre la cual se ha conferido la expresión específica del polen de un rasgo deseado.

Otro posible uso se relaciona con la alta producción del alérgeno del polen de ciertas especies de plantas. La capacidad de modificar la expresión del gen del polen permitiría la manipulación de la producción de alérgenos del polen por las plantas, facilitando así el desarrollo de las plantas que causan alergenicidad reducida del polen.

5 Como se utilizan en este documento, el término "aislado" significa que el material se retira de su ambiente original (por ejemplo. El ambiente natural si es de origen natural). Por ejemplo, un fragmento de ácido nucleico de origen natural presente en una planta viva no se aísla, pero el mismo fragmento del ácido nucleico separado de algo o todos los materiales coexistentes en el sistema natural, se aísla. Dicho aislado del fragmento de ácido nucleico podría ser parte de un vector y/o tales fragmentos del ácido nucleico podrían ser parte de una composición, e incluso ser aislado en ese citado vector o composición no es parte de su ambiente natural.

10 El término "aislado" también abarca moléculas sintéticas, por ejemplo de un promotor híbrido o modular.

Por "variante" en relación con una secuencia de nucleótidos se entiende, por ejemplo, un análogo, derivado o mutante, que sigue siendo capaz de modificar la expresión específica del polen, preferiblemente de una molécula de un segundo ácido nucleico ligado operativamente.

15 Tales variantes incluyen variantes alérgicas de origen natural y variante de origen no-natural. Las adiciones, eliminaciones, sustituciones y derivaciones de uno o más de los nucleótidos se contemplan siempre y cuando las modificaciones no resulten en pérdida de actividad funcional de la variante. Preferiblemente la variante tiene al menos aproximadamente 80% de identidad, tal como por ejemplo 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% o 89% de identidad con la parte relevante de la secuencia mencionada anteriormente, más preferiblemente al menos aproximadamente 90%, tal como por ejemplo 91 %, 92%, 93% o 94% de identidad, más preferiblemente al menos aproximadamente 95% de identidad, tal como por ejemplo 96%, 97%, 98%, 99% y 100% de identidad.

20 La presente invención también se extiende a las variantes de la molécula de ácido nucleico de la presente invención, que son variantes de una especie de raigrás (*Lolium*) o de festuca (*Festuca*), y variantes que tienen una región codificante correspondiente con al menos aproximadamente 80% de identidad, tal como por ejemplo 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% o 89% de identidad, más preferiblemente al menos aproximadamente 90% de identidad, tal como por ejemplo 91%. 92%, 93% o 94% de identidad, más preferiblemente al menos aproximadamente 95% de identidad, tal como por ejemplo 96%, 97%, 98%, 99% y 100% de identidad a la secuencia codificante mostrada en la Fig 1 en este documento.

25 Por "fragmento" en relación con una secuencia de nucleótidos se entiende una parte de la molécula de ácido nucleico, que sigue siendo capaz de modificar la expresión específica del polen, preferiblemente de una molécula de un segundo ácido nucleico ligado operativamente. Tales fragmentos pueden tener un tamaño de, por ejemplo, al menos aproximadamente 15 nucleótidos, al menos aproximadamente 30 nucleótidos, al menos aproximadamente 45 nucleótidos, al menos aproximadamente 100 nucleótidos, o al menos aproximadamente 200 nucleótidos.

En una modalidad particularmente preferida, el fragmento puede incluir una o más secuencias seleccionadas de una parte de los grupos que consisten de:

35 AGGTCA (elemento Zm13 Q; SEQ ID NO:4);

TGTGGTTATATA (elemento LAT52; SEQ ID NO: 5); y

GTGA (elemento GTGANTGIO; SEQ ID NO:6).

40 Por "ligado operativamente" se entiende que la molécula de ácido nucleico de la presente invención es capaz de causar la expresión de una segunda u otra molécula de ácido nucleico en una célula vegetal. Por lo general, la molécula de ácido nucleico está en dirección 5' de la segunda u otra molécula de ácido nucleico. Dónde un terminador se une operativamente, el terminador es capaz de terminar la transcripción expresada de la segunda u otra molécula de ácido nucleico. Por lo general, el terminador está en dirección 3' de la segunda u otra molécula de ácido nucleico.

45 Por "expresión" se entiende que una molécula de ácido nucleico relevante se transcribe y opcionalmente se traduce. Así, el término "expresión" se puede relacionar tanto con la transcripción del ácido ribonucleico (ARN) del ADN, así como la transcripción de ARN seguido por la traducción de aquel ARN en una secuencia de aminoácido. La modificación de la expresión incluye, por ejemplo la situación donde la molécula del ácido nucleico de la presente invención se utiliza para inhibir la expresión de un gen endógeno, por ejemplo utilizando tecnología de supresión anti-sentido o sentido, o ARN de interferencia (RNAi) o tecnología de horquilla. La modificación de la expresión también incluye uso de la molécula de ácido nucleico de la presente invención para expresar una proteína codificada mediante un gen endógeno existente o para la integración de una secuencia derivada exógenamente y opcionalmente expresa la proteína de estas.

Por "específica del polen" se entiende que la expresión se limita sustancialmente al polen.

"Condiciones de alta restricción" para la hibridación pueden ser identificadas como se describe en Sambrook *et al*, 1989.

5 Tales condiciones se determinan fácilmente por alguien de habilidad en el oficio, y generalmente son un cálculo empírico basado en la longitud de la sonda, concentración de la sal y temperatura de lavado. Por ejemplo, el uso de una solución de lavado que incluye aproximadamente 0.2 a aproximadamente 0.1 x SSC a aproximadamente 60°C a aproximadamente 70°C generalmente sería considerado condiciones de alto rigor.

10 La referencia en este documento a un "gen", "segunda molécula de ácido nucleico" u "otra molécula de ácido nucleico" se debe tomar en su contexto más amplio e incluye una secuencia del ácido desoxirribonucleico (ADN), que es capaz de tener su expresión modificada por la molécula de ácido nucleico de la presente invención. Como se define anteriormente, el término "expresión" se puede relacionar tanto con la transcripción de ácido ribonucleico (ARN) a partir del ADN, así como la transcripción de ARN seguido por la traducción de aquel ARN en una secuencia de aminoácido. En consecuencia, un gen, segunda u otra molécula de ácido nucleico incluye dentro de su alcance tanto un ADN codificante de ARN que codifica un aminoácido (i.e. ARNm) así como un ADN que codifica un ARN 15 que no codifica para una secuencia de aminoácido. Dicho ARN que no codifica para una secuencia de aminoácido puede incluir un ARN antisentido. Un gen, segunda u otra molécula de ácido nucleico puede ser de un tipo salvaje o forma alterada. En el caso de una forma alterada, la secuencia puede ser modificada por alteraciones a la secuencia de nucleótidos.

20 En una modalidad preferida de este aspecto de la invención, la otra molécula de ácido nucleico es una secuencia, por ejemplo un gen o fragmento de este, capaz de modificar la expresión de un alérgeno del polen, preferiblemente capaz de causar la inhibición de la expresión de un alérgeno del polen. Preferiblemente el alérgeno del polen es *Lol p 1* y/o *Lol p 2*.

25 En una modalidad preferida de este aspecto de la invención, la molécula de ácido nucleico aislado incluye la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 o un fragmento o variante de esta. En una modalidad particularmente preferida, el fragmento o variante puede incluir la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3, modificada de tal manera que el nucleótido final en la secuencia de nucleótidos terminal 3' CCAGA se suprime y el penúltimo nucleótido en esa secuencia se modifica de tal manera que la secuencia es CCAC.

En una modalidad particularmente preferida el fragmento puede incluir una o más secuencias seleccionadas de una parte de los grupos que consiste de:

30 AGGTCA (elemento Zm13 Q; SEQ ID NO:4);
TGTGGTTATATA (elemento LAT52; SEQ ID NO: 5); y
GTGA (elemento GTGANTGIO; SEQ ID NO:6).

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una construcción que incluye una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

35 El término "construcción" como se utiliza en este documento se refiere a una molécula de ácido nucleico ensamblado artificialmente o aislado, que incluye la molécula de ácido nucleico de la presente invención. En general una construcción también puede incluir otra(s) molécula(s) de ácido nucleico de interés, un gen marcador que en algunos casos también puede ser la otra molécula de ácido nucleico de interés y otras secuencias reguladoras apropiadas. Sería apreciado que la inclusión de estas otras secuencias reguladoras en la construcción es opcional, 40 por ejemplo, tales secuencias pueden no ser necesarias en situaciones donde las secuencias reguladoras de una célula huésped son para ser utilizadas. El término construcción incluye vectores pero no debería ser visto como que se limita a esta. El término construcción también incluye genes quiméricos.

45 El término "vector" como se utiliza en este documento abarca tanto los vectores de clonación como los de expresión. Los vectores por lo general las moléculas recombinantes que contienen moléculas de ácido nucleico a partir de varias fuentes.

En consecuencia, la construcción puede ser un vector. En una modalidad preferida de este aspecto de la invención, el vector puede incluir a otra molécula de ácido nucleico, por ejemplo un gen o fragmento de este, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y un terminador; dicha molécula de ácido nucleico, otra molécula de ácido nucleico y terminador que es ligado operativamente.

En una modalidad preferida de este aspecto de la invención, la otra molécula de ácido nucleico es una secuencia, por ejemplo un gen o fragmento de este, capaz de modificar la expresión de un alérgeno del polen, preferiblemente capaz de causar la inhibición de la expresión de un alérgeno del polen. Preferiblemente el alérgeno del polen es *Lol p 1* y/o *Lol p 2*.

En otra modalidad, el vector puede incluir más de otra molécula de ácido nucleico. Las otras moléculas del ácido nucleico dentro del mismo vector pueden tener secuencias idénticas o diferentes. En una modalidad particularmente preferida, cada otra molécula de ácido nucleico tiene una o más moléculas de ácido nucleico en dirección 5' de acuerdo con la presente invención y uno o más terminadores en dirección 3', aunque la expresión de más de otra molécula de ácido nucleico a partir de una molécula de ácido nucleico en dirección 5' o terminación de más de otra molécula de ácido nucleico a partir de un terminador(s) en dirección 3' no está excluido.

El vector puede ser cualquier tipo apropiado y puede ser viral o non-viral. El vector puede ser un vector de expresión. Tales vectores incluyen secuencias del ácido nucleico cromosómico, no-cromosómico y sintético, por ejemplo., derivados de virus de plantas; plásmidos bacterianos; derivados del plásmido Ti a partir de *Agrobacterium tumefaciens*, derivados del plásmido Ri a partir del *Agrobacterium rhizogenes*; ADN del fago; cromosomas artificiales de la levadura; cromosomas artificiales de bacterias; cromosomas artificiales de bacterias binarias; vectores derivados de las combinaciones de plásmidos y ADN del fago. Sin embargo, ningún otro vector puede ser utilizado siempre que sea replicable, o integrativo o viable en la célula vegetal.

El terminador puede ser de cualquier tipo apropiado y puede ser endógeno a la célula vegetal diana o puede ser exógeno, a condición que sea funcional en la célula vegetal diana. Una variedad de terminadores que se pueden emplear en los vectores de la presente invención son bien conocidos por aquellos de habilidad en el oficio. El terminador puede ser de la secuencia genómica original a partir de que la secuencia promotor fue aislada o una secuencia genómica diferente. Los terminadores particularmente apropiados son señales de poliadenilación, tales como el CaMV 35S poliA y otros terminadores a partir de los genes de la nopalina sintasa (*nos*) y la octopina sintasa (*ocs*).

El vector puede incluir otros elementos necesarios para la expresión de la otra molécula de ácido nucleico, en diferentes combinaciones, por ejemplo esqueleto del vector, origen de replicación (*ori*), sitios de clonación múltiple, secuencias espaciadoras, potenciadores, intrones [tales como el intrón UBI de la Ubiquitina del Maíz], genes de resistencia antibiótica y otros genes marcadores seleccionables (tales como el gen de la neomicina fosfotransferasa (*npt2*), el gen higromicina fosfotransferasa (*hph*), el gen fosfinotricina acetiltransferasa (*bar* o *pat*)), y genes indicadores [tales como beta-glucuronidasa gen (*GUS*) (*gusA*)]. El vector también puede contener un sitio de enlace de ribosoma para el inicio de la traducción. El vector también puede incluir secuencias apropiadas para la expresión amplificada.

Como una alternativa al uso de un gen marcador seleccionable para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células huésped transformadas, la presencia del vector en células transformadas se puede determinar por otras técnicas bien conocidas en el oficio, tal como PCR (reacción en cadena de la polimerasa), análisis de hibridación Southern blot, ensayos GUS histoquímicos, análisis de hibridación northern y western blot.

Aquellos de habilidad en el oficio apreciarán que los diferentes componentes del vector se ligan operativamente, para dar lugar a la expresión de gen o genes de dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico. Las técnicas para ligar operativamente los componentes del vector de la presente invención son bien conocidas por aquellos de habilidad en el oficio. Tales técnicas incluyen el uso de ligantes, tales como ligantes sintéticos, por ejemplo incluyendo uno o más sitios de enzima de restricción.

La construcción puede ser un gen quimérico. En consecuencia, en otro aspecto de la presente invención se proporciona un gen quimérico que incluye una molécula de ácido nucleico de la presente invención ligado operativamente a otra(s) molécula(s) de ácido nucleico capaz de causar la inhibición de la expresión de un alérgeno del polen, por ejemplo un gen o genes codificantes de uno o más alérgenos del polen o un fragmento de este. Preferiblemente, los alérgenos del polen son los principales alérgenos del polen *Lol p 1* y/o *Lol p 2*. La secuencia de la otra molécula de ácido nucleico puede ser en ya sea una orientación sentido o antisentido cuando se une operativamente con la molécula de ácido nucleico de la presente invención. En una modalidad preferida, el gen quimérico se incluye en un vector que puede ser utilizado para transformar una célula vegetal.

Las construcciones, vectores y genes quiméricos de la presente invención se pueden incorporar en una variedad de plantas, que incluye: monocotiledóneas, tales como malezas a partir de los géneros *Lolium*, *Festuca*, *Paspalum*, *Pennisetum*, *Panicum* y otros forrajes y céspedes, maíz, arroz, azúcar de caña, avena, trigo y cebada; dicotiledóneas, tales como *arabidopsis*, tabaco, soja, canola, algodón, patata, garbanzo, médicos, trébol blanco, trébol rojo, trébol subterráneo, alfalfa, eucalipto, álamo, e híbrido aspen; y gimnospermas, tales como árbol de pino. En una modalidad preferida, los vectores pueden ser utilizados para transformar monocotiledóneas, preferiblemente especie hierba tal como raigrás (especie *Lolium*) y fescues (especie *Festuca*), incluso más preferiblemente raigrás

perenne (*Lolium perenne*), raigrás Italiano (*Lolium multiflorum*) y raigrás híbrido (*Lolium x boucheanum*), incluyendo variedades de forraje y del tipo césped.

Las técnicas para la incorporación de las construcciones, vectores y genes quiméricos de la presente invención en células vegetales (por ejemplo por transducción, transfección o transformación) se conocen por aquellos de habilidad en el oficio. Tales técnicas incluyen introducción mediada por el *Agrobacterium*, electroporación a los tejidos, células y protoplastos, fusión de protoplastos, inyección en órganos reproductivos, inyección en embriones inmaduros y la introducción del proyectil a alta velocidad a las células, tejidos, callos, embriones inmaduros y maduros. La elección de la técnica dependerá en gran medida en el tipo de planta que será transformada. Otras consideraciones incluyen la facilidad de transformación, tipo de tejido y número de inserciones del gen que sea necesario.

Las células incorporadas en las construcciones, vectores y genes quiméricos de la presente invención pueden ser seleccionadas, como se describe anteriormente, y a continuación del cultivo en un medio apropiado para regenerar las plantas transformadas, utilizando técnicas bien conocidas en el oficio. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, serán capaces de determinar sin experimentación indebida por alguien de habilidad en el oficio. Las plantas resultantes se pueden reproducir, ya sea sexualmente o asexualmente, utilizando métodos conocidos en el oficio, para producir generaciones sucesivas de plantas transformadas.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una célula vegetal, planta, semilla de planta u otra parte de la planta, que incluye, por ejemplo., transformada con, una molécula de ácido nucleico, construcción, vector o gen quimérico de la presente invención.

La célula vegetal, planta, semilla de planta u otra parte de la planta puede ser a partir de cualquier especie apropiada, que incluye monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas. En una modalidad preferida la célula vegetal, planta, semilla de planta u otra parte de la planta es a partir de una especie monocotiledónea, preferiblemente una especie de hierba, más preferiblemente un raigrás (especie *Lolium*), aún más preferiblemente raigrás perenne (*Lolium perenne*), raigrás Italiano (*Lolium multiflorum*) y raigrás híbrido (*Lolium x boucheanum*), que incluye ambas variedades de forraje y del tipo césped.

La presente invención también proporciona una planta, semilla de planta u otra parte de la planta derivada de una célula vegetal de la presente invención. La presente invención también proporciona una planta, semilla de planta u otra parte de la planta derivada de una planta de la presente invención.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para modificar la expresión del gen en polen, dicho método que incluye la introducción en una célula vegetal de una cantidad efectiva de una molécula de ácido nucleico, construcción, vector o gen quimérico de acuerdo con la presente invención.

Por "una cantidad efectiva" se entiende una cantidad suficiente para dar lugar a un rasgo de identificación fenotípico en la célula vegetal, o una planta, semilla de planta u otra parte de la planta derivada de la misma. Tales cantidades se pueden determinar fácilmente por una persona debidamente cualificada, teniendo en cuenta el tipo de planta, la ruta de administración y otros factores relevantes. Dicha persona será capaz de determinar fácilmente una cantidad y método de administración apropiado. Ver, por ejemplo, Sambrook *et al*, 1989.

La molécula de ácido nucleico, de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para dirigir la expresión específica del polen de otra molécula de ácido nucleico para inhibir la expresión de los alérgenos del polen en la planta. La inhibición de la expresión se puede lograr a través de cualquiera de un rango de técnicas conocidas, fácilmente disponibles para alguien de habilidad en el oficio, incluyendo por ejemplo tecnología de supresión sentido y antisentido, y otras tecnologías de silenciamiento tales como vía el uso de ARN de interferencia. Preferiblemente, el alérgeno se selecciona de entre una parte principal de los alérgenos del polen *Lol p 1* y *Lol p 2*. La secuencia de la otra molécula de ácido nucleico puede estar en una orientación ya sea sentido o antisentido cuando de liga operativamente con la molécula de ácido nucleico de la presente invención. Por otra parte, la otra molécula de ácido nucleico se puede incorporar como múltiples copias, en cualquier orientación, en un rango de posibles construcciones que generan ARNi. La tecnología de ARNi ha sido descrita en un amplio rango de publicaciones que incluye, por ejemplo, Fire, A. *et al* (1998); Caplan, N. *et al* (2000); Patente de los Estados Unidos 6,506,559; Solicitudes internacionales de patente WO 99/53050 y WO 99/49029; y patente de los Estados Unidos 6,573,099.

Utilizando los métodos y materiales de la presente invención, los genes pueden ser dirigidos para la expresión en polen, o la expresión de genes específicos del polen pueden ser modificados. Por ejemplo, la expresión del gen puede ser facilitada en polen colocando una copia o copias de otra molécula de ácido nucleico, por ejemplo el gen que será expresado o un fragmento de este, operablemente bajo el control de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Adicionalmente, una molécula de ácido nucleico de la presente invención puede ser utilizada para introducir a otra molécula de ácido nucleico, por ejemplo un gen o fragmento de este, en una planta para propósitos específicos tales como la introducción de esterilidad masculina. Por otra parte, la disminución

de la expresión de un gen específico del polen endógeno se puede lograr colocando una molécula sentido o antisentido de ácido nucleico o ARNs o ARN de interferencia pequeño (ARNsi) derivada del gen operablemente bajo el control de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de producción una planta con reducida fertilidad masculina en comparación con una planta del tipo salvaje, dicho método que incluye la introducción en la planta de una molécula de ácido nucleico de la presente invención en combinación con otra molécula de ácido nucleico capaz de modular la fertilidad masculina. Preferiblemente la planta es una planta estéril masculina. En una modalidad preferida, la otra molécula de ácido nucleico puede ser capaz de modificar el desarrollo del polen, aún más preferiblemente la otra molécula de ácido nucleico se puede involucrar en y es preferiblemente un gen o un fragmento de este crítico para desarrollar el polen. En otra modalidad preferida, la expresión de la otra molécula de ácido nucleico puede dar lugar a la muerte celular en el sitio de expresión. En otra modalidad preferida la otra molécula de ácido nucleico puede codificar la ribonucleasa barnasa bacteriana o un fragmento de esta. El uso de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede permitir la expresión específica del gen relevante en polen, reduciendo cualquiera de los efectos secundarios no deseados de la expresión en otros tejidos de la planta.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una planta con reducida fertilidad masculina en comparación con una planta del tipo salvaje, preferiblemente una planta estéril masculina, producida de acuerdo con los métodos de acuerdo con la presente invención. Tales plantas se pueden utilizar para desarrollar un sistema de contención del transgen reduciendo la fertilidad del polen. Adicionalmente, tales plantas se pueden utilizar en la producción de semillas híbridas.

La presente invención se describe con más detalle con referencia a los Ejemplos y dibujos acompañantes. Debe entenderse, sin embargo, que la siguiente descripción es solo ilustrativa y de ninguna manera debe ser tomada como una restricción a la generalidad de la invención descrita anteriormente.

En las figuras:

Figura 1 muestra secuencia genómica hecha (SEQ ID NO:1) mostrando promotor putativo (SEQ ID NO:2) y las regiones codificantes. Cursiva (y parcialmente negrita): 952 bp de secuencia genómica (SEQ ID NO:3); doblemente subrayado: secuencia codificante; cursiva negrita, subrayado de puntos: cebador D21 pr1L; cursiva negrita: cebador D21pr1R (parcialmente doble subrayado). También se muestra el sitio de restricción SacI (negrita) y varios codones de parada en la región codificante del gen (negrita subrayada).

Figura 2 muestra el análisis de los elementos promotor de la región genómica de 952 bp del promotor específico del polen a partir de raigrás perenne; elemento Zm13 Q (puntas de flechas sólidas), elemento LAT52 (puntas de flechas perfiladas) y elemento GTGANTG10 (punta de flecha tramada).

Figura 3 muestra los vectores quiméricos que contienen la región genómica 952 bp. **A** vector de fusión pLp952:GUS conducido por la región genómica de 952 bp pBS-260gn (Hamilton *et al.* 1992) fue utilizado como la base para la construcción del casete indicador del promotor para la transformación de la célula vegetal utilizando técnicas de transformación mediadas por PEG. PBS-260gn contiene el gen indicador GUS (Jefferson *et al.* 1987) y la secuencia terminadora nopalina sintasa (nos). **B** Vector que contiene *Lol p 1* en una orientación antisentido conducido por la región genómica de 952 bp (pLP2-asLolp1). **C** Vector que contiene *Lol p 2* en una orientación antisentido conducido por la región genómica de 952 bp (pLP2-asLolp2).

Figura 4 muestra los vectores quiméricos para el silenciamiento del gen basado en la formación de ARN de doble hebra utilizando la región genómica de 952 bp del promotor específico del polen a partir del raigrás perenne de la presente invención. **A** Vector que contiene repeticiones invertidas del fragmento ca. 200 bp de *Lol p 1* con intrón LpCCR1. **B** Vector que contiene repeticiones invertidas del fragmento ca. 200 bp de *Lol p 2* con intrón LpCCR1. **C** Vector que contiene repeticiones invertidas de fragmentos combinados ca. 200 bp de *Lol p 1* y *Lol p 2* con intrón LpCCR1.

Figura 5 muestra las etapas involucradas en la generación de tabaco transgénico utilizando transferencia del gen mediada por PEG directo. **A** protoplastos del tabaco. **B** Callos regenerados a partir de protoplastos del tabaco. **C** Plántulas transgénicas del tabaco putativas en medio selectivo. **D** Tabaco transgénico putativo en medio que induce la raíz.

Figura 6A muestra análisis de PCR de plantas transgénicas de tabaco que contienen la construcción Lp952GUS utilizando cebadores específicos de GUS (*gusA*) **B**. Hibridación Southern de las plantas positivas de PCR mostrando la integración estable de *gusA* (Sonda:*gusA*).

Figura 7 muestra la tinción histoquímica de GUS de polen recolectado a partir de plantas transgénicas de tabaco que contienen la construcción Lp952GUS.

Figura 8 muestra la etapas involucradas en la generación de raigrás transgénico para inhibir la expresión de alérgenos del polen usados para dirigir la expresión específica del polen de un gen para inhibir la expresión de alérgenos del polen. **A** Inflorescencia de raigrás perenne inmaduro. **B - F** Desarrollo de callos de inflorescencia de raigrás perenne inmaduro. **G** callos de inflorescencia inmadura diseminados en el disco de filtro fácil para el bombardeo de partículas. **H** sistema de entrega de partículas. **I, J** Regeneración de plántulas de raigrás perenne en medio selectivo. **K** plántulas de raigrás perenne transgénico putativo en medio que induce la raíz. **L** plantas de raigrás perenne transgénico putativo bajo condiciones de invernadero de contención.

Ejemplo 1

Clonación de un Promotor Novedoso

En una modalidad de la presente invención, una secuencia promotor fue aislada de un gen de raigrás. Un fragmento de 3.9 kb de secuencia genómica fue aislado de una biblioteca genómica Lambda-DASH II (Stratagene) construida de raigrás perenne de cuatro semanas de edad (*Lolium perenne* L.) cv. Barlano después de selección de hibridación de la biblioteca genómica con una secuencia de ADNc de *Lol p 2*. Las placas positivas del tamizado terciario fueron amplificadas y purificadas, el ADN del fago fue aislado. La región genómica fue secuenciada por completo (Figura 1) y se encontró que contenía 3.3 kb incluyendo aproximadamente 2.7 kb de la región promotora 5' y 567 bp de la secuencia del gen que tiene un ORF de 366 bp y codifica una proteína pequeña de 122 aminoácidos. Los elementos promotores de la región genómica de 952 bp del promotor específico del polen a partir del raigrás perenne se muestran (Figura 2).

Ejemplo 2

Construcción de los Vectores del Gen Quimérico

Un producto de PCR que contiene 952 bp de región promotora (SEQ ID NO:3) fue producido utilizando condiciones estándar de PCR. Las secuencias de los siguientes cebadores.

D21pr1L: 5'-AAAAGTGTGCTGGGATGGTG-3' (SEQ ID NO:7)

D21pr1R: 5'-CCATCCAACAAATCCAGAATGGCTTCC-3' (SEQ ID NO:8)

El producto de PCR de 952 bp se purificó, subclonó en pGEMTeasy (Promega), y se secuenció para comprobar los errores de amplificación de PCR. Una construcción se hizo utilizando el anterior producto de PCR como un promotor en fusión con la secuencia codificante (*gusA*) del gen indicador β -glucuronidasa (GUS) mostrada en la Figura 3A.

El producto de PCR de 952 bp también fue utilizado para construir los vectores que contienen las secuencias codificantes del alérgeno del polen *Lol p 1* (Figura 3 B) y *Lol p 2* (Figura 3 C) en orientación antisentido. Estos vectores fueron diseñados para ser capaces de silenciar los correspondientes genes endógenos.

Adicionalmente, los vectores de silenciamiento génico basados en la formación de ARN de doble hebra se diseñaron y construyeron utilizando el producto de PCR de 952 bp como el elemento regulador y repeticiones cortas invertidas de *Lol p 1*, *Lol p 2* y *Lol p 1+ Lol p 2* separadas por un intrón de raigrás perenne (Figura 4).

Ejemplo 3

La Generación de Plantas de Tabaco Transgénicas para el Análisis de Patrones de Expresión Dirigidos por el Promotor Novedoso

El vector de fusión GUS quimérico del Ejemplo 1 fue expresado transgénicamente en el sistema heterólogo, tabaco, con el fin de evaluar el patrón de expresión dirigido por la región genómica de 952 bp. Las plantas de tabaco transgénicas fueron generadas por transferencia del gen dirigido mediado por PEG (DGT) de protoplastos del tabaco como se describe con detalle a continuación.

A. Aislamiento de protoplastos mesófilos a partir de cultivos de brotes de tabaco

Las hojas totalmente expandidas (2-4) de un cultivo de brotes de 6 semanas de edad fueron colocadas bajo condiciones estériles en un plato de cultivo de plástico de 9 cm que contiene 12 ml de solución de enzima [1.0% (peso/vol) celulasa "Onozuka" R10 y 1.0% (peso/vol) Macerozyme® R10]. Las hojas se humedecieron a fondo con

solución de enzima y se retiraron las nervaduras medias. Las mitades de la hoja se cortaron en piezas pequeñas y se incubaron durante la noche (14-18 h) a 25°C en la oscuridad sin agitar.

Los protoplastos fueron liberados por pipeteando suavemente arriba y abajo, y la suspensión a través de un tamiz de malla de acero inoxidable de 100 µm en un vaso de precipitados de vidrio de 100 ml. La suspensión de protoplastos se mezcló suavemente, se distribuye en dos tubos de centrifuga de plástico estériles de 14 ml y se superponen cuidadosamente con 1 ml de solución W5 (Spangenberg *et al* 1988). Después de la centrifugación durante 5 min. a 70 g (centrifuga de mesa Clements Orbital 500, oscilante del rotor, 400 rpm), los protoplastos fueron recolectados de la interfase y se transfirieron a un nuevo tubo de centrifuga de 14 ml. 10 ml de solución W5 se adicionaron, los protoplastos se resuspendieron por inclinación suave del tubo tapado y se forma una pella, como antes. Los protoplastos fueron resuspendidos en 5-10 ml de solución W5 y el rendimiento se determina por el recuento de una dilución 1:10 en un hemocitómetro.

B. La transferencia del gen directo a protoplastos utilizando polietileno glicol

Los protoplastos fueron peletizados [70 g a 400 rpm durante 5 min.] y se resuspenden en solución reguladora de transformación a una densidad de 1.6×10^6 protoplastos/ml. Se tuvo cuidado de llevar tan poco como sea posible solución W5 en la mezcla de transformación. Las muestras (300 µl) de la suspensión de protoplastos (ca. 5×10^5 de protoplastos) se dividieron en alícuotas en tubos de centrifuga de plástico estériles de 14 ml, y 30 µl de ADN de transformación se adicionaron. Después de mezclar cuidadosamente, 300 µl de solución PEG (Spangenberg *et al* 1988) se adicionaron y se mezclan de nuevo por agitación cuidadosa. La mezcla de transformación se incubó durante 15 min. a temperatura ambiente con agitación ocasional. 10 ml de solución W5 fueron adicionados gradualmente, los protoplastos se peletizaron [70g a 400 rpm durante 5 min.] y el sobrenadante se retiró. Los protoplastos fueron resuspendidos en 0.5 ml de medio K3 (Spangenberg *et al* 1988), listo para el cultivo.

C. Cultivo de protoplastos, selección de líneas transformadas y regeneración de plantas transgénicas de tabaco

Aproximadamente 5×10^5 protoplastos fueron colocados en una caja de petri de 6 cm. Precalentados (fusionados y mantenidos en un baño de agua a 40-45°C) 1:1 mezcla de medio K3:H (4.5 ml) (Spangenberg *et al* 1988) que contiene 0.6% de SeaPlaque™ agarosa se adicionaron y, después de mezclar suavemente, se deja decantar.

Después de 20-30 min los platos fueron sellados con Parafilm® y los protoplastos fueron cultivados 24 h en la oscuridad a 24°C, seguido por 6-8 días en poca luz continua ($5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, tubos blancos Osram L36 W/21 Lumilux), tiempo durante el cual las primeras y múltiples divisiones celulares ocurrieron. El agarosa que contiene los protoplastos divididos se cortó en cuadrantes y se colocó en 20 ml de medio A (Spangenberg *et al* 1988) en un 250 ml recipiente de cultivo de plástico. El correspondiente agente de selección se adicionó a una concentración final de 50 mg/l de kanamicina sulfato (para la expresión de *npt2*) o 25 mg/l de higromicina B (para expresión *hph*). Por otra parte, la selección puede ser llevada a cabo utilizando 20 mg/l de fosfotricina (para expresión *bar*). Las muestras se incubaron en un agitador rotatorio con 80 rpm y 1.25 cm de trio a 24°C en poca luz continua.

Las colonias resistentes fueron vistas primero 3-4 semanas después de la siembra de los protoplastos, y después de un tiempo total de 6-8 semanas las colonias resistentes derivadas del protoplasto (a los 2-3 mm de diámetro) fueron transferidos en medio morfo MS (Spangenberg *et al* 1988) se solidificaron con 0.6% (peso/vol) de agarosa en placas de 12 pozos y se mantuvieron por las siguientes 1-2 semanas a 24°C en poca luz continua ($5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, tubos blancos Osram L36 W/21 Lumilux). Durante este tiempo, los callos proliferaron y alcanzaron un tamaño de 8-10 mm; los brotes que estaban arraigados en medio libre de hormonas MS (Spangenberg *et al* 1988) se diferenciaron y las plantas transgénicas de tabaco se recuperaron. (Figura 5).

Las plantas transgénicas de tabaco putativas fueron seleccionadas por análisis de PCR y de Hibridación Southern. La selección de PCR se llevó a cabo utilizando cebadores específicos *gusA* para la identificación inicial de las plantas transformadas (Figura 6A). La presencia del gen *gusA* se demostró mediante la amplificación PCR de un fragmento 270 bp, utilizando el cebador hacia adelante:

5'-CTTTAACTATGCCGGGATCCATCG-3' (SEQ ID NO:9)

y el cebador reverso:

5'-TAACCTTCACCCGGTTGCCAGAGG-3' (SEQ ID NO:10).

Las plantas positivas de PCR transgénicas luego fueron analizadas por Hibridación Southern para mostrar la integración estable del transgen (Figura 6B). Para el análisis de hibridación Southern, el ADN genómico fue extraído a partir del material vegetal liofilizado utilizando un protocolo basado en CTAB. Las muestras de ADN (10 - 15 µg) fueron digeridas con enzimas de restricción BamHI, HindIII, EcoRI, o XhoI. Los fragmentos de ADN resultantes se

separaron en un gel de agarosa al 1% y se transfirieron a membranas Hybond N (Amersham Pharmacia Biotech). La hibridación se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la incorporación de DIG-dUTP en las sondas de ADN y la detección de sondas unidas se realizó utilizando el Kit de Detección Luminiscente DIG (Roche Diagnostics Cat. No 1363514) siguiendo el protocolo del proveedor. Las condiciones de hibridación fueron: 4 x SSC, 50% (v/v) de formamida, 0.1% (peso/vol) de N-lauroil-sarcosina, 0.02% (peso/vol) de SDS, y 2% (v/v) de solución bloqueadora a 42°C. Las membranas se lavaron dos veces en 2 x SSC/0.1% (peso/vol) de SDS por cinco minutos a 25°C luego 0.2 x SSC/0.1% (peso/vol) de SDS seguido por 0.1 x SSC/0.1% (peso/vol) de SDS, ambos de quince minutos a 68°C. Las plantas positivas de Southern fueron transferidas al suelo y se cultivaron bajo condiciones de invernadero hasta la floración.

Ejemplo 4

Ensayo de la Actividad del Promotor en Células Vegetales Bajo Condiciones Estables

Las muestras de tejido fueron recolectados a partir de las plantas positivas de Southern y seleccionadas por ensayos GUS histoquímicos para evaluar el patrón de expresión del promotor de 952 bp de *Lolium perenne*. La expresión del gen indicador *gusA* fue observado exclusivamente en los granos de polen de las plantas transgénicas de tabaco que contienen la fusión de 952 bpGUS (Figura 7).

Estos resultados indican que la región de 952 bp de secuencia genómica de *Lolium perenne* confiere la expresión específica del polen fuerte a la secuencia del gen codificante *gusA* y por lo tanto es un promotor específico del polen que representa un candidato excelente para las aplicaciones que requieren la expresión dirigida del gen a las células del polen tal como, por ejemplo, contención del transgen y/o la inhibición de la expresión de los genes alérgenos del polen y/o la inducción de esterilidad masculina.

Ejemplo 5

La Generación de Plantas Transgénicas de Raigrás Perenne para inhibir la expresión de Alérgenos del Polen Utilizando Genes Quiméricos Bajo Control del Novedoso Promotor Específico del Polen

Las etapas en la producción de plantas de raigrás transgénicas para la inhibición de la expresión de los principales alérgenos del polen *Lol p 1* y *Lol p 2*, utilizando genes quiméricos bajo el control del promotor específico del polen, se muestran en la Figura 8.

A. Producción de material diana para la transformación biolística

Las Plantas donantes bien establecidas, multi-brotes, generadas a partir de las plántulas, se vernalizaron a menos de 10 °C (mínimo 4 °C) en una duración de 8 horas al día por un período mayor de 8 semanas. La floración de las plantas se induce por el cultivo a 24 °C bajo un aumento de la duración al día mayor de 12 horas (óptimo 16 horas).

Las plantas se monitorearon diariamente después de los primeros 2 - 3 días de inducción y los tallos florales identificados para la cosecha. Las inflorescencias inmaduras diana deben ser de color blanquecino y no más de 0.5 mm de longitud.

Los tallos florales se cosecharon, cortando justo por debajo del nodo de la base y antes de las hojas más jóvenes. Los brotes se despojaron de todo el material de la hoja y se recolectaron en un recipiente plástico limpio. Para la esterilización, el recipiente de recolección se llena con una solución de esterilización que contiene 5% de cloro disponible con 5 gotas de Tween 20 para cada 100 ml para asegurar la esterilización adecuada del material vegetal. La esterilización de los brotes se logra por la agitación de velocidad media a alta durante 20 minutos sobre una vibradora de banco de plataforma.

Posteriormente, los brotes se enjuagan exhaustivamente con agua destilada estéril y se transfieren en lotes de 8 - 10 en láminas de papel A5 esterilizadas.

Las inflorescencias inmaduras se prepararon, se cortaron libres de la base del nodo y se transfirieron al medio de inducción de callos, LP5 [MS Macro, MS Micro, MS Vitaminas (hormona libre MS) con 5 mg/l del ácido 2,4-diclorofenoxiacético y 30 g/l de maltosa] + 250 mg/l de cefotaxima. Si la inflorescencia en piezas no intactas (muy probablemente en 2 piezas debido al corte), pueden ser sembradas individualmente.

Todos los platos se sellaron con parafilm y se incubaron en la oscuridad a 24°C por hasta 8 semanas para inducir el desarrollo de los callos.

B. Preparación de callos embriogénicos para el bombardeo de microproyectiles

Los callos embriogénicos, friables, de color amarillento (1-2), derivados de inflorescencias inmaduras sembradas, se transfirieron en papel filtro cubierto de medio. Los callos se aplastan para producir una capa uniforme, fina de células a través de la superficie del disco y se incubaron por 4-6 horas a temperatura ambiente para preparar las células para el bombardeo.

5 C. Preparación de partículas para el bombardeo de microproyectiles

A un tubo Eppendorf estéril de 1.5 ml, 10 µl de ADN de transformación (1 µg/µl; gen de interés), 10 µl de marcador de selección (1 µg/µl), 100 µl de solución de partículas de oro (60 mg/ml), 100 µl de CaCl₂ 2.5 M y 40 µl de espermidina 100 mM se le adicionan, se coloca en el vórtex durante 1 minuto y se deja sedimentar durante 1 minuto. El sobrenadante se retira, las partículas se resuspenden en 900 µl de 100% (peso/vol) etanol esterilizado por filtración y se mezclan. Las partículas lavadas se sedimentan y la etapa de lavado se repite. Las partículas luego se resuspenden en 200 µl al 100% (peso/vol) de etanol esterilizado por filtración.

D. El bombardeo de microproyectiles de los callos derivados de la inflorescencia inmadura utilizando un Sistema de Entrega de Partículas Biorad

Los microportadores se sumergen en 100% (peso/vol) de isopropanol durante 30 minutos, se secan al ambiente, se incrustan en macroportadores de autoclave y se transfirieron a una caja de tip esterilizada con UV que contiene sílica gel deshidratada. Las partículas preparadas (20 µl) luego se cargan en el centro de un microportador y se secan al ambiente. Las partículas preparadas como se describe en la Sección C arriba, luego se administran al material diana, siguiendo las instrucciones del fabricante de los sistemas de administración de partículas.

Las placas posteriormente se sellan con parafilm y se incuban en la oscuridad a 25°C durante la noche.

20 E. Transformación mediada por el Agrobacterium de callos embriogénicos

El material embriogénico obtenido como se describe anteriormente se puede utilizar de manera alterna para la transformación mediada por el Agrobacterium. Los tejidos de la muestra se inoculan por infiltración con vacío con una suspensión de *Agrobacterium* (O.D.600 0.3-1.0) en un medio AA líquido modificado (Spangenberg *et al* 1995) (sales inorgánicas principales AA, aminoácidos AA y vitaminas, 2% (peso/vol) de sacarosa, 3% (peso/vol) de sorbitol, 0.2mg/L de quinetina, 0.1mg/L ácido giberélico, 6.8 µM de 2,4-D y 100µM acetosiringona). Los tejidos de la muestra luego se transfieren a papel de filtro seco estéril durante 3 días en la oscuridad a 21°C. La selección y regeneración son como se describe en la Sección F, a continuación.

F. Selección de callos transformados y regeneración de plantas transgénicas de raigrás

Los discos de papel de filtro que contienen los callos bombardeados se transfieren a medio de proliferación solidificado, LP3 [MS Macro, MS Micro, Vitaminas MS (hormona libre MS) con 3 mg/l del ácido 2,4-diclorofenoxiacético y 30 g/l de maltosa] para inducir el cultivo de las células. Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron en la oscuridad a 25°C durante 48 horas. Los discos de papel filtro luego se transfieren a medio de selección solidificado, LP3 + 100 mg/l de higromicina + 250 mg/l de cefotaxima y se incubaron en la oscuridad a 25°C. Después de 2 semanas, los discos de papel filtro se transfieren a medio de regeneración solidificado, MSK (Spangenberg *et al* 1995) + 100 mg/l de higromicina + 250 mg/l de cefotaxima y se incubaron bajo luz directa a 25°C bajo condiciones de luz fluorescente (fotoperiodo 16 hr de luz/8 hr de oscuridad; 55 µmol m⁻² sec⁻¹) para alentar el brote y el desarrollo radicular.

Los brotes resistentes a la higromicina (Hygr) con raíces desarrolladas luego se transfieren a un medio de elongación del brote, MSO [MS Macro, MS Micro, MS Vitaminas (hormona libre MS) con 30 g/l de maltosa] + 250 mg/l de cefotaxima, y se incubaron a 25° C bajo un fotoperiodo de 8h hasta que los sistemas de raíces se han establecido. Por último, las plantas se transfieren al suelo y se mantienen bajo condiciones de invernadero de contención.

G. Análisis molecular de plantas transgénicas de raigrás para la inhibición de la expresión de alérgenos del polen utilizando genes quiméricos bajo el control del promotor específico del polen

45 Selección inicial de las plantas de raigrás perenne transgénicas putativas se logra mediante el análisis de PCR.

Las plantas transgénicas positivas al PCR luego se analizan por Hibridación Southern para mostrar la integración estable del transgen. El ADN genómico se extrae del material vegetal liofilizado utilizando un protocolo basado en CTAB. Las muestras de ADN (10 - 15 µg) se digieren con las enzimas de restricción BamHI, HindIII, EcoRI, o XhoI. Los fragmentos de ADN resultantes se separan en un gel de agarosa al 1% y se transfirieron a membranas Hybond

N (Amersham Pharmacia Biotech). La hibridación se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la incorporación de DIG-dUTP en sondas de ADN y la detección de las sondas unidas se realiza utilizando el Kit de Detección Luminiscente DIG (Roche Diagnostics Cat. No 1363514) siguiendo el protocolo del proveedor. La condiciones de hibridación son: 4 x SSC, 50% (v/v) de formamida, 0.1% (peso/vol) de N-lauroil-sarcosina, 0.02% (peso/vol) de SDS, y 2% (v/v) de solución bloqueadora a 42°C. Las membranas se lavan dos veces en 2 x SSC/0.1% (peso/vol) de SDS, durante cinco minutos a 25°C luego 0.2 x SSC/0.1% (peso/vol) de SDS seguido por 0.1 x SSC/0.1% (peso/vol) de SDS, ambas por quince minutos a 68°C. Las plantas positivas al Southern se transfieren al suelo y se cultivan bajo condiciones de invernadero hasta la floración.

Para la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) y el análisis de western blot, las proteínas totales se extraen mediante la molienda de las anteras maduras de las plantas de raigrás en solución reguladora PBS (10 mM solución reguladora de fosfato, pH 7.2; NaCl 150 mM) que contiene PMSF 1 mM seguido por la centrifugación a 14,000 rpm durante 20 minutos a 4°C., las proteínas solubles en el sobrenadante se cuantifican mediante el ensayo Bio-Rad (Bio-Rad). Las proteínas se separan en geles SDS/15% de PAGE en un sistema Mini-Protean II (Bio-Rad). Los geles se tiñen ya sea con azul brillante de Coomassie R250 o se utilizan en el análisis de western blot.

Para el western blotting, las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfieren en membrana de nitrocelulosa. Las transferencias se prueban con anticuerpos primarios o suero humano durante la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios, incluyendo anti- *Lol p 1* conejo policlonal o anti- *Lol p 2* conejo policlonal, se diluyen 1:1000 utilizando PBS. Los sueros de los pacientes alérgicos al polen de hierba se utilizan a una dilución de 1:10. el enlace de anticuerpos monoclonales se detecta con IgG anti-conejo de cabra conjugado a fosfatasa alcalina (Bio-Rad) a una dilución de 1:1000, mientras que el enlace de suero humano se detecta con anticuerpos IgE anti-humano de ratón conjugado a la fosfatasa alcalina (Southern Biotech) a una dilución de 1:1000. La detección del anticuerpo secundario se lleva a cabo durante 2 horas a 25°C. La reacción de color se desarrolla utilizando una kit de sustrato conjugado de fosfatasa alcalina (Bio-Rad). La igualdad de la carga de proteínas totales de las muestras de plantas transgénicas y control no-transformadas para el análisis western se garantiza mediante la cuantificación contenido de proteína total y el ensayo de tinción Bio-Rad de replicas de geles para cada extracción.

EJEMPLO 6

La Generación de Plantas Transgénicas para la inducción de la Esterilidad Masculina y/o Contención de Transgenes Utilizando Genes Quiméricos Bajo el Control del novedoso Promotor Específico del Polen

Las plantas masculinas transgénicas estériles se producen mediante la introducción en la planta de la molécula de ácido nucleico de la presente invención en combinación con un gen capaz de modular la fertilidad masculina. Los métodos establecidos para la transferencia del gen a las plantas se utilizan para la producción de plantas transgénicas como se describe en 'Gene Transfer to Plants' I. Potrykus and G Spangenberg, Springer Lab Manual, 1995, ISBN 3-540 58406-4, y/o como se publica en los Ejemplos 3 y 5, arriba.

El gen utilizado para modular la fertilidad masculina es un gen crítico para desarrollar el polen y/o la germinación. Los genes apropiados incluyen, por ejemplo, genes codificantes polen callosa sintasa, polen de tubulina, polen de actina o algún otro expresado del polen "genes de mantenimiento". Los genes quiméricos transferidos en la planta para la inducción de esterilidad masculina conduce a la disminución de la expresión de la expresado de la planta de polen endógeno, si los codificantes polen de callosa sintasa, polen de tubulina, polen actina o algunos otros polen-expresados "genes de mantenimiento". Esto se logra colocando una molécula antisentido de ácido nucleico o ARNds o ARN de interferencia pequeño (ARNsi), derivada del gen expresado del polen de la planta, operablemente bajo el control del promotor de acuerdo con la presente invención.

Un gen capaz de modular la fertilidad masculina para la producción de plantas transgénicas estériles masculinas también puede ser un gen la expresión del cual resulta en muerte celular en el sitio de expresión. Tales genes incluyen el gen codificante de la ribonucleasa segregada bacteriana, barnasa, derivada del *Bacillus amyloliquefaciens*. La expresión de un gen quimérico transferido que incluye la secuencia codificante para la ribonucleasa barnasa del *Bacillus amyloliquefaciens*, operablemente bajo el control de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, conduce a la expresión específica de el gen barnasa en polen, lo que reduce cualquiera de los efectos secundarios no deseados de expresión de barnasa en otro tejido de la planta.

EJEMPLO 7

La Restauración de la Fertilidad Masculina en Plantas Transgénicas Estériles Masculinas Utilizando Genes Quiméricos Bajo el Control de los Novedosos Promotores Específicos del Polen Para Producción de Híbridos

Plantas transgénicas fértiles masculinas se producen mediante la introducción en la planta de la molécula de ácido nucleico de la presente invención en combinación con un gen capaz de revertir la acción de un gen que conduce a la esterilidad masculina. Los métodos establecidos para la transferencia del gen a las plantas se utilizan para la

producción de plantas transgénicas como se describe en 'Gene Transfer to Plants' I. Potrykus and G Spangenberg, Springer Lab Manual, 1995, ISBN 3-540 58406-4, y/o como se publica en los Ejemplos 3 y 5, arriba.

El gen capaz de restaurar la fertilidad masculina de plantas transgénicas estériles masculinas – generado por la expresión específica del polen de un gen que produce la muerte celular en el sitio de expresión, que incluye el gen codificante de la ribonucleasa secreta bacteriana barnasa del *Bacillus amyloliquefaciens* - es un gen que contrarresta el efecto del gen de esterilidad masculina. El gen barstar del *Bacillus amyloliquefaciens*, que codifica el inhibidor de la ribonucleasa secreta bacteriana barnasa del *Bacillus amyloliquefaciens*, se utiliza como gen restaurador de la fertilidad masculina. Los genes quiméricos que incluyen el gen barstar del *Bacillus amyloliquefaciens*, operablemente bajo el control de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, conduce a la expresión específica del gen barstar en el polen. Los cruces de las plantas transgénicas estériles masculinas que expresan el gen barnasa operablemente bajo el control de un promotor específico del polen, incluyendo la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, se hacen con polen de plantas transgénicas fértiles masculinas que expresan el gen barstar operablemente bajo el control de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Los descendientes recuperados de estos cruces conducen a plantas híbridas fértiles.

Aquellos de habilidad en el oficio apreciarán que la invención descrita anteriormente es susceptible a variaciones y modificaciones distintas de aquellas específicamente descritas. Se debe entender que la invención incluye todas las variaciones y modificaciones. La invención también incluye todas las etapas, características, composiciones y productos mencionados o indicados en esta especificación, individual o colectivamente, y cualquiera y todas las combinaciones de dos o más de dichas etapas o características.

La referencia a cualquier oficio previo en esta especificación no es, y no debe ser tomado como, un reconocimiento o ninguna forma de sugerencia de que este oficio previo forma parte del conocimiento general común en Australia o cualquier otra jurisdicción.

REFERENCIAS

Caplan, N. et al (2000); Gene 252:95-105

Fire, A. et al (1998); Nature 391:806-811

Hamilton DA, Roy M, Rueda J, Sindhu RK, Sanford J, Mascarenhas JP (1992) Dissection of a pollen-specific promoter from maize by transient transformation assays. Plant Mol. Biol. 18:211 - 218.

Jauhar PP (1993) Cytogenetics of the Festuca-Lolium complex. Relevance to breeding. In: Frankel R, Grossman M, Linskens HF, Maliga P, Riley R (eds) Monographs on theoretical and applied genetics, vol 18. Springer, Berlin Heidelberg New York, 243 pp.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants, EMBO J. 6:3901-3907.

Potrykus I, Spangenberg G (eds.) (1995) Gene transfer to plants, Laboratory Manual, Springer Verlag, Heidelberg

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning - a Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring

Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

Siegel MR, Latch GCM, Johnson MC (1985) Acremonium fungal endophytes of tall fescue and perennial ryegrass: significance and control. Plant. Dis., 69: 179-183.

Spangenberg G, Wang ZY, Potrykus I (1998) Isolation, culture and plant regeneration from protoplasts, In Cell Biology: A Laboratory Handbook, Second Edition, Vol 1, Academic Press

Spangenberg G, Wang ZY, Wu X, Nagel J, Potrykus I (1995), Transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells, Plant Science 108:209-217

Organización solicitante

Calle : Waite Building, Waite Campus, PMB 1

Ciudad : Glen Osmond

Estado : South Australia Country : Australia

Código Postal : 5064

Número de teléfono :

5 Número de Fax:

Dirección de correo electrónico :

<110> Nombre de la organización: Molecular Plant Breeding Nominees Ltd

Proyecto de la Solicitud

10 <120> Título: Molécula de ácido nucleico capaz de modificar la expresión específica del polen

<130> Referencia del Archivo de la Aplicación: M80713536 <140> Número de la Aplicación Actual:

<141> a:

Aplicaciones anteriores

15 <150> Número de Aplicación Anterior: 2003903132

<151> Fecha previa de presentación : 2003-06-20

secuencia

<213> Nombre del Organismo : Lolium perenne

20 <400> PreSequenceString:

agtgtaacct	aggactctag	gccagatcgt	gacattggaa	tagtgcacga	catttccctg	60
catacgtaac	gcctatgggt	atggagcttc	ataccgagac	tccaagtat	cataccagag	120
gggacgtggc	ctcctctatt	ctagggcgca	cgccaccctt	ggcaataaaa	ataggaactt	180
ctactagata	agggggaggg	ctcgaagcaa	caaagaggct	aagaaaggcg	aaaatcaagc	240
aagaacacaa	acccaacaag	ccagagctaa	acaagcctta	gcaccatggg	ctctcgact	300
cgaaaataac	gaggcgagat	gacactcttt	ccattccaac	atttcatagc	ttagtagcta	360
cccaagagga	ggaacaagca	ccagccaact	tcccgcggga	agcggcacc	actcagactc	420
actagcacct	cgcgcacaat	caataaaaaa	accaccacca	agaagtaggg	ttgttattga	480
cgatgtattc	tcgggtcccta	aattgtatat	ctctcgtgtg	catgtggatg	ttacccaatg	540
gaatcgtggg	cacaagccca	ccacctacat	aagaatatac	aaccgggaac	caaaaccctg	600
acactaggca	aatcattagg	gccacgcccga	ctatctcatt	cccgcacgcg	tctagggttc	660
ccgcccgttt	ctaccccttg	tgggtatccc	ccatcttctt	tgtttgattt	ggtccaaaaa	720
atcagcaaa	tttgctttgc	cgtgtgtatt	catataacac	tcgataatga	ccccatcggc	780
cttatttttt	tattgtttcc	ttcctgcctt	ttcttccccg	cgatctttca	gcccttgtgt	840
ccctatatat	acccatctct	cggatacata	attcacaacc	cacctccacc	ataaagtaca	900
aagaagagca	ctacccttag	ggaaccttga	agggtggggg	cttgataaaa	gtcatggcag	960
cgatgtacaa	ggcttgcatc	atctaggggt	cctagatgaa	acgcttagca	tcagctagggt	1020
aataataacc	ttgggtgaca	tagttgccaa	aacaagctta	tattgtgcac	atgtgcgtgt	1080
gtcatgggac	tggaaagggt	cgccggtgtg	aaccactgat	gtgtgctgcc	athtaggaag	1140
actctagatg	aatgggggaa	ctcccagggtc	gggtccacca	gaggaaaatc	ttgcgagatc	1200
ttgggctgaa	tcattgaatt	tcattgtacca	agtaactaac	caaatagaaa	ccaagagaaa	1260
atctcattgt	tcagcagctt	ttcgttgaat	tttagaggga	tatgcggtgg	agggcctccg	1320
agggcagcgt	tcgcccgcata	ccacatttcg	gagggcccga	atccatccaa	aactatcaag	1380
tgggacatac	acatgaacat	acgtgtgttg	agattcttag	atgcccaaga	gccagctccc	1440
gcgcgtagac	cacttcaccg	gcgaccgctg	ccacttagga	aggttcttga	ctgaaaaagg	1500
gaaaacatccc	acgatgggtt	cacccgaggga	aatcttgcca	gatcatgagc	tcaaccattg	1560
ctttccattgt	tcctatgaac	taaccacaac	atcaagtga	aatcccattg	gccaccggtg	1620
gttttaataaa	tttcagaagc	gtagaccatg	cttcggatgg	ccaaaatcca	cctaaaactt	1680
gcaagtgggc	ctaataatgtg	tgtaaaagtg	tgctgggatg	gtgagggggc	caagagctag	1740
ctagcgtggc	ggcatgctgt	cgtgggagta	agaaaatctc	tgacagtggt	gttttagggc	1800
aacactttggc	aaatgtgtga	tcttcggaac	atcccaagct	tgggaccgct	aagttgcctt	1860
tggtgcgcaa	gtaaacgcaa	aaaacatgcg	ccactctctt	accatatgcc	ggacaaaaaa	1920
aacttgccaa	atgggtatttt	ccttggtgat	cggtgttctg	cgccgtatgc	cgatggctga	1980
cataggcttt	gccgtgttct	gcgttgctct	tgctgtggct	ttttccaca	tggcaaatcc	2040
ataattttcca	gtagtgactc	aataatattt	gaaggcaaga	acaccaggga	gccgaattga	2100
atttccggca	tatccgctac	tatagattga	aaataaggag	gcggatcatc	tccttgggtg	2160
aacccctttt	ttgtctaaaa	ataattttct	ttttgaatat	tttacatttc	ttcatactat	2220
aattttggat	acataaaaata	ttaactttat	atatgaaaat	ataattccaa	tacttttgca	2280
ctcatcaaat	aattaatttt	ggatatataa	ctagttgagt	tgtttatgca	aaattcctat	2340
taaattatttt	tcgggtaccaa	acaatgtaaa	attagtaagg	tcataactag	ttgtgcaacg	2400
tatactgaaa	aaattaatttt	tggaaatttcg	caaaaaaaaa	aatggataca	tggaaacgctc	2460
aggcgatgtc	tgtggccatg	aaaccgcgct	tgtcctgtgc	ataattctag	ggtgtgggtg	2520
cttctataaa	tggataatga	gcattgcata	gaacgctcca	gcgatgtttg	tggccatgag	2580
acagagcttg	tccgtgcatg	cctacgcggc	tctcctctgc	cgtggcccaa	gctctgttcc	2640
cttccgacag	acccggccgg	tacaagcgcc	tgcgacatgg	ccgaagcgcc	gcccattccg	2700
gcataaatac	ccgcacacca	tctatcaccg	attcacaacc	aacagcagca	gcacacatat	2760
acacacaaga	accatccaac	aaatccagaa	tggcttcctc	atcaagcagg	atgctggcgg	2820
cggcgggcgt	ggcgggcgctg	ttcgtgggcg	cgatgtgcga	ggcccccggtg	acgttcacgg	2880
tagagaaggg	ctccgacgag	aagaacctgg	cgctgtcgat	caagtacaac	aaggaggggc	2940
actccatggc	ggaggtggag	ctcaaggagc	acggctccaa	cgagtggctg	gccctgaaga	3000
agaacggcga	cggcggtgtg	gagatcaaga	gcgacaagcc	gctcaagggg	ccattcaact	3060
tccgcttcgt	gtccgagaag	gggatgagga	acgtgttcga	cgacgtgggt	ccggcggagt	3120
tcaaggctcg	caccacctac	aagcccagg	agtagatccg	ccatcggtcg	tcacggaag	3180
ttttcgattt	tcctcatatc	atgaataatt	tgctgaggtt	ttgtcagtg	aggtgggtgat	3240
tgggagaagc	acaactatgg	atgtgcttcc	tagtatctcc	catgcacca	ttaccatgac	3300
caataattttt	ttatatgaat	cggnttangt	aanttaattt	aaaagncctt	taaaag	3356

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 3356

5 Nombre de la Secuencia: SEQIDNO.1

Descripción de la Secuencia :

Secuencia

<213> Nombre del Organismo : Lolium perenne

<400> PreSequenceString :

agtgtaacct	aggactctag	gccagatcgt	gacattggaa	tagtgcacga	catttccctg	60
catacgtaac	gcctatgggt	atggagcttc	ataccgagac	tcccaagtat	cataccagag	120
gggacgtggc	ctcctctatt	ctagggcgca	cgccaccctt	ggcaataaaa	ataggaaactt	180
ctactagata	aggggggaggg	ctcgaagcaa	caaagaggct	aagaaaggcg	aaaatcaagc	240
aagaacacaa	acccaacaag	ccagagctaa	acaagcctta	gcacatgggt	ctctcgact	300
cgaaaataac	gaggcgagat	gacactcttt	ccattccaac	atttcatagc	ttagtagcta	360
cccaagagga	ggaacaagca	ccagccaact	tcccgcggga	agcggcacc	actcagactc	420
actagcacct	cgcgacacat	caataaaaaac	accaccacca	agaagttagg	ttgttattga	480
cgatgtattc	tcgggtcccta	aattgtatat	ctctcgtgtg	catgtggatg	ttacccaatg	540
gaatcgtgg	cacaagccca	ccactacat	aagaatatac	aaccgggaac	caaaaccttg	600
acactagatg	aatcattagg	gccacgcccga	ctatctcatt	ccgcacgcg	tctaggtttc	660
ccgcccgttt	ctaccccttg	tgggtatccc	ccatcattct	tgtttgtatt	ggtccaaaaa	720
atcagcaaag	tttgctttgc	cgtgtgtatt	catataacac	tcgataatga	ccccatcggc	780
cttatttttt	tattgttttc	ttcctgcctt	ttcttccccg	cgatctttca	gcccttgtgt	840
ccctatagat	acccaattct	cggatacata	attcacaacc	cacctccacc	ataaagtaca	900
aagaagagca	ttcactctag	ggaaccttga	aggtgtgggt	cttgataaaa	gtcatggcag	960
cgatgtacaa	ggcttgcatc	atctaggggt	cctagatgaa	acgcttagca	tcagctagggt	1020
aataataaacc	ttgggtgaca	tagttgcca	aacaagctta	tattgtgcac	atgtgcgtgt	1080
gtcatgggac	tggaaagggt	cgccggtgtg	aaccactgat	gtgtgctgcc	atttaggaag	1140
actctagatg	aatgggggaa	ctcccagggtc	gggtccacca	gaggaaaatc	ttgcgagatc	1200
ttgggctgaa	tcattgaatt	tcatgtacca	agtaactaac	caaatagaaa	ccaagagaaa	1260
atctcattgt	tcagcagtct	ttcgttgaat	tttagaggga	tatgcggtgg	agggcctccg	1320
aggcagcggt	tcgccgctata	ccacatttcg	gagggcccga	atccatccaa	aactatcaag	1380
tgggactaac	acatgaacat	acgtgtgttg	agattctgag	atgcccaaga	gccagctccc	1440
gcgcgtgacc	cacttcaccg	gcgaccgctg	ccacttagga	aggttcttga	ctgaaaaagg	1500
gaaaactccc	acgatgggtt	caccgagga	aatcttgcga	gatcatgagc	tcaaccattg	1560
ctttccatgt	tccatgaac	taaccaaaac	atcaagtga	aatcccattg	gccaccggtg	1620
gtttaaataa	tttcagaagc	gtagaccatg	cttcggatgg	ccaaaatcca	cctaaaactt	1680
gcaagtgggc	ctaataatgtg	tgtaaaagtg	tgctgggag	gtgagggggc	caagagctag	1740
ctagcgtggc	ggcatgctgt	cgtgggagta	atgaaatctc	tgacacagtgt	gttttagggc	1800
aacacttggc	aaatgtgtga	tcttcggaac	atcccaagct	tgggaccgtc	aagtgtcttt	1860
tgtgcgcaaa	gtaaacgcaa	aaaacatgcg	ccactccttt	accatattgc	ggacaaaaaa	1920
aacttggcaa	atgggtattt	ccttgggtgat	cggtgttctg	cgccgtatgc	cgatggtcga	1980
catagctttt	gccgtgttct	gcgttgcttt	tgtcgtggct	ttttccaca	tggcaaatcc	2040
ataattttcca	gtagtacttc	aataatattt	gaaggcaaga	acaccaggga	gccgaattga	2100
atttccggca	tatccgctac	tatagattga	aaataaggag	gcggatcatc	tccttgggtg	2160
aacccttttt	ttgtctaaaa	ataattttct	ttttgaatat	tttacatttc	ttcatactat	2220
aattttggat	acataaaaata	ttaactttat	atatgaaaat	ataattccaa	tacttttgca	2280
ctcatcaaat	aattaatttt	ggatatataa	ctagttaggt	tgtttatgca	aaattcctat	2340
taaattattt	tcgggtaccaa	acaatgtaaa	attagtaagg	tcataactag	ttgtgcaacg	2400
tatactgaaa	aaattaattt	tggaaatttcg	caaaaaaaaa	aatggataca	tggaaacgctc	2460

aggcgatgtc	tgtggccatg	aaaccgcgct	tgtcctgtgc	ataattctag	ggtgtgggtg	2520
cttctataaa	tggataatga	gcatgcatca	gaacgctcca	gcgatgtttg	tggccatgag	2580
acagagcttg	tccgtgcatg	cctacgcggc	tctccctcgc	cgtggcccaa	gctctgttcc	2640
cttccgacag	acccggccgg	tacaagcgcc	tgcgacatgg	ccgaagcgcc	gcccatccgc	2700
gcataaatac	ccgcacacca	tctatcaccg	attcacaacc	aacagcagca	gcacacatat	2760
acacacaaga	accatccaac	aatccaga				2789

<212> Type : DNA

<211> Length : 2789

SequenceName : SEQIDNO.2

SequenceDescription :

secuencia

5 -----

<213> Nombre del Organismo : Lolium perenne

<400> PreSequenceString :

agcttgggac	cgtcaagttg	cttttgtgcg	caaagttaac	gcaaaaaaca	tgcgccactc	60
ctttaccata	tgccggacaa	aaaaaacttg	gcaaattggt	atttccttgg	tgatcgggtg	120
tctgcgcggt	atgccgatgg	tcgacatagg	ctttgcccgt	ttctgcgttg	cctttgtcgt	180
ggctttttcc	cacatggcaa	atccataatt	tccagtagtg	actcaataat	atttgaaggc	240
aagaacacca	gggagccgaa	ttgaatttcc	ggcatatccg	ctactataga	ttgaaaaata	300
ggaggcggt	catctccttg	gtgcaacccc	ttttttgtct	aaaaataatt	ttctttttga	360
atatttttaca	tttcttcata	ctataatttt	ggatacataa	aatattaact	ttatatatga	420
aaatataatt	ccaatacttt	tgcactcatc	aaataattaa	ttttggatat	ataactagtt	480
gagttgttta	tgcaaaattc	ctattaaatt	attttcggta	ccaaacaatg	taaaattagt	540
aagggtcataa	ctagtgtgtc	aacgtatact	gaaaaaatta	attttggaat	ttcgcaaaaa	600
aaaaaatgga	tacatggaac	gctcaggcga	tgtctgtggc	catgaaaccg	cgcttgtcct	660
gtgcataaatt	ctaggggtgtg	gggtgcttcta	taaatggata	atgagcatgc	atcagaacgc	720
tccagcgatg	tttgtggcca	tgagacagag	cttgtccgtg	catgcctacg	cggtctctcc	780
tcgccgtggc	ccaagctctg	ttcccttccg	acagaccg	ccggtacaag	cgcttgcgac	840
atggccgaag	cgccgcccac	ccgcgcataa	ataccgcac	accatctatc	accgattcac	900
aaccaacagc	agcagcacac	atatacacac	aagaaccatc	caacaaatcc	aga	953

<212> Tipo : ADN

<211> Longitud : 953

Nombre de la Secuencia : SEQIDNO.3

5 Descripción de la Secuencia :

secuencia

<213> Nombre del Organismo : Zea mays

<400> PreSequencestring :

10 aggtca 6

<212> Tipo : ADN

<211> Longitud : 6

Nombre de la Secuencia : SEQIDNO.4

Descripción de la Secuencia :

15 Secuencia

<213> Nombre del Organismo : Lycopersicon esculentum

<400> PresequenceString :

tgtggtata ta 12

20 <212> Tipo : ADN

<211> Longitud : 12

Nombre de la Secuencia : SEQIDNO5.

Descripción de la Secuencia :

Secuencia

25 -----

<213> Nombre del Organismo : Nicotiana tabacum

<400> PresequenceString :

gtga 4

<212> Tipo : ADN

5 <211> Longitud : 4

Nombre de la Secuencia : SEQIDNO.6

Descripción de la Secuencia :

Secuencia

10 <213> Nombre del Organismo : Artificial

<400> PreSequenceString :

aaaagtgtgc tgggatggtg 20

<212> Tipo : ADN

<211> Longitud : 20

15 Nombre de la Secuencia : SEQIDNO.7

Descripción de secuencia :

Secuencia

<213> Nombre del Organismo : Artificial

20 <400> PreSequenceString :

ccatccaaca aatccagaat ggcttcc. 27

<212> Tipo : ADN

<211> Longitud : 27

Nombre de la Secuencia : SEQIDNO.8

25 Descripción de la Secuencia :

secuencia

<213> Nombre del Organismo : Artificial

<400> PresequenceString :

30 cttaactat gccgggatcc atcg 24

<212> Tipo : ADN

<211> Longitud : 24

Nombre de la Secuencia : SEQIDNO.9

Descripción de la Secuencia :

Secuencia

5 -----

<213> Nombre del Organismo : Artificial

<400> PresequenceString :

taaccttcac ccggttgcca gagg . 24

<212> Tipo : ADN

10 <211> Longitud : 24

Nombre de la Secuencia : SEQIDNO.10

Descripción de la Secuencia :

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislado que incluye una secuencia de nucleótidos seleccionado del grupo que consiste de
 - a) una secuencia de nucleótidos publicada en SEQ ID NO: 3;
 - 5 b) una secuencia que hibridiza a SEQ ID NO: 3 bajo condiciones muy estrictas;
 - c) un complemento de (a) o (b); y
 - d) un fragmento o variante de (a), (b) o (c) que tiene un tamaño de al menos 100 nucleótidos y al menos 95% de identidad con la SEQ ID NO: 3;en donde dicha molécula es capaz de modificar la expresión específica del polen de un molécula de un segundo ácido nucleico ligado operativamente, dando lugar a la expresión de dicha segunda molécula de ácido nucleico.
- 10 2. Una molécula de ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 1, una parte de una especie de raigrás (*Lolium*).
3. Una molécula de ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 2 una parte de raigrás perenne (*L. perenne*).
- 15 4. Una molécula de ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 3, una parte de un gen *Lol p 2* de raigrás perenne (*L. perenne*).
5. Un vector que incluye una molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. Un vector de acuerdo con la reivindicación 5, que además incluye dicha segunda molécula de ácido nucleico y un terminador, dicha molécula de ácido nucleico, segunda molécula de ácido nucleico y terminador siendo ligado operativamente para dar lugar a la expresión de dicha segunda molécula de ácido nucleico.
- 20 7. Un vector de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicha segunda molécula de ácido nucleico es capaz de modificar la expresión de un alérgeno del polen.
8. Un vector de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho alérgeno del polen es *Lol p 1* y/o *Lol p 2*.
9. Un gen quimérico que incluye una molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 ligada operativamente a dicha segunda molécula de ácido nucleico.
- 25 10. Un gen quimérico de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha segunda molécula de ácido nucleico es capaz de modificar la expresión de un alérgeno del polen.
11. Un gen quimérico de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho alérgeno del polen es *Lolp 1* y/o *Lolp 2*.
12. Una célula vegetal, planta, semilla de planta u otra parte de la planta que incluye un vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 - 8 o un gen quimérico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-11.
- 30 13. Una planta de acuerdo con la reivindicación 12, que es de una especie de *Lolium*.
14. Un método para modificar la expresión del gen en el polen, dicho método que incluye la introducción en una célula vegetal de una cantidad efectiva de un vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 - 8 o un gen quimérico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-11, dando lugar a la expresión de dicha segunda molécula de ácido nucleico en dicha célula vegetal.
- 35 15. Un método de producción de una planta con reducida fertilidad masculina en comparación con una planta del tipo salvaje, dicho método que incluye la introducción en la planta de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en combinación con una molécula de ácido nucleico capaz de modular la fertilidad masculina, en donde dicha molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4 permite la expresión específica del polen de dicha molécula de ácido nucleico capaz de modular la fertilidad masculina.
- 40

16. Un método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde dicha molécula de ácido nucleico capaz de modular la fertilidad masculina es capaz de modificar el desarrollo del polen.

17. Un método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde dicha molécula de ácido nucleico capaz de modular fertilidad masculina codifica una bamasa ribonucleasa bacteriana.

5 **18.** Una planta producida por un método de acuerdo con la reivindicación 15.

19. Una planta de acuerdo con la reivindicación 18, en donde dicha planta es una planta estéril masculina.

AGTGTAACCTAGGACTCTAGGCCAGATCGTGACATTGGAATAGTGACGACATTTCCCTG
 CATACGTAACGCCTATGGGTATGGAGCTTCATACCGAGACTCCCAAGTATCATACCAGAG
 GGGACGTGGCCTCCTCTATTCTAGGGGCGACGCCACCCCTGGCAATAAAAAATAGGAACCTT
 CTACTAGATAAGGGGGAGGGCTCGAAGCAACAAAGAGGCTAAGAAAGGCGAAAATCAAGC
 AAGAACACAAACCCAACAAGCCAGAGCTAAACAAGCCTTAGCACCATGGTCTCTCGCACT
 CGAAAATAACGAGGCGAGATGACACTCTTTCCATTCCAACATTTCATAGCTTAGTAGCTA
 CCCAAGAGGAGGAACAAGCACCAGCCAACCTCCCGCCGGAAGCGGCACCCACTCAGACTC
 ACTAGCACCTCGCGCACAATCAATAAAAAACACCACCACCAAGAAGTAGGGTTGTTATTGA
 CGATGTATTCTCGGTCCCTAAATTGTATATCTCTCGTGTGCATGTGGATGTTACCCAATG
 GAATCGTGGTCACAAGCCCAACCACTACATAAGAATATACAACCGGGAACCAAAACCTG
 AACTAGGCCAAATCATTAGGGCCACGCCGACTATCTCATTCCCGCACGCGTCTAGGTTTC
 CCGCCCGTTTCTACCCCTTGTGGGTATCCCCCATCATTCTTGTTTGTATTGGTCCAAAA
 ATCAGCAAAGTTTGCTTTGCCGTGTGTATTATATAAAGTCTGATAATGACCCCATCGGC
 CTTATTTTTTTTATTGTTTCCTTCCTGCCTTTTCTTCCCGCGATCTTTCAGCCCTTGTGT
 CCCTATATATACCCATCTCTCGGATACATAATTACAACCCACCTCCACCATAAAGTACA
 AAGAAGAGCATTCACTCTAGGGAACCTTGAAGGTGTGGGTCTTGTATAAAGTCATGGCAG
 CGATGTACAAGGCTTGCATCATCTAGGGTTCCTAGATGAAACGCTTAGCATCAGCTAGGT
 AATAATAACCTTGGGTGACATAGTTGCCAAAACAAGCTTATATTGTGCACATGTGCGTGT
 GTCATGGGACTGGAAAGGGTCGCCGGTGTGAACCACTGATGTGTGCTGCCATTTAGGAAG
 ACTCTAGATGAATGGGGGAACTCCAGGTTCGGGTCCACCAGAGGAAAATCTTGCGAGATC
 TTGGGCTGAATCATTGAATTTTATGTACCAAGTAACCAAAATAGAAACCAAGAGAAA
 ATCTCATTGTTTCAGCAGTCTTTCGTTGAATTTTAGAGGGATATGCGGTGGAGGGCCTCCG
 AGGCAGCGTTTCGCCGCATACCACATTTTCGGAGGGCCGAAATCCATCCAAAACCTATCAAG
 TGGGACTAACACATGAACATACGTGTGTTGAGATTCTGAGATGCCCAAGAGCCAGCTCCC
 GCGCGTGACCCACTTCACCGGCGACCGCTGCCACTTAGGAAGGTTCTTGACTGAAAAAGG
 GAAAACTCCCACGATGGGTTCACCCGAGGAAATCTTGCGAGATCAT**GAGCT**CAACCATTG
 CTTTCCATGTTCCCTATGAACTAACCAACAATCAAGTGAAAATCCCATTGGCCACCGGTA
 GTTTAAATAATTTCAGAAGCGTAGACCATGCTTCGGATGGCCAAAATCCACCTAAAACCTT
 GCAAGTGGGCCTAATATGTGTGT**AAAAAGTGTGCTGGGATGGT**GAGGGGGCCAAGAGCTAG
 CTAGCGTGGCGCATGCTGTCGTGGGAGTAAGAAAATCTCTGCACAGTGTGTTTTAGGG

FIGURA 1

CAACACTTGGCAAATGTGTGATCTTCGGAACATCCCAAGCTTGGGACCGTCAAGTTGCTT
 TTGTGCGCAAAGTAAACGCAAAAACATGCGCCACTCCTTTACCATATGCCGGACAAAAA
 AAACCTTGGCAAATGGTTATTTTCCTTGGTGATCGGTGTTCTGCGCCGTATGCCGATGGTCC
 ACATAGGCTTTGCCGTGTTCTGCGTTGCCTTTGTCTGCGTGGCTTTTTCCCACATGGCAAATC
 CATAATTTCCAGTAGTGAATCAATAATTTGAAGGCAAGAACACCAGGGAGCCGAATTG
 AATTTCCGGCATATCCGCTACTATAGATTGAAAATAAGGAGGCGGATCATCTCCTTGGTG
 CAACCCCTTTTTTGTCTAAAAATAATTTTCTTTTTGAATATTTTACATTTCTTCATACTA
 TAATTTTGGATACATAAAATATTAACCTTTATATATGAAAATATAATTCCAATACTTTTGC
 ACTCATCAAATAATTAATTTTGGATATATAACTAGTTGAGTTGTTTATGCAAAATTCCTA
 TTAAATTATTTTCGGTACCAAACAATGTAAAATTAGTAAGGTCATAACTAGTTGTGCAAC
 GTATACTGAAAAAATTAATTTTGGAAATTCGCAAAAAAATAATGGATACATGGAACGCT
 CAGGCGATGTCTGTGGCCATGAAACCGCGCTTGTCTGTGCATAATTCTAGGGTGTGGGT
 GCTTCTATAAATGGATAATGAGCATGCATCAGAACGCTCCAGCGATGTTTGTGGCCATGA
 GACAGAGCTTGTCCGTGCATGCCTACGCGGCTCTCCCTCGCCGTGGCCCAAGCTCTGTTC
 CCTTCCGACAGACCCGGCCGGTACAAGCGCTGCGACATGGCCGAAGCGCCGCCCATCCG
 CGCATAAATACCCGCACACCATCTATCACCGATTCAACAACAGCAGCAGCACACATA
 TACACACAAGAACCATCCAACAAATCCAGAATGGCTTCCTCATCAAGCAGGATGCTGGCG
 GCGGCGGCGCTGGCGGCGCTGTTTCGTGGGCGCGATGTGCGAGGCCCCCGTGACGTTACG
 GTAGAGAAGGGCTCCGACGAGAAGAACCTGGCGCTGTGATCAAGTACAACAAGGAGGGC
 GACTCCATGGCGGAGGTGGAGCTCAAGGAGCACGGCTCCAACGAGTGGCTGGCCCTGAAG
 AAGAACGGCGACGGCGTGTGGGAGATCAAGAGCGACAAGCCGCTCAAGGGGCCATTCAAC
 TTCCGCTTTCGTGTCCGAGAAGGGGATGAGGAACGTGTTTCGACGACGTGGTTCCGGCGGAG
 TTCAAGGTCGGCACCCACTACAAGCCCGAGGAGTAGATCCGCCATCGGTTCGTCATCGGAA
 GTTTTTCGATTTTCCTCATATCATGAATAATTTGTGAGGTTTTTGTGAGTGAGGTGGTGA
 TTGGGAGAAGCACAACATATGGATGTGCTTCCTAGTATCTCCCATGCACCCATTACCATGA
 CCAATATTTTTTTATATGAATCGGNTTANGTAANTTAATTTAAAAGNCCCTTAAAAG

FIGURA 1 (Cont.)

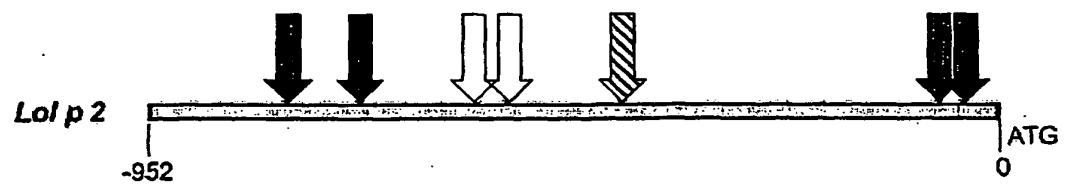
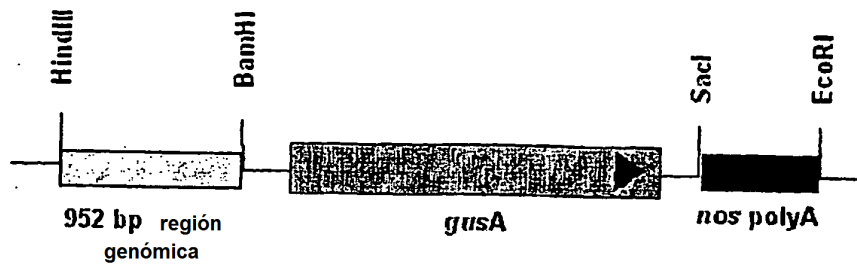
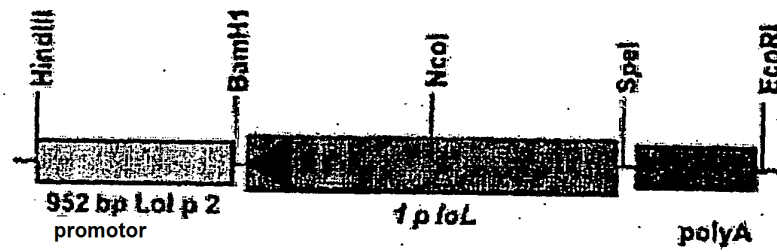


FIGURA 2

A



B



C

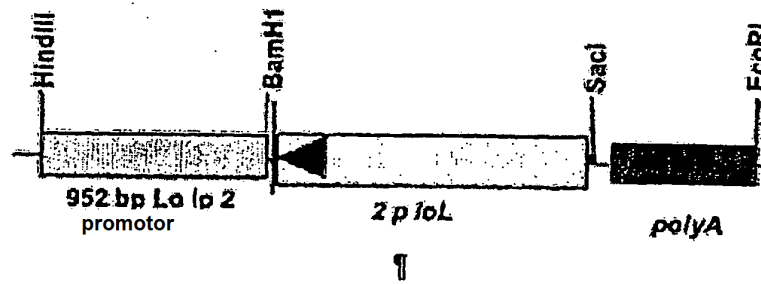


FIGURA 3

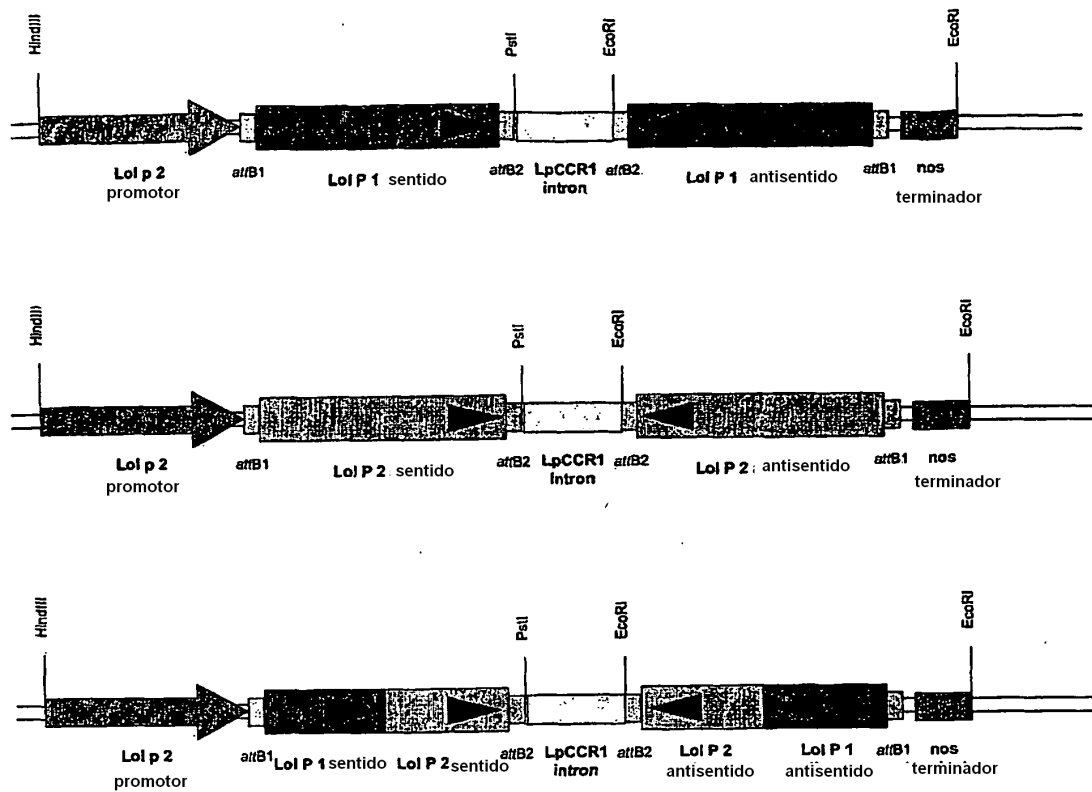


FIGURE 4

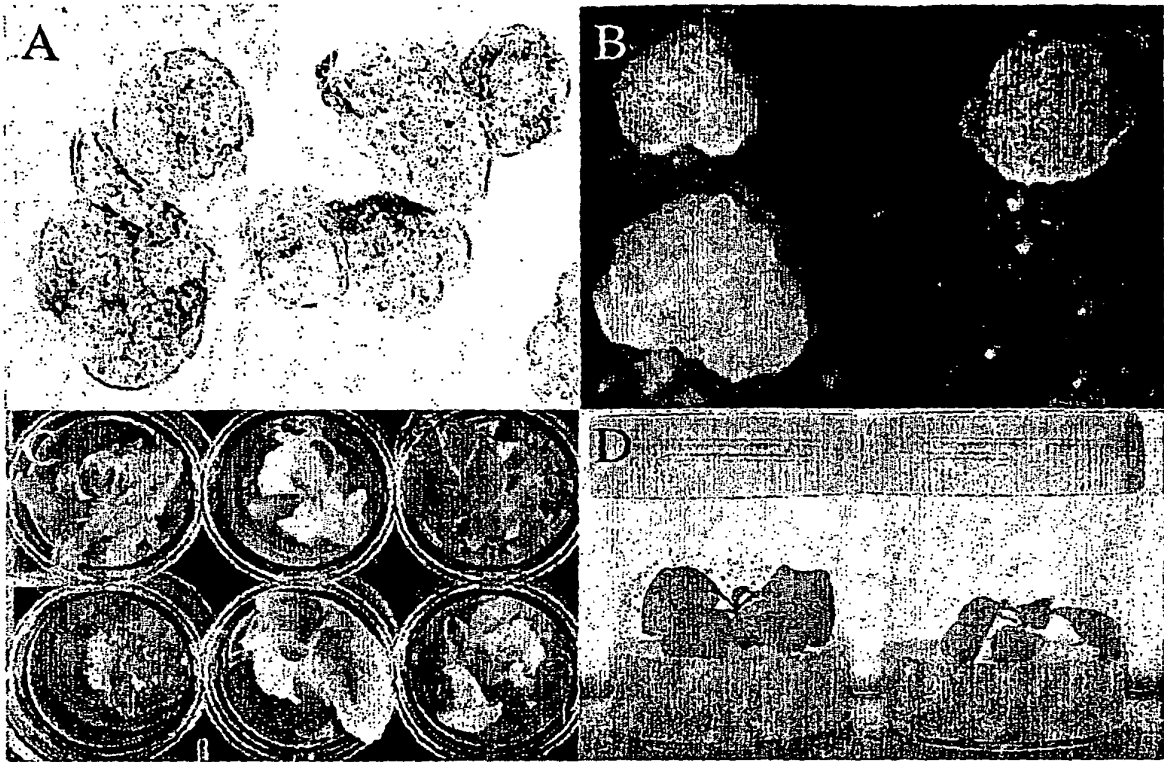
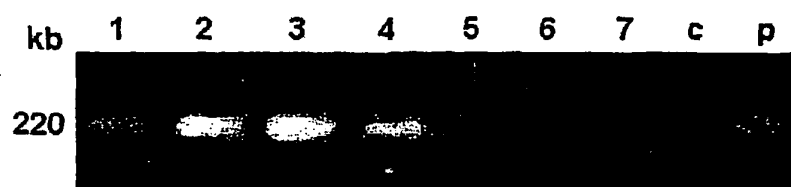


FIGURA 5

A



B

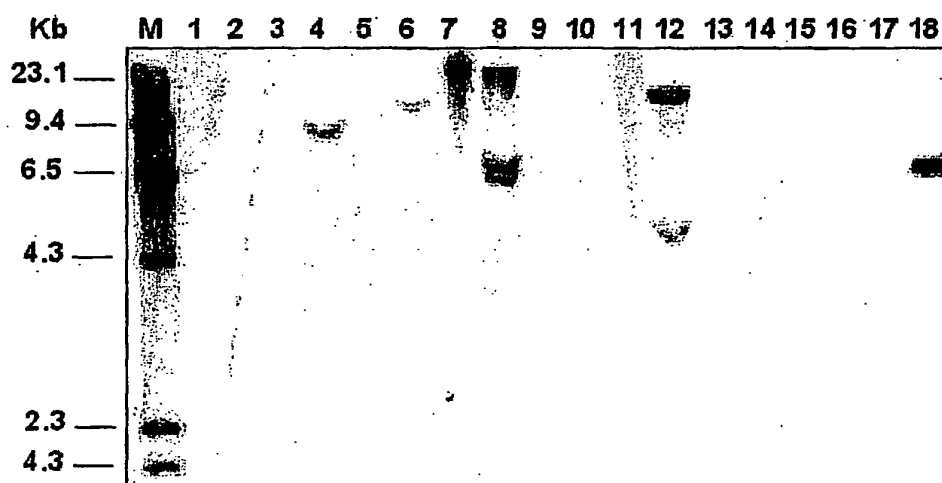


FIGURA 6

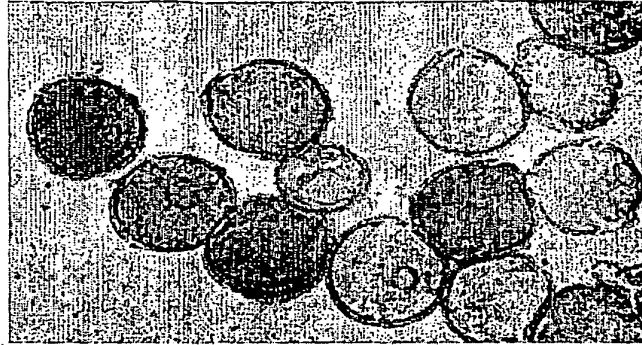


FIGURA 7

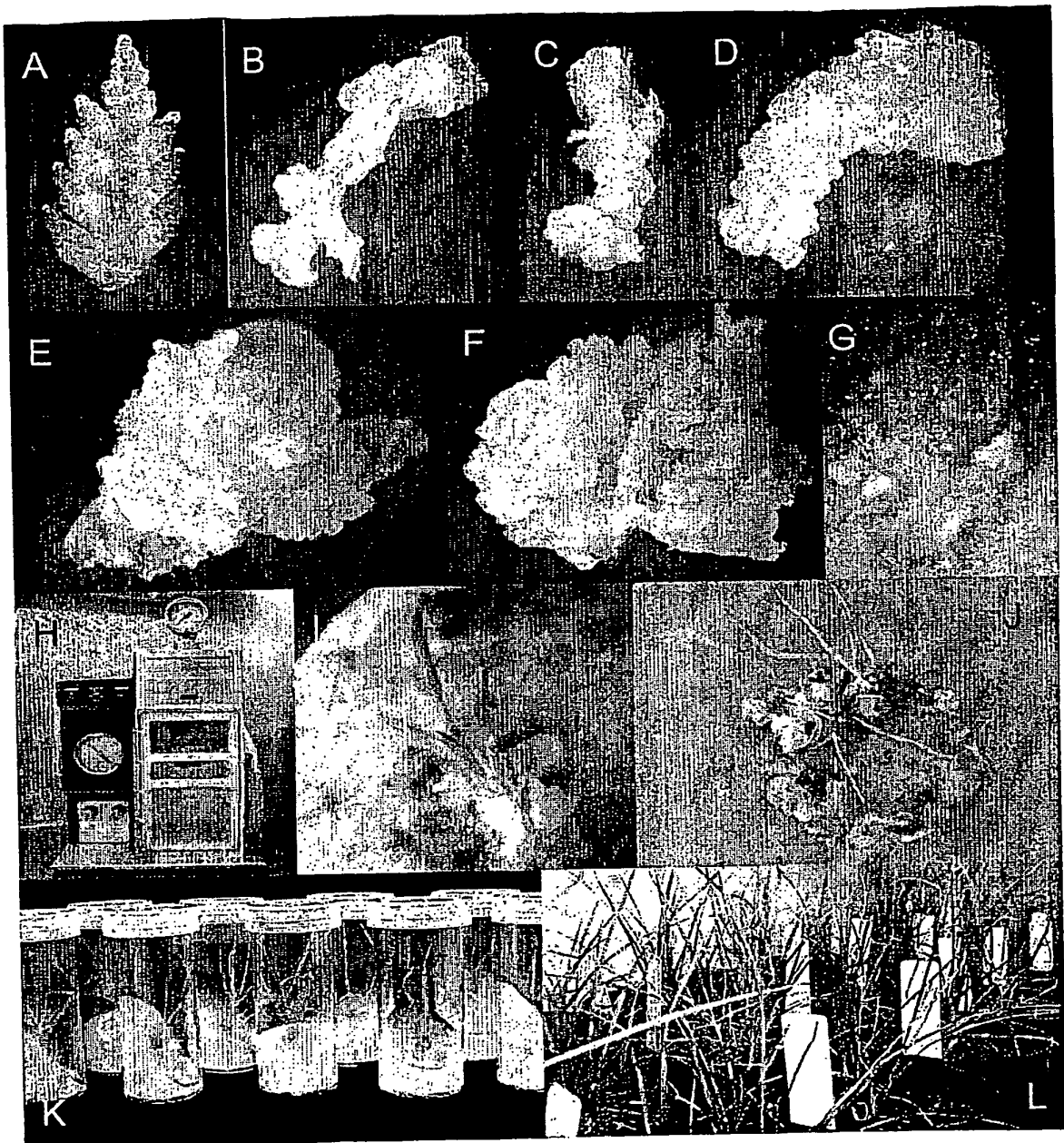


FIGURA 8