

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 307**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 1/02 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **99901793 .2**
96 Fecha de presentación: **22.01.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1054985**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.11.2000**

54 Título: **Producción de semillas híbridas**

30 Prioridad:
20.02.1998 GB 9803659
17.03.1998 GB 9805669

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.07.2012

73 Titular/es:
Syngenta Limited
European Regional Centre Priestley Road Surrey
Research Park
Guildford Surrey GU2 7YH, GB

72 Inventor/es:
KNIGHT, Mary Elizabeth;
JEPSON, Ian;
DALY, Allan y
BAYLISS, Michael William

74 Agente/Representante:
Lehmann Novo, Isabel

ES 2 385 307 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

Producción de semillas híbridas

La presente invención se refiere a métodos para preparar semillas híbridas.

5 En particular, la presente invención se refiere al control molecular de la esterilidad en plantas de cosechas. Tal esterilidad masculina y femenina en plantas se puede usar en la preparación de semillas híbridas a partir de cosechas que son naturalmente autopolinizadoras.

La presente invención también se refiere a casetes de expresión para la incorporación en plantas, y al uso de tales casetes de expresión en un sistema restaurador de la esterilidad masculina/femenina.

10 Las plantas híbridas que se hacen crecer a partir de semillas híbridas se benefician de los efectos heteróticos de cruzar dos trasfondos genéticos distintos. La producción de semillas híbridas depende de la capacidad para controlar la autopolinización y asegurar la polinización cruzada de plantas progenitoras masculinas y femeninas.

Existe un número de métodos para controlar la fertilidad del polen. Por ejemplo, en el caso de maíz, que tiene flores masculinas y femeninas separadas, el control de la fertilidad del polen se logra retirando físicamente la inflorescencia o borla masculina, antes del desprendimiento del polen, evitando así la autopolinización.

15 Sin embargo, la inmensa mayoría de las cosechas importantes tienen órganos reproductivos funcionales tanto masculinos como femeninos en la misma flor. En este caso, la retirada de los órganos productores de polen es muy laborioso y caro. El uso de productos químicos (gametocidas), particularmente en trigo, maíz (maíz) y arroz, para exterminar o bloquear la producción de polen produce esterilidad masculina transitoria, pero el uso de tales productos químicos es caro. También son un problema la fiabilidad de los productos químicos y su duración de acción.

20 Existe un considerable interés en desarrollar sistemas de control del polen basándose en mecanismos genéticos que produzcan esterilidad masculina. Hay dos tipos generales: a) esterilidad masculina nuclear, provocada por el fallo de la producción de polen debido a uno o más genes nucleares, y b) esterilidad masculina citoplásmica (CMS), en la que la producción de polen se bloquea debido a un defecto en un gen en la mitocondria. Los ejemplos de sistemas de esterilidad que usan mecanismos genéticos se describen en los documentos EP412006, WO9627673, EP412911, WO96113588, WO94125593 y EP344029.

25 Los sistemas nucleares actualmente disponibles se basan en la introducción de un rasgo de esterilidad masculina en una planta progenitora, seguido de la introducción de un gen de la restauración de la fertilidad como resultado de polinización cruzada con otra planta para producir plantas híbridas fértiles. El sistema Paladin, que se describe en el documento WO96/01799, es diferente, y se basa en una separación durante la producción de genes de semillas híbridas que, cuando se expresan juntos en otra planta, tienen un efecto citotóxico, conduciendo a la esterilidad masculina.

30 El arroz y el trigo son plantas que se autopolinizan y tienen pequeñas flores hermafroditas, y de esta manera el enfoque de la eliminación de la borla adoptado para la producción de semillas híbridas en el maíz no es aplicable. La retirada manual de las anteras es difícil y consume tiempo. Además, el polen del trigo es relativamente pesado y es viable sólo durante un periodo de tiempo corto, raras veces permaneciendo viable durante más de 30 minutos. Por lo tanto, la técnica de plantación usada en la producción de maíz híbrido, es decir, plantar el progenitor masculino en un bloque separado físicamente del progenitor femenino (el estéril masculino) y permitir la polinización por el viento, no funciona bien en el trigo o el arroz. Los progenitores masculinos y femeninos para estas cosechas han de ser interplantados para asegurarse la polinización cruzada. Puesto que las semillas híbridas necesitan comprender más de 95% de híbridos, es necesario eliminar las semillas que se producen de la autopolinización del progenitor masculino, o es necesario hacer que el progenitor masculino sea incapaz de autofertilizarse, y por lo tanto sea incapaz de producir semillas no híbridas. Claramente, la interplantación de las plantas progenitoras significa que la primera opción es difícil excepto que las plantas masculinas sean susceptibles a cierto tratamiento químico al que el progenitor femenino es tolerante, por ejemplo tratamiento con herbicidas.

35 Nuestra Solicitud de Patente Internacional nº PCT/GB90/00110 (WO90/08830) describe una cascada de secuencias génicas que expresan una proteína que interrumpe la biosíntesis de polen viable en una planta progenitora femenina. En este caso, sin embargo, sólo una de las plantas progenitoras, es decir, el progenitor masculino, es estéril, para minimizar la autopolinización de la planta femenina, y esta planta femenina se cruza con una planta progenitora masculina fértil para producir semillas híbridas fértiles. Sin embargo, no hay ninguna descripción en la bibliografía de un método para producir semillas híbridas en el que ambas plantas progenitoras sean incapaces de autopolinizarse.

40 La presente invención se refiere a un método mediante el cual se pueden producir semillas híbridas que busca superar los problemas asociados actualmente con la producción de semillas híbridas, particularmente con la producción de semillas híbridas de trigo y arroz.

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un casete de expresión que comprende:

- (a) una primera secuencia promotora génica que es un promotor específico de tapetum, de antera, de estambre y/o de polen;
- 5 (b) un gen interruptor que codifica un producto capaz de interrumpir la fertilidad masculina, operablemente enlazado al primer promotor génico;
- (c) una segunda secuencia promotora génica que es un promotor específico floral de ovario, de óvulos, de pistilo, de estilo, de estigma, de aparato transmisor y/o de placenta, opcionalmente enlazado operablemente a una o más secuencias potenciadoras de la traducción o intrónicas;
- 10 (d) un gen restaurador que codifica un producto capaz de restaurar la fertilidad femenina, operablemente enlazado a la segunda secuencia promotora génica;
- (e) un tercer promotor génico que es inducible mediante la aplicación de un inductor químico exógeno, opcionalmente enlazado operablemente a una o más secuencias potenciadoras de la traducción o intrónicas; y
- (f) un gen restaurador que codifica un producto capaz de restaurar la fertilidad masculina, operablemente enlazado a la tercera secuencia promotora génica.

15 Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un casete de expresión que comprende:

- (a) un primer promotor génico que es un promotor específico floral de ovario, de óvulos, de pistilo, de estilo, de estigma, de aparato transmisor y/o de placenta,
- (b) un gen interruptor que codifica un producto capaz de interrumpir la fertilidad femenina, enlazado operablemente al primer promotor génico;
- 20 (c) un segundo promotor génico que es un promotor específico del tapetum, de antera, de estambre y/o de polen, opcionalmente enlazado operablemente a una o más secuencias potenciadoras o intrónicas;
- (d) un gen restaurador que codifica un producto capaz de restaurar la fertilidad masculina, enlazado operablemente al segundo promotor génico;
- 25 (e) un tercer promotor génico que es inducible mediante la aplicación de un inductor químico exógeno, opcionalmente enlazado operablemente a una o más secuencias potenciadoras o intrónicas; y
- (f) un gen restaurador que codifica un producto capaz de restaurar la fertilidad femenina, enlazado operablemente al tercer promotor génico.

Se proporciona un método para producir semillas híbridas, que comprende:

- 30 (a) incorporar un casete de expresión según el primer aspecto de la presente invención en una primera planta para generar una planta progenitora femenina hemicigota, aplicar un inductor químico exógeno a la planta progenitora femenina, permitiendo de ese modo que la planta progenitora femenina se autopolinice, obtener semillas de dicha planta progenitora femenina, y seleccionar una planta progenitora femenina, que se hace crecer a partir de dichas semillas, que es homocigota para dicho casete de expresión.
- 35 (b) incorporar un casete de expresión según un segundo aspecto de la presente invención en una segunda planta para generar una planta progenitora masculina hemicigota, aplicar un inductor químico exógeno a la planta progenitora masculina, permitiendo de ese modo que la planta progenitora masculina se autopolinice, obtener semillas de dicha planta progenitora masculina, y seleccionar una planta progenitora masculina, que se hace crecer a partir de dichas semillas, que es homocigota para dicho casete de expresión;
- 40 (c) cruzar la planta masculina homocigota seleccionada de la parte (b) y la planta femenina homocigota de la parte (a); y
- (d) recoger las semillas híbridas producidas en el progenitor femenino.

Se proporciona tejido vegetal transformado con uno de los casetes de expresión como se define anteriormente, y material derivado de dicho tejido vegetal transformado.

45 Se proporcionan plantas completas fértiles que comprenden el tejido o material como se define anteriormente.

Se proporciona la progenie de las plantas seleccionadas producidas, comprendiendo la progenie casetes de expresión como se definen anteriormente, incorporados, preferiblemente incorporados de forma estable, en su genoma, y las semillas de tales plantas y tal progenie.

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona una planta, cuyo genoma comprende el primer casete de expresión según el primer aspecto de la presente invención.

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona una planta, cuyo genoma comprende el segundo casete de expresión según el segundo aspecto de la presente invención.

5 Se describen además semillas híbridas producidas cruzando estas dos plantas y obteniendo las semillas híbridas resultantes producidas de ellas.

Se proporciona el uso de una planta según la presente invención para producir semillas híbridas.

10 Se describe además un método para transformar una planta que comprende incorporar en el genoma de la planta un casete de expresión como se define anteriormente en el que el gen restaurador, que está enlazado operablemente a una tercera secuencia promotora génica, es expresado de forma inducible en el tejido diana, pero puede ser expresado de forma constitutiva en uno o más tejidos diferentes de manera que el gen interruptor sólo es eficaz en el tejido diana. La tercera secuencia promotora se puede expresar constitutivamente en una etapa particular, por ejemplo en tejido de callo.

15 Preferiblemente, el primer casete de expresión definido anteriormente y usado en el método comprende un gen interruptor que codifica un producto que es capaz de interrumpir la producción de polen.

Preferiblemente, el primer casete de expresión definido anteriormente comprende un gen interruptor que codifica un producto que es capaz de ser expresado en las células tapetales de la planta.

Preferiblemente, la tercera secuencia promotora génica en el primer casete de expresión es la secuencia del promotor Alc A o la secuencia del promotor GST-27.

20 Preferiblemente, el segundo casete de expresión definido anteriormente y usado en el método comprende un gen restaurador que codifica un producto que es capaz de restaurar la producción de polen.

Preferiblemente, el segundo casete de expresión definido anteriormente comprende un gen restaurador que es capaz de superar la interrupción de las células tapetales.

25 Preferiblemente, la tercera secuencia promotora génica en el segundo casete de expresión es la secuencia del promotor Alc A o la secuencia del promotor GST-27.

Preferiblemente, las plantas masculinas en el método comprenden un gen dominante homocigoto que restaura la fertilidad masculina.

Preferiblemente, las plantas femeninas en el método comprenden un gen dominante homocigoto que restaura la fertilidad femenina.

30 Preferiblemente, las semillas híbridas F1 producidas dan lugar a plantas cuyas anteras producen aproximadamente 50% de polen viable, en las que la primera secuencia promotora génica del primer casete de expresión como se define anteriormente es una secuencia promotora gametofítica.

35 Preferiblemente, las semillas híbridas F1 producidas dan lugar a plantas, todas las cuales son completamente fértiles, en las que la primera secuencia promotora del primer casete de expresión como se define anteriormente es una secuencia promotora esporofítica.

Preferiblemente, las semillas híbridas F2 dan lugar a plantas que se segregan para esterilidad, de las cuales un número significativo son estériles femeninas.

40 Preferiblemente, las plantas homocigotas masculinas y femeninas producidas mediante el método se multiplican y se mantienen mediante la aplicación a las plantas de un inductor químico exógeno, permitiendo de ese modo que las plantas se autopolinicen. A este respecto, se pueden producir generaciones adicionales de autopolinización de las plantas homocigotas masculinas y femeninas seleccionadas, y, cuando se necesitan semillas híbridas, las plantas se pueden cruzar para obtener semillas híbridas.

Preferiblemente, las plantas usadas en el método son trigo, cebada, arroz, maíz, remolacha, tomate, girasol, cáñola, algodón, haba de soja y otros vegetales.

45 Preferiblemente, el gen restaurador usado en el método para transformar una planta es expresado constitutivamente en tejido de callo, a partir del cual se regeneran plantas transformadas.

Preferiblemente, el gen restaurador es expresado induciblemente en las estructuras florales masculinas o femeninas.

50 Preferiblemente, la tercera secuencia promotora génica de los casetes de expresión usados en el proceso de transformación es la secuencia del promotor GST-27 o del promotor Alc A.

5 Se describe adicionalmente un método para preparar semillas híbridas, que comprende interplantar una planta progenitora masculina, que es fértil masculina y estéril femenina recesiva homocigota, y una planta progenitora femenina, que es estéril masculina recesiva homocigota y fértil femenina, permitir la polinización cruzada y obtener semillas producidas de ello, en el que el ADN genómico de cada planta progenitora tiene integrado en él un constructo génico que comprende una secuencia promotora sensible a la presencia o ausencia de un inductor químico exógeno, enlazada operablemente a un gen que restaura completamente la fertilidad de cada planta progenitora, expresándose el gen mediante la aplicación a la planta de un inductor químico externo que permite de ese modo que cada progenitor se autopolinice cuando se necesite para la multiplicación de los lotes de semillas de cada planta progenitora.

10 Se describe además un sistema de expresión, que comprende:

- (a) una primera secuencia promotora génica que es una secuencia de promotor específico de flor masculina;
- (b) un gen interruptor que codifica un producto capaz de interrumpir la fertilidad masculina, enlazado operablemente a la primera secuencia promotora génica;
- 15 (c) una segunda secuencia promotora génica que es una secuencia de promotor específico de tejido femenino, opcionalmente enlazada operablemente a una o más secuencias potenciadoras de la traducción o intrónicas;
- (d) un gen restaurador que codifica un producto capaz de restaurar la fertilidad femenina, enlazado operablemente a la segunda secuencia promotora génica;
- 20 (e) una tercera secuencia promotora génica sensible a la presencia o ausencia de un inductor químico exógeno, enlazada operablemente a una o más secuencias potenciadoras de la traducción o intrónicas;
- (f) un gen restaurador que codifica un producto capaz de restaurar la fertilidad masculina, enlazado operablemente a la tercera secuencia promotora génica;

25 por medio de lo cual la presencia del inductor químico exógeno controla la fertilidad masculina, en el que el gen capaz de interrumpir la esterilidad masculina es un gen interruptor que codifica un producto que es expresado en las células tapetales de la planta.

Se describe además un sistema de expresión, que comprende:

- (a) una primera secuencia promotora génica que es una secuencia de promotor específico de tejido femenino;
- (b) un gen interruptor que codifica un producto capaz de interrumpir la fertilidad femenina;
- 30 (c) una segunda secuencia promotora génica que es una secuencia de promotor específico de tejido masculino, opcionalmente enlazada operablemente a una o más secuencias potenciadoras de la transcripción o intrónicas.
- (d) un gen restaurador que codifica un producto capaz de restaurar la fertilidad masculina, enlazado operablemente a la segunda secuencia promotora génica;
- 35 (e) una tercera secuencia promotora génica sensible a la presencia o ausencia de un inductor químico exógeno, enlazada operablemente a una o más secuencias potenciadoras de la traducción o intrónicas; y
- (f) un gen restaurador que codifica un producto capaz de restaurar la fertilidad femenina, enlazado operablemente a la tercera secuencia promotora génica;

40 por medio de lo cual la presencia del inductor químico exógeno controla la fertilidad femenina, y en el que el gen capaz de restaurar la fertilidad masculina es un gen que codifica un producto que restaura la producción de polen en las células tapetales.

Las secuencias de promotor específico de flor masculina preferidas son las secuencias del promotor MSF14 y C5 (derivada de pectina metil esterasa) del maíz.

45 La expresión "material vegetal" incluye una cariópside en desarrollo, una cariópside en germinación o grano, o un plantón, una plántula o planta, o tejidos o células de los mismos, tales como las células de una cariópside en desarrollo o los tejidos de un plantón en germinación o grano en desarrollo o planta (por ejemplo en las raíces, hojas y tallo).

50 El término "casete", que es sinónimo de términos tales como "constructo", "híbrido" y "conjugado", incluye un gen de interés unido directa o indirectamente a una secuencia promotora génica. Un ejemplo de una unión indirecta es la provisión de un grupo espaciador adecuado, tal como una secuencia intrónica o potenciadora, intermedia entre el

promotor y el gen de interés. Tales constructos también incluyen plásmidos y fagos, que son adecuados para transformar una célula de interés.

La expresión "gen interruptor" es un gen que actúa de manera dominante, y, cuando se expresa en una etapa adecuada del desarrollo vegetal, conducirá a la imposibilidad de una planta para formar estructuras florales femeninas que funcionen normalmente o estructuras florales masculinas que funcionen normalmente, de manera que la planta es estéril femenina o estéril masculina. Tal gen puede ejercer su efecto interrumpiendo tejidos tales como el tapetum y el endotelio. El gen se puede expresar específicamente en flores masculinas durante la formación del polen, provocando la muerte celular de las anteras y tejidos asociados, células madre de polen, polen y tejidos asociados. También se puede expresar en el estigma o en el aparato transmisor del estilo, interfiriendo así con el proceso de adhesión del polen, hidratación, germinación del polen y crecimiento y guía del tubo del polen. El origen de los genes interruptores puede ser de una variedad de fuentes de origen natural, por ejemplo células humanas, células bacterianas, células de levadura, células vegetales, células fúngicas, o pueden ser genes totalmente sintéticos que pueden estar compuestos de secuencias de ADN, algunas de las cuales se pueden encontrar en la naturaleza, algunas de las cuales no se encuentran normalmente en la naturaleza, o una mezcla de ambos. Estos genes tendrán preferiblemente un efecto sobre el metabolismo mitocondrial, puesto que es sabido que un requisito absoluto para la producción de polen fértil es un buen suministro de energía. Sin embargo, los genes interruptores se pueden dirigir de forma efectiva a otras funciones bioquímicas esenciales, tales como el metabolismo del ADN y ARN, la síntesis proteica, y otras rutas metabólicas. El gen interruptor dominante preferido es barnasa.

La expresión "gen restaurador" es un gen que actúa de manera dominante, y, cuando es expresado, invertirá los efectos del gen interruptor. El gen restaurador dominante preferido es barstar.

La expresión "flor femenina" pretende incluir todas las partes de los órganos reproductores femeninos, incluyendo, pero sin limitarse a, ovario, óvulos, pistilo, estilo, estigma, aparato transmisor, placenta.

La expresión "flor masculina" pretende incluir todas las partes de la flor masculina, incluyendo, pero sin limitarse a, tapetum, anteras, estambres, polen.

El método de producción de semillas híbridas es diferente de y tiene un número de ventajas con respecto a métodos existentes por muchas razones. La utilización de esterilidad tanto masculina como femenina no se ha descrito previamente. Esta característica evita la autopolinización de cualquier progenitor, permitiendo así la producción de semillas híbridas sin la necesidad de bloques de plantación separados para progenitores masculinos y femeninos. Esta interplantación de plantas progenitoras masculinas y femeninas maximiza la oportunidad de polinización cruzada en cosechas, tales como trigo y arroz, que son esencialmente autopolinizadoras. En los ejemplos de trigo y arroz, en los que no se lleva a cabo la plantación de bloques, este método permite la producción de semillas híbridas sin la necesidad de aplicar herbicida para apartar las plantas progenitoras masculinas después de la fertilización de la progenitora femenina. Un sistema restaurador químicamente inducible sólo es necesario para el mantenimiento de líneas parentales homocigotas en lugar de para el proceso de producción de semillas híbridas. Esto significa que se aplican compuestos químicos a extensiones limitadas de tierras, y entonces sólo de forma poco frecuente. En la presente invención se puede usar un número de sistemas de interruptores-restauradores, o sistemas de operadores-represores.

Las plantas que contienen los casetes de expresión de la presente invención que controlan la fertilidad masculina y femenina también se pueden usar separadamente para obtener híbridos F1 con otras líneas progenitoras, que no contienen los casetes de expresión, si en la otra línea se usa un control alternativo adecuado de la fertilidad masculina o femenina (tal como la retirada mecánica de las anteras u óvulos, o el uso de gametocidas químicos). Si la progenie de estos híbridos F1 se retrocruzan entonces durante un número apropiado de generaciones con los otros progenitores híbridos, mientras se selecciona la presencia del casete de expresión con técnicas moleculares, bioquímicas o de ensayo de progenie, el sistema para controlar la fertilidad masculina o femenina se puede transferir o introgresar en nuevos trasfondos progenitores. Como alternativa, los híbridos F1 con otras líneas progenitoras se pueden autopolinizar, mediante la aplicación de un inductor químico exógeno para restaurar la fertilidad masculina o femenina según sea apropiado, para seleccionar nuevos progenitores híbridos que contienen los casetes de expresión, a través del proceso normal de reproducción vegetal. El uso de tal introgresión y reproducción vegetal permitirá que los métodos de producción de semillas híbridas de la presente invención sean usados con una amplia variedad de combinaciones parentales nuevas y ya existentes de híbridos F1.

Los promotores que son inducibles mediante aplicación de compuestos químicos exógenos son conocidos en la técnica. Los promotores inducibles adecuados son aquellos que son activados por aplicación de un compuesto químico, tal como un protector de herbicidas. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen el sistema conmutador Alc A/R descrito en la Publicación Internacional nº WO. 93/21334, el sistema conmutador de GST descrito en las Publicaciones Internacionales nºs WO 90/08826 y WO 93/031294, o el conmutador de ecdisona descrito en la Publicación Internacional nº WO 96/37609. Tales sistemas de promotores se denominan aquí como "promotores conmutadores". Los compuestos químicos conmutadores usados conjuntamente con los promotores conmutadores son compuestos químicos agrícolamente aceptables que hacen a estos promotores particularmente útiles en los métodos.

Una de las ventajas de usar el promotor Alc A, que es un componente del sistema conmutador Alc A/R, en la presente invención es que el inductor químico usado es etanol. Este compuesto químico es ventajoso por cuanto se puede aplicar como un empapamiento de raíces, como una pulverización acuosa, o como un gas. Es eficaz a concentraciones de 1%, y no es tóxico para los operarios ni para el entorno.

5 La presente invención se puede usar para cualquier planta mono- o dicotiledónea que el reproductor o el criador desee producir como semillas F1 y para las cuales están o se hacen disponibles técnicas de transformación adecuadas, particularmente cosechas de trigo y arroz. La presente invención tiene la ventaja de reducir los costes de manipulación de las cosechas asociados con la producción de semillas híbridas F1, facilita el control de la pureza de las semillas híbridas, y mantiene líneas parentales.

10 En una aplicación particular, la presente invención se refiere a la producción de plantas parentales masculinas y femeninas, que se hacen estériles usando técnicas de ingeniería molecular. La esterilidad de estas plantas se puede invertir usando una aplicación química, que conduce a la restauración de la fertilidad.

15 La antera es el sitio de los procesos reproductivos masculinos en plantas en floración. Está compuesta de varios tejidos y tipos celulares, y es responsable de producir granos de polen que contienen las células de esperma. El tapetum es un tejido especializado que juega un papel crítico en la formación del polen. Rodea al saco de polen de forma temprana en el desarrollo del polen, se degenera durante las últimas etapas del desarrollo, y no está presente en una forma organizada en la antera madura. El tapetum produce un número de compuestos que ayudan al desarrollo del polen o se incorporan en la pared externa del polen, y se ha demostrado que muchas de las mutaciones de esterilidad masculina naturales tienen una diferenciación o función alterada del tapetum. Por lo tanto, el tejido tapetal es crítico para la formación de granos de polen funcionales.

20 Se ha identificado y clonado un número de genes que son expresados específicamente en el tejido tapetal. Estos incluyen Osg6B, Osg4B (Tsuchiya et al. 1994, Yokoi, S et al. 1997), pE1, pT72 (documento WO9213957), pCA55 del maíz (documento WO92/13956), TA29, TA13 (Seurinck et al. 1990), RST2 del maíz (documento WO9713401), MS14,18,10 y A6, A9 de *Brassica napus* (Hird et al. 1993).

25 Se ha demostrado que un promotor específico del tapetum, aislado del arroz, da lugar a plantas estériles masculinas cuando se usa para dirigir la expresión de β 1,3-glucanasa en tabaco (Tsuchiya et al.1995). El promotor específico del tapetum TA29 se ha usado para producir tabaco estéril masculino (Mariani et al. 1990), y pC55, pE1 y pT72 para producir trigo estéril masculino (De Block et al. 1997) cuando se dirige la expresión de barnasa.

30 Se han obtenido clones específicos del polen a partir de un número de especies, incluyendo maíz (Hanson et al. 1989, Hamilton et al. 1989,) y tomate (Twel et al. 1990, 1991).

Se han aislado clones específicos de anteras a partir de un número de especies Bp4A y C de *Brassica napus* (Albani et al. 1990), chs de petunia (Koes et al. 1989), arroz (Xu et al. 1993, Zou et al. 1994), entre otros.

35 Se pueden obtener homólogos de trigo de estos clones y de otros mediante métodos tales como PCR degenerada, utilizando secuencias encontradas en la bibliografía, y la identificación subsiguiente de genotecas de trigo y de otros, y el análisis de la especificidad tisular usando la expresión de genes informadores. Estos métodos están bien documentados en la bibliografía.

40 En plantas superiores, el órgano reproductor femenino está representado por el pistilo, compuesto del ovario, estilo y estigma. Se ha demostrado que el gineceo contiene hasta 10.000 ARNm diferentes no presentes en otros órganos (Kamalay y Goldberg 1980). Estos incluyen genes reguladores responsables de controlar el desarrollo del pistilo, así como aquellos "aguas abajo" que codifican proteínas asociadas con tipos celulares diferenciados en el pistilo. Los genes que gobiernan la autoincompatibilidad y sus homólogos son una clase de genes con patrones de expresión predominante en el pistilo (Nasrallah et al. 1993). Otros genes clonados incluyen β glucanasa (Ori et al. 1990), pectato liasa (Budelier et al. 1990) y quitinasa (Lotan et al. 1989), que son expresados en el tejido transmisor, y un inhibidor de proteínasa (Atkinson et al. 1993) que es expresado en el estilo. Otros están relacionados con la patogénesis, o son homólogos de genes implicados en la ruptura de los enlaces glucosídicos. Estas enzimas pueden facilitar el crecimiento del tubo del polen mediante la digestión de proteínas en el tejido mediante el cual crece el tubo del polen.

45 Se ha identificado un número de mutantes estériles femeninos en *Arabidopsis*. Por ejemplo, sin1 (integumento corto) (Robinson-Beers et al. 1992) y bel1 (bell) (Robinson-Beers et al. 1992) afectan al desarrollo del óvulo. La mutación Aintegumenta bloquea la megasporogénesis en la etapa de tétrada (Elliot, R.C, et al. 1996, Klucher.K.M, 1996). Se ha observado en el maíz pero no se ha clonado una mutación de óvulo 2 letal (Nelson et al. 1952). Se han clonado endoquitinasas básicas específicas del pistilo a partir de un número de especies (Ficker et al. 1997, Dzelzkalns et al. 1993, Harikrishna et al. 1996, Wemmer et al. 1994), y se ha demostrado que los genes similares a extensina son expresados en los estilos de *Nicotiana glauca* (Chen C-G, et al. 1992).

55 Los siguientes son clones específicos del óvulo: ZmOV23.13 (Greco R., et al. sin publicar), OsOsMAB3A (Kang H.G., et al. 1995), ZmZmM2 (Theissen G., et al. 1995), y específicos del estigma: sitg1 (Goldman, M.H et al. 1994), STG08, STG4B12 (documento EP-412006-A). Goldman et al. usaron el promotor del gen de STIG1 para dirigir la

expresión de barnasa en la zona secretora estigmática. Esto conduce a flores que no tienen zona secretora en los pistilos, y de este modo fueron estériles femeninas. Los granos de polen fueron capaces de germinar, pero fueron incapaces de penetrar la superficie.

5 Se han aislado de la orquídea siete ADNc específicos del óvulo (Nadeau et al. 1996). Nuevamente, los homólogos de trigo de estos y de muchos otros se pueden obtener mediante técnicas de biología molecular estándar.

Se describe además la identificación de genes que impactan sobre la esterilidad masculina y femenina. Tales genes se pueden usar en una variedad de sistemas para controlar la fertilidad.

10 Se ha revisado el procedimiento para marcar genes de maíz con elementos transponibles (Doring, 1989). Uno de los métodos que se puede usar es cruzar una línea de maíz que posee elementos transponibles activos y un alelo dominante del gen diana con una cepa de maíz normal que no posee elementos transponibles. La progenie procedente del cruzamiento se puede autopolinizar e identificar en busca de las mutaciones más deseables, es decir, aquellas que conduzcan a esterilidad. Las plantas estériles representan casos potenciales en los que un elemento transponible se ha transpuesto a un locus que posee un gen esencial para la fertilidad. Los genes se pueden recuperar entonces de muchas maneras. La patente US 5.478.369 describe el aislamiento, mediante este
15 método, de un gen descrito como MS45.

20 Se ha identificado un gen de fertilidad masculina en *Arabidopsis thaliana* usando el sistema marcador de transposon *EnSpm-l/dSpm* para obtener un mutante de esterilidad masculina 2 (*ms2*) y el gen MS2 (Aarts et al. 1993). Se ha demostrado que este gen MS2 está implicado en la gametogénesis masculina, la síntesis de la pared celular no se produce después de la meiosis de las células madre de las microsporas, y las microsporas se degradan eventualmente. Se han identificado homólogos de MS2 en *Brassica napus*, *Zea Mays*, y a un marco de lectura abierto encontrado en ADN mitocondrial de trigo. Por lo tanto, el aislamiento de genes críticos para la fertilidad en *Arabidopsis* puede conducir a la clonación de homólogos en otras especies. Este enfoque se ha tomado claramente para aislar otros genes críticos para la fertilidad.

25 Ahora hay pruebas de la existencia de regiones amplias de colinealidad conservada entre especies de pastos a nivel genético. Ahn y Tanksley (1993) demostraron la relación entre arroz y maíz, y Kurata et al (1994) demostraron que el genoma del trigo se podría alinear con el arroz, y Moore et al (1995) demostraron que los tres mapas se podrían alinear. Esto abre la vía al uso del cartografiado genómico comparativo como medio para aislar genes.

30 El enfoque de microsintenia para clonar genes se basa en la similitud emergente en el orden génico y de los marcadores moleculares entre especies evolutivas relacionadas. Este enfoque es particularmente atractivo para especies de cereales de grandes genomas de importancia agrícola, como trigo, maíz y cebada, que pueden aprovecharse de su pariente genómico pequeño, el arroz. Kilian et al. (1997) informan del progreso sobre la clonación a base de mapas de los genes *Rpg1* y *rpg4* de la cebada, usando arroz como vehículo de cartografiado intergenómico.

35 Puesto que el enfoque anterior está limitado a genes diana que se han cartografiado genéticamente, se está desarrollando en el arroz, usando el sistema *Ac/Ds* del maíz, Izawa et al (1997), un método alternativo de aislamiento génico, que es un sistema de marcaje de transposición efectivo.

Se ha sugerido como útil un número de métodos para inactivar genes necesarios para la fertilidad, o para producir compuestos citotóxicos en los tejidos para evitar el desarrollo normal de gametofitos.

40 La solicitud de patente internacional n° WO9942598 describe un método para inhibir la expresión génica en un tejido vegetal diana usando un gen interruptor seleccionado de UUIT, tubulinas, T-urf, subunidades de ATP-asa, cdc25, ROA, MOT.

Hay otros varios sistemas inactivadores conocidos. Por ejemplo, barnasa (Mariani et al. 1990), la cadena A de la toxina de la difteria, pectato liasa. Dos ejemplos de la expresión de compuestos citotóxicos descritos previamente son la expresión de avidina e lamH/lamS.

45 Se ha demostrado que la expresión de β 1,3-glucanasa en células tapetales genera plantas estériles masculinas (Worrall et al. 1992). El mecanismo antisentido se ha propuesto como un mecanismo mediante el cual se puede reducir la expresión de genes críticos para el desarrollo de polen, y se ha demostrado (Van der Meer 1992) que la inhibición antisentido de la biosíntesis de flavonoides conduce de hecho a la esterilidad masculina. Se ha reivindicado que la reducción de la expresión de flavanol en maíz da como resultado esterilidad masculina (documento WO 9318171, Pioneer Hi-Bred International). También se han descrito otros mecanismos (Spena et al.
50 1992).

55 Baulcombe (1997) describe un método de silenciamiento génico en plantas transgénicas vía el uso de vectores de ARN vírico replicable (Amplicons™), que también puede ser útil como un medio para desactivar la expresión de genes endógenos. Este método tiene la ventaja de que produce una mutación dominante, es decir, es puntuable en el estado heterocigoto y desactiva todas las copias de un gen seleccionado como diana, y también puede desactivar las isoformas. Esto es una clara ventaja en el trigo, que es hexaploide. La fertilidad se podría restaurar entonces

usando un promotor inducible para llevar a cabo la expresión de una copia funcional del gen desactivado.

Kempin et al. (1997) dan a conocer la interrupción seleccionada de un gen funcional usando recombinación homóloga. Sin embargo, este método produce normalmente una mutación recesiva, es decir, es puntuable sólo en el homocigoto. Para ser detectable en el estado heterocigoto, tendría que ser directamente letal o, por ejemplo, provocar un bloqueo en una ruta de manera que hubiese una acumulación de un compuesto citotóxico, que conduzca a la letalidad. A fin de detectar una mutación de esterilidad, sería necesario generar un homocigoto recesivo por autopolinización, en el que uno de cuatro de la progenie sería estéril. El constructo conmutador que permite la expresión del gen desactivado tendría que ser introducido en un heterocigoto obtenido mediante retrocruzamiento del homocigoto. Éste es un método potencialmente útil para generar los mutantes recesivos necesarios para el método descrito más tarde en el Ejemplo 1.

Las ribozimas son moléculas de ARN capaces de catalizar reacciones de ruptura endonucleolítica. Pueden catalizar reacciones en trans, y se pueden dirigir a diferentes secuencias y por lo tanto son alternativas potenciales al antisentido como medio para modular la expresión génica (Hasselhof y Gerlach). Wegener et al (1994) han demostrado la generación de una mutación dominante en trans mediante expresión de un gen de ribozima en plantas.

Se conocen varios métodos para alterar los sistemas de autoincompatibilidad de las plantas modificando la expresión del gen S como medio para introducir la esterilidad masculina, en los que una planta se transforma con un constructo que utiliza un gen S gametofítico que codifica una ribonucleasa, de tal manera que una planta autoincompatible se convierte en autocompatible, o una planta autocompatible se convierte en autoincompatible, evitando así la autopolinización.

Los ejemplos de combinaciones de genes interruptores/restauradores incluyen barnasa y barstar, y TPP y TPS. Se ha descrito el uso del sistema de barnasa/barstar para generar en primer lugar esterilidad y después restaurar la fertilidad (Mariani et al. (1992)). La trehalosa fosfato fosfatasa (TPP), cuando se expresa en células tapetales de tabaco usando el promotor específico del tapetum Tap1 (Nacken et al 1991) de *Antirrhinum*, da como resultado esterilidad masculina. Se piensa que es como resultado de cambiar la capacidad metabólica y fotosintética de hidratos de carbono de los tejidos en los que se expresa. Las anteras muestran signos de necrosis, y cualquier polen producido está muerto. El retrocruzamiento con tabaco de tipo salvaje da como resultado el desarrollo de semillas normales. El análisis de la progenie muestra que la esterilidad se segrega con el transgén. TreC, trehalosa-6-fosfato hidrolasa, es un segundo gen cuya expresión perturba los niveles de trehalosa-6-fosfato, y se ha demostrado que, cuando se expresa usando el promotor constitutivo de plastocianina, el resultado es la escisión del capullo antes de la floración. De este modo, si la expresión se limita al tapetum, se puede producir esterilidad masculina de la misma manera como cuando se expresa TPP en el tapetum. También se ha demostrado que, después de la aplicación de GA, los capullos florales permanecen en la planta, y se produce algún polen, conduciendo en algunos casos a la producción de semillas.

También se ha demostrado que la expresión equimolar simultánea de trehalosa fosfato sintasa (TPS) y TPP no da ningún efecto sobre la fisiología vegetal, es decir, TPS contrarresta el efecto de TPP en la capacidad metabólica y fotosintética de los hidratos de carbono de tejidos en los que se expresan. También se ha demostrado que es posible restaurar la fertilidad retransformando líneas de tabaco estériles con un constructo que expresa TPS en el tapetum. Claramente, la expresión de TPS también se podría poner bajo control de un promotor inducible para permitir que se restaurase la fertilidad cuando se desee, o la optimización de la aplicación de GA podría ser un medio alternativo para restaurar la fertilidad. El promotor procedente de un gen expresado específicamente en los tejidos que rodean al óvulo o en el óvulo, tal como el gen FBP7 de la caja MADS, se podría usar para llevar a cabo la expresión de TPP o TreC para obtener esterilidad femenina. Es probable que se requiera cierta optimización del uso de codones para obtener el mismo efecto en una planta de cosecha de monocotiledóneas, tal como trigo o maíz (Merlo y Folkerts), (Seed y Haas).

El uso de un número de sistemas de operadores/represores se ha descrito como medio para controlar la expresión génica en plantas. Wilde et al. demostraron el uso del sistema *lac* de *E. coli* para reprimir la expresión de GUS bajo el control del promotor *cab* del maíz (expresión de *lac* I dirigida por el promotor 35S CaMV). Se insertaron secuencias operadoras en diversas posiciones en el promotor CAB, y se evaluó el grado de represión. Dependiendo de la posición de las secuencias operadoras, se observó un intervalo de represión. Cuando la secuencia operadora se incorporó mediante sustitución entre la caja TATA y el comienzo de la transcripción, se obtuvo una represión de ~90%. Esta represión se puede aliviar mediante la adición de IPTG. Esto se demostró tanto en protoplastos del tabaco como en transformantes estables.

Lehming et al. informan que se pueden lograr cambios drásticos en la afinidad de unión mediante la modificación de aminoácidos en la hélice de reconocimiento del represor *lac*, dando así un control más estricto de la expresión. Se han descrito otros sistemas, e incluyen el sistema del promotor inducible por tetraciclina, desarrollado por Gatz et al. (1991, 1992), en el que un promotor 35S CaMV modificado es reprimido en plantas que expresan niveles elevados de la proteína represora de tetraciclina, pero se restaura cuando se añade tetraciclina.

La inducción de la actividad proteica mediante esteroides puede proporcionar un sistema de expresión inducible

químicamente, que no sufre de problemas de toxicidad química. Los dominios de unión a ligando de receptores de esteroides de mamíferos y de insectos, tales como el receptor de glucocorticoides (GR), el receptor de estrógenos, se pueden usar para regular la actividad de proteínas en células de mamíferos (Picard et al. 1993). Un dominio de unión a ligando fusionado a una proteína mantiene la proteína en un estado inactivo hasta que se introduce el ligando. Lloyd et al. (1994) describen una fusión de un regulador transcripcional del maíz con GR. Simon et al. (1996) describen una fusión de GR con un producto génico del tiempo de floración de *Arabidopsis* responsable de la inducción de la transcripción, y Aoyama et al. (1995) describen una fusión de Gal4 o VP16 con una proteína transactivadora vegetal, Athb-1, colocada bajo control de esteroides por medio del dominio de unión a ligandos de GR. Se sabe que la capacidad de los activadores transcripcionales para unirse a ADN y para activar simultáneamente la transcripción está localizada en dominios definidos de tales factores de transcripción. Se ha demostrado, (Ptashne 1988) y Mitchell y Tijan (1989), que los factores activadores transcripcionales están hechos de módulos que funcionan independientemente. Ptashne y Gann (1980), y otros, han demostrado que es posible combinar una porción responsable de la activación de la transcripción de un factor con una porción de unión a ADN de otro factor, y que la proteína híbrida resultante es activa en células de levadura. Un sistema que incorpora estos componentes se puede usar para aliviar la represión e inducir así la expresión de genes de manera controlada.

También se ha descrito el uso de hormona juvenil o uno de sus agonistas como un ligando químico para controlar la expresión génica en plantas mediante transactivación mediada por receptores.

Preferiblemente, el sistema conmutador usado para expresar de forma inducible el gen restaurador es el sistema conmutador de AlcA/R. Se ha demostrado la expresión inducible de GUS en anteras y polen de tomate, y se han introducido constructos similares en trigo para demostrar la expresión de GUS en tejido masculino y femenino usando el sistema conmutador de AlcA/R. También se ha demostrado la expresión inducible de GUS en borlas, barbas, embriones y endospermo de maíz usando el sistema conmutador de GST inducible por un protector (Jepson et al. 1994). Por supuesto, en la presente invención también pueden ser útiles otros sistemas conmutadores.

La expresión de genes citotóxicos o interruptores durante la transformación vegetal como resultado de expresión "permeable" desde los promotores específicos de flores masculinas y femeninas a un nivel muy bajo en tejidos distintos del tejido diana puede provocar la muerte celular y la falta de recuperación de los transformantes. Los promotores inducibles usados en la presente invención para dirigir la expresión de los genes restauradores pueden ofrecer cierta protección frente a esta posibilidad, por las siguientes razones.

En el caso del promotor GST-27, se ha observado la expresión constitutiva en callo. En el caso del promotor AlcA, que es inducido con etanol, se ha observado la inducción de la expresión de GUS a concentraciones de 7 ng/100 ml de aire. Esta concentración de etanol se puede añadir al medio de cultivo tisular para asegurar la expresión del gen restaurador.

Los ejemplos de combinaciones de genes interruptores/restauradores incluyen barnasa y barstar, y TPP y TP.

En la presente invención, se prefiere el uso de secuencias potenciadoras de la traducción, en particular la secuencia Ω de TMV (Gallie et al.), para dar un incremento en los niveles de expresión a partir de los promotores específicos de tejidos constitutivos y promotores inducibles, de manera que la expresión del gen restaurador, por ejemplo barstar, excede sobradamente la que se necesita para inhibir el gen interruptor, por ejemplo barnasa, que se está produciendo. Gallie et al. demostraron que la traducción de los ARNm procariotas y eucariotas está potenciada enormemente por un derivado contiguo de la secuencia líder de 5', de 68 nucleótidos, de la cepa U1 del virus del mosaico del tabaco, denominada Ω . También se ha demostrado que otras varias secuencias líder víricas potencian la expresión, tal como el virus del mosaico de la alfalfa (AIMV) y el virus del mosaico de la retama (BMV). En protoplastos del mesófilo del tabaco, se observa una potenciación de ~20 veces. También se pueden usar en la presente invención otras secuencias potenciadoras, por ejemplo el virus del grabado del tabaco.

Además, el uso de secuencias intrónicas para potenciar los niveles de expresión está muy bien documentado. Entre aquellas estudiadas está la secuencia del intrón 1 del maíz *adh1*, que se ha demostrado que incrementa los niveles de expresión 12-20 veces cuando se inserta en secuencias traducidas de 5' en constructos quiméricos introducidos en protoplastos del maíz (Mascarenhas et al. 1990), y el intrón *Sh 1*, también del maíz. La inclusión de este intrón en constructos en los que el promotor CaMV35S dirigió la expresión de CAT dio como resultado incrementos de entre 11 y 90 veces (Vasil et al 1989).

Los niveles de expresión de los genes restauradores e interruptores también se pueden balancear o modular de las siguientes maneras. Se podría usar un promotor que da niveles elevados de expresión para llevar a cabo la expresión del gen restaurador, mientras que se podría usar un promotor que da niveles más bajos de expresión para llevar a cabo la expresión del gen interruptor. Esto aseguraría que el producto del gen interruptor está inundado por el producto del gen restaurador, inactivando de ese modo todas las moléculas citotóxicas o interruptoras, permitiendo la restauración completa de la fertilidad. Una manera adicional de modular los niveles de expresión se podría llevar a cabo usando mutagénesis para cambiar la secuencia alrededor del codón de iniciación AG, de tal manera que la expresión del gen interruptor no es óptima (Kozak (1989)), y por lo tanto está disminuida.

Los sistemas de expresión se pueden introducir en una planta o célula vegetal vía cualquiera de los métodos

disponibles, tales como transformación por *Agrobacterium*, electroporación, microinyección de células vegetales y protoplastos, bombardeo de microproyectiles, bombardeo bacteriano, particularmente el método de "fibra" o "filamento", dependiendo de la especie vegetal particular a transformar. Las células transformadas se pueden regenerar entonces en casos adecuados en plantas completas, en las que el nuevo material nuclear se incorpora de forma estable en el genoma. De esta manera se pueden obtener plantas transformadas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. Para detalles completos de los métodos conocidos, se puede hacer referencia a la bibliografía.

Christou y Heie (1997) describen la transformación de arroz usando metodología de bombardeo y el progreso en la transformación del arroz mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Otros métodos publicados para transformar trigo incluyen Becker et al (1994), que describen el uso de bombardeo de microproyectiles de tejido escutelar, y Vasil et al (1993), que describen la generación rápida de trigo transgénico tras el bombardeo directo de embriones inmaduros. La Figura 22 describe líneas cronológicas para la transformación de trigo mediante bombardeo.

En el proceso de transformación, es necesario el uso de marcador seleccionable para seleccionar transformantes que poseen los constructos de esterilidad. Éste podría ser un marcador seleccionable de antibióticos, o un gen de resistencia a herbicidas. El uso de un gen de resistencia a herbicidas u otro marcador no es esencial (pero se puede considerar que es conveniente) para el procedimiento de la producción de semillas híbridas. Las plantas hemicigotas usadas en el método de la presente invención se pueden tratar con un compuesto químico para inducir la expresión de los genes restauradores, que permiten que se produzca la autopolinización. La progenie de esta autopolinización será segregante, y se puede hacer crecer, se puede tratar con un compuesto químico y se puede autopolinizar. La progenie de líneas homocigotas no se segregarán para fertilidad. Entonces se puede llevar a cabo una repetición del procedimiento para engrosar la semilla estéril homocigota.

Los componentes individuales de los casetes de expresión de la presente invención se pueden proporcionar en uno o más vectores individuales. Estos se pueden usar para transformar o cotransformar células vegetales para permitir que tenga lugar la interacción apropiada entre los elementos.

La presente descripción se describirá ahora mediante ejemplos, en los que se ha de hacer referencia a las Figuras que se acompañan, en las que:

La Figura 1 muestra una representación esquemática de casetes de expresión usados en un método de producción de semillas híbridas que usa un progenitor femenino estéril masculino recesivo homocigoto.

Las Figuras 2a y 2b muestran la generación de semillas híbridas F1 a partir de un progenitor femenino estéril masculino recesivo homocigoto y un progenitor masculino estéril femenino, y la segregación en la generación F2.

La Figura 3 muestra una representación esquemática de casetes de expresión usados en un procedimiento de producción de semillas híbridas.

La Figura 4 muestra una representación esquemática de un casete de expresión usado en la producción de una planta progenitora fértil femenina estéril masculina usando un promotor específico de flor masculina y un promotor específico de tejido femenino.

La Figura 5 muestra una representación esquemática de un casete de expresión usado en la producción de una planta progenitora masculina estéril femenina usando un promotor específico de flor masculina y un promotor específico de flor femenina.

Las Figuras 6a, 6b y 6c muestran la generación de plantas híbridas F1 usando una planta progenitora femenina estéril masculina y una planta progenitora masculina estéril femenina, ambas bajo el control de promotores esporofíticos, y la generación de las semillas híbridas F1 y la segregación de la progenie F2.

Las Figuras 7a, 7b y 7c muestran la generación de plantas híbridas F1 usando una planta progenitora femenina estéril masculina y una planta progenitora masculina estéril femenina, estando la esterilidad masculina bajo el control de un promotor gametofítico, y estando la esterilidad femenina bajo el control de un promotor esporofítico, y la generación de semillas híbridas F1 y la segregación de la progenie F2.

La Figura 8 muestra el vector de transformación vegetal binario pMOG1006.

La Figura 9 muestra el vector de transformación vegetal binario pMOG1006-FSE.

La Figura 10 muestra el vector de clonación pFSE4.

La Figura 11 muestra la expresión de GST en diversos tejidos de maíz mediante análisis northern.

La Figura 12 muestra la expresión inducible del gen informador GUS en hoja de tabaco mediante el promotor GST.

La Figura 13 muestra la expresión inducible del gen informador GUS en hoja de maíz mediante el promotor GST.

- La Figura 14 muestra la expresión inducible del gen informador GUS en borlas de maíz mediante el promotor GST.
- La Figura 15 muestra la expresión inducible del gen informador GUS en el endospermo de maíz.
- La Figura 16 muestra las estrategias de clonación de pPUG y RMS-3.
- La Figura 17 muestra el vector pGSTTAK.
- 5 La Figura 18 muestra el vector RMS-3.
- La Figura 19 muestra el mapa de pSRN.AGS, un vector de expresión de GUS inducible para uso en especies dicotiledóneas.
- La Figura 20 muestra la estrategia de clonación para pSRN.AGS, un vector de expresión de GUS inducible para uso en especies de dicotiledóneas.
- 10 La Figura 21 muestra el mapa de pUIRN.AGS, un vector de expresión de GUS inducible para uso en especies monocotiledóneas.
- La Figura 22 muestra las líneas cronológicas para la transformación de trigo mediante bombardeo.
- La Figura 23 muestra el mapa de pSRN.
- La Figura 24 muestra el mapa de pAGS.
- 15 La Figura 25 muestra el mapa de pMOG1006-SRN.AGS, un vector de transformación del arroz.
- La Figura 26 muestra el mapa de pGUN.
- La Figura 27 muestra el mapa de pdvh405.
- La Figura 28 muestra Tap1AlcR-AlcAGluGUSIntnos.
- La Figura 29 muestra Stig1AlcR-AlcAGluGUSIntnos.
- 20 La Figura 30 muestra el vector de transformación del maíz Zm/RMS14.
- La Figura 31 muestra pMOG1006-C5-GUS, un vector de transformación del arroz.
- La Figura 32 muestra el vector de clonación pFSE.
- La Figura 33 muestra pMOG1006-MFS14-GUS, un vector de transformación del arroz.
- La Figura 34 muestra el Casete A, MFS14-barnasa/barstar-nos.
- 25 La Figura 35 muestra el Casete B, C5-barnasa/barstar-nos.
- La Figura 36 muestra el Casete C, CaMV 35S-AlcR-nos.
- La Figura 37 muestra el Casete D, AlcA.Glu11-barstar-nos.
- La Figura 38 muestra el Casete E, MFS14.Glu11-barstar-nos.
- La Figura 39 muestra el Casete F, Stig1-barnasa/barstar-nos.
- 30 La Figura 40 muestra el Casete G, Stig1.Glu11-barstar-nos.
- La Figura 41 muestra RMS30.
- La Figura 42 muestra RMS32.
- La Figura 43 muestra la expresión de GUS en callo de tabaco Alc-GUS transgénico y de tipo salvaje no inducido e inducido por etanol.
- 35 La Figura 44 muestra la expresión de GUS en anteras de tabaco Alc-GUS transgénicas y de tipo salvaje inducidas por vapor de etanol y no inducidas.
- La Figura 45 es igual que antes, pero la inducción se realiza mediante empapamiento de las raíces con agua y etanol.
- 40 La Figura 46 muestra la expresión de GUS en pistilos no inducidos e inducidos a partir de capullos de flores de tabaco de 9-10 mm.

La Figura 47 muestra la expresión de GUS en pistilos no inducidos e inducidos a partir de capullos de flores de tabaco de 17-22 mm.

La Figura 48 muestra la expresión de GUS en pistilos no inducidos e inducidos a partir de capullos de flores de tabaco de 33-35 mm.

5 La Figura 49 muestra la expresión de GUS en flores de colza no inducidas e inducidas.

La Figura 50 muestra la flor de colza no inducida.

La Figura 51 muestra la expresión de GUS en pistilos de colza, dos días después de la inducción por empapamiento de las raíces.

Las Figuras 52 a 55 muestran la expresión de GUS en el estigma y el estilo de flores de colza inducidas por etanol.

10 La Figura 56 muestra pistilos de colza de tipo salvaje y Alc-GUS inducidos por agua.

La Figura 57 muestra pistilos de colza Alc-GUS, dos días después del empapamiento de las raíces con etanol al 2%.

La Figura 58 muestra pistilos Alc-GUS tratados con agua y tratados con etanol al 5%.

La Figura 59 muestra la flor de colza tras la inducción.

15 La Figura 60a muestra la expresión de GUS en anteras de tomate, dirigida por el promotor Alc A, y la 60b muestra la expresión de GUS en polen de tomate, dirigida por el promotor AlcA.

La Figura 61 muestra la secuencia de ADN que codifica la secuencia del promotor ZmC5 en el maíz.

La A subrayada es el punto de inicio transcripcional putativo, y el ATG en negrita y subrayado es el punto de inicio traduccional.

EJEMPLO 1

20 En este ejemplo, la planta progenitora masculina es fértil masculina y estéril femenina homocigota como resultado de una mutación natural o manipulada. La planta progenitora femenina es estéril masculina recesiva homocigota y fértil femenina. La esterilidad masculina se puede manipular genéticamente o se puede introducir mediante cruzamiento, o podría ser debida a una mutación natural. Por ejemplo, podría ser debida a una mutación en un gen, tal como MS45, que se ha demostrado que actúa de manera recesiva, conduciendo solamente a esterilidad cuando es homocigoto.

25 Las líneas parentales también contienen una secuencia de ADN que codifica un promotor inducible enlazado operablemente a una copia funcional del gen de la esterilidad, restaurando así la fertilidad con el fin de mantener las líneas parentales femenina y masculina, respectivamente (véase la Figura 1).

30 El cruzamiento de estas dos plantas progenitoras genera híbridos F1 que son heterocigotos para los alelos recesivos de esterilidad masculina y esterilidad femenina, y por lo tanto son completamente fértiles. Sin embargo, si el granjero cosecha y hace crecer la semilla F1, la generación F2 se segrega para esterilidad, conduciendo a una pérdida de heterosis y producción puesto que aproximadamente 25% de las plantas femeninas son estériles (véanse las Figuras 2a, 2b y 2c).

Aunque se conocen mutaciones recesivas femeninas en el maíz, los genes todavía no se han clonado.

35 EJEMPLO 2

Se ha formulado un segundo método para producir semillas híbridas basándose en la esterilidad provocada enteramente por manipulación genética (véase la Figura 3).

PROGENITOR FEMENINO

40 El progenitor femenino es una línea estéril masculina, es decir, un gen inactivante es expresado por un promotor esporofítico masculino, evitando de ese modo la producción de polen funcional viable. Además, un gen restaurador es expresado en los tejidos femeninos. La autofertilidad se puede restaurar por medio de un promotor inducible enlazado a un gen restaurador. La transformación con tal casete de expresión (véase la Figura 4) conduce a plantas hemocigotas MS R^F R^{CS} -----.

R^{CS} = fertilidad masculina y femenina químicamente restaurable.

45 MS = esterilidad masculina dominante.

R^M = restaurador de la fertilidad masculina dominante.

FS = esterilidad femenina dominante.

R^F = restaurador de la esterilidad femenina dominante.

Para obtener plantas homocigotas para uso en la producción de semillas híbridas, la planta hemicigota debe ser inducida con un inductor químico exógeno, tal como etanol en el caso del conmutador génico Alc A/R, y se debe dejar que se autopolinice.

5

Gametos	MS R ^F R ^{CS}	-----
MS R ^F R ^{CS}	MS R ^F R ^{CS}	-----
-----	MS R ^F R ^{CS}	MS R ^F R ^{CS}
	-----	-----
	MS R ^F R ^{CS}	-----

Tres cuartos de las plantas producen polen 100% estéril, ya que el gen de la esterilidad tiene un efecto dominante; sólo la línea nula es fértil masculina. La planta homocigota se puede distinguir de las plantas heterocigotas haciendo crecer la semilla que resulta de la autopolinización para repetir el procedimiento de inducción y autopolinización. La progenie de éstas se segregará para esterilidad, y se puede puntuar fácilmente, dependiendo del genotipo, como se describe anteriormente. También se podría usar para la puntuación un gen de resistencia a herbicidas u otro gen marcador seleccionable. En el caso de la planta homocigota, toda la progenie será estéril masculina y resistente a herbicidas; en el caso de la heterocigota, la progenie continuará segregándose para esterilidad.

10

De este modo, la línea estéril masculina homocigota, fértil femenina homocigota se puede seleccionar de esta manera.

15

PROGENITOR MASCULINO

La planta progenitora masculina es completamente fértil masculina, pero es estéril femenina, es decir, estéril femenina homocigota, fértil masculina. En este caso, la esterilidad femenina es provocada expresando, en órganos florales femeninos, un gen inhibidor que es pernicioso para el desarrollo de órganos florales femeninos, como se define anteriormente. Como alternativa, el tubo del polen se puede destruir, o se puede evitar de otro modo que la planta desarrolle la semilla. Un gen restaurador también es expresado en los tejidos florales masculinos.

20

La planta progenitora masculina se obtiene de la misma manera que la planta progenitora femenina, pero usando el constructo mostrado en la Figura 5. En este caso, las plantas hemicigotas tienen el genotipo:

FS R^M R^{CS}

25

y la plantas homocigotas tendrán el genotipo

FS FS R^M R^M R^{CS} R^{CS}

EJEMPLO 3

En este ejemplo, el casete de expresión comprende un promotor gametofítico (por ejemplo, específico de polen) (véase la Figura 5). La planta progenitora masculina es como se describe en el Ejemplo 2 anterior. Los ejemplos de promotores específicos del polen incluyen Zm13 (Hanson et al.) y C5, depositado en The National Collection of Industrial and Marine Bacteria como NCIMB 40915 el 26 de enero de 1998. La secuencia promotora C5 se muestra en la Figura 61. Una vez más se debe obtener la línea estéril masculina homocigota, y las plantas hemicigotas se tratan químicamente y se autopolinizan.

30

Gametos	MS R ^f R ^{CS}	-----
MS R ^F R ^{CS}	MS R ^F R ^{CS}	-----
	MS R ^f R ^{CS}	-----
	-----	-----
	MS R ^F R ^{CS}	-----

35

En este caso, la línea homocigota, es decir, MS MS R^F R^F R^{CS} R^{CS} produce polen 100% estéril, que se puede identificar mediante tinción con DAPI. Éste se puede distinguir del polen procedente de la planta heterocigota, que produce polen 50% estéril y 50% fértil, que también es identificable mediante tinción con DAPI.

De este modo, se puede seleccionar la línea MS MS R^F R^F R^{CS} R^{CS}.

Por lo tanto, se puede observar que ni la planta homocigota masculina ni la femenina se pueden autopolinizar.

40

La planta progenitora femenina en los Ejemplos 2 y 3 posee un casete de expresión que comprende un promotor

específico femenino que dirige la expresión de un gen restaurador, y la planta progenitora masculina posee un casete de expresión que comprende un promotor específico masculino que dirige la expresión de un gen restaurador. En las plantas progenitoras, estos casetes de expresión no tienen ningún efecto sobre la fertilidad, debido a la especificidad de los promotores.

5 Sin embargo, cuando estas dos líneas progenitoras se cruzan, el resultado depende de si se ha usado un promotor gametofítico (por ejemplo, específico del polen) o un promotor esporofítico (por ejemplo, específico del tapetum), para producir esterilidad masculina en el progenitor femenino. Cuando se usa un promotor esporofítico, se logra una restauración completa de la fertilidad, y la semilla F1 es completamente fértil, es decir, produce polen aproximadamente 100% fértil (véanse las Figuras 6a, 6b). Sin embargo, si se retiene la semilla F1 y se hace crecer por el granjero, la esterilidad se segrega como antes (véase la Figura 6c). Si se usa un promotor gametofítico para obtener esterilidad masculina, no se logra la restauración completa de la fertilidad, puesto que el polen es haploide, y sólo alrededor de 50% del polen heredará el alelo funcional que produce fertilidad del polen (véanse las Figuras 7a, 7b). La progenie F2 se segrega como se describe previamente (Figura 7c).

10 El mantenimiento de las líneas estériles homocigotas se logra, cuando se requiere, mediante el tercer componente del sistema. Por lo tanto, cada línea parental comprende un promotor inducible, enlazado opcionalmente a una secuencia potenciadora o una o más secuencias intrónicas, dirigiendo la expresión del restaurador en todos los tejidos al aplicar el compuesto químico inductor, permitiendo de este modo la producción de polen en el progenitor femenino y el desarrollo normal del óvulo del tejido en el progenitor masculino. Entonces se puede producir la autopolinización, permitiendo el engrosamiento de la semilla parental.

15 En todos los ejemplos, la aplicación de compuestos químicos en el campo es necesario solamente para producir semillas de las líneas parentales, lo que se necesita hacer de forma poco frecuente y en una extensión relativamente pequeña de terreno.

20 En los Ejemplos descritos, es posible usar un promotor específico del tapetum (Figuras 6a, 6b o 6c) o un promotor específico del polen (Figuras 7a, 7b) para dirigir la expresión del gen inactivante. Se prefiere el uso de un promotor específico del tapetum, ya que se puede restaurar completamente la fertilidad. Sin embargo, puesto que el polen es haploide, la restauración completa de la fertilidad no es posible cuando se usa un promotor específico del polen. Sin embargo, puede haber ventajas a la hora de usar un promotor específico del polen. Por ejemplo, los promotores específicos del polen pueden tener una mayor especificidad por el tejido. El tratamiento químico de las plantas sólo es necesario para restaurar la fertilidad para permitir la autopolinización.

30 EJEMPLO 4

PREPARACIÓN DE VECTORES DE CLONACIÓN GENERALES

Todas las técnicas de biología molecular se llevaron a cabo como se describe por Maniatis et al Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (1989), Cold Spring Harbour Laboratory Press: Vols I y II (D.N. Glover ed 1985), o como recomiendan los fabricantes citados.

35 Preparación de pMOG1006-Fse

pMOG1006 (Figura 8) es un vector binario que posee como marcador seleccionable un gen de resistencia a higromicina, y se usa para la transformación del arroz mediada por *Agrobacterium*. El vector modificado se preparó dirigiendo pMOG1006 con *EcoRI* e insertado un par hibridado de oligonucleótidos complementarios que tienen las secuencias

40 Link1A AAT TGA TCG GCC GGC CCT AG

Link1B AAT TCT AGG GCC GGC CGA TC

que introduce un sitio único *FseI*. Los clones que contienen la secuencia oligonucleotídica correcta se seleccionaron mediante hibridación con el oligonucleótido link1A marcado con $\gamma^{32}\text{P}$, y los clones que contienen la secuencia en la orientación deseada se seleccionaron después de la caracterización mediante secuenciación (Figura 9).

45 pVB6

pVB6 es análogo al vector binario descrito anteriormente por cuanto contiene un sitio único *FseI* pero posee el marcador seleccionable npt11, y se usa en transformación de tabaco mediada por *Agrobacterium*.

Preparación de pFse4 (Figura 10)

50 Este vector se construyó para permitir el ensamblaje de vectores que contienen un número de casetes de expresión. Esto se logró usando sitios de reconocimiento de enzima de restricción de 8 bases raros en la región del sitio de clonación múltiple. El ADN de pFSE (Fig 32) se digirió con *FseI*, y se eliminó la región de clonación múltiple existente. Se insertaron los oligonucleótidos complementarios que tienen las secuencias:

DAA-1A:

5' CCGTTTAAACATTTAAATGGCGCGCCAAGCTTGC GGCCGCGGGAATTCGGCCGG-3'

DAA-1S:

5' CCGAATTC CGGCGGCGCCGAAGCTTGGCGCGCCATTTAAATGTTTAAACGGCCGG-3'

5 Esta secuencia introduce un sitio único *EcoRI*, *NotI*, *HindIII*, *Ascl*, *Swal* y *PmeI*, flanqueado por los sitios *FseI*. Los casetes de expresión se ensamblaron en pSK+, y se insertaron ligadores para flanquear cada casete con sitios únicos como se describe más abajo. Los casetes completos se insertaron entonces en pFSE4 según se requiera. Los casetes múltiples se pudieron eliminar entonces como un fragmento *FseI* para los vectores pMOG1006-*FseI* y VB6 descritos anteriormente.

10 EJEMPLO 5

CLONACIÓN MEDIANTE PCR DEL PROMOTOR STIG1 DEL TABACO

Un fragmento de 1,6 kb se amplificó mediante PCR a partir de 100 ng de ADN genómico de tabaco usando *PfuTurbo* DNA polymerase de Stratagene y los oligonucleótidos ST1-L2 (5'-ATTGACCTCGCCCCGAGCTGTATATG-3') y ST1-R2 (5'-GATGAGAATGAGAAGGTTGATAAAAGCC-3'). Las condiciones de termociclación fueron las siguientes:

15 95°C durante 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto, 72°C durante 4 minutos, seguido de una incubación final a 72°C durante 5 minutos. Un producto de amplificación de 1,6 kb se purificó en gel usando el kit de extracción en gel QIAquick de QIAGEN, y se ligó en el vector de Invitrogen pCR-ZERO Blunt. Se determinó la secuencia de ADN del inserto, y mostró una identidad de 100% con la secuencia de STIG1 publicada (Goldman et al 1994). El inserto se transfirió entonces, en un fragmento *SacI-NotI*, en pBluescript SK+ para manipulación posterior (pSK-STIG1).

20

EJEMPLO 6

PREPARACIÓN DE VECTORES DE TRANSFORMACIÓN VEGETAL PARA ENSAYAR LA EXPRESIÓN A PARTIR DE PROMOTORES QUÍMICAMENTE INDUCIBLES

GST-GUS

25 La caracterización del ADNc de GST27 del maíz se ha dado a conocer previamente, y los experimentos han demostrado que GST27 no es expresado constitutivamente en barbas, hoja, embrión o endospermo. Después de la aplicación del protector, la expresión se detectó en todos estos tejidos (véanse las Figuras 11 a 15). Los constructos de transformación vegetal que utilizan el promotor GST 27 para dirigir la expresión de GUS se pueden obtener como se describe en la patente US nº 5.589.614 (Figura 16). Estos son pGSTTAK (Figura 17) para la transformación del

30 tabaco, y RMS-3 (Figura 18) para la transformación del maíz. Estos vectores se pudieron usar para generar transformantes estables de tabaco y de maíz. El protector formulado se puede aplicar como una pintura de hoja (tabaco) o como un empapamiento de la raíz (maíz) como se describe en la patente mencionada anteriormente, y se observó la expresión de GUS. Los resultados para la inducción de la expresión de GUS en hojas de tabaco se muestran en la Figura 12; se produjo una inducción clara de la expresión hasta 100X. De forma similar, para el maíz,

35 ha habido una inducción de la expresión de GUS en la hoja después del tratamiento con el protector. También se observó inducción de la expresión en borlas y en tejido de endospermo y embrión. También se usó RMS-3 para transformar trigo, y se estudió la inducción de la expresión de GUS. Los vectores modificados que usan higromicina como marcador seleccionable se pudieron introducir en el arroz.

GST-Barstar

40 El vector de transformación del maíz Zm/RMS 14 (descrito más arriba) posee un gen *barstar* fusionado al promotor GST-27 inducido por protector. Se demostró mediante PCR que WU25 contiene esta fusión génica. La inversión de la esterilidad se demostró mediante aplicación de un empapamiento de la raíz del protector R-29148 a plantas que se hicieron crecer en invernadero. Las plantas tratadas mostraron un aumento del tamaño de la borla con relación a las plantas no tratadas. No hubo ningún efecto del protector sobre el tamaño o fertilidad de las borlas en plantas fértiles no transgénicas. Correlacionado con el incremento del tamaño de la borla, se observó desarrollo de

45 microsporas en muestras de anteras tomadas de muestras empapadas en la raíz en el invernadero. Se observó un efecto similar después de una aplicación foliar a plantas que se hicieron crecer en el campo, pero no en plantas no tratadas en ningún experimento. La reanudación del desarrollo de las microsporas parece estar relacionado con la inhibición de *barnasa* por *barstar*, superando de ese modo la ablación de las células tapetales. En plantas expuestas a un tratamiento prolongado con protector, la microsporogénesis ha transcurrido dando como resultado anteras

50 llenas con polen postmitótico inmaduro. Por el contrario, las anteras de plantas estériles se deshicieron.

pSRNAGS

Se construyó un vector de transformación vegetal binario, pSRNAGS (Figura 19), según la estrategia descrita en la

Figura 20. Este vector comprende el promotor quimérico 35S-Alc A, que dirige la expresión de GUS, y el promotor 35S CaMV, que dirige la expresión del gen Alc R.

pUIRN.AGS

5 Se preparó un vector a base de pUC para uso en la transformación de maíz y trigo, en el que se usó el promotor de ubiquitina enlazado al intrón de ubiquitina para dirigir la expresión del gen AlcR (Figura 21). Las líneas cronológicas para obtener trigo transgénico se muestran en la Figura 22.

pMOG1006-SRNAGS (Arroz)

10 El pSRN plasmídico (Figura 23) se digirió con *EcoRI* e *HindIII* para liberar un fragmento de 2,6 kb (AlcR-nos), que se clonó como un fragmento *EcoRI-HindIII* en pMOG1006. El fragmento del promotor 35S CaMV de 560 pb se clonó entonces en el sitio *EcoRI* para producir 35S-AlcR-nos, y se seleccionaron clones en la orientación deseada mediante análisis de secuencias (pSRN). El pAGS plasmídico (Figura 24) se digirió con *HindIII*, y se clonó un fragmento de 2,5 kb (AlcA-GUS-nos) en el sitio *HindIII* de pMOG1006-SRN para producir el constructo final denominado pMOG1006-SRN-AGS (Figura 25). La orientación del fragmento *HindIII* se determinó mediante análisis de restricción y de secuencias.

15 A fin de optimizar los niveles de expresión de AlcR en el tapetum, pistilo, polen y otros tejidos reproductivos, se prepararon los siguientes vectores usando promotores específicos de tejidos para dirigir la expresión de AlcR.

AlcA-Glu11-GUSint-nos

20 Un sitio *SacI* al final del gen GUS en pGUN (Fig 26) se cambió a un sitio *PstI* usando el kit QUIckChange según lo habitual, y se usó una digestión subsiguiente con *NcoI-SacI*, que contiene el gen GUS (+ intrón), para sustituir el gen *barstar* en el casete D (véase más tarde) para producir un vector que contiene promotor AlcA-potenciador de glucanasa-GUS-nos. Éste se cortó como un fragmento *PmeI* y se clonó en pFSE4.

Tap1-AlcR-nos-Alc A-Glu11-GUSint-nos

El AlcA-Glu11-GUSint-nos (Glu11 es la región no traducida de 5' de glucanasa) se clonó como un fragmento *PmeI* en pFSE4 cortado con *PmeI*.

25 El promotor Tap1 específico del tapetum, aislado originalmente de *Antirrhinum* y clonado ahora a partir de *pvdh405* (Figura 27), se clonó como un fragmento *EcoRI* en pSK-AlcR-nos (generado clonando el fragmento *EcoRI-HindIII* de pSRN en pSK+), y el Tap1-AlcR-nos resultante se clonó como un fragmento *NotI* en pFSE4-AlcA-Glu11-GUSint-nos. El inserto de *FseI* resultante se insertó en pVB6 para generar el vector de transformación de tabaco final (Figura 28).

Stig1-AlcR-nos-AlcA-Glu11-GUSint-nos

30 Este constructo se obtuvo como antes, excepto que el promotor Stig1 específico del aparato transmisor del pistilo, clonado a partir de tabaco (véase más abajo), se clonó como un fragmento *EcoRI-NcoI* en pSK-AlcR-nos, y se llevaron a cabo manipulaciones posteriores según lo anterior (Figura 29).

EJEMPLO 7

35 CONSTRUCCIÓN DE VECTORES PARA EVALUAR LA ESPECIFICIDAD TISULAR DE PROMOTORES MASCULINOS

pMS14-GUS

El fragmento del promotor de 5,8 Kb procedente de MFS14 (Wright et al. 1993) se fusionó al gen informador GUS. La expresión de GUS se detectó sólo en anteras en las etapas tempranas del desarrollo del capullo floral, pero no en las hojas.

40 pMS14-Barnasa

45 El mismo fragmento de promotor se fusionó a barnasa para generar el vector de transformación de maíz ZM/RMS14 (Figura 30). Esta fusión también contenía un gen *barstar* fuera del marco con un promotor bacteriano funcional para proporcionar protección frente a barnasa durante las etapas de clonación. Se obtuvieron plantas de maíz transgénicas, y varias se hicieron progresar para análisis posterior. Se estudió en particular con cierto detalle WU25 vegetal, analizando la progenie derivada de cruzamientos con polen de una planta completamente fértil. Toda progenie que hereda el transgén según se evalúa mediante PCR y se pinta en la hoja para detectar el gen pat fue completamente estéril, mientras que la progenie que carece del transgén fue completamente fértil. Las borlas estériles fueron generalmente más pequeñas que aquellas de las hermanas fértiles, y poseían anteras que carecían de polen y no se extrajo de la borla. En todos los otros aspectos, las plantas estériles fueron indistinguibles de sus hermanas no transgénicas fértiles.

pC5-GUS

Se ha aislado un clon genómico de pectina metil esterasa de maíz (denominado C5 como se muestra en la Figura 61), y el promotor se ha usado en fusiones transcripcionales con GUS para permitir el estudio de la especificidad tisular. El vector se introdujo en tabaco mediante transformación con *Agrobacterium*, y los transformantes se seleccionaron en kanamicina. Los granos de polen procedentes de anteras dehiscentes se cosecharon y se tiñeron para determinar la actividad de GUS. Dos plantas mostraron un polen con una tinción de azul de aproximadamente 50%. No se observó tinción en los controles no transgénicos. Se realizaron extractos a partir de un intervalo de tejidos que incluyen etapas de anteras en desarrollo, y se analizaron fluorométricamente para determinar la expresión de GUS. Sólo se observaron niveles muy bajos de expresión en tejidos distintos de anteras en desarrollo y anteras dehiscentes. La tinción de las microsporas indica que el tiempo de la expresión coincide bastante bien con los datos Northern, que muestran que, tanto en tabaco como en maíz transgénicos, su entorno nativo, el promotor ZmC5 funciona tardíamente en el desarrollo del polen.

pMOG1006-C5-GUS (Arroz)

Se cortó C5-GUS(bin) con *EcoRI* y *BamHI* para producir un fragmento *BamHI-EcoRI* de 2,1 kb (GUS-nos), que se clonó en pMOG1006 cortado con *EcoRI-BamHI*, y un fragmento *BamHI* de 1,9 kb (promotor C5), que se clonó subsiguientemente en este pMOG1006-GUS-nos para producir el vector final, pMOG1006-C5-GUS, y la orientación del promotor se confirmó mediante secuenciación (Figura 31).

pMOG1006-MFS14-GUS (Arroz)

El promotor MFS14 de 2,3 kb se aisló del vector RMS30 (Figura 41) usando *BamHI*, y se clonó en pFSE (Figura 32). El casete del intrón de GUS se clonó entonces a partir de pGUN como un fragmento *PstI* en el vector pFSE-MFS14. El fragmento completo MFS14-GUSint-nos se clonó entonces como un fragmento *FseI* en pMOG1006-Fse (Figura 33).

EJEMPLO 8

PREPARACIÓN DE VECTORES PARA GENERAR ESTERILIDAD Y RESTAURAR LA FERTILIDAD

Preparación del Casete A -MFS14-barnasa-nos- un casete de esterilidad masculina esporófitica dominante.

El terminador nos de RMS14 se aisló como un fragmento *EcoRI-HindIII* y se clonó en pSK+ cortado con las mismas dos enzimas. El plásmido resultante se digirió con *HindIII*, y un par hibridado de oligonucleótidos complementarios que tienen las secuencias:

Link2A AGCTTC TGG AAT TCG TCT

Link2B AGC TAG ACG AAT TCC AGA

es decir, que codifica Δ *HindIII-EcoRI-HindIII*, se ligó con el vector cortado. Las colonias transformadas putativas se extendieron en estrías sobre membranas de nailon y se sondaron de la manera habitual con el oligonucleótido Link2A etiquetado con γ ³²P. Se analizó mediante secuenciación un número de colonias positivas, y se seleccionó para manipulación posterior un clon que tiene la orientación en la que el sitio *HindIII* fue interno con relación a los dos sitios *EcoRI*. En este vector, cortado con *HindIII* y tratado con fosfatasa alcalina de gamba para evitar la religación del vector, se ligó un fragmento *HindIII* aislado de RMS14 que posee el promotor MFS14 y las secuencias codificantes de barstar y barnasa. Los transformantes que contienen el fragmento *HindIII* en la orientación deseada se identificaron mediante análisis de secuencias (Figura 34). Todo el fragmento que posee MFS14-barnasa/barstar-nos se cortó en un fragmento *EcoRI* y se insertó en pVB6 y pMOG1006-Fse vía pFse4 para la introducción en el arroz y en el tabaco.

Preparación de Casete B -C5-barnasa- un casete de esterilidad masculina gametocítico dominante.

El sitio único *SalI* de pBluescript SK+ (Stratagene) se sustituyó por un sitio de reconocimiento *NotI* mediante inserción de un ligador oligonucleotídico MKLINK4 (5'-TCGATTCGGCGGCCCGCAA-3') en el sitio *SalI* digerido. Un fragmento de 0,9 kb, *BamHI-HindIII*, que posee la región codificante de barnasa seguida de una región codificante de barstar dirigida por un promotor bacteriano, se insertó en el fragmento correspondiente del pBluescript modificado. El terminador nos en un fragmento *HindIII-NotI* se insertó en el fragmento correspondiente del vector resultante. Entonces se eliminó un sitio *BamHI* indeseado usando el sistema QuickChange de Stratagene, siguiendo las instrucciones del fabricante y usando los oligonucleótidos DAM-3A (5'-GGTCTGACTCTAGAGGAACCCCGGGTACCAAGC-3') y DAM-3S (5'-GCTTGGTACCCGGGGTTCCTCTAGAGTCCGACC-3'). El plásmido resultante (denominado pSK-BBN) se digirió hasta su terminación con *BamHI*, se desfosforiló con fosfatasa alcalina de gamba (37°C, 1 hora). En este se ligó un fragmento *BamHI* de 1,9 kb de la región flanqueante de 5' de C5, seguido de la digestión con *BamHI* y *PstI* para comprobar la presencia y orientación del inserto, respectivamente. El plásmido resultante se denominó pSK-C5-BBN (Figura 35). Todo el casete se eliminó entonces como un fragmento *EcoRI-NotI* hasta un vector de transformación

vegetal binario pVB6. El constructo se introdujo entonces en *Agrobacterium tumefaciens* mediante el método de congelación-descongelación. Para introducir el ADN en el tabaco, se usaron técnicas estándar.

Preparación del Casete C -35S-AlcR-nos

5 Se aisló un fragmento *EcoRI-HindIII* del vector conocido como pUC3; este fragmento contiene la secuencia codificante de AlcR y el terminador nos. Este fragmento se clonó en pSK+ cortado con *EcoRI-HindIII*. Se insertó en el sitio *HindIII* un par hibridado de oligonucleótidos complementarios que tienen las secuencias:

Link5A AGC TAT TAG CGG CCG CTA TGT TTA AAC GCG T

Link5B AGC TAC GCG TTT AAA CAT AGC GGC CGC TAA T

10 que posee los sitios de restricción para Δ *HindIII-NotI-PmeI- Δ HindIII*, añadiendo así un sitio *PmeI* y *NotI* y suprimiendo el sitio *HindIII* en el extremo 3' del casete. El fragmento *EcoRI* de pUC3 que posee el promotor 35S CaMV se clonó en el sitio *EcoRI* y se orientó mediante análisis de restricción y de secuencias (Figura 36). Todo el casete se puede cortar como un fragmento *NotI* para la manipulación posterior, y contiene el sitio *PmeI* en el que se puede insertar el casete AlcA-Glu11-barstar-nos.

Preparación del Casete D AlcA-Glu11-barstar-nos

15 El vector pMJB1 se digirió con *XhoI* y *NcoI* para eliminar el potenciador omega de TMV. Se hibridaron según es costumbre dos oligonucleótidos que codifican 5' UTR de glucanasa 11 y flanqueados por los sitios *XhoI* y *NcoI*, que tienen las secuencias:

Glu1 TCG AGA CAA TTT CAG CTC AAG TGT TTC TTA CTC TCT CAT TTC CAT TTT AGC

Glu1 1 CAT GGC TAA AAT GGT TTT GAG AGA GTA AGA AAC ACT TGA GCT GAA ATT GTC

20 y se ligaron en el vector cortado. El vector secuenciado se digirió con *HindIII* y *XhoI* para eliminar el promotor 35S CaMV y el promotor Alc A ligado en un fragmento *HindIII-XhoI*. Mediante PCR a partir de RMS9 se obtuvo un fragmento que codifica barstar que tiene extremos *NcoI* y *BamHI*. Esto se insertó entonces en el vector anterior cortado con *NcoI-BamHI* para dar un casete completo que posee AlcA-Glu11-barstar-nos. A fin de facilitar la manipulación del casete, se añadió en cada extremo un sitio *PmeI* mediante el uso de oligonucleótidos que codifican Δ *HindIII-PmeI-HindIII* y Δ *EcoRI-PmeI- Δ EcoRI* (Figura 37). Esto permite la inserción de este casete en el casete 35S-AlcR-nos descrito anteriormente, permitiendo que ambos componentes del conmutador AlcA/R se muevan en pFSE4 como un fragmento *NotI*.

Preparación del Casete E MFS14-Glu11-barstar-nos - un casete restaurador de la fertilidad masculina.

30 Se clonó en pSK+ cortado con *BamHI-SacI* un fragmento *BamHI-SacI* de 320 pb que posee el extremo 3' del promotor MFS14. El sitio *HindIII* se eliminó usando el kit QuikChange de Qiagen, siguiendo procedimientos estándar. Los oligonucleótidos usados para eliminar el sitio tuvieron las secuencias:

MKM1A CGG TAT CGA TAA GCT AGA TAT CGA ATT CCT G

MKM1S CAG GAA TTC GAT ATC TAG CTT ATC GAT ACC G

35 La supresión del sitio se confirmó mediante análisis de restricción y mediante secuenciación. Entonces se introdujo un nuevo sitio *HindIII* cerca del sitio *SacI* mediante inserción de oligonucleótidos hibridados que codifican los sitios Δ *SacI-HindIII-SacI*.

SHSLINK1 CAT AAA GCT TAT ACA GCT

SHSLINK2 GTA TAA GCT TTA TGA GCT

40 La presencia del nuevo sitio se confirmó mediante análisis de restricción, y la orientación correcta del ligador se definió mediante secuenciación. La orientación deseada dio un sitio *HindIII* hacia el exterior del sitio *SacI* con relación al sitio *BamHI*. El sitio *BamHI* se eliminó entonces y se introdujo un nuevo sitio *XhoI* de la misma manera usando un oligonucleótido que codifica Δ *BamHI-XhoI- Δ BamHI*. Este tuvo la secuencia:

Link6 GAT CGT ATC TCG AGA TAC

La ausencia del sitio *BamHI* y la introducción del sitio *XhoI* se confirmó de la manera habitual.

45 Se digirió RMS14 con *HindIII* y *SacI*, y se aisló el fragmento de 5,5 kb que codifica el resto del promotor MFS14. Este fragmento se insertó entonces en el vector anterior cortado con *HindIII-SacI*, y la integridad del promotor se confirmó mediante secuenciación. Todo el promotor MFS14 se cortó entonces como un casete *HindIII-XhoI*, y se insertó en el Casete D sustituyendo el promotor AlcA en la etapa antes de la adición de los ligadores a los extremos. Para este casete, se usaron ligadores que introdujeron los sitios *SwaI* en cada extremo (Figura 38).

Preparación del Casete F Stig 1-barnasa-nos - un casete de esterilidad esporofítica femenina

Se introdujo un sitio *Bam*HI próximo al sitio de inicio de la traducción del promotor STIG1 en el vector pSK-STIG1. Esto se logró usando el kit QuickChange de Stratagene, con los oligonucleótidos:

ST1-BA (5'-GATAAAAGCCATAATT**GGATCCT**GGTGGTTTCTGC-3') y

5 ST1-BS (5'-GCAGAAACCACCAG**GATCCA**ATTATGGCTTTTATC-3').

El promotor STIG1 de 1,6 kb se liberó entonces en un fragmento *Bam*HI y se clonó en pSK-BBN digerido con *Bam*HI. La presencia y la orientación correcta del promotor se determinaron mediante amplificación por PCR entre las secuencias del vector y del promotor. El casete STIG1-BBN se transfirió en un fragmento *Not*I-*Eco*RI al vector pFSE4, denominándose el plásmido resultante pFSE4-STIG1-BBN (Figura 39). Todo el casete se transfirió entonces como un fragmento *Fse*I a VB6.

10

Preparación del Casete G Stig1-Glu11-barstar-nos – un casete restaurador de la fertilidad femenina

El constructo pAlcA-Glu11-barstar-nos-pp se modificó para sustituir un sitio de restricción *Hind*III por un sitio *Eco*RI. Esto se logró usando el kit QuickChange de Stratagene y los oligonucleótidos:

15 DAM-6A (5'-CGGAACTATCCC**GAATTC**TGCACCGTTTAAACGC-3') y DAM-6S (5'-GCGTTTAAACGGTGC**AGAATTC**GGGATAGTTCCG-3').

Se introdujo un sitio *Xho*I próximo al sitio de inicio de la traducción del promotor STIG1 en el vector pSK-STIG1. Esto se logró usando el kit QuickChange de Stratagene con los oligonucleótidos:

ST1-XA (5'-GATAAAAGCCATAATTGG**CTCGAG**GTGGTTTCTGCTGAG-3') ST1-XS (5'-CTCAGCAGAAACCAC**CTCGAG**CCAATTATGGCTTTTATC-3').

20 Entonces se liberó el promotor STIG1 de 1,6 kb en un fragmento *Xho*I-*Eco*RI y se clonó en el fragmento más grande producido mediante digestión de pAlcA-glu11-barstar-nos-pp con *Xho*I y *Eco*RI, sustituyendo el promotor AlcA por el promotor STIG1 (Fig 40). El casete completo se cortó en un fragmento *Pme*I y se clonó en pVB6 y pMOG1006-Fse.

Preparación de un vector de TPS commutable - AlcA-TPS-nos Tap1-AlcR-nos

25 Se ha descrito el casete Tap1-AlcR-nos. El gen GUS en pAGS se sustituyó por TPS, y el nuevo casete se clonó como un casete *Hind*III en pFSE4. El Tap1-AlcR-nos descrito previamente fue como un fragmento *Not*I en este vector pFSE4-AlcA-TPS-nos. El fragmento *Fse*I completo se cortó y se clonó en un pVB6. Este vector se puede usar ahora para retransformar tabaco hecho estéril mediante transformación con un constructo que posee un casete de expresión Tap1-TPP-nos.

EJEMPLO 9

30 PREPARACIÓN DE VECTORES DE TRANSFORMACIÓN VEGETAL

Se puede hacer cualquier combinación de los casetes anteriores en pFSE4, y la transferencia subsiguiente del fragmento *Fse*I resultante en pMOG1006-Fse o pVB6 permite la transformación en tabaco o arroz.

Se han realizado las siguientes combinaciones de casetes como vectores de transformación vegetal:

35 A+C+D = planta estéril masculina esporofítica, cuya fertilidad es restaurable mediante inducción química del gen restaurador

E = planta restauradora de la fertilidad masculina esporofítica, que, cuando se poliniza de forma cruzada mediante la planta anterior, restaura la fertilidad en la progenie

F+C+D = planta estéril femenina esporofítica, cuya fertilidad es restaurable mediante inducción química del gen restaurador

40 G = planta restauradora de la fertilidad femenina esporofítica, que, cuando se poliniza de forma cruzada mediante la planta anterior, produce progenie fértil femenina

B+d = planta estéril masculina gametofítica, cuya fertilidad se puede restaurar mediante inducción química del gen restaurador

45 La generación de los progenitores de las plantas híbridas F1 como se describen aquí se logra de la siguiente manera:

Progenitor masculino, es decir, estéril femenino

Casete F	Stig1-barnasa	Esterilidad femenina
Casete E	MFS14-Glu11-barstar	Restaurador masculino
Casete C	35S-AlcR-nos	Componente conmutador
Casete D	AlcA-Glu11-Barstar	""

Progenitor femenino, es decir, estéril masculino

Casete A	MFS14-barnasa	Esterilidad masculina
Casete G	Stig1-Glu11-barstar	Restaurador femenino
Casete C	35S-AlcR-nos	Componente conmutador
Casete D	AlcA-Glu11-barstar	""

EJEMPLO 10

5 CONSTRUCCIÓN DE VECTORES PARA ENSAYAR NUEVO GEN PIG

RMS30 y RMS32 (Tabaco)

El gen de tubulina se clonó como un fragmento *Hinfl* a partir de *ptubulina*, y se clonó en *pFSE-MFS14* generado anteriormente. El *MFS14-tubulina-nos* resultante se clonó en *pVB6* como un fragmento *FSE* para producir *RMS30* (Figura 41).

10 El promotor *MFS14* + operador *lac* se cortó a partir de *RMS32* como un fragmento *BamHI*, y se clonó en *pFSE*. Tras la inserción del gen de tubulina, el fragmento *Fsel* de *MFS14-op lac-tubulina-nos* se clonó en *pVB6* para producir *RMS32* (Figura 42).

RMS30 y RMS32 (Arroz)

15 Los fragmentos *Fsel* que contienen el promotor *MFS14 (+/- op lac)-tubulina-nos* se clonaron en *pMOG1006-Fse* para generar los vectores de transformación vegetal.

Optimización de trehalosa-fosfato fosfatasa (*TPP*) y trehalosa-6-fosfato hidrolasa (*TreC*) para uso para generar esterilidad en *Zea Mays*

20 Se sintetizan versiones de regiones que codifican *TPP* y *TreC* optimizadas para la expresión en *Zea Mays* (que tiene una preferencia por G o C en posiciones redundantes de cada codón), mediante Operon Technologies Inc. Se derivan secuencias nucleotídicas a partir de sus secuencias de aminoácidos usando los codones presentes *in vivo* por encima de 1,0% y a frecuencias representativas de las relaciones que aparecen en la naturaleza (según la Genbank Codon Usage Database, Release 108). También se incluyen sitios de enzimas de restricción útiles próximos a los sitios de inicio de la traducción, incluyendo *BamHI* y *NcoI* y un sitio *PstI* en los extremos 3', para facilitar la clonación.

25 Constructos para ensayar el uso de *Zea Mays TPP* y *TreC* de codones optimizados

Se eliminó el sitio *BamHI* en el extremo 5' del promotor *MFS14* en el vector *pFSE-MFS14* usando el sistema QuikChange de Stratagene con los oligonucleótidos:

DAM-7A: 5'-CGATGCTTTCGGAACCGGTACCGAATTCG-3'

DAM-7S: 5'-CGAATTCGGTACCGGTTCCGAAAGC ATCG-3'

30 Los genes *TPP* y *TreC* sintéticos se cortaron entonces en fragmentos *BamHI* – *PstI*, y se clonaron entre el promotor *MFS14* y el terminador *nos* en el vector *pFSE-MFS14* modificado. El intrón *adh1* se insertó entre el promotor y las secuencias codificantes, para impulsar los niveles de expresión. El casete completo se transfirió entonces a un

vector de clonación a base de pUC que contiene el marcador de selección bacteriano IGPD y un casete génico de resistencia a herbicidas para selección de plantas transgénicas.

EJEMPLO 11

PRODUCCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS

5 Se ha introducido pSRN.AGS en tabaco, colza y tomate (estas plantas se denominan aquí como plantas Alc-GUS). pMOG1006-Fse-SRNAGS y pMOG1006-C5-GUS se han introducido en arroz vía transformación mediada por *Agrobacterium*.

10 Los vectores de transformación vegetal que contienen cada una de las combinaciones de casetes dadas anteriormente se han introducido en tabaco y/o arroz mediante transformación mediada por *Agrobacterium*. Los explantes se analizaron mediante PCR, y aquellos que contienen insertos intactos se propagaron de forma clonal y se transfirieron al invernadero, y se hicieron crecer hasta la floración. RMS30 y 32 también se han introducido en tabaco.

15 pUIRN.AGS se ha introducido en trigo y maíz vía métodos de bombardeo con proyectiles, y se han recuperado plantas transgénicas, por medio de cobombardeo con un plásmido que posee un marcador seleccionable. Otros vectores para ensayar diversos componentes se transforman en maíz mediante bombardeo con microproyectiles.

EJEMPLO 12

ANÁLISIS DE PLANTAS TRANSGÉNICAS

Estudios de la expresión de GUS a partir del promotor AlcA en cultivo de tejidos

20 A fin de evaluar si las plantas, tras la transformación con un constructo que contiene un promotor unido a un gen citotóxico, tal como barnasa, serían recuperables, particularmente si el promotor tiene cierta expresión en la fase de callo del proceso de transformación, se estudió la expresión en callo de tabaco para determinar si la expresión fue o no constitutiva como en el caso del promotor GST27, o si podría ser inducida mediante aplicación de etanol.

25 Se usaron plantas de tabaco Alc-GUS (35S-AlcR-nos/AlcA-GUS-nos) de cuatro semanas, que se hicieron crecer en condiciones de cultivo de tejidos estándar, para ensayar la expresión del promotor AlcA en callo, tanto con como sin etanol. Se produjeron discos de hojas y se colocaron sobre medio MS suplementado con 3% (p/v) de sacarosa y 0,8% (p/v) de Bacto-agar, 1 µg/ml de 6-BAP y 100 ng/ml de hormonas NAA. Algunos de los discos se colocaron sobre este medio que contiene 0,1% (v/v) de etanol. Después de 3 semanas cuando la producción del callo había progresado, las muestras de callo se usaron para los ensayos fluorométricos de GUS, cuyo resultado se muestra en la Figura 43.

30 Los niveles de GUS muestran que el promotor AlcA tiene fugas en callo, y los niveles se pueden incrementar con la adición de etanol al medio del cultivo tisular vegetal. Por lo tanto, se pueden recuperar transgénicos usando el promotor AlcA que dirige un gen restaurador en el mismo constructo que un promotor que dirige un gen citotóxico.

En el invernadero

35 Se ha demostrado que el conmutador génico AlcA/R da buenos niveles de inducción del gen informador o de rasgo en las hojas de tabaco al añadir el inductor químico etanol, ya sea mediante aplicación como pulverización, vapor o empapamiento de las raíces (Caddick et al., Salter et al.). Para examinar la inducción génica en tejidos florales, se usaron plantas transgénicas Alc-AGUS de tabaco, colza y tomate.

Tabaco

40 1) Se cerró herméticamente una bolsa de plástico alrededor de un tallo de flor de tabaco AlcA-GUS, y se colocó dentro de la bolsa una pequeña cazuela que contiene 50 ml de etanol al 5%. Después de 3 días, se cosecharon las anteras de diferentes etapas del capullo de flor, y se evaluaron para determinar la expresión de GUS. Los resultados se muestran en la Figura 44. Ésta muestra los valores de GUS procedentes de cuatro capullos de flor independientes de plantas de tipo salvaje, AlcA-GUS no inducidas y AlcA-GUS inducidas. Los capullos de flor se midieron en nm, y cada barra presenta cinco anteras. La gráfica muestra que, comparadas con plantas AlcA-GUS que no recibieron el tratamiento de vapor de etanol, las anteras procedentes de la planta inducida contuvieron mayores niveles de GUS en ellas.

50 2) Se cortaron tallos de flor de plantas de tabaco de tipo salvaje y Alc-GUS, y se colocaron en vasos de precipitados que contienen 300 ml de agua, etanol al 1%, al 2% o al 5%, y se dejaron en el invernadero durante dos días antes de cosechar las anteras de los capullos de flor para los ensayos fluorométricos de GUS. La Figura 45 es una gráfica de barras que representa los datos de GUS de este experimento que muestra anteras procedentes de tallo de flor de tipo salvaje, de Alc-GUS tratada con agua y tallos de flor Alc-GUS tratada con etanol al 1%, 2% o 5%. Este experimento también demuestra que la expresión del gen informador ha sido inducida por etanol en las anteras a

niveles por encima de los observados en las flores tratadas con agua. Los niveles de expresión de GUS procedentes de las anteras AlcA-GUS inducidas estuvieron por encima de aquellos de una planta MFS14-GUS.

5 3) Se empaparon raíces de plantas de tabaco AlcA-GUS maduras en el invernadero con 250 ml de agua, o etanol al 5%. Una planta de tipo salvaje y una planta 35S-GUS también se trataron con etanol. Dos días después, los pistilos procedentes de diversos tamaños de capullos de flor se disecaron y se tiñeron para determinar la actividad de GUS. La Figura 46 muestra pistilos procedentes de capullos de 9-10 mm de las plantas Alc-GUS tratadas con agua y tratadas con etanol al 5%. La fotografía demuestra claramente que el tratamiento de etanol condujo a la inducción de GUS en los pistilos. Las Figuras 47 y 48 muestran la región de estigma/estilo de pistilos procedentes de capullos de 10 17-22 mm y 33-35 mm respectivamente, nuevamente procedentes de plantas Alc-GUS tratadas con agua y tratadas con etanol. La tinción de GUS está presente a lo largo de este área, en comparación con la planta tratada con agua, que es similar al tipo salvaje.

4) También se ensayaron plantas Alc-CAT (35S-AlcR-nos/AlcA-CAT-nos), y se mostró un incremento en los niveles de gen informador en tejidos florales después de la inducción con etanol.

Colza

15 1) Se empaparon las raíces de plantas AlcA-GUS de colza (OSR) con 250 ml de agua, etanol al 1% o etanol al 2%, tanto en el día 0 como en el día 1. Se tomaron entonces muestras de flores de estas plantas dos días después de la primera inducción. Las muestras tomadas para el análisis fluorométrico de GUS fueron anteras de flores maduras (madura indica que estaban completamente abiertas), estigma/estilos de flores maduras, anteras de flores inmaduras (capullos de flor con los pétalos sin abrir), estigma/estilos de flores inmaduras, y finalmente el resto de los 20 pistilos de flores que incluyen los ovarios.

La Figura 49 muestra los datos de GUS gráficamente, y de izquierda a derecha muestra los resultados de plantas de colza Alc-GUS inducidas con agua, Alc-GUS inducidas con etanol al 1% y Alc-GUS inducidas con etanol al 2%. Las dos primeras barras en cada sección representan respectivamente los niveles de GUS de anteras sin inducir y estigma/estilo sin inducir. Cada barra representa tres réplicas, conteniendo cada réplica anteras procedentes de tres 25 flores diferentes o estigma/estilos procedentes de ocho flores diferentes u ovarios procedentes de seis flores diferentes.

Los datos muestran claramente un incremento en los niveles de GUS en tejidos florales cuando se comparan plantas de colza tratadas con agua con plantas inducidas con etanol. Todos los tejidos examinados en las plantas 30 tratadas con etanol al 2% muestran un incremento en GUS a partir tanto de niveles no inducidos como de la planta de control tratada con agua.

2) Se sometieron flores Alc-GUS de colza a tinción de GUS tras la inducción con etanol. La Figura 50 es una fotografía de una flor Alc-GUS antes de la inducción, y la Figura 51 es una fotografía de una flor procedente de la misma planta, dos días después del empapamiento de las raíces con 250 ml de etanol al 5%. Esto muestra que el 35 tratamiento ha conducido a la inducción del gen informador en la región del estigma/estilo, así como los filamentos.

La Figura 52 muestra capullos de flor inmaduros, sin sépalos ni flores. La planta tratada con etanol a la derecha muestra expresión de GUS en la región del estigma/estilo, en comparación con el control de la izquierda, tratado con agua. Las Figuras 53-55 son ejemplos adicionales de esto. La Figura 56 muestra secciones de pistilo de plantas de colza de tipo salvaje y plantas Alc-GUS de colza inducidas con agua. La Figura 57 muestra secciones de pistilo de una raíz empapada de una planta con etanol al 2% dos días después de que se tomaron las muestras de flores. 40 Esto muestra inducción de GUS a lo largo de la región del pistilo. La Figura 58 muestra pistilos de una planta tratada con agua y una planta tratada con etanol al 5%. Nuevamente se muestra que la aplicación del compuesto químico etanol ha conducido a la inducción de GUS en los tejidos femeninos.

La Figura 59 muestra una flor procedente de un experimento en el que se cortó un tallo de flor y se colocó en un vaso de precipitados con etanol al 5% y se dejó durante dos días antes de teñir la inflorescencia completa para 45 determinar la actividad de GUS. La tinción azul es manifiesta en los filamentos, sépalos, pétalos y las regiones de estigma/estilo de la flor.

Tomate

Flores de tomate Alc-GUS se indujeron usando vapor de etanol como se describe anteriormente para flores de tabaco. Dos días después de la inducción, las anteras y el polen se tiñeron para detectar la expresión de GUS. 50 Como se puede observar en las Figuras 60a y 60b, se observó tinción de azul en ambos tejidos.

Arroz

Los experimentos previos para ensayar la capacidad de inducción del conmutador Alc en arroz incluyen un ensayo hidropónico que implica discos de hojas expuestos a vapor de etanol durante dos días antes de la evaluación para determinar la actividad de GUS. Una vez en el invernadero, a las plantas completas se les empapan las raíces con

etanol al 1-5%, antes y durante la formación de panículo/fase de floración, para investigar la inducción de la expresión de GUS en los tejidos florales.

Ensayos de GUS

5 Se molió material floral en 2-300 μ l de tampón de extracción (100 mM de tampón de fosfato de sodio pH 7, 10 mM de EDTA, 0,1% de Triton X-100, 1% de Sarcosyl, 10 mM de b-mercaptoetanol). Las muestras se hicieron girar en una microcentrifugadora durante 15 minutos, y se usaron 5 μ l del sobrenadante para los ensayos de proteína de Bradford, con BSA como patrón. Se diluyeron 20 μ l 1 en 5 con tampón de extracción y 400 μ l de tampón de ensayo (igual que para el tampón de extracción, excepto que contiene 1 mM de 4-MUG y metanol al 20%). Se tomaron 100 μ l (muestra T₀) y se añadieron a 900 μ l de tampón de parada (carbonato de sodio 0,2 M), y el resto se incubó a 37°C

10 durante dos horas antes de tomar otros 100 μ l (muestras T₂) para ser añadidos a 900 μ l de tampón de parada.

La fluorescencia de las muestras se midió en un espectofotómetro, y GUS se representó como nM 4M U por mg de proteína por hora.

Trigo

15 Se bombardeó tejido de escutelo con pUIRN, y el tejido se expuso a vapor de etanol. La tinción para la expresión de GUS se lleva a cabo después de 2-3 días, cuando se observan numerosos puntos azules que indican que el promotor AlcA se ha inducido, conduciendo a la expresión de GUS.

Las plantas Alc-GUS transgénicas obtenidas se hacen crecer hasta madurez, y se cosechan las semillas, y la expresión inducible de GUS se determina en las plantas de progenie de la misma manera como se describe anteriormente para el arroz.

20 Histoquímica de GUS

Para la tinción de GUS se usó el protocolo de Blume y Grierson (1997).

Investigación de la esterilidad

1) Plantas estériles masculinas

25 a) Las plantas estériles masculinas esporofíticas generadas mediante transformación con el casete A se identifican mediante la falta de polen o por la presencia de polen muerto. La semilla se produce mediante retrocruzamiento con tabaco de tipo salvaje como donante de polen.

b) Las plantas estériles gametofíticas generadas mediante transformación con el casete B se identifican usando tinción vital en el polen, el 50% del polen es estéril y el 50% fértil.

2) Plantas estériles femeninas

30 Las plantas estériles femeninas esporofíticas generadas mediante transformación con el casete F se identifican por su incapacidad para ser polinizadas de forma cruzada con polen de tipo salvaje.

Las plantas restauradoras en ambos casos generadas mediante transformación con los casetes E y G se autopolinizan, la progenie se hace crecer y las líneas homocigotas se seleccionan de la manera habitual mediante selección en kanamicina de semilla T2.

35 Restauración inducible de la fertilidad

Se espera que la progenie del cruce entre plantas esporofíticamente estériles y plantas de tipo salvaje se segreguen 1:1 para esterilidad con la presencia del transgén, y se seleccionan en una etapa de crecimiento temprano mediante análisis de PCR. Se llevan a cabo experimentos de inducción para investigar la restauración de la fertilidad, ya que estas plantas estériles se pueden tratar con etanol vía empapamiento de las raíces o mediante aplicación por pulverización o de vapor para inducir la expresión de barstar en los tejidos pertinentes. Se espera que la inducción en el tiempo apropiado permita la autopolinización y que se produzca después la producción de semillas, lo que se puede puntuar fácilmente. Las plantas homocigotas se seleccionan de la progenie resultante por los medios habituales y se usan para ensayar la restauración constitutiva cruzándolas con plantas restauradoras homocigotas.

40

45 Sin embargo, el retrocruzamiento de plantas C5-barnasa.AlcA-barstar con plantas de tipo salvaje o que permiten que se produzca la autopolinización da como resultado la recuperación de una población, de la cual el 50% son completamente fértiles y el 50% productora de polen, el cual sólo es fértil el 50%. Estas plantas pueden ser inducidas sin embargo con una pulverización de etanol, empapamiento de la raíz o tratamiento con vapor para expresar barstar en el polen en desarrollo para permitir la autopolinización. En este caso, las plantas homocigotas son 100% estériles, mientras que las plantas hemicigotas son 50% estériles. Las diferencias en los resultados

50 obtenidos mediante la tinción permite que se extraigan conclusiones sobre la eficiencia de la inducción y la autopolinización.

Restauración constitutiva de la fertilidad mediante polinización cruzada

El cruzamiento de plantas estériles masculinas con la planta restauradora masculina se logra transfiriendo polen desde la planta restauradora al pistilo de la planta estéril masculina (después de la eliminación de cualesquiera anteras que estén presentes, incluso aunque éstas contendrán sólo polen muerto). El pistilo polinizado se embolsa entonces para evitar la contaminación mediante polen de tipo salvaje o de otro polen en el entorno. La semilla producida se cosecha. La progenie se hace crecer, y se observa y se mide la producción de polen. La restauración de la fertilidad de este modo conduce a la producción de polen normal.

El cruzamiento de plantas estériles femeninas se logra transfiriendo polen desde estas plantas a los pistilos de las plantas restauradoras de la fertilidad femenina, nuevamente después de la eliminación de las anteras de estas plantas. La flor se embolsa como antes. Se cosecha la semilla producida. La progenie se hace crecer, y las flores se embolsan. Se observa la capacidad de estas plantas para autopolinizarse. La restauración de la fertilidad de esta manera permite que se produzca la autopolinización. De la misma manera, se analizan las plantas generadas mediante transformación con los casetes E y F, es decir, estériles femeninas y que poseen el gen restaurador masculino, y con los casetes A y G, es decir, estériles masculinas y que poseen el gen restaurador femenino.

REFERENCIAS

Aarts *et al.*, Transposon Tagging of a Male Sterility Gene in *Arabidopsis*. *Nature*, 363:715-717

Ahn, S, Tanksley, S.D, (1993). Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Proc Nat Acad Sci* 90: 7980-7984.

Albani D., Robert L.S., Donaldson P.A., Altosaar I., Arnison P.G., Fabijanski S.F. (1990) Characterization of a pollen-specific gene family from *Brassica napus* which is activated during early microspore development. *Plant Mol. Biol.* 15:605-622

Aoyama *et al.* (1995) *Plant Cell* 7:1773-

Atkinson, A.H., Heath, R.L., Simpson, R.J., Clarke, A.E., y Anderson, M.A. (1993). Proteinase inhibitors in *Nicotiana glauca* stigmas are derived from a precursor protein which: processed into five homologous inhibitors. *Plant Cell* 5, 203-213.

Becker D *et al.* Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. *Plant Journal* 5: 299-307 (1994)

Budelier, K.A., Smith, A.G., y Gasser, C.S. (1990). Regulation of a stilar transmitting tissue-specific gene in wild type and transgenic tomato and tobacco. *Mol. Gen. Genet* 224, 183-192.

Mark X. Caddick, Andrew J. Greenland, Ian Jepson, Klaus-Peter Krause, Nan Qu, Kay V. Riddell, Michael G. Salter, Wolfgang Schuch, Uwe Sonnewald y A. Brian Tomsett (1998) An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism. *Nature Biotechnology* Vol. 16:177-180.

Paul Christou en *Plant Mol. Biol.* 35: 197-203 (1997)

De Block, M., Debrouwer, T., Moens, T. (1997). The development of a nuclear male sterility system in wheat. Expression of the barnase gene under the control of tapetum specific promoters. *Theor Appl Genet.* 95, 125-131.

H.P Doring (1989). Tagging genes with Maize Transposable elements. An Overview. *Maydica* 34(1989) 73-88.

Elliot, R. C., Betzner, A.S., Huttner, E., Oakes, M. P., Tucker, W.Q.J., Gerentes, D., Perez, P., y Smyth, D. R. (1996) AINTEGUMENTA, an APELATA2-like gene of *Arabidopsis* with pleiotrophic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell* 8, 155-168

Ficker, M., Wemmer, T., y Thompson, R.D (1997). A promoter directing high level expression in pistils of transgenic plants. *Plant Mol Biol* 35, 425-431

Gallie, D.R., Sleat, D.E., Watts, J.W., Turner, P.C., Wilson, T.M.A, (1987) A comparison of eukaryotic viral 5' leader sequences as enhancers of mRNA expression in vivo. *Nucleic Acids Research* 15: 8693-8710.

Gatz C *et al.* (1991) *Mol Gen Genet* 227, 229-237

Gatz C *et al.* (1992) *Plant J* 2. 397-404

Goldman, M.H., Goldberg, R.B., Mariane, C. (1994). Female sterile tobacco plants are produced by stigma specific cell ablation. *EMBO J* 13: 2976-2984.

Hamilton, D.A., Bashe, D.M., Stinson, J.R., Mascarenhas, J.P. (1989). Characterisation of a pollen specific genomic clone from maize. *Sex Plant Reprod* 2, 208-212.

- Hanson, D.H., Hamilton, D.A., Travis, J.L., Bashe, D.M., Mascarenhas, J.P. (1989). Characterisation of a pollen specific cDNA clone from Zea Mays and its expression. *The Plant Cell* 1, 173-179
- Hasselhof, J y Gerlach W.L, (1988) *Nature* Vol 334: 585-591.
- Hiei Y *et al.* Efficient transformation of rice mediated by *Agrobacterium*. *Plant Journal* 6: 271-282 (1994)
- 5 Hiei Y *et al.* Rice transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol* 35:205-218(1997)
- Hird, D.L., Worrall, D., Hodge, R., Smartt, S., Paul, W y Scott, R (1993). The anther-specific protein encoded by the Brassica napus and Arabidopsis thaliana A6 gene displays similarity to β -1,30glucanases. *The Plant Journal* 4(6). 1023-1033.
- 10 Izawa T, Ohnishi T, Toshitsugu N, Ishida N, Hiroyuki E, Hashimoto H, Itoh K, Terada R, Wu C, Miyazaki C, Endo T, Iida S y Shimaamoto K (1997). Transposon tagging in rice. *Plant Mol Biol* 35: 219-229
- Jepson, I, Lay, V., Holt, D.C., Bright, W.J., y Greenland, A.J.,(1994). Cloning and characterisation of maize herbicide safener-induced cDNAs encoding subunits of glutathione S-transferase isoforms I, II and IV. *Plant Molecular Biology* 26: 1855-1866.
- Kamalay, J.C., y Goldberg, R.B. (1980). Regulation of structural gene expression in tobacco. *Cell* 19. 935-946
- 15 Kang H.G., Noh Y.S., Chung Y.Y., Costa M.A., An K., An G. (1995). Phenotypic alterations of petal and sepal by ectopic expression of a rice MADS box gene in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 29:1-10
- De Block, M., Debrouwer, T., Moens, T. (1997). The development of a nuclear male sterility system in wheat. Expression of the barnase gene under the control of tapetum specific promoters. *Theor Appl Genet.* 95. 125-131.
- 20 Kempin., S.A., Liljgren, S.J., Block, L.M., Rounsley, S.D., y Yanofsky, M.F. (1997). Targeted disruption in Arabidopsis. *Nature* Vol 389
- Kilian A, Chen J, Han F, Steffenson B y Kleinhofs A (1997). Towards map based cloning of the barley stem rust resistance genes *Rpg1* and *rpg4* using rice as an intergenomic cloning vehicle. *Plant Mol Biol* 35: 187-195.
- Koes R.E., Spelt C.E., van Den Elzen P.J.M., Mol J.N.M. (1989). Cloning and molecular characterization of the chalcone synthase multigene family of Petunia hybrida. *Gene* 81:245-257
- 25 Kozak, M (1989), *J. Cell. Biol* 108: 229-241
- Kurata, N, Moore G, Nagamura Y, Foote T, Yano M, Minobe Y, Gale M. (1994) Conservation of genome structure between rice and wheat. *Bio/Technology* 12:276-278
- Lloyd *et al.* (1994) *Science* 266,436-439
- 30 Lotan,T., Ori, N., y Fluhr, R. (1989). Pathogenesis-related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers. *Plant Cell* 1, 881-887
- Mascarenhas D, Mettler I.J, Pierce D.A, Lowe, H.W (1990) Intron mediated enhancement of heterologous gene expression in maize. *Plant Mol Biol* 15: 913-920.
- Mariani, C., De Beuckeleer, Marc., Truettner, J., Leemans, J., y Goldberg, R.B (1990). Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* Vol. 347, 737-741
- 35 Celestina Mariani., Veronique Gossele., Marc De Beuckeleer., Marc De Block., Robert B. Goldberg., Willy De Greef y Jan Leemans (1992). A chimaeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature* Vol. 357, 384-387.
- Merlo, Donald J.; Folkerts, Otto. (Dowelanco, USA). PCT Int. Appl., 117 p. CODEN: PIXXD2. WO 9713402 A1 970417. Synthetic genes for d-endotoxins optimized for expression in plants and their in generation of lepidopteran-resistant plants.
- 40 Mitchell y Tijan (1989) *Science* 245, 371-378.
- Moore G, Devos K.M, Wang Z, Gale M.D. (1995). Cereal genome evolution. *Current Biol* 5: 737-739
- Nadeau, J .A., Zhang, X.S., Li, J y O'Neill, S.D. (1996). Ovule development: Identification of stage and tissue specific cDNAs. *The Plant Cell* 8,213-239
- 45 Nacken *et al.* *Mol and Gen Genet.* 229.129-136. (1991)

- Nasrallah, J.B., y Nasrallah, M.E. (1993). Pollen-stigma signalling in the sporophytic self-incompatibility response. *Plant Cell* 5., 1325-1335.
- Nelson, O.E., y Clary, G.B. (1952) *J Hered.* 43, 205-210
- 5 Ori, N., Sessa, G., Lotan, T., Himmelhoch, S., y Fluhr, R. (1990). A major stylar matrix polypeptide (sp41) is a member of the pathogenesis-related proteins superclass. *EMBO J* 9. 3429-3436
- Picard *et al.* (1993) *TICB* 3,278-280
- Ptashne (1988) *Nature* 355, 683-689
- Ptashne y Gann (1990) *Nature* 346, 329-331
- 10 Robinson-Beers, KK., Pruitt, R. E., y Gasser, C. S. (1992). Ovule development in wild type *Arabidopsis* and two female sterile mutants. *Plant Cell* 4. 1237-1249
- M.G. Salter, J.A. Paine, K.V. Riddell, I. Jepson, A.J. Greenland, M.X. Caddick y A.B. Tomsett (1998). Characterisation of the ethanol-inducible ale gene expression system for transgenic plants. *Plant Journal* 16 (1) 127-132
- 15 Seed, Brian; Haas, Jurgen. (The General Hospital Corp., USA). U.S., 36 p. Cont-in-part of U. S. Ser. N° 324,243. CODEN: USXXAM. US 5795737 A 980818. Patent written in English. Application: US 95-532390 950922. Priority: US 94-324243 940919 CAN 129:171505. Modulating efficiency of expression of foreign genes in host cells by manipulation of codon usage.
- Seurinck J., Truettner J., Goldberg R.B. (1990). Nucleotide sequence of an anther-specific gene. *Nucleic Acids Res.* 18:3403-3403
- 20 Simon *et al.* (1996) *Nature* 384, 59-62
- Spena, A., Estruch, J.J., Prensens, E., Nacken, W., Van Onckelen, H., Sommer, H. (1992). Anther-specific expression of the rolB gene of *Agrobacterium rhizogenes* increases IAA content in anthers and alters anther development in whole flower growth. *Theor Appl Genet* 84, 520-527
- 25 Theissen G., Strater T., Fischer A., Saedler H. (1995). Structural characterization, chromosomal localization and phylogenetic evaluation of two pairs of AGAMOUS-like MADS-box genes from maize. *Gene* 156:155-166
- Tsuchiya T., Toriyama K., Ejiri S., Hinata K. (1994). Molecular characterization of rice genes specifically expressed in the anther tapetum. *Plant Mol. Biol.* 26:1737-1746
- Tsuchiya, T., Toriyama, K., Yoshikawa, M., Ejiri, S., Hinata, K., (1995). Tapetum specific expression of the gene for an endo- β -1,3-glucanase causes male sterility in transgenic tobacco. *Plant Cell Phys.* 36:487-494.
- 30 Twell, D., Wing, R.A., Yamaguchi, J., McCormick, S. (1989). Isolation and expression of an anther-specific gene from tomato. *Mol Gen Genet* 217,240-245.
- Twell, D., Yamaguchi, J., McCormick, S. (1990). Pollen specific gene expression in transgenic plants: Coordinate regulation of two different tomato gene promoters during microsporogenesis. *Development* 109, 705-713.
- 35 Vasil.V, Clancy. M, Ferl, R.J, Vasil. I.K, Hannah. L.C, (1989) Increased Gene Expression by the First Intron of Maize Shrunken-1 locus IN Grass Species. *Plant Phys* 91: 1575-1579.
- Vasil V *et al.* Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos. *Biotechnology* 11:1553-1558 (1993).
- Weeks JT *et al.* Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat. *Plant Phys* 102:1077-1084 (1993)
- 40 Wegener, D, SteineckeP, HergetT, PetereitI, PhilippC, SchreierP.H, (1994) Expression of a reporter gene is reduced by a ribozyme in transgenic plants. *Mol Gen Genet* 245: (465-470)
- Wright,S.Y., Suner, M-M., Bell, P,J., Vaudin, M., y Greenland, A.J (1993) Isolation and characterisation of male flower cDNA'S from maize. *The Plant Journal* 3,41-49.
- 45 Xu, H., Davis, S.P., Kwan, B.Y.H., O'Briens, A.P., Singh, M., Knox, R.P. (1993) Haploid and diploid expression of a *Brassica Campestris* anther specific gene promoter in *Arabidopsis* and tobacco. *Mol Gen Genet* 239,58-65.
- Yokoi, S., Tsuchiya, T., Toriyama, K., Hinata, K (1997). Tapetum specific expression of the Osg6B promoter -p-glucuronidase gene in transgenic rice. *Plant Cell Reports* 16,363-367.

Zou, J.T., Zhan, X.Y., WU, H.M., Wang, H., Cheung, A.Y. (1994). Characterisation of a rice pollen-specific gene and its expression. *Am J Bot* 81, 552-561.

Documento WO94/13822 Methods for stable transformation of wheat, Ciba Geigy.

REIVINDICACIONES

1. Un casete de expresión que comprende:
- (a) un primer promotor génico que es un promotor específico de tapetum, de antera, de estambre y/o de polen;
 - 5 (b) un gen interruptor que codifica un producto capaz de interrumpir la fertilidad masculina, operablemente enlazado al primer promotor génico;
 - (c) un segundo promotor génico que es un promotor específico floral de ovario, de óvulos, de pistilo, de estilo, de estigma, de aparato transmisor y/o de placenta, opcionalmente enlazado operablemente a una o más secuencias potenciadoras de la traducción o intrónicas;
 - 10 (d) un gen restaurador que codifica un producto capaz de restaurar la fertilidad femenina, operablemente enlazado al segundo promotor génico;
 - (e) un tercer promotor génico que es inducible mediante la aplicación de un inductor químico exógeno, opcionalmente enlazado operablemente a una o más secuencias potenciadoras de la traducción o intrónicas; y
 - 15 (f) un gen restaurador que codifica un producto capaz de restaurar la fertilidad masculina, operablemente enlazado al tercer promotor génico.
2. Un casete de expresión que comprende:
- (a) un primer promotor génico que es un promotor específico floral de ovario, de óvulos, de pistilo, de estilo, de estigma, de aparato transmisor y/o de placenta,
 - 20 (b) un gen interruptor que codifica un producto capaz de interrumpir la fertilidad femenina, enlazado operablemente al primer promotor génico;
 - (c) un segundo promotor génico que es un promotor específico del tapetum, de antera, de estambre y/o de polen, opcionalmente enlazado operablemente a una o más secuencias potenciadoras o intrónicas;
 - (d) un gen restaurador que codifica un producto capaz de restaurar la fertilidad masculina, enlazado operablemente al segundo promotor génico;
 - 25 (e) un tercer promotor génico que es inducible mediante la aplicación de un inductor químico exógeno, opcionalmente enlazado operablemente a una o más secuencias potenciadoras o intrónicas; y
 - (f) un gen restaurador que codifica un producto capaz de restaurar la fertilidad femenina, enlazado operablemente al tercer promotor génico.
- 30 3. Un casete de expresión según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que el gen interruptor codifica un producto que es barnasa o trehalosa fosfato fosfatasa (TPP).
4. Un casete de expresión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el tercer promotor génico es el promotor Alc A o el promotor GST-27.
5. Tejido vegetal transformado que comprende uno o más de los casetes de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 35 6. Una planta, cuyo genoma comprende el casete de expresión de la reivindicación 1.
7. Una planta, cuyo genoma comprende el casete de expresión de la reivindicación 2.
8. Una planta según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en la que dicha planta se selecciona del grupo que consiste en trigo, arroz, maíz, tomate, girasol, remolacha, cáñola, algodón, haba de soja y otros vegetales.
- 40 9. Una planta según la reivindicación 6, en la que dicha planta es homocigota para el casete de expresión de la reivindicación 1.
10. Una planta según la reivindicación 7, en la que dicha planta es homocigota para el casete de expresión de la reivindicación 2.

Fig.1.

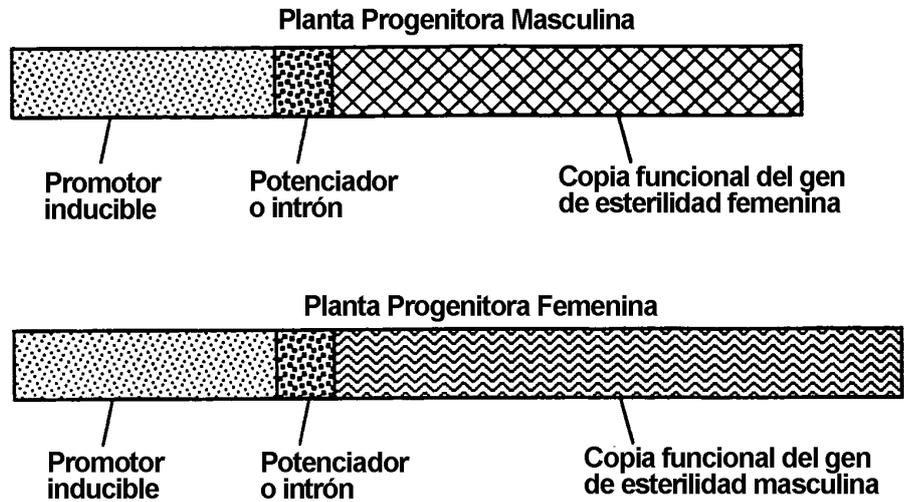
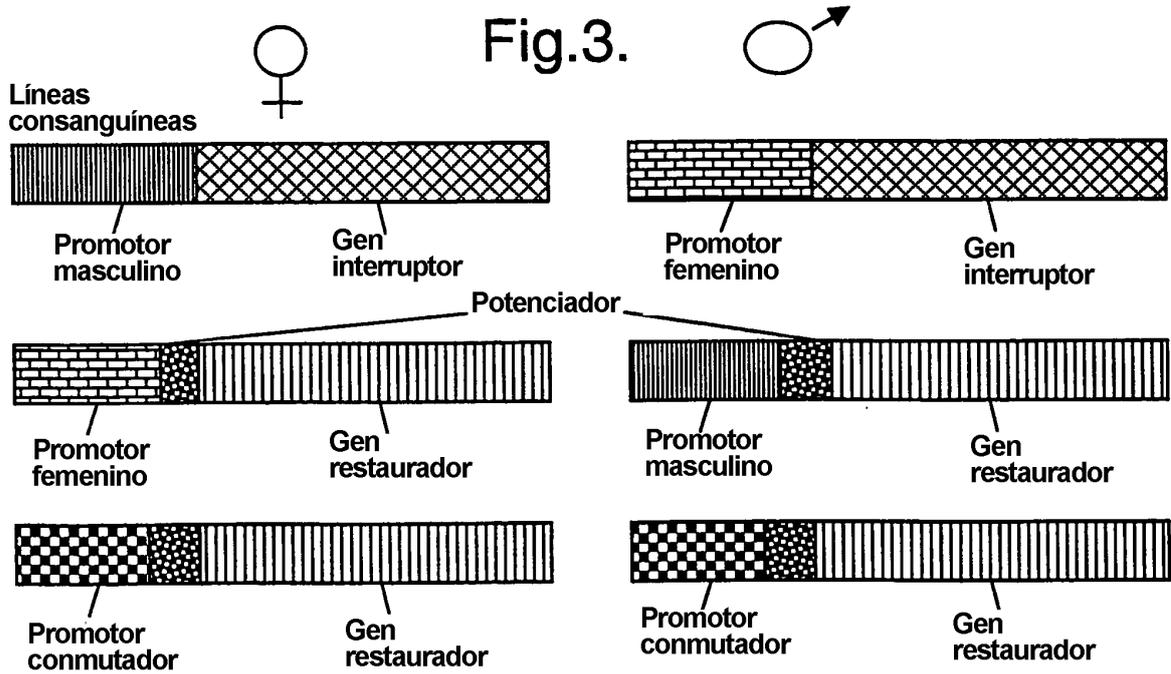


Fig.3.



Tratar químicamente para autopolinizar líneas para el mantenimiento

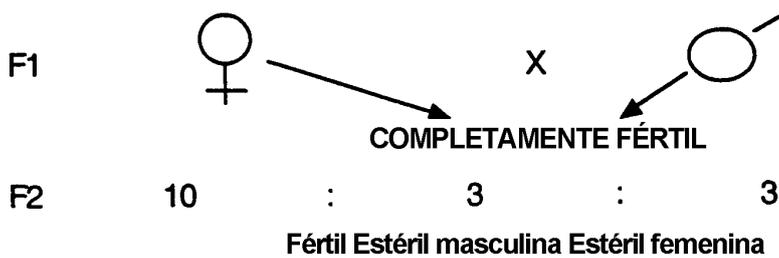
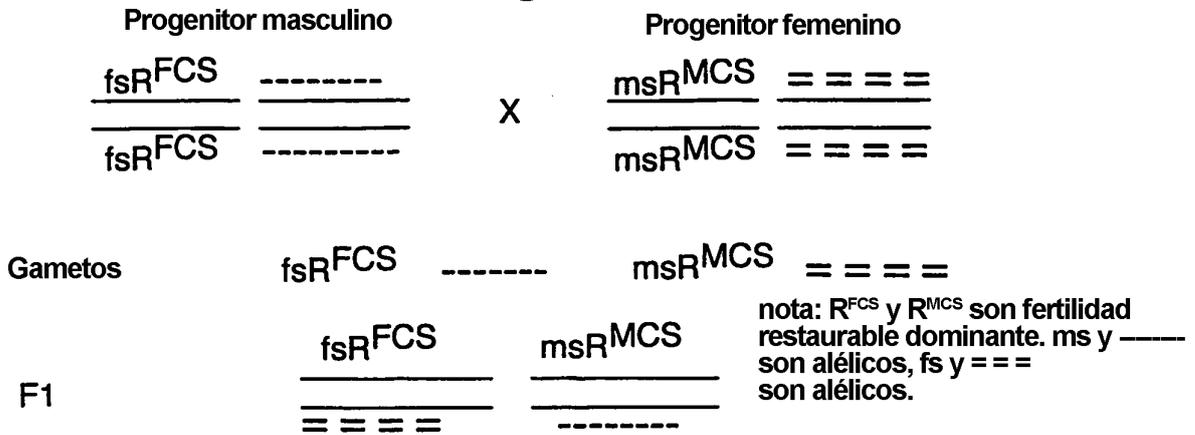


Fig.2A.



TODAS LAS PLANTAS F1 SON COMPLETAMENTE FÉRTILES

Fig.2B.

Polen →	fsR^{FCS}	fsR^{FCS}	msR^{MCS}	=====
Célula de huevo ↓	-----	msR^{MCS}	=====	-----
fsR^{FCS}	FS	FS	FF	FF

fsR^{FCS}	FS	FS,MS	MS	FF
msR^{MCS}				
msR^{MCS}	FF	MS	MS	FF
=====				
=====	FF	FF	FF	FF

en el que MS = estéril masculino, FS = estéril femenino, FF = completamente fértil
 Segregación es 3 MS, 3FS, 9FF, 1 MS y FS

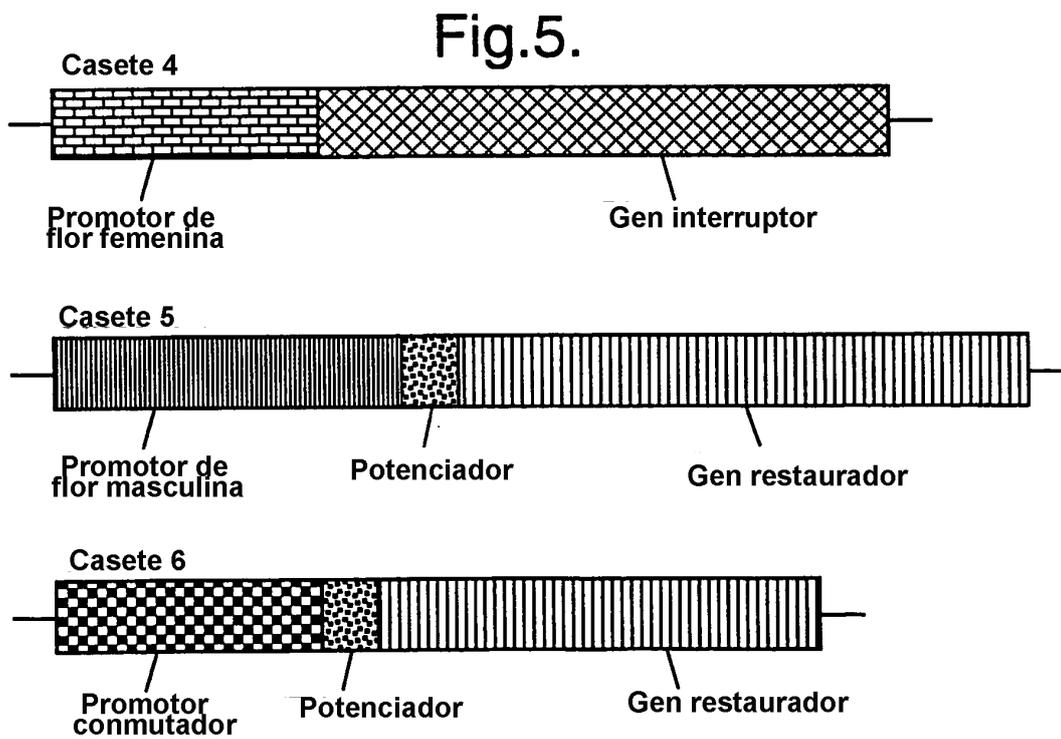
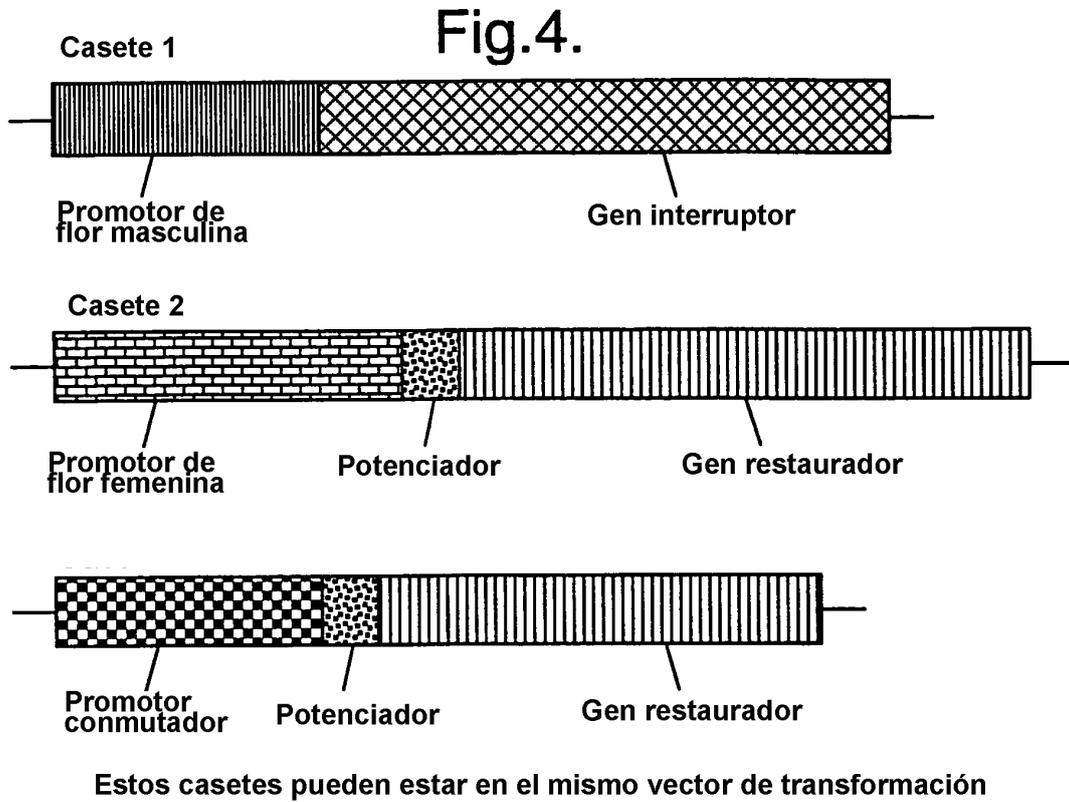


Fig.6A.

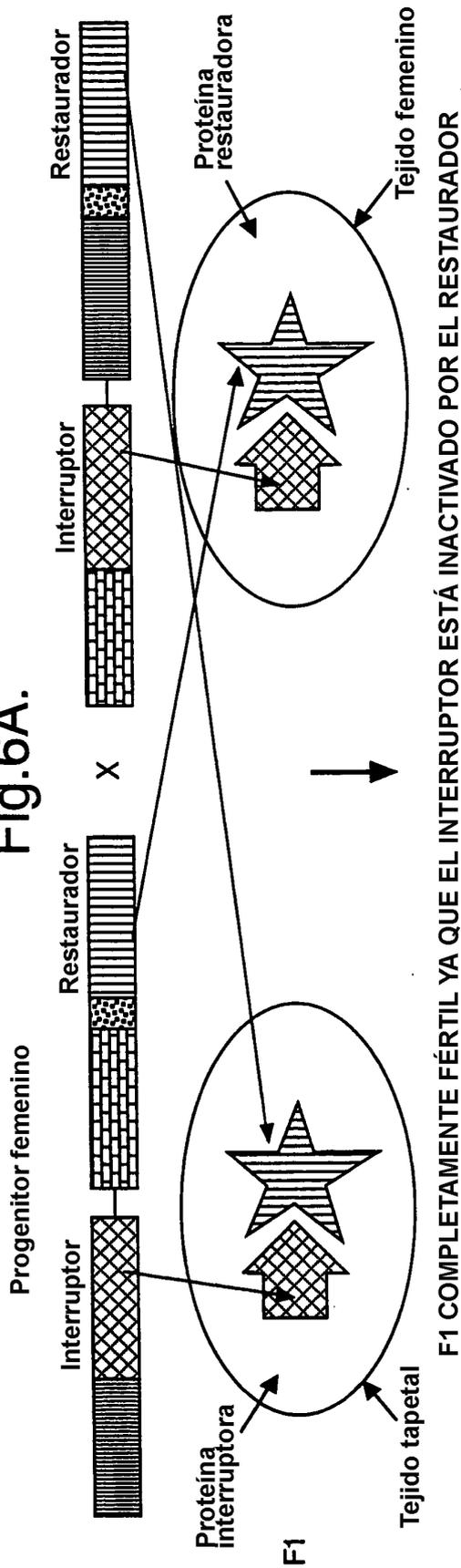


Fig.7A.

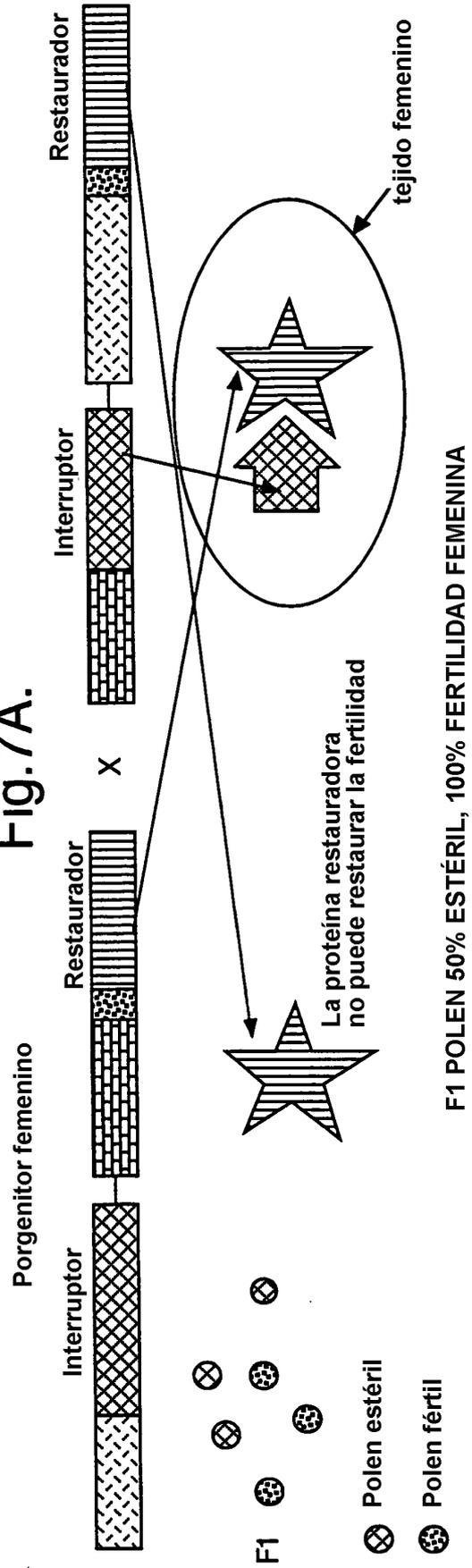


Fig.7b.

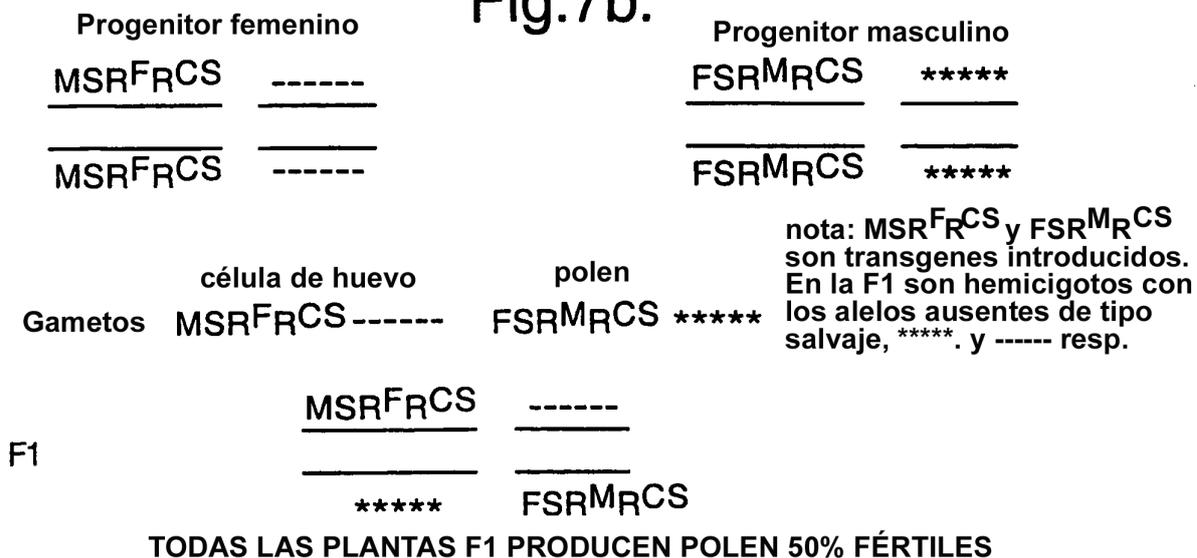


Fig.7c.

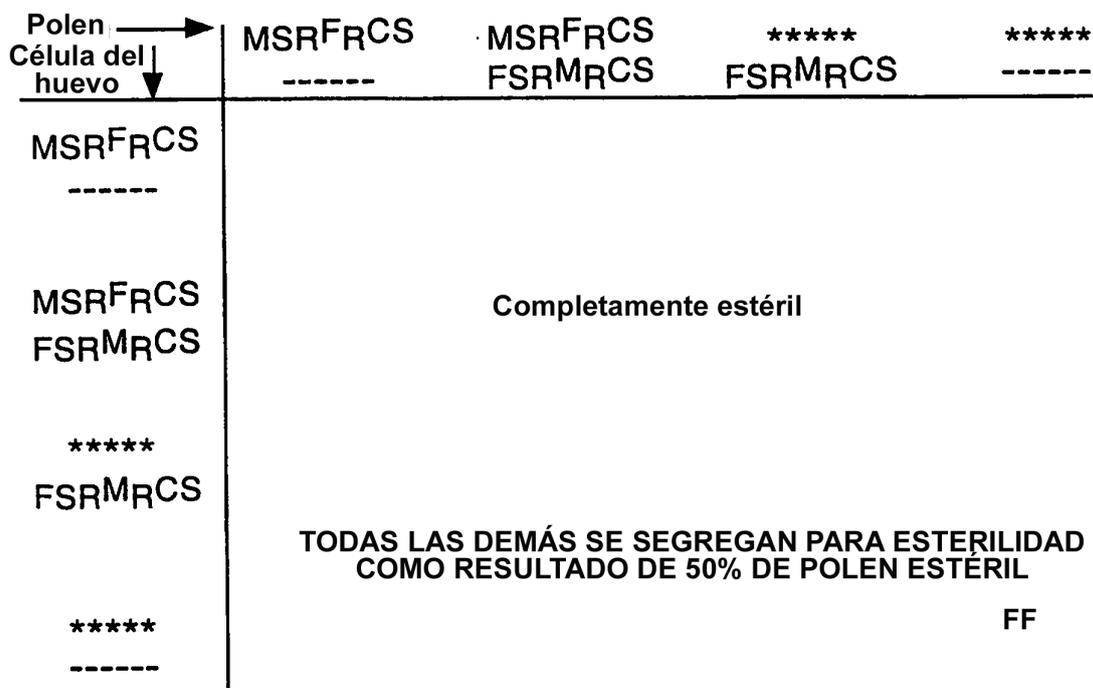


Fig.8.

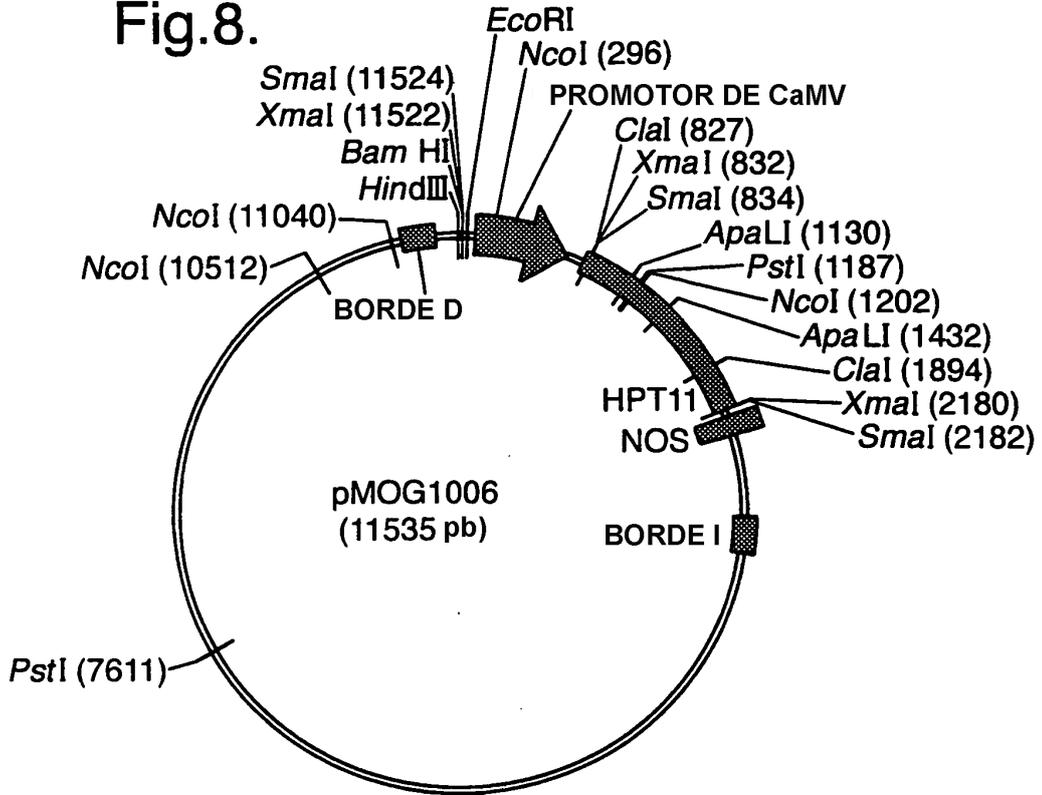


Fig.9.

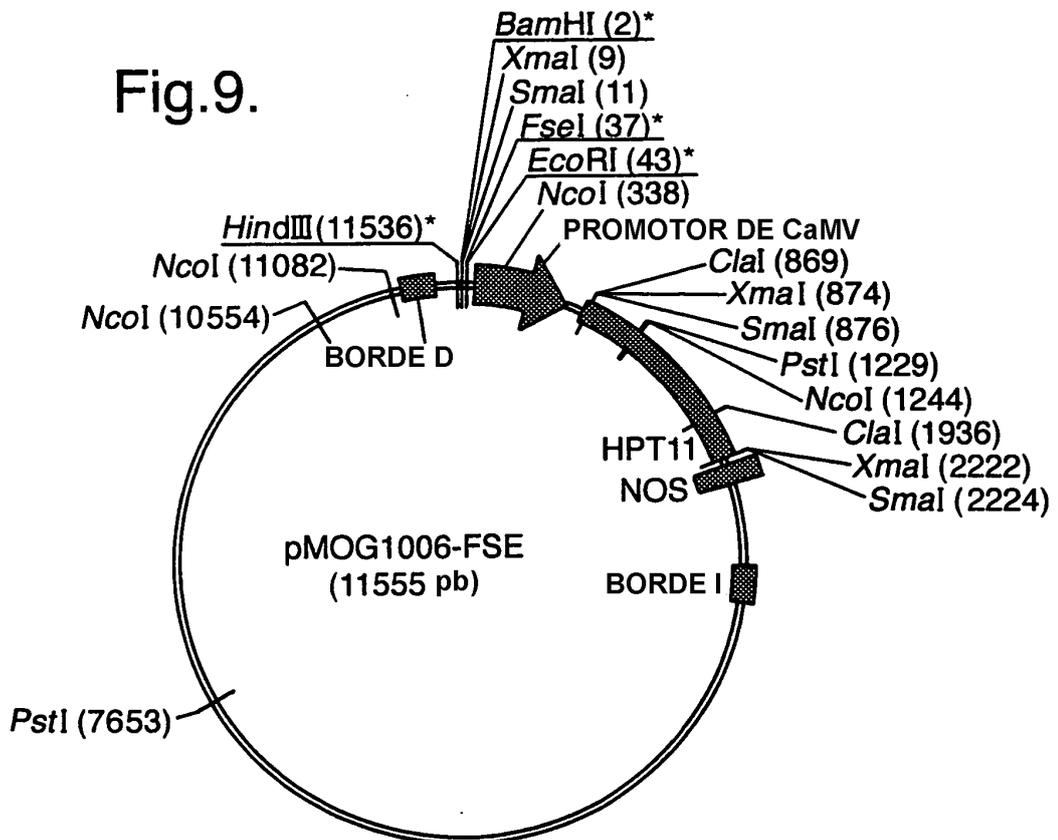


Fig.10.

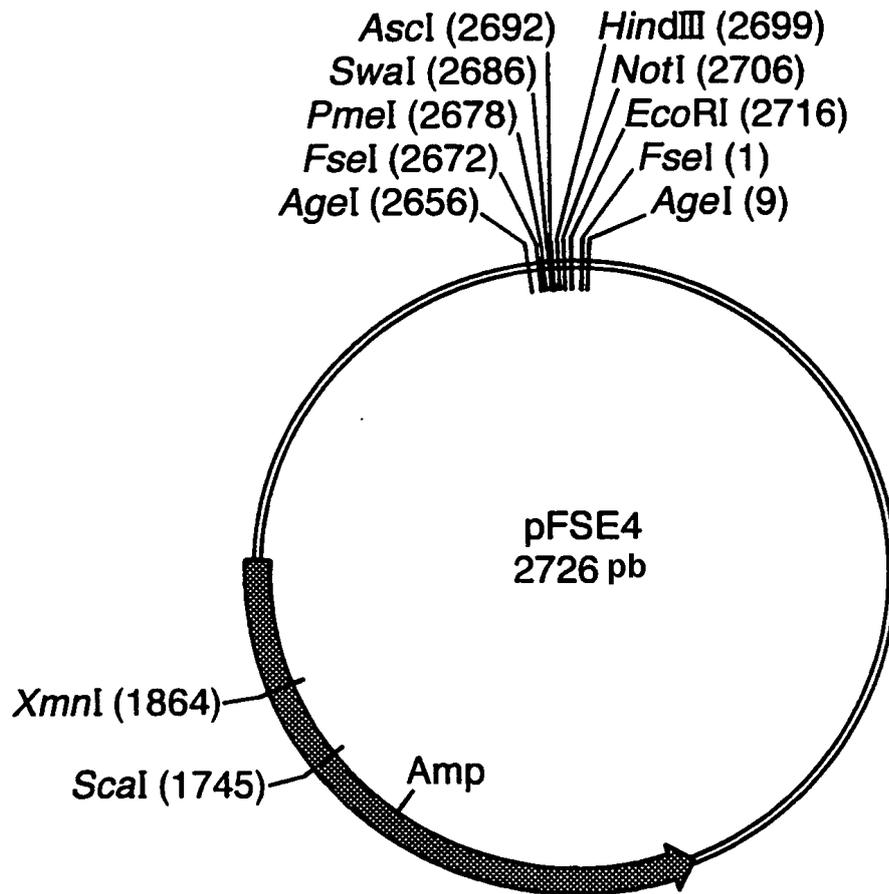
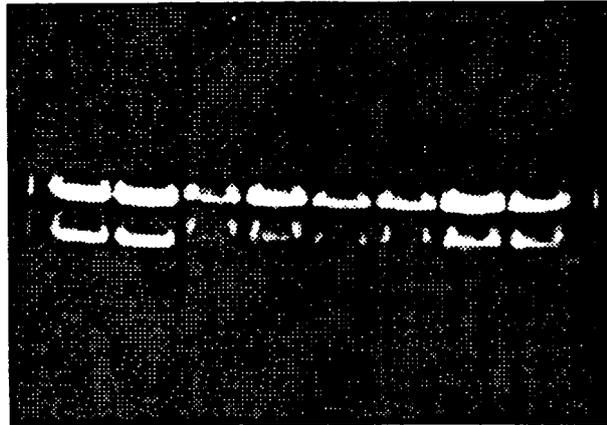


Fig.11.

ANÁLISIS NORTHERN

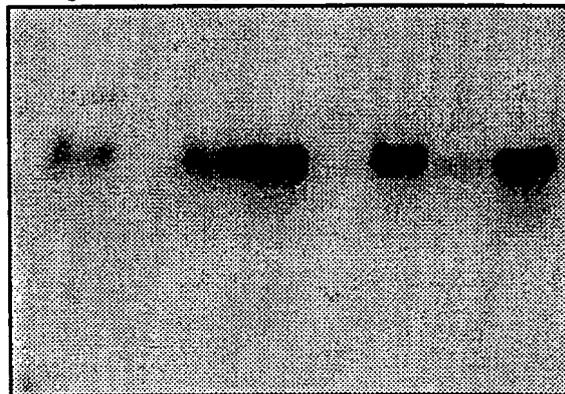
8 7 6 5 4 3 2 1

Gel teñido con
bromuro de etidio



Hibridación Northern
con GST II-27

8 7 6 5 4 3 2 1



- 1 = Borla inducida
 - 2 = Endospermo no inducido
 - 3 = Endospermo inducido
 - 4 = Embrión inducido
 - 5 = Embrión no inducido
 - 6 = embrión inducido
 - 7 = Endospermo no inducido
 - 8 = Endospermo inducido
- } 14 d.d.p.
- } 24 d.d.p.

Fig.12.

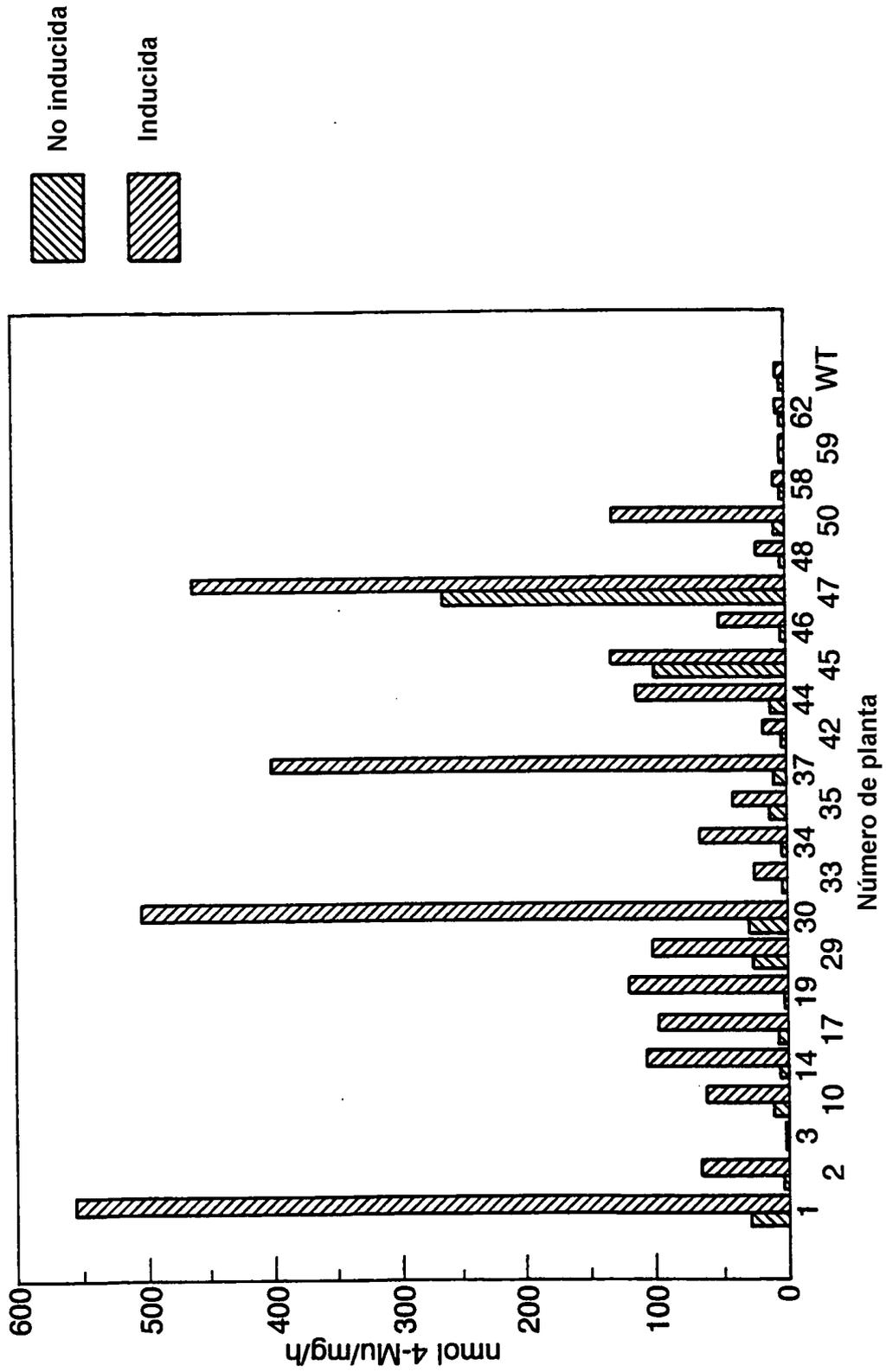


Fig.13.

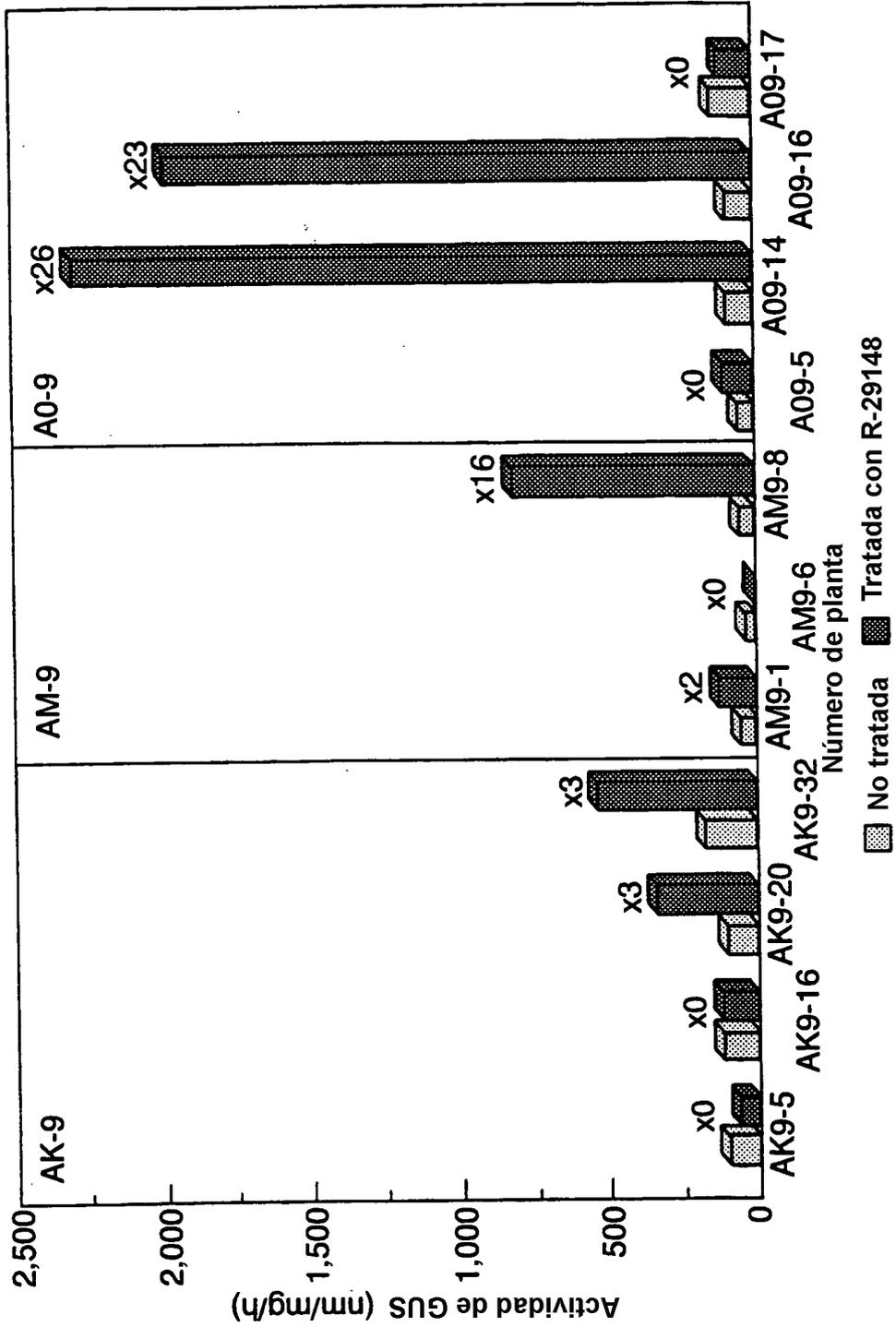
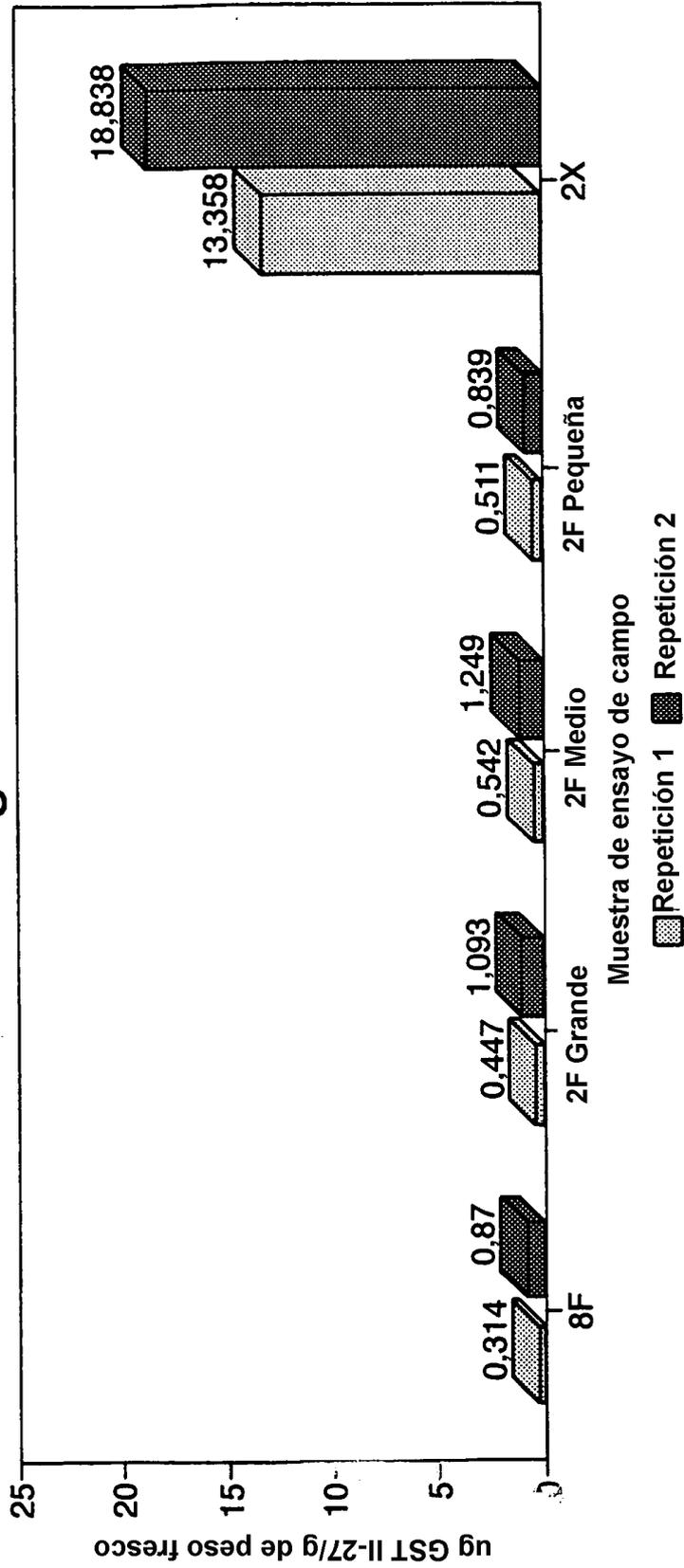
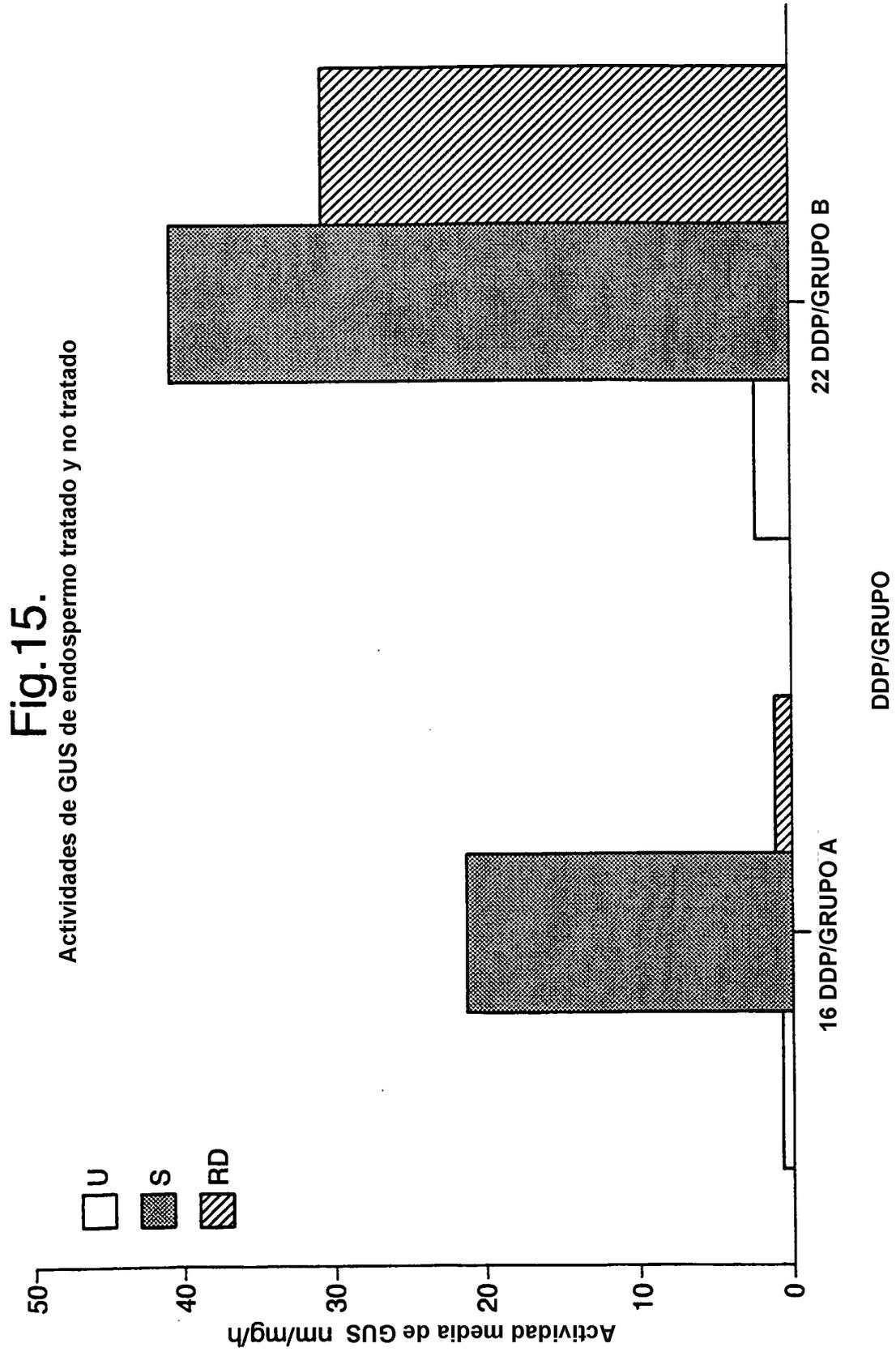
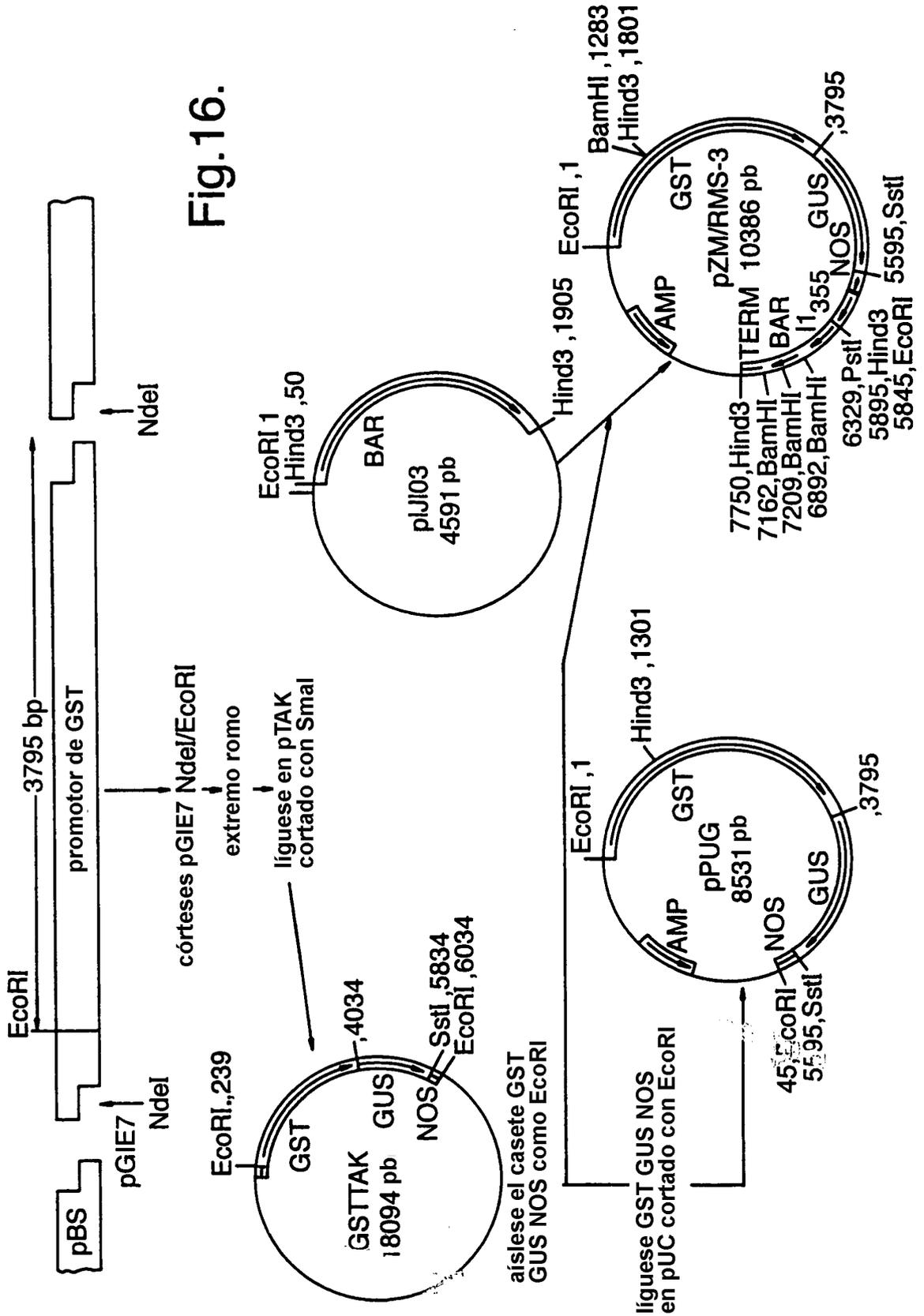
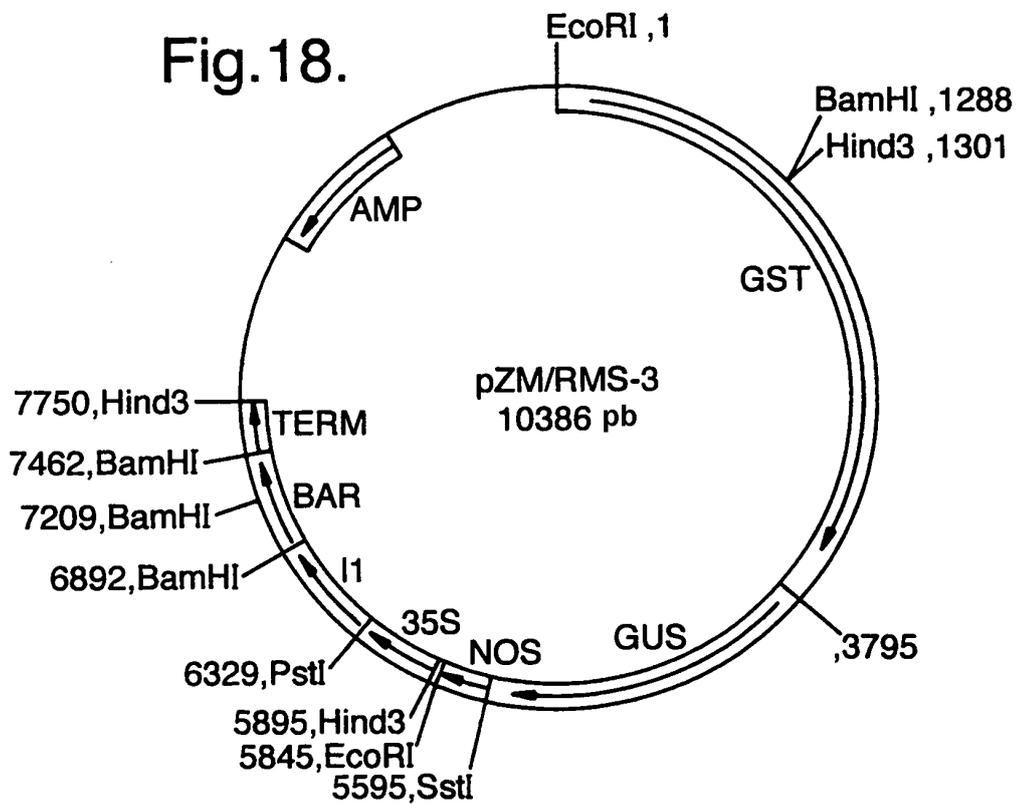
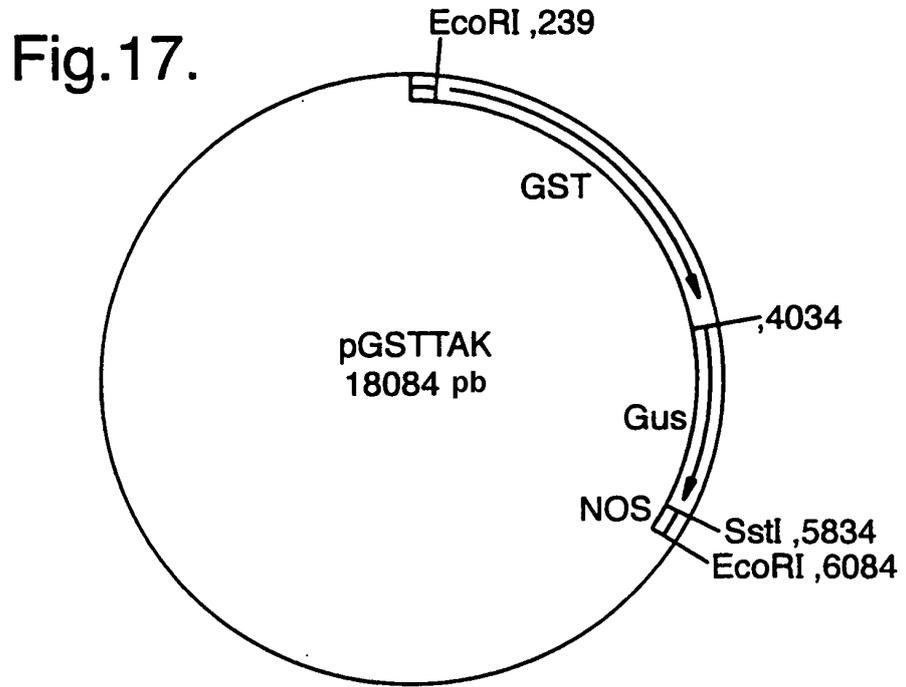


Fig.14.









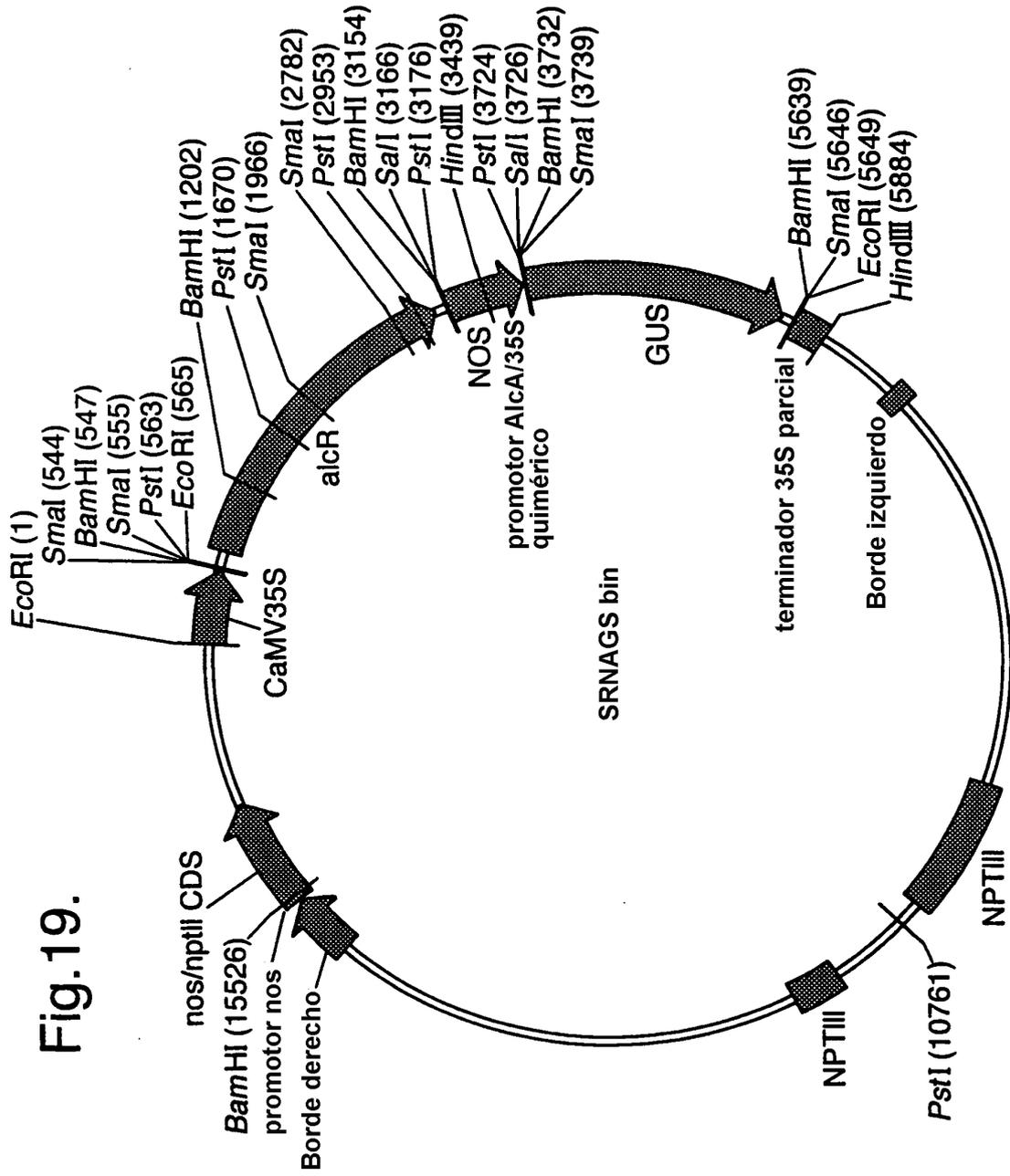


Fig.20.

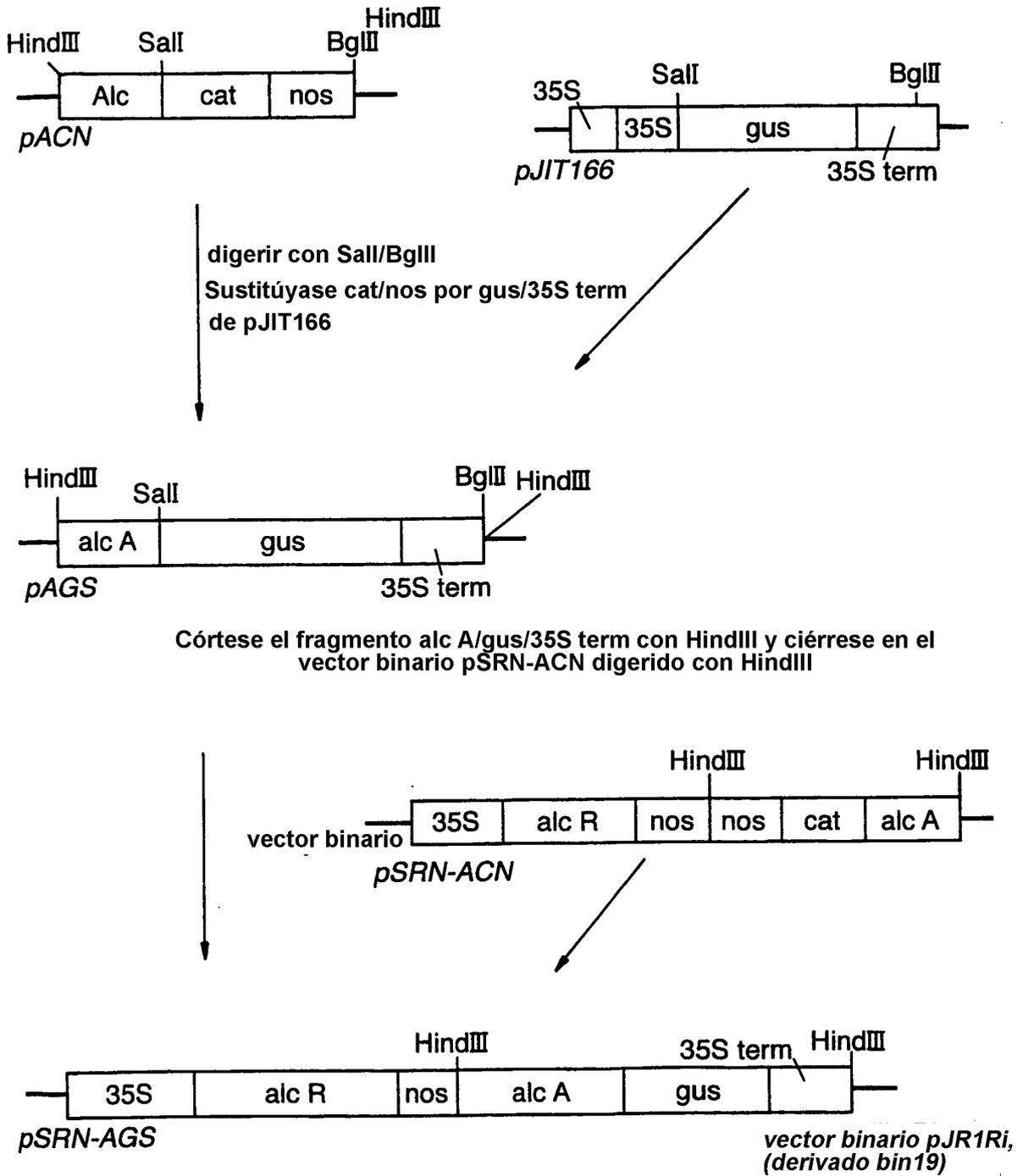


Fig.21.

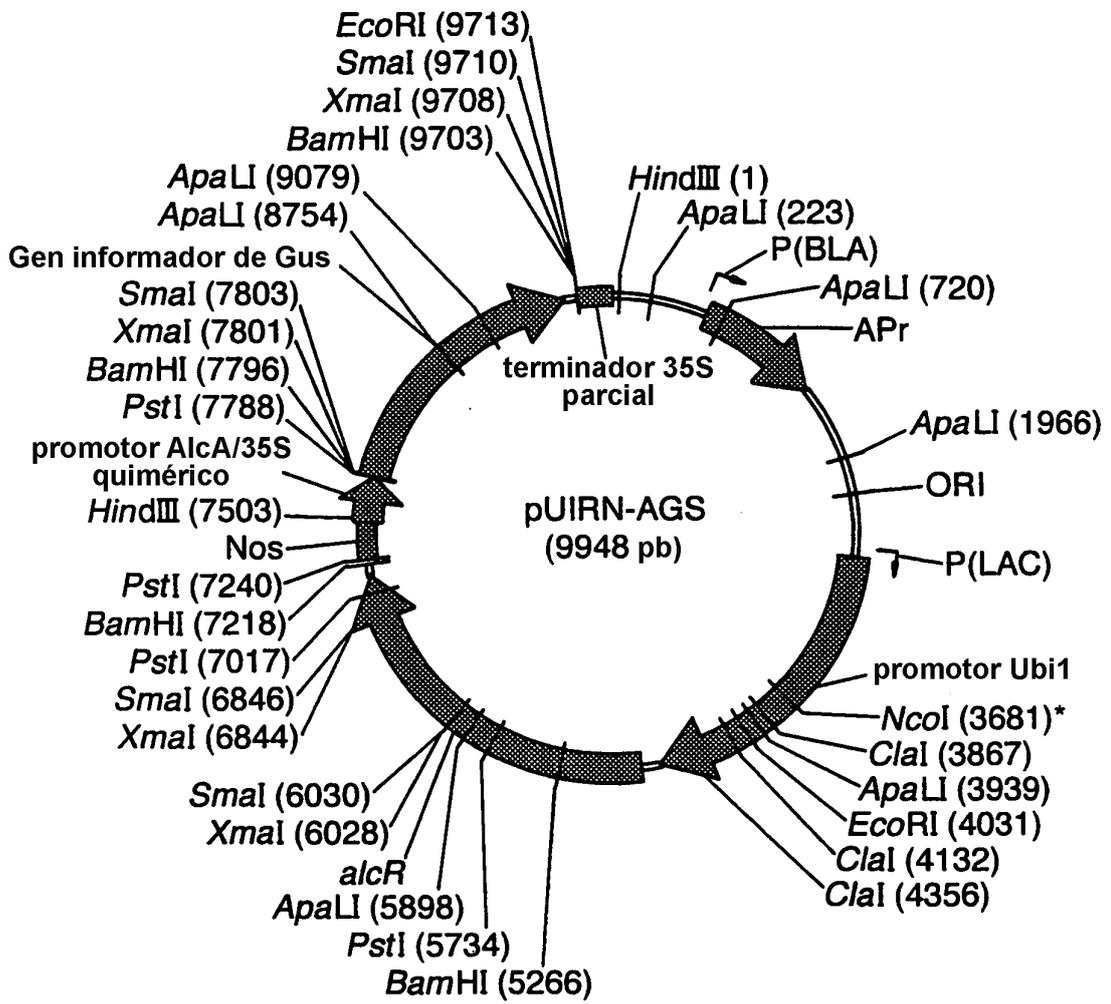


Fig.22.

Líneas cronológicas para la transformación de trigo

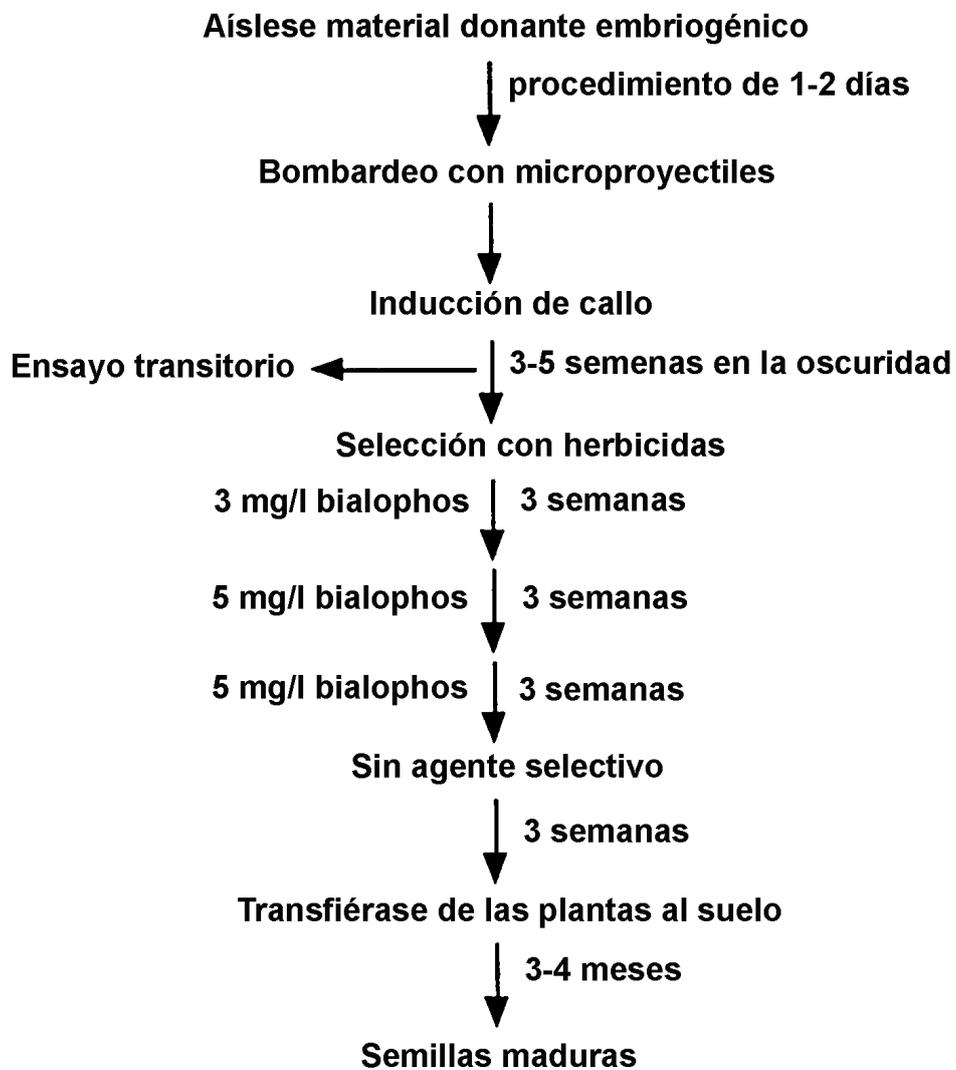


Fig.23.

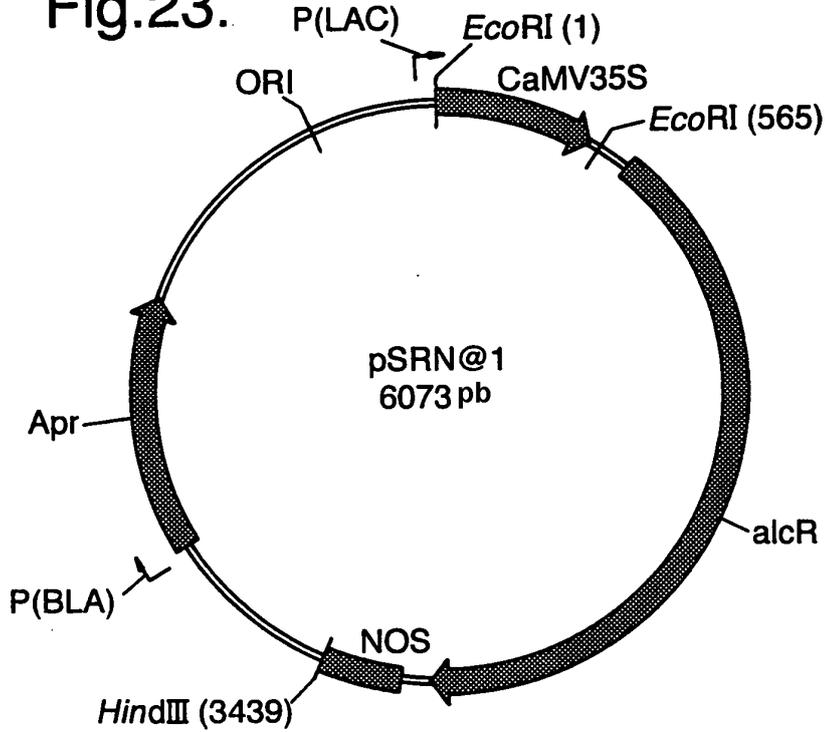
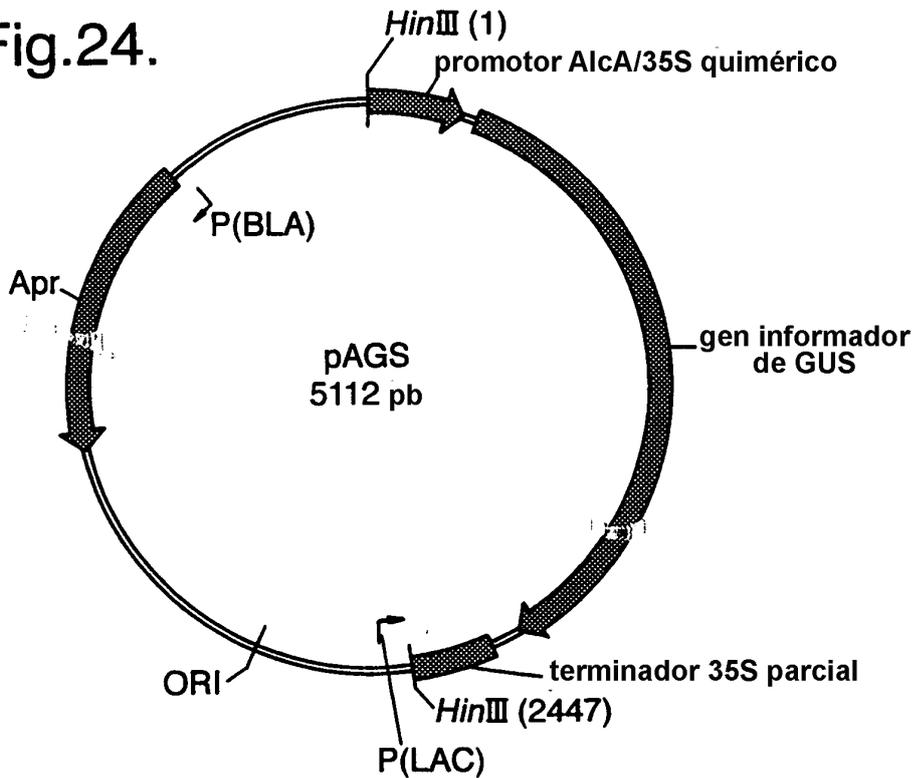


Fig.24.



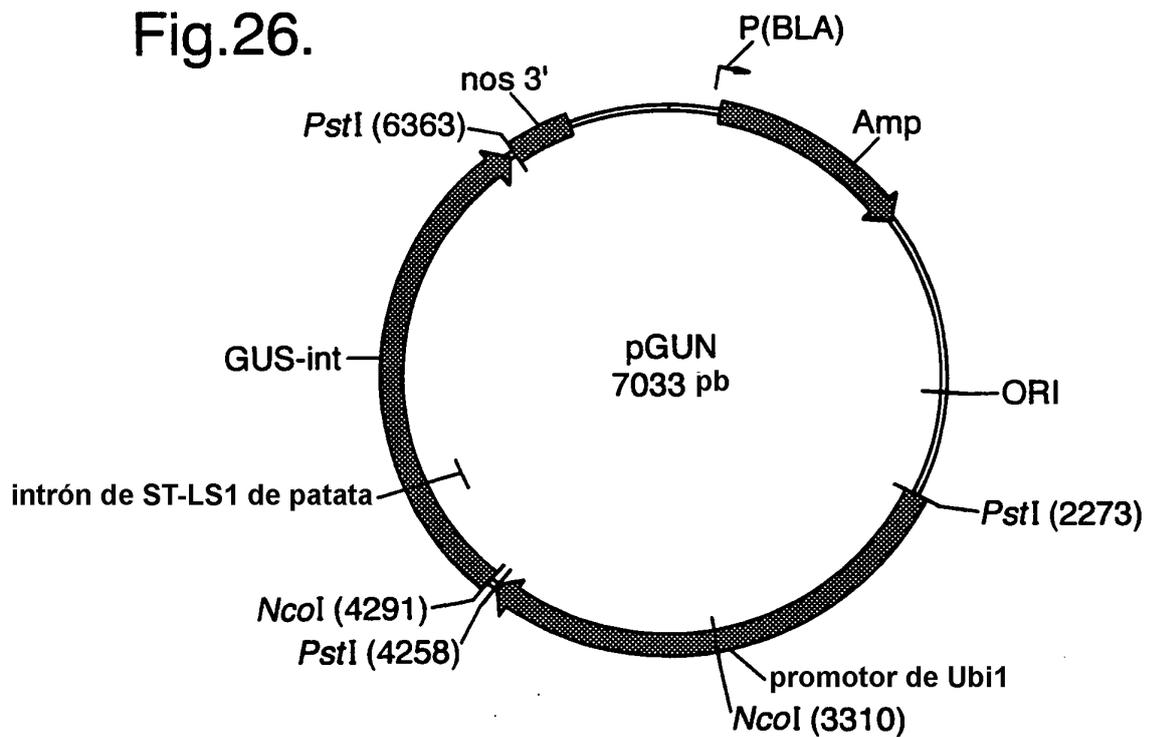
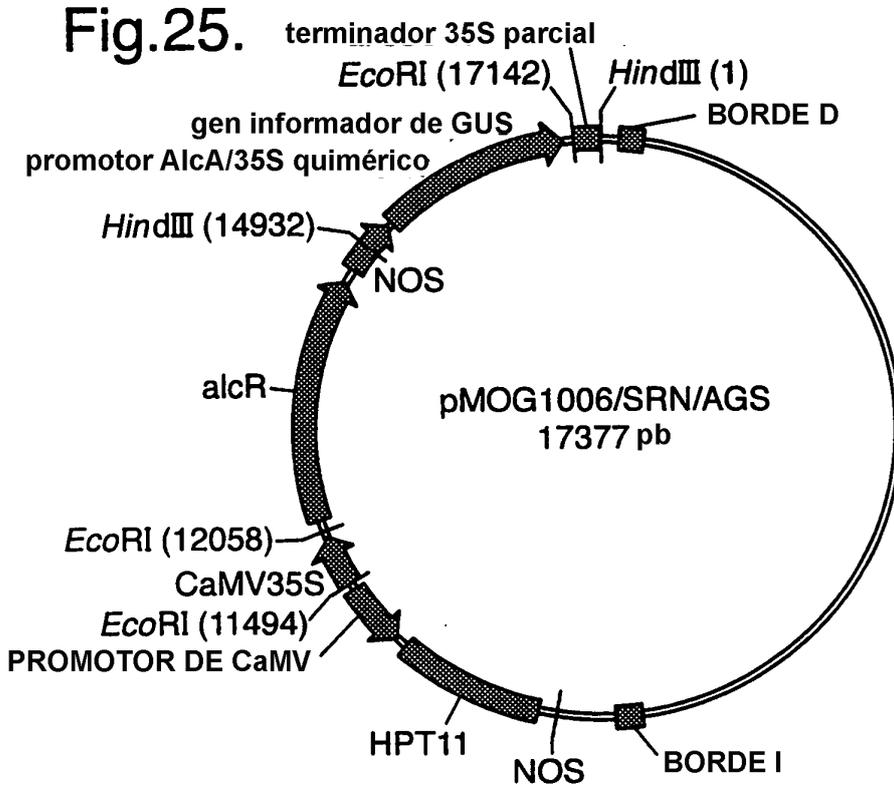


Fig.27.

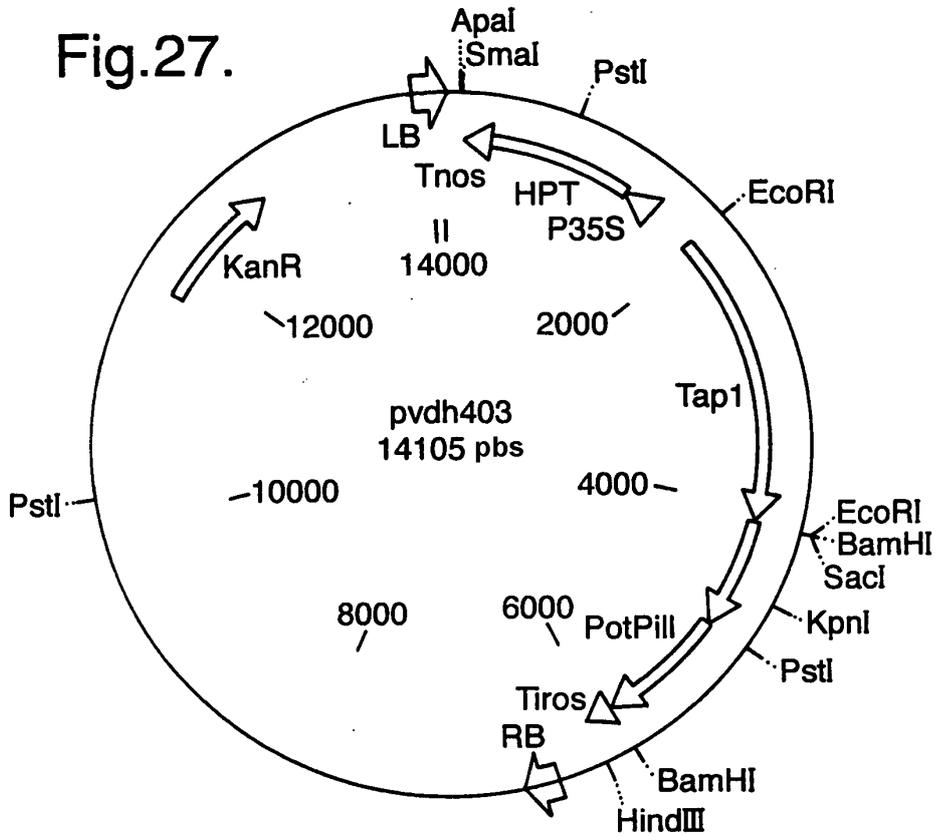


Fig.28.

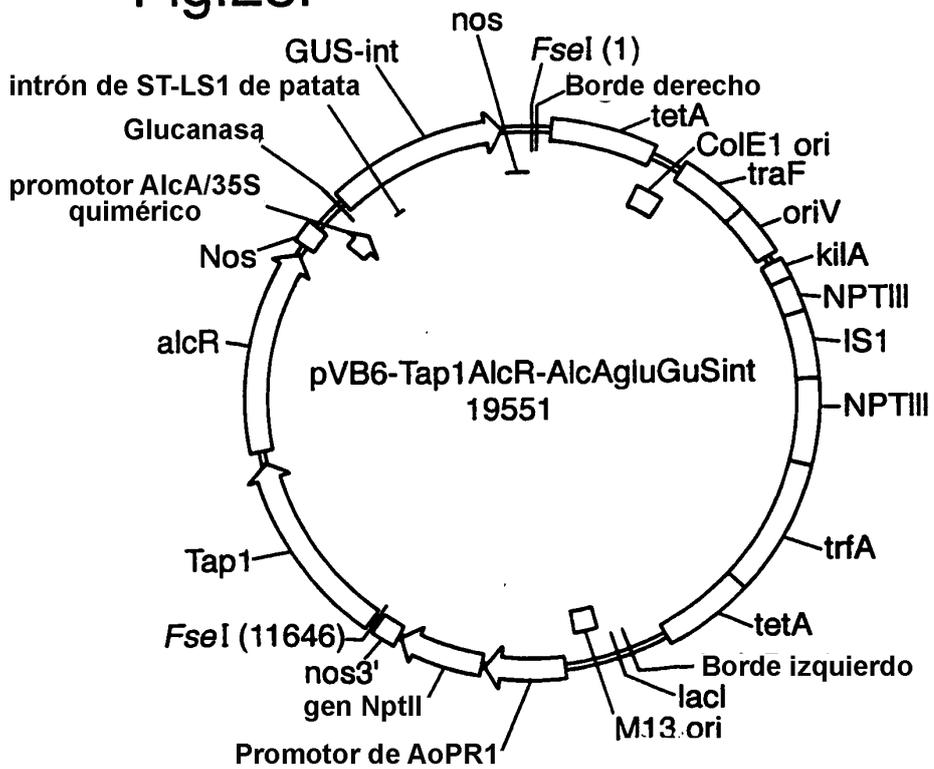


Fig.29.

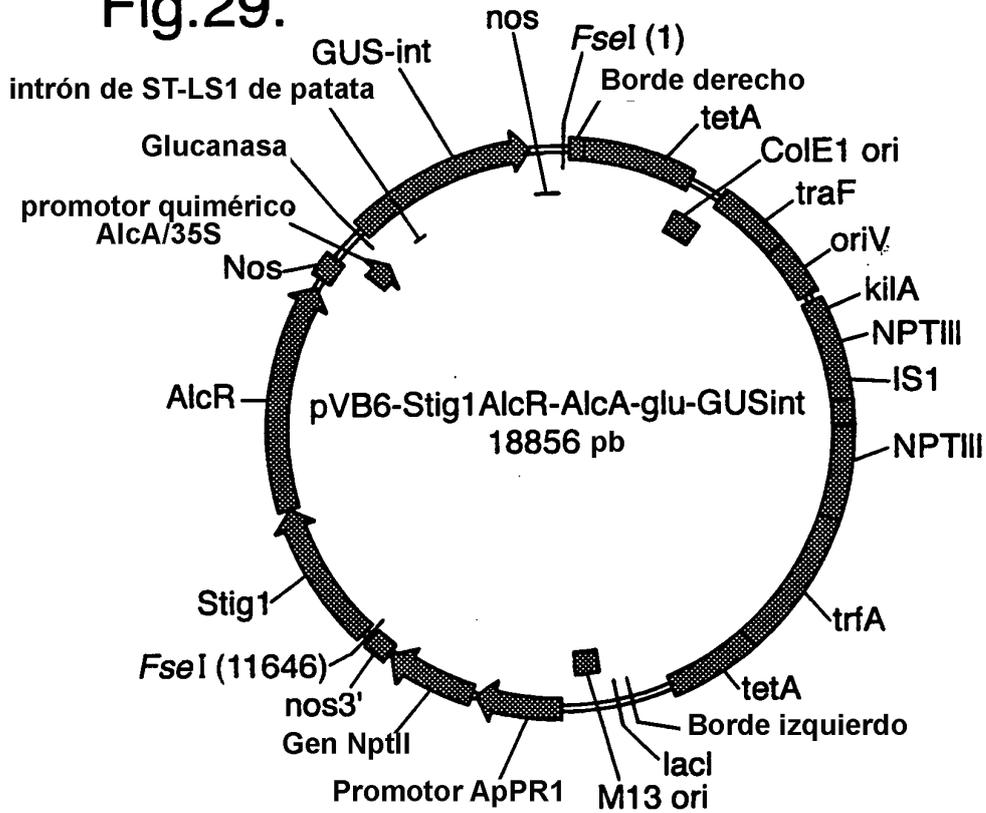


Fig.31.

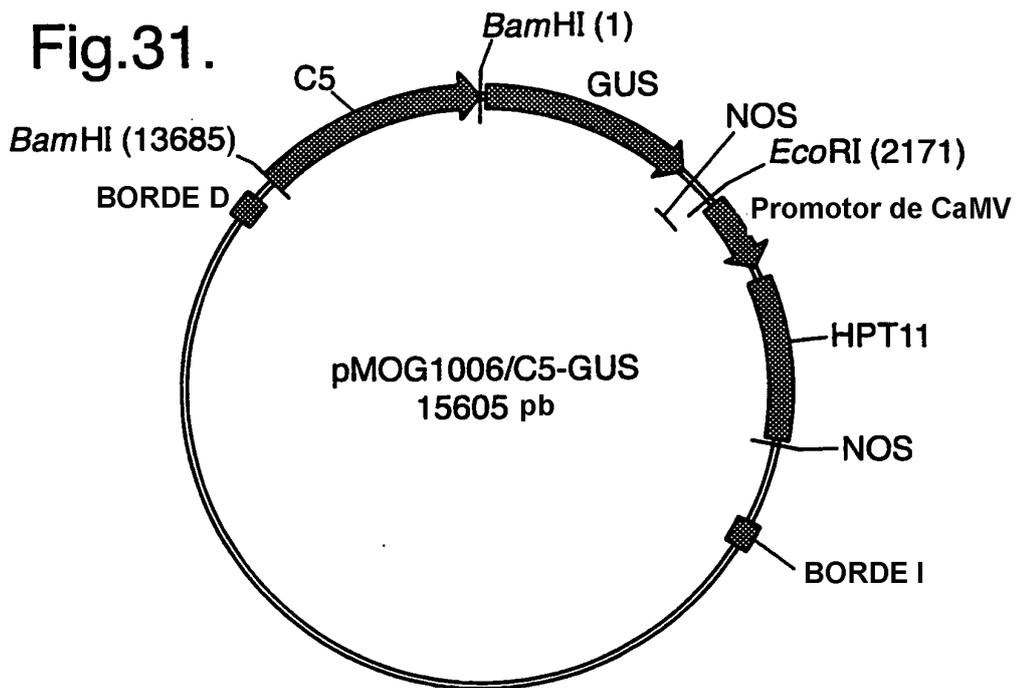
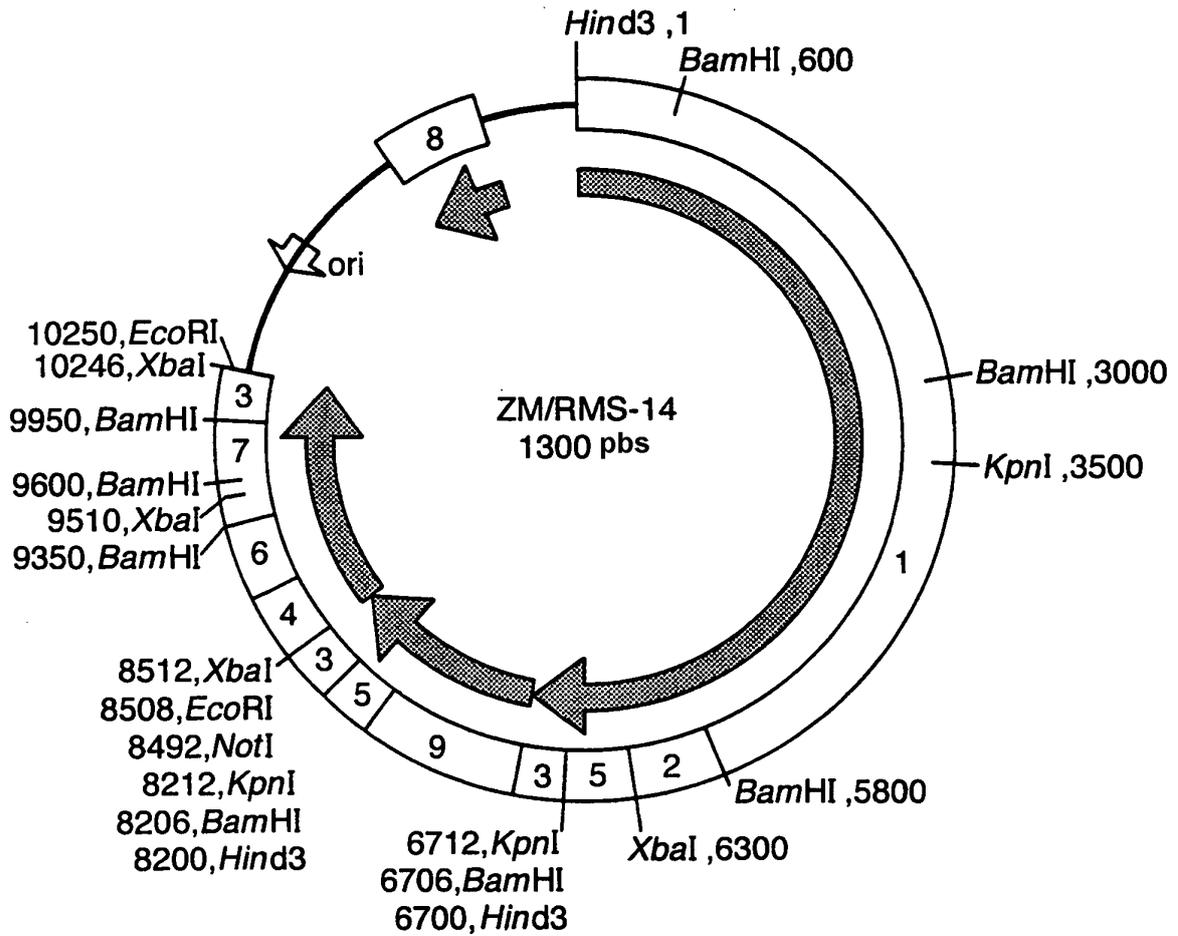


Fig.30.



CLAVE PARA GENES

- | | |
|---|-------------------------------|
| 1 = promotor de MSF14 (fragmento de 5,8 kb) | 6 = intrón Adh 1 |
| 2 = barnasa | 7 = bar |
| 3 = nos poly A | 8 = resistencia a ampicilina |
| 4 = promotor de CaMV 35S | 9 = prom. de GST II-27 0,9 kb |
| 5 = barstar | |

Fig.32.

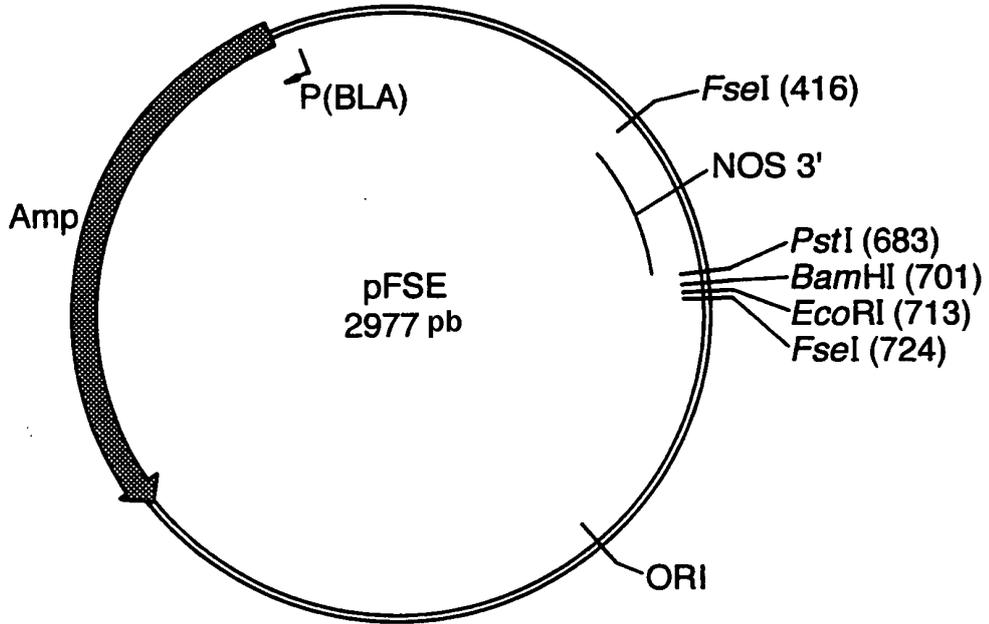


Fig.33.

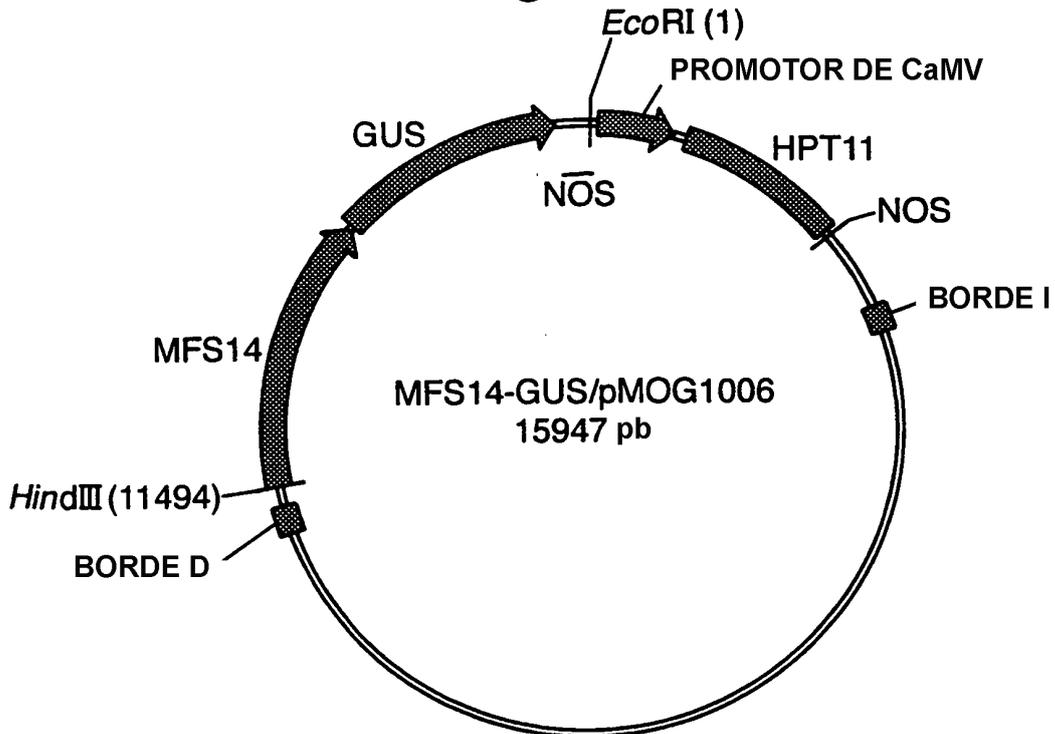


Fig.34.

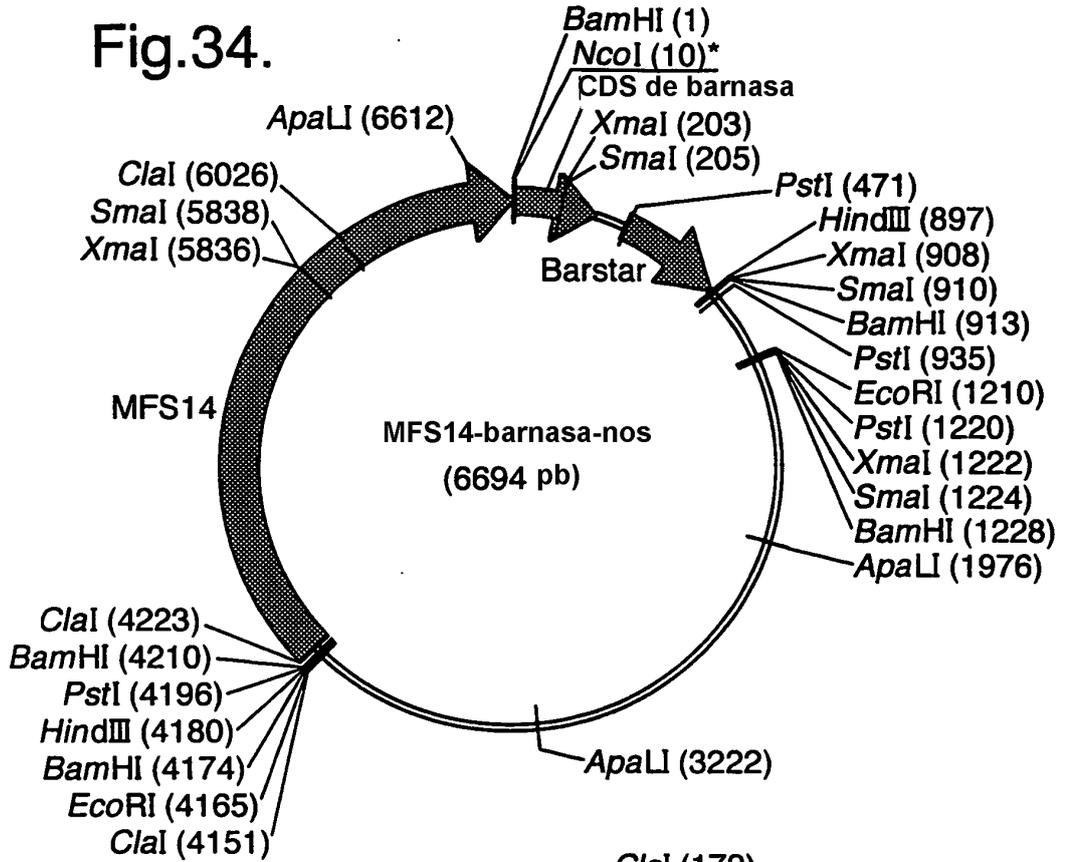


Fig.35.

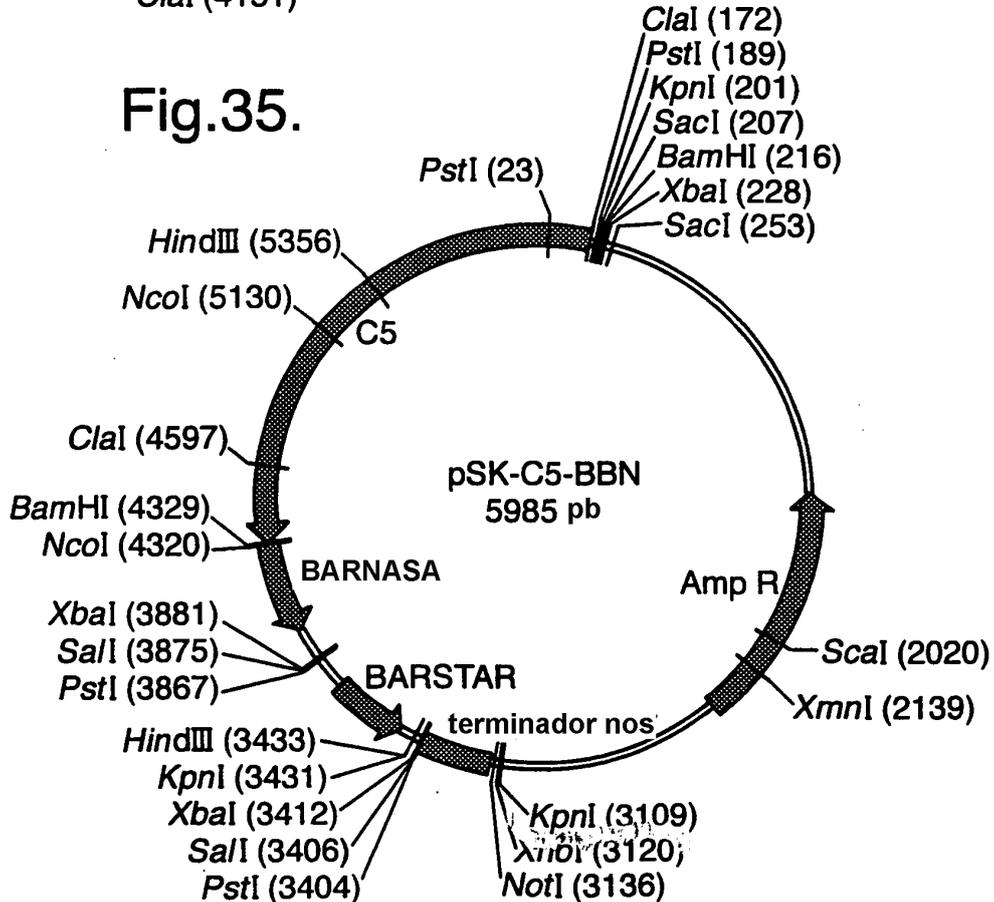


Fig.36.

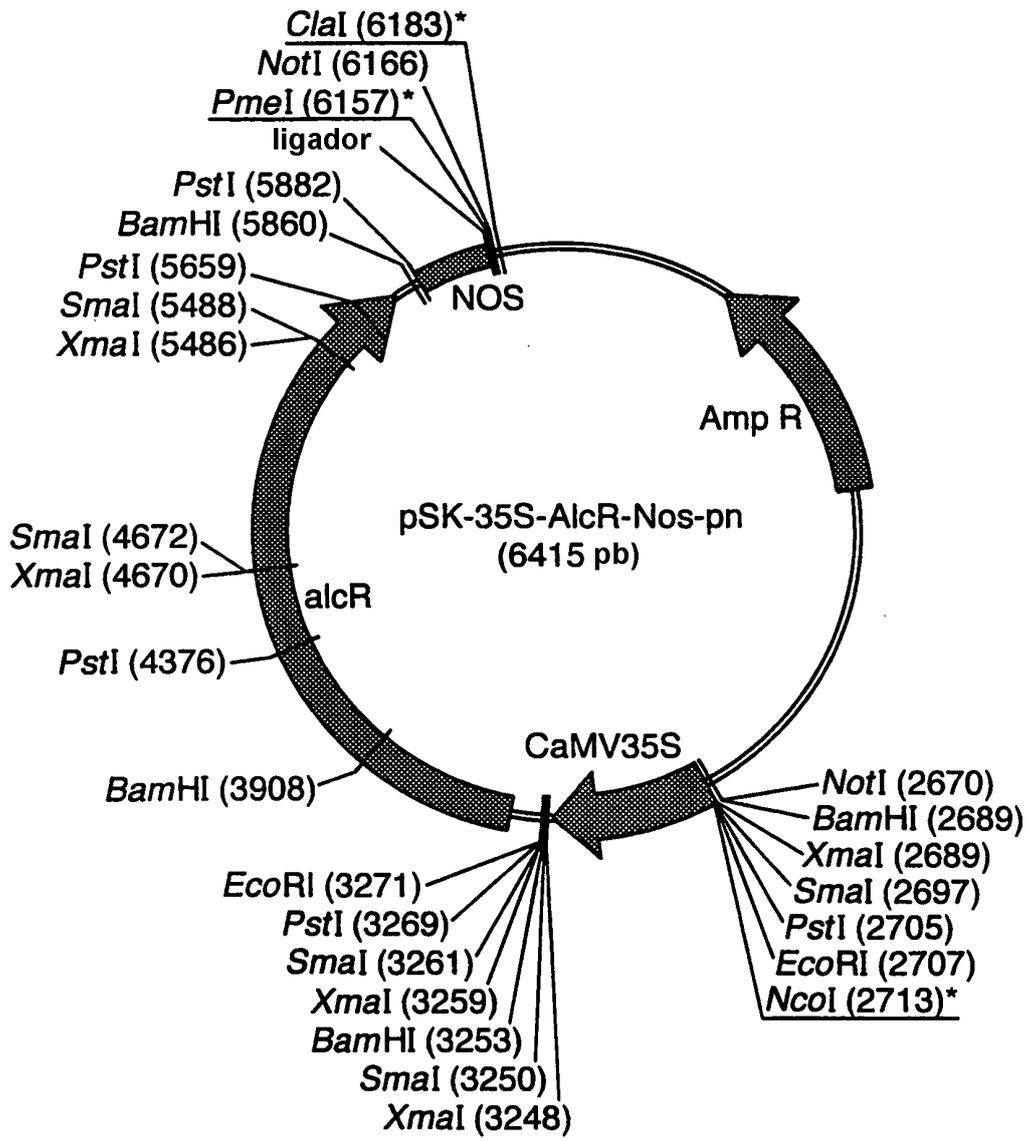


Fig.37.

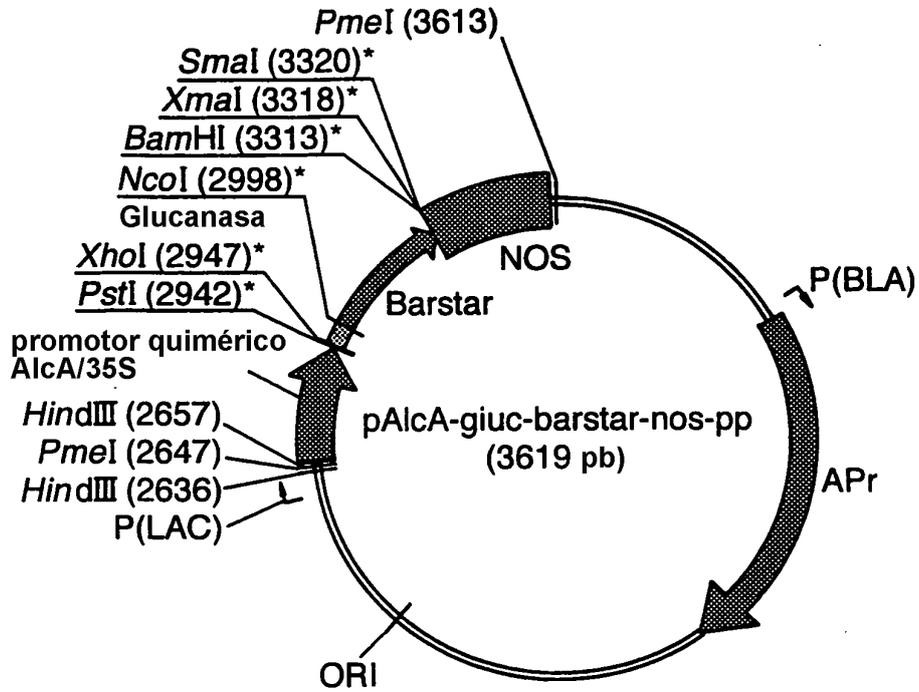


Fig.38.

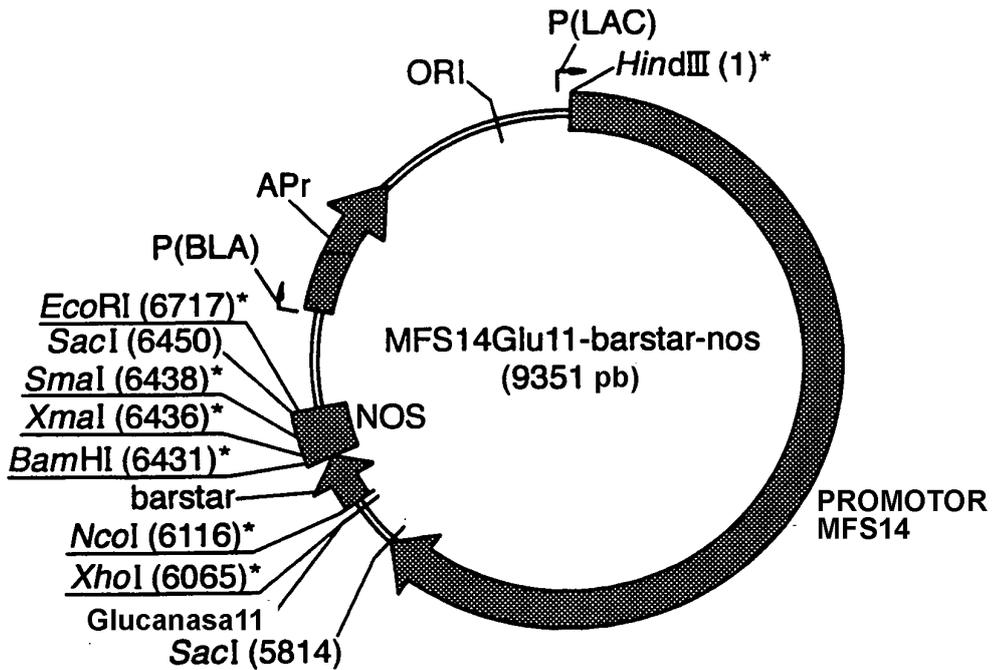


Fig.39.

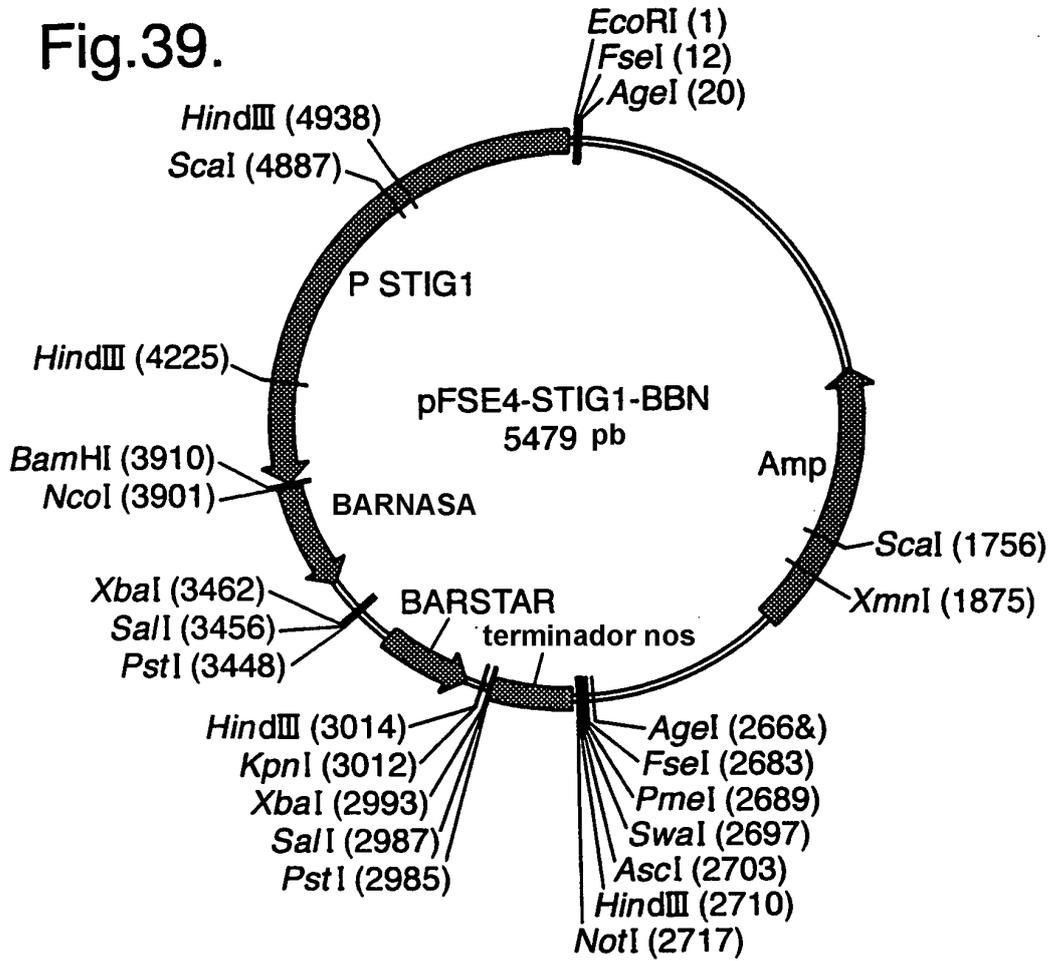
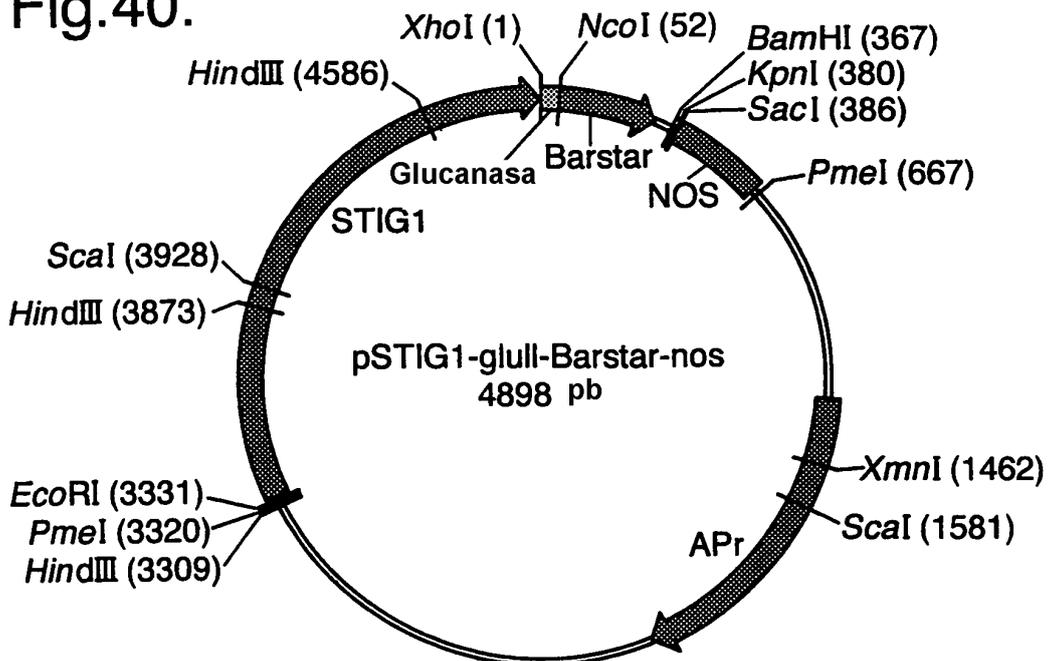


Fig.40.



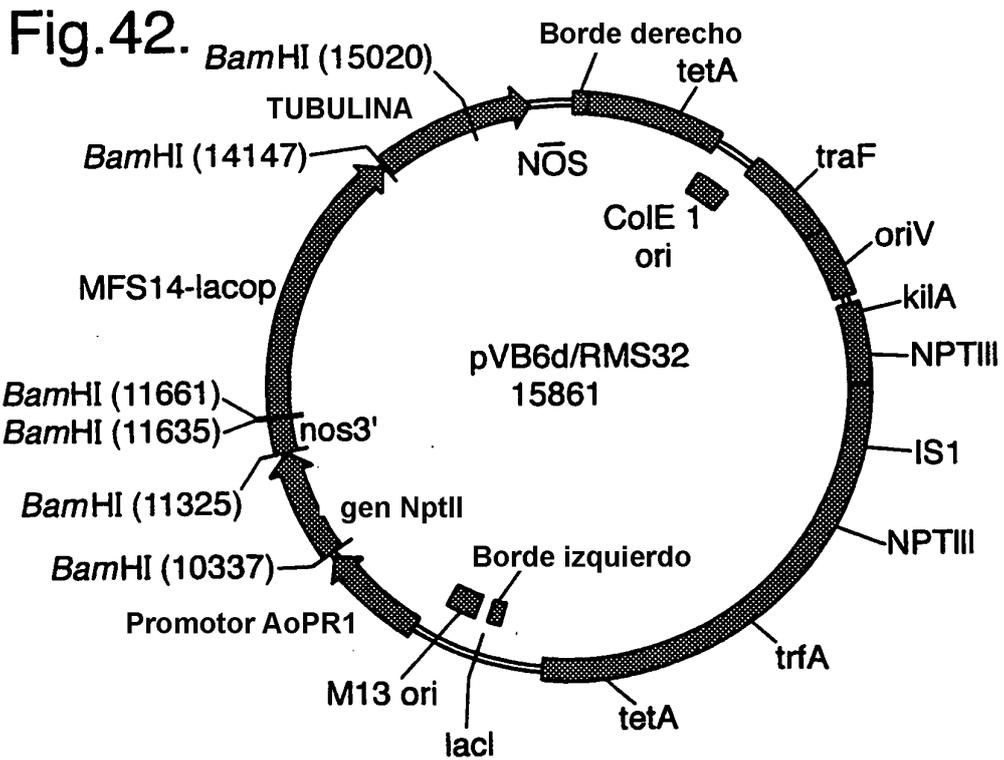
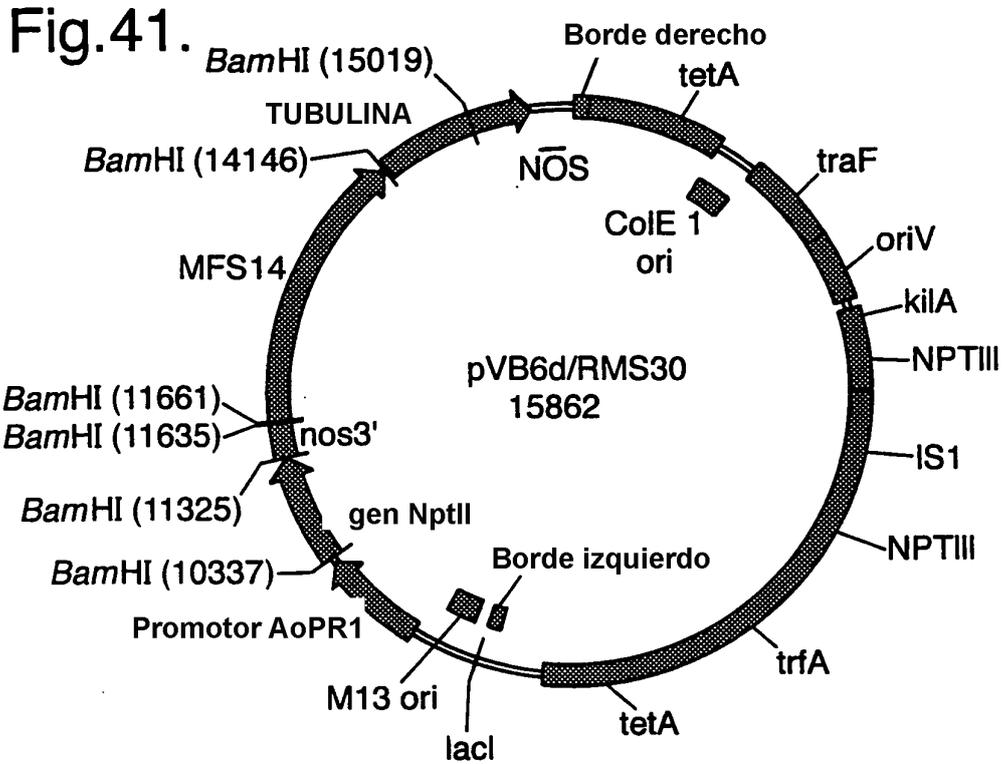


Fig.43.

Experimento para ensayar la capacidad de fuga e inducción del promotor AlcA en callo de tabaco transgénico

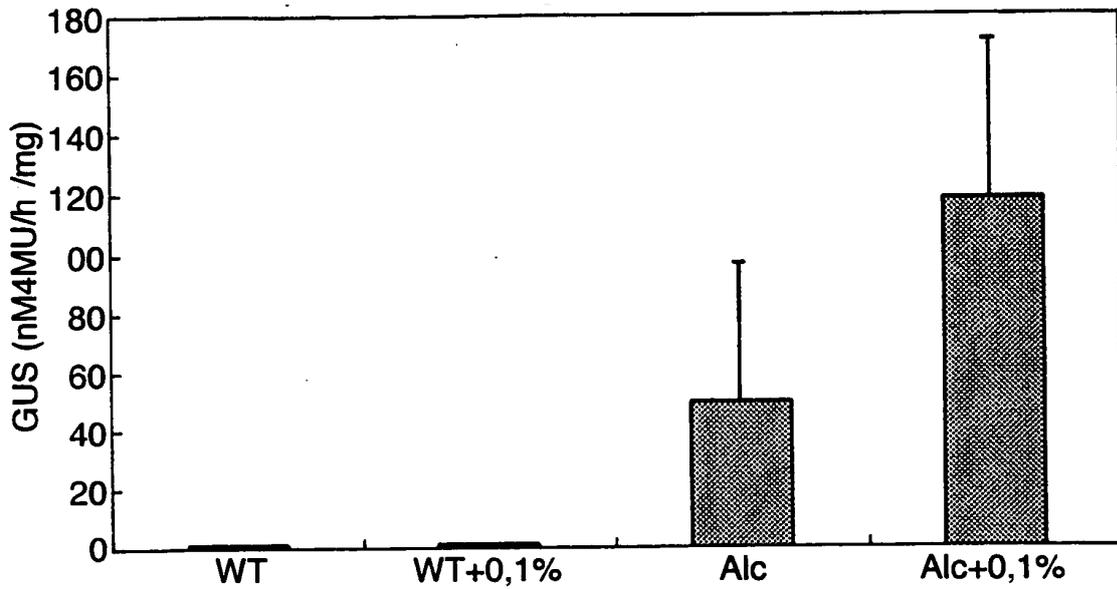


Fig.44.

Análisis de GUS de anteras procedentes de plantas de tabaco sin inducir e inducidas

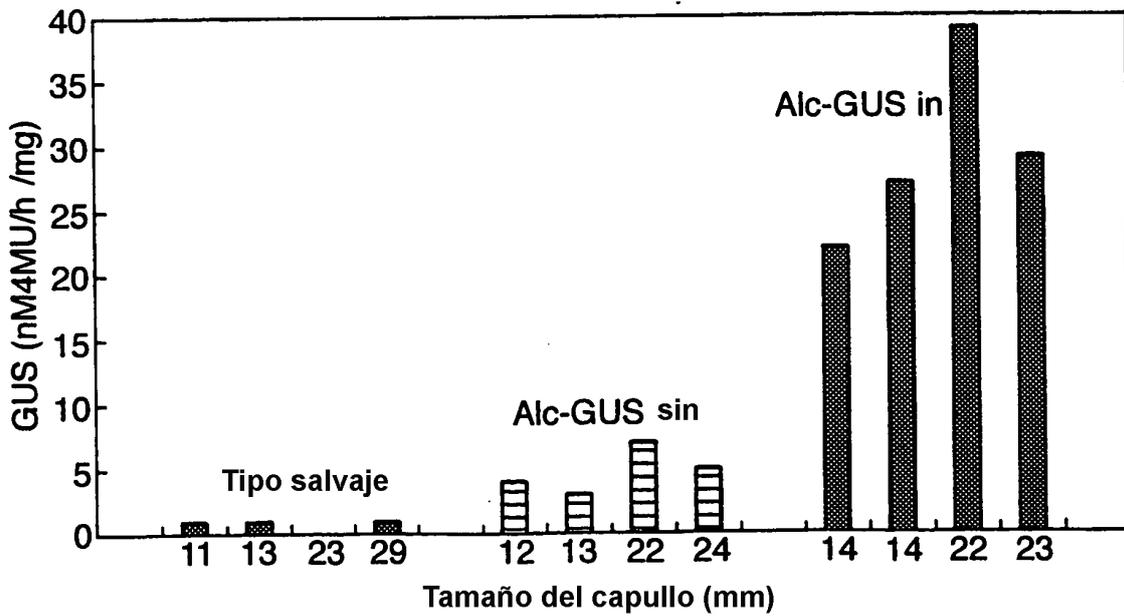


Fig.45.

Análisis de GUS de anteras procedentes de tallos de tabaco tratados con agua o etanol

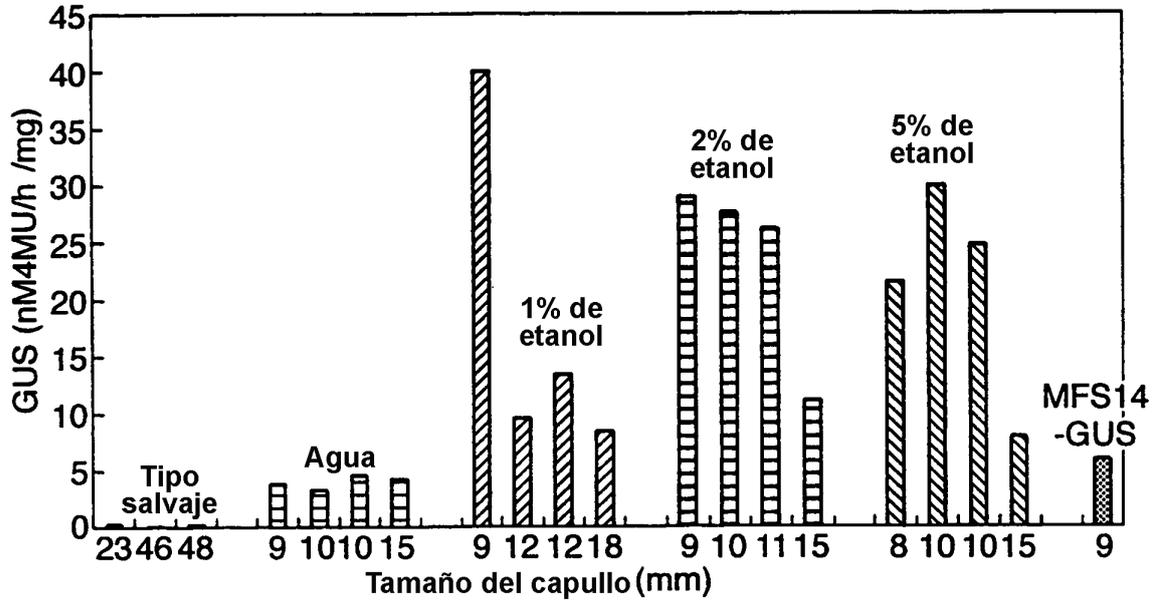
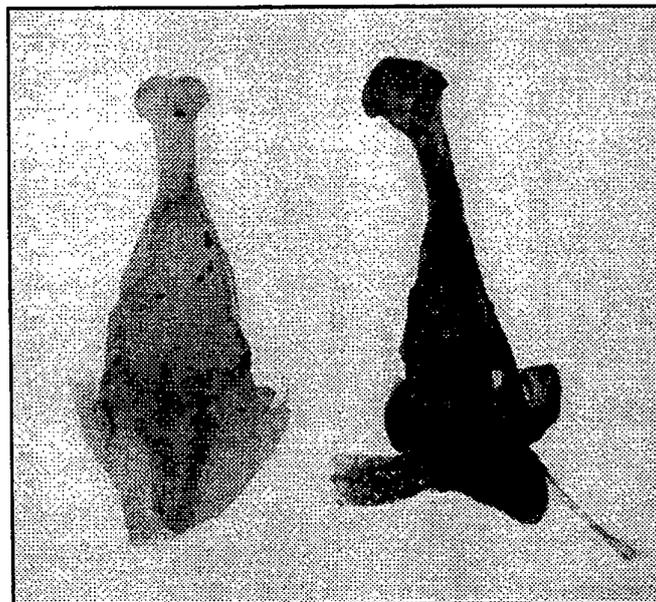


Fig.46.

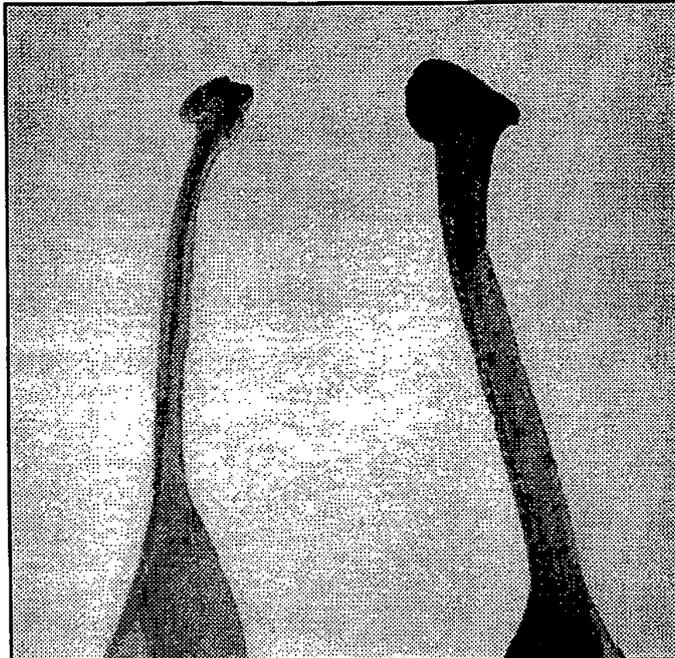


Tratado con H₂O

Tratado con 5% de etanol

Capullos de tabaco de 9-10 mm

Fig.47.

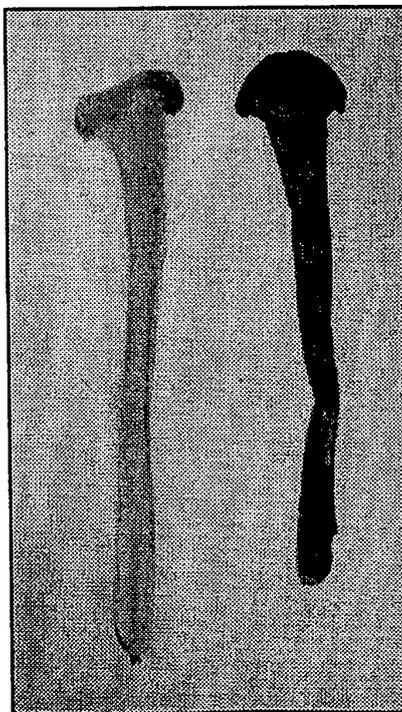


Tratado con
H₂O

Tratado con
5% de etanol

Capullos de tabaco de 17-22 mm

Fig.48.



Tratado con
H₂O

Tratado con 5%
de etanol

Capullos de tabaco de 33-35 mm

Fig.49.

Inducción de flores Alc-GUS de OSR

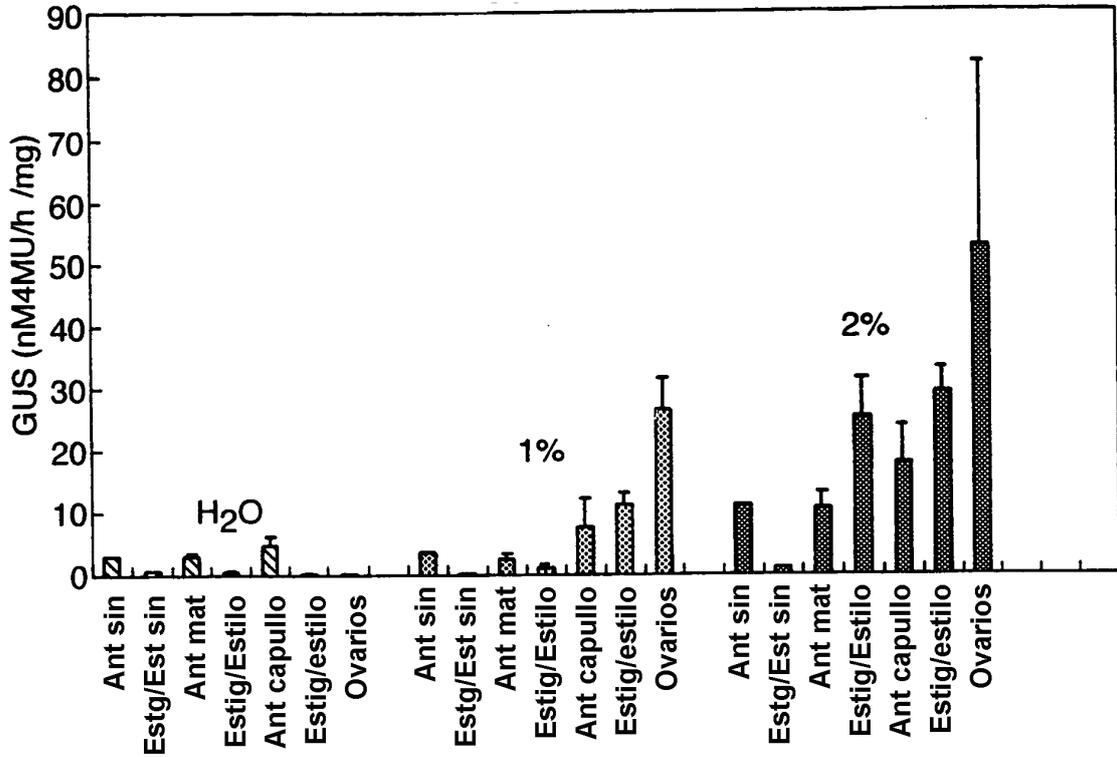
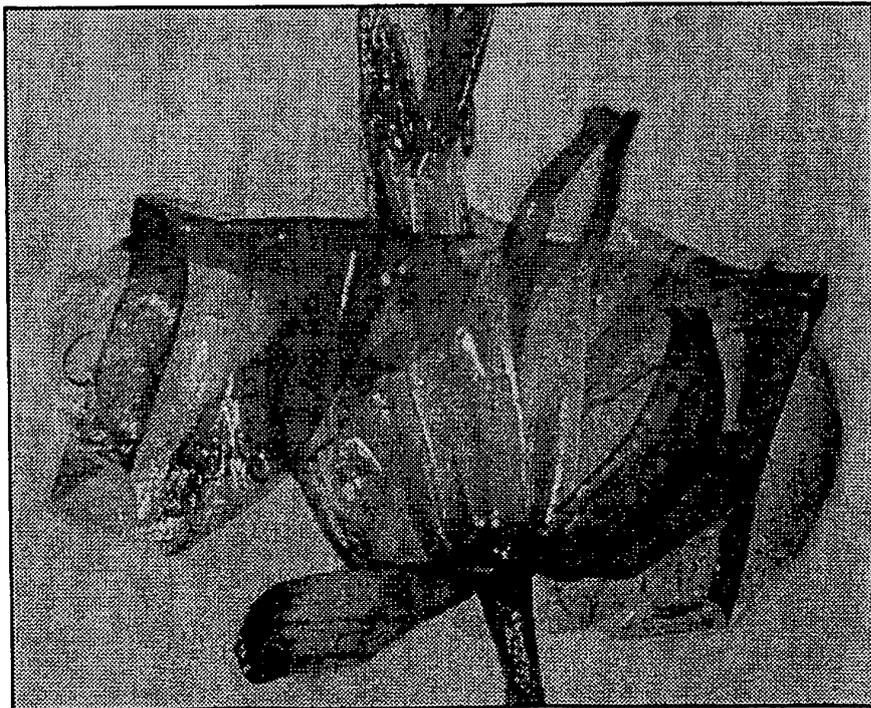
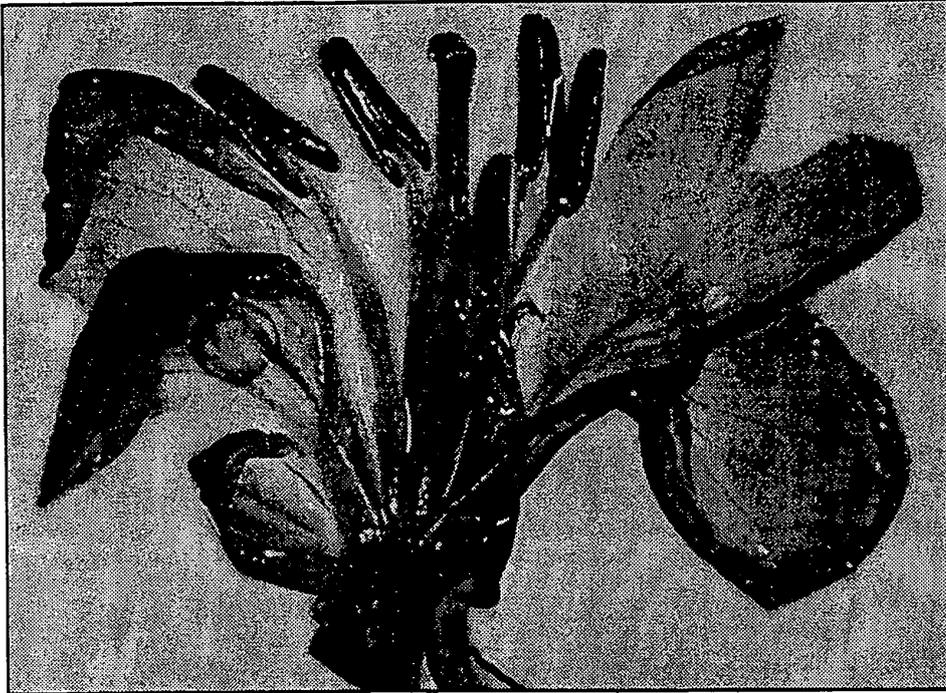


Fig.50.



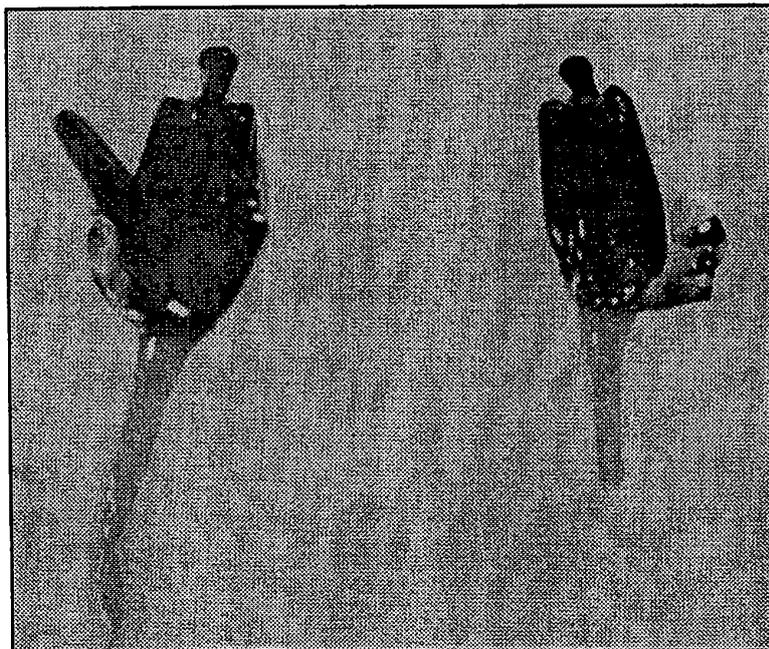
flor Alc-GUS de colza antes de la inducción

Fig.51.



flor Alc-GUS de colza dos días después del empapamiento de las raíces con etanol al 5%

Fig.52.



Tratado con
H₂O

Tratado con
etanol al 5%

Capullo de colza inmaduro (sin pétalos)

Fig.53.



Imagen de flor de colza después de empapar las raíces con etanol al 5%

Fig.54.

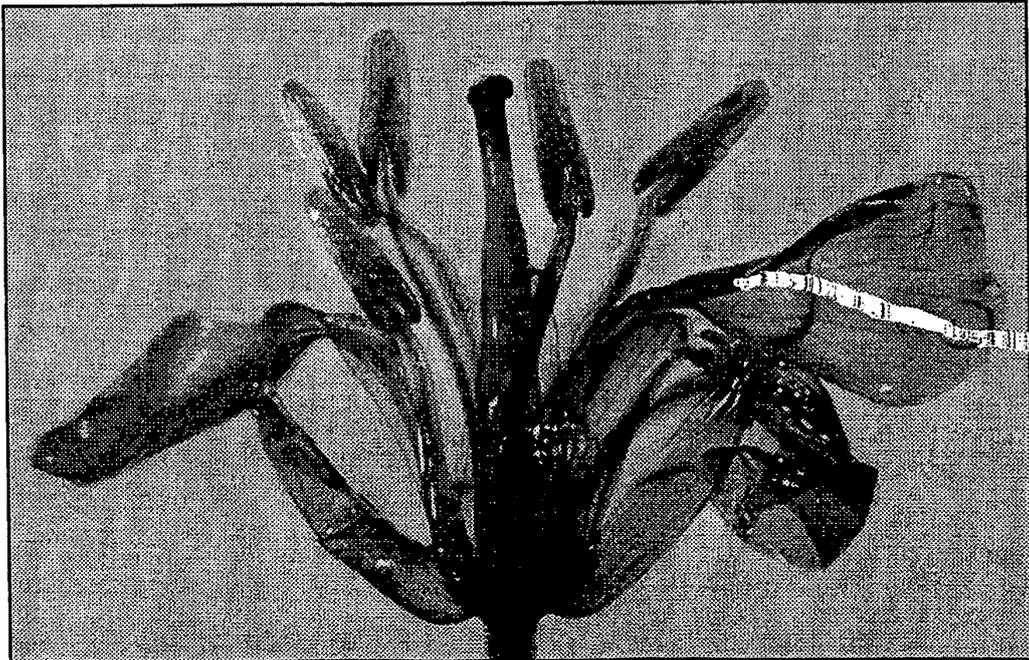


Imagen de flor de colza después de empapar las raíces con etanol al 5%

Fig.55.

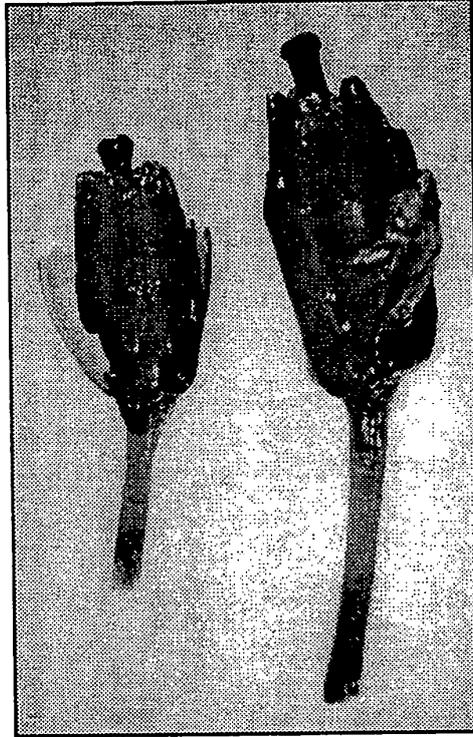
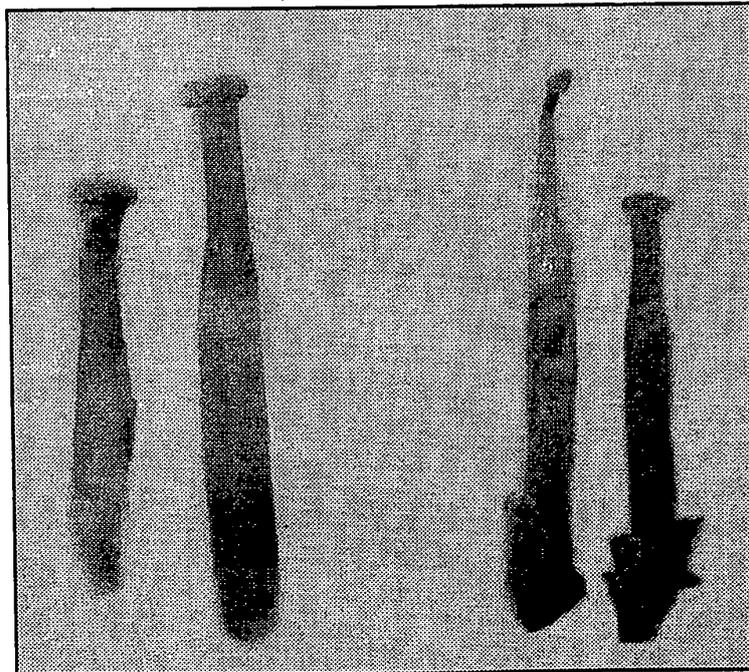


Imagen de flor de colza después de empapar las raíces con etanol al 5%

Fig.56.



Colza de tipo salvaje

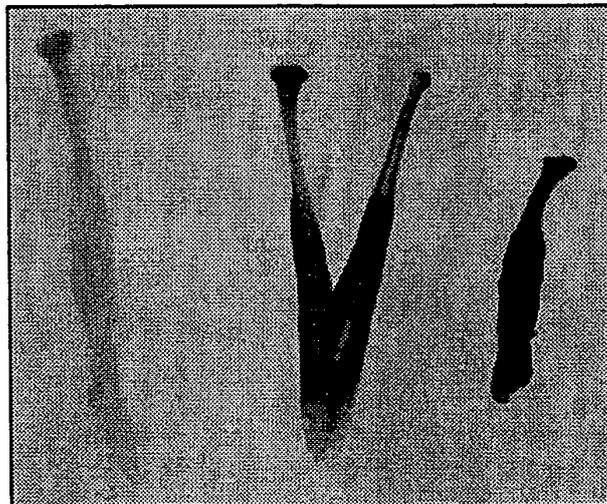
**Colza Alc-GUS
inducida con agua**

Fig.57.



Colza Alc-GUS 2 días después del empapamiento de las raíces con etanol al 2%

Fig.58.



**Planta Alc-GUS
tratada con H₂O**

**Plantas Alc-GUS
tratadas con etanol al 5%**

Fig.59.



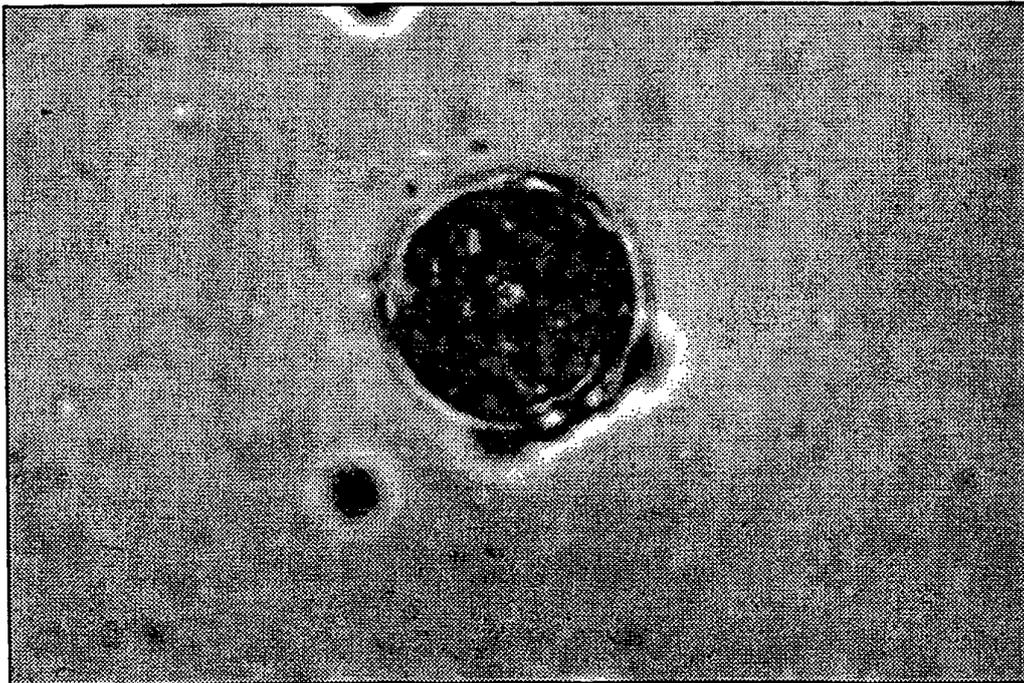
**Flor de colza inducida dejando reposar el tallo de la flor
en etanol al 5%, teñida después de dos días**

Fig.60a.



**Tinción de GUS en la expresión de anteras de tomate
a partir del promotor AlcA**

Fig.60b.



Tinción de GUS en la expresión de polen de tomate a partir del promotor AlcA

Fig.61.

GGATCCTGAAACATATCAGTTGTGTTTGTGTTTTGTAAAT
CTTTTATACTACTAGGGGAGAAAATTAGCTTAGTTCAA
TCGCATCTCATATGTCTAATTACCAGGGGAGAAAATTA
GCTTAGTTCATTTTGTGCTGCCATATGGGTGAAAAAA
TAATGAGACATCTAAATCAGTAAATTGGAAATATAGC
ATCTTAAACCTGCAGGTAGTTTCTTAAACCTGATTCTA
GCTACAACCTAGTACAACCTACTGGTAGTTTTTTAAACC
TGATTCTAGCTACATGTTTTATATTGTGGCACAAGAAC
TTTTAAGAACATATGCTGATGCCCACTGTATTTAGTTA
CTACTTCAAGACCAACTGTATTTTAGTTACAAATGTGT
TTTCAAGATTGTAGAAATTTGTAGCTGAAATTATCCAC
ACCATATTTGTGAACTGACATCATTCTAAGAATATTA
CTGATTAGAATCTTTCACTTTTATAATGCTTTGCAGGAG
TGGCCCCTCTGGAGTTGAATATGCAGTTATAACCAAAT
TTTACCCCTTTTATCCTAGAAGAGTTGCCAAGACACGG
TATAAGACCATGATAATAGACTAAGAGAGGATTTGGC
TCTAATTACTATATGTTTTATTTATGCAGTCCCATGAGA
ACTTTGAGTATTTGCAGATTGCTTTATTAATTTATTA
GTTAAAGATTGTATGTGTTGAGTATGTATCCACTCTTGT
TGGAAGTGTCTTGCAATTCCAATCCAAGGATGTATAAA
ATACTGCATGGGCTAAGTATGTGTTTTTTTCATGATTTG
GAGTATATACTTTTTGTTGCTTGAGAACATGTATGT
ACACTAGAAGCTTGTCAATTGTGTGAACTTGAGTTGAT
CCCTGTCTAACCTGAGTATATATATATATATATTTTGT
GCTTGAGAACAAAGTATGTACAATAGAGGCTTGACAAT
TGTGTGAACTTGAGTTGAACATGAATTTTGATAATCAC
AACTCACCATCCCTTTCAATATGCTTAGAATATAGCTT
TTTATAATTTTTCACCCTACAATACAAAATTGTTCTATG
AAGGCCATGGTACATCATCATATCCTGTATTATCAACC
TAGGATTTGTCTATTTTCGATTAATAATGGCATTGAGTC
AAATTTTGGTTGTTTCAAATGATAGACTTCGATATTTGT
TATGATTTATGAGTTGATTCTTGATAGCATTACTAAAA
AATGACCTATGTATATACAAGTGTCTTCCGTTGCAACG
CACGGGCATATACCTAGTCAATCACTAAGACCCTAATT
TTGAAGTTGGGACTTAGACGTGTTCCACGTTTGTAAG
GCGAGTATATAGGTGTATGTATATAAGAGCCGGTGTAT

Fig.61 (Cont).

ACAACAATTTTTATAAGAAAACCTTGAACAAGTAGCCA
GGTGTTGAAATCTTCATATATGTGCCGACGCCATTCAA
CATCATATTTGGCTTCTGGCGAGGATCGTAGTATCAAG
CAACATAAAAGCAATGACAAACAGCGAAGCACAAAG
ATCTCCCAGGCTCGTCATAAACTAATCACAATGTTGTT
TGTCCTCCACAATTAGCACAACCCATTTTAGAAAAAGA
TGCCACGATCGATCGAGACGTTGGCCAGCTATCAAAC
AGATAAGAACTACCCAAATATTTCCCTAAATCCAGAAC
GGAAGACCCATTGACTAGGTCCTTACCTCTCAAATAGA
CAGACTATTCTTCTCCACATCAAATATAGGGACTCCC
GATGCAACAAACACGGGCCACCACACAACAATGGTGA
AATGACCATGCATGCATCCACGTCCGTACGCAGCCATT
TCGTCTATAAATTTGCTTCCCATCCGATTCAACTACAA
GCTTGCGGGCAAAA**ATGGCAAAGGCTC**

La A subrayada es el punto de inicio transcripcional putativo,
y el ATG en negrita y subrayado es el punto de inicio traduccional.