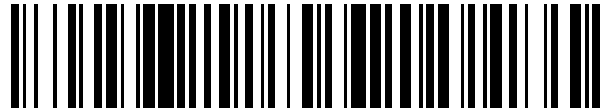


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 542**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2009 E 09795538 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 2350290**

54 Título: **Método para producir plantas estériles masculinas**

30 Prioridad:

28.11.2008 IN DE26972008

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

02.01.2014

73 Titular/es:

**COUNCIL OF SCIENTIFIC & INDUSTRIAL
RESEARCH (100.0%)**

**Anusandhan Bhawan, 2
Rafi Marg New Delhi 110 001, IN**

72 Inventor/es:

**SAWANT, SAMIR, VISHWANATH;
TULI, RAKESH y
SINGH, SUDHIR, PRATAP**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 436 542 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para producir plantas estériles masculinas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para producir plantas estériles masculinas. En particular, esta invención se refiere a la transformación de una planta con una construcción genética que comprende el gen *BECLIN 1* vegetal, y la expresión de este gen en el tapete de las anteras produce una planta transgénica estéril masculina. Las plantas estériles masculinas son útiles para la producción de plantas híbridas mediante hibridación sexual. El desarrollo de variedades cultivadas híbridas es muy deseable debido a su productividad generalmente incrementada debido a un vigor híbrido o heterosis incrementada.

10 Antecedentes de la invención y técnica anterior

15 Las plantas híbridas se han hecho cada vez más importantes en diversos cultivos de alimentos comerciales en todo el mundo. Las plantas híbridas tienen la ventaja de un mayor rendimiento, mejor calidad y resistencia a agresiones que sus progenitores, debido a la heterosis o vigor híbrido. La uniformidad de los cultivos es otra ventaja de las plantas híbridas cuando los progenitores son homocigotos; esto conduce a una gestión mejorada de los cultivos. La semilla híbrida, por lo tanto, es comercialmente importante y se vende a un precio más elevado. En cultivos tales como maíz, girasol, sorgo, remolacha azucarera, algodón, y muchas hortalizas, los híbridos representan una gran proporción del mercado de semillas. No solamente los EE.UU. y Europa, sino también muchos países en desarrollo basan su producción de alimentos en gran medida en los híbridos. La venta de híbridos en los diversos cultivos representa casi un 40 por ciento del negocio global de semillas comerciales de alrededor de 15.000 millones de dólares. Es probable que esta proporción se incremente, ya que todavía se tiene que comprender completamente la importancia del vigor híbrido, especialmente en los países en desarrollo.

25 La producción de variedades híbridas de maíz (desde los años treinta en los EE.UU.), algodón (desde 1970 en India) y de arroz (desde 1976 en China) representa el esfuerzo de mejora vegetal más significativo y eficaz del siglo veinte. Se observó un incremento del 600% entre 1930 y 1990 en la producción de maíz en EE.UU. tras la introducción de la mejora vegetal híbrida, en comparación con los rendimientos uniformes para las poblaciones seleccionadas con polinización libre durante los 60 años anteriores (Stuber, 1994).

30 El concepto de vigor híbrido (Zirkle, 1952) surgió desde las primeras observaciones en el siglo dieciocho de J.G. Koelreuter de cruces interespecíficos en *Nicotiana*, *Dianthus*, *Verbascum*, *Mirabilis*, *Datura*, confirmadas por Darwin (Darwin, 1876) en hortalizas, y W.J. Beal en maíz (Beal, 1880). Posteriormente, este efecto se aprovechó en la mejora vegetal (Shull, 1952) cuando aparecieron las herramientas para producir la cantidad necesaria de semillas en especies hermafroditas: el primer sistema de esterilidad masculina se desarrolló en cebolla en 1943 (Jones, 1943) y otros se desarrollaron en una amplia diversidad de especies tales como remolacha azucarera, maíz, sorgo, girasol, arroz, semilla de colza, y zanahoria (Frankel, 1977).

35 La clave de la producción comercial eficaz de semillas híbridas es el control suficiente del proceso de polinización que es la esterilidad masculina. La esterilidad masculina se define como la incapacidad de las plantas de producir anteras funcionales, polen, o gametos masculinos. La primera documentación de la esterilidad masculina apareció en 1763 cuando Koelreuter observó el aborto de las anteras en especies e híbridos específicos. El maíz tiene flores masculinas y femeninas claramente diferentes que hacen que la planta sea muy adecuada para la emasculación manual o mecánica. Las espigas se eliminan de las plantas de semillas antes de que puedan esparcir polen. Aunque la eliminación de las espigas se usa actualmente en la producción de semillas híbridas para plantas tales como el maíz, el proceso es laborioso y costoso, tanto con respecto al coste de la eliminación propiamente dicha de las espigas como con respecto a la pérdida de rendimiento como resultado de la eliminación de las espigas del progenitor femenino.

45 La mayoría de las plantas de cultivo de interés tienen ambos órganos masculinos y femeninos funcionales en la misma flor, y, por lo tanto, la emasculación no es un procedimiento simple. Aunque es posible eliminar manualmente los órganos que forman el polen antes de que se esparza el polen, esta forma de producción de híbridos es extremadamente laboriosa y cara. Las semillas se producen de esta manera solamente si el valor y la cantidad de semillas recuperadas garantizan el esfuerzo.

50 Otros medios generales para producir semillas híbridas es usar productos químicos que destruyen o bloquean la formación de polen viable. Estos productos químicos, denominados gametocidas, se usan para conferir una esterilidad masculina transitoria. La producción comercial de semillas híbridas mediante el uso de gametocidas está limitada por el coste y la disponibilidad de los productos químicos y la fiabilidad y la duración de la acción de las aplicaciones. Una limitación grave de los gametocidas es que tienen efectos fitotóxicos, cuya gravedad depende del genotipo. Otras limitaciones incluyen que estos productos químicos pueden no alcanzar de manera eficaz las zonas reproductivas masculinas, o pueden no ser eficaces para cultivos con un periodo de floración prolongado, porque las flores nuevas producidas pueden no verse afectadas. Por lo tanto, es necesaria la aplicación repetida de los productos químicos.

Muchos sistemas de producción de semillas híbridas comerciales actuales para cultivos de campo se basan en un medio genético de control de la polinización. Las plantas que se usan como hembras no pueden producir polen, no pueden esparcir el polen, o producen polen que es bioquímicamente incapaz de llevar a cabo la auto-fertilización. Los sistemas de control del polen basados en mecanismos genéticos que provocan esterilidad masculina tienen un interés más generalizado para la producción comercial de semillas. Existen tres tipos principales de esterilidad masculina observados en la naturaleza. Los tres tipos de esterilidad masculina se usan en los programas comerciales de mejora vegetal para asegurar una polinización cruzada para producir semillas híbridas en diferentes cultivos.

Un tipo de esterilidad masculina es la codificada nuclear denominada esterilidad masculina genética. Está controlada normalmente por un único gen recesivo, *ms*, pero también se conocen genes dominantes que controlan la esterilidad masculina, p.ej. en girasol. Así, la esterilidad masculina nuclear puede ser dominante o recesiva. Se han aislado muchos genes de esterilidad masculina (*ms*) nucleares diferentes en maíz. En arroz se conocen 25 *ms*. En una planta homocigota recesiva para tal gen, el polen no puede desarrollarse hasta la madurez. Para fines de mejora vegetal, una planta progenitora estéril masculina recesiva se mantiene cruzándola con una planta fértil masculina heterocigota que también incluye el alelo de esterilidad masculina recesiva, de forma que la descendencia consiste en un 50% de plantas estériles masculinas recesivas. El otro 50% son plantas fértiles masculinas que se tienen que descartar en programas de cruce exogámico que solamente se pueden llevar a cabo con eficacia si el alelo de esterilidad masculina recesiva se segrega junto con un marcador seleccionable o cribable. En la patente de EE.UU. 4.727.219 se describe un procedimiento para el uso de la esterilidad masculina recesiva para la producción de maíz híbrido. Las plantas estériles masculinas nucleares dominantes, en comparación con las plantas estériles masculinas recesivas, se pueden mantener por medio del cruce con una planta fértil masculina, para producir una descendencia que consiste en un 50% de plantas estériles masculinas dominantes. La utilidad de la planta estéril masculina nuclear dominante, sin embargo, es limitada debido a que su alelo de esterilidad masculina dominante en la mayoría de los casos no está asociado estrechamente (es decir, dentro del mismo locus genético) a un marcador seleccionable o cribable. La esterilidad dominante se puede usar solamente para la formación de semillas híbridas si es posible la propagación de la línea femenina (por ejemplo, por medio de la propagación clonal in vitro). Se desarrollaron líneas estériles masculinas nucleares dominantes con un marcador de semillas azul en trigo candeal y trigo común (Tian y Liu, 2001). Esta esterilidad masculina genética es de existencia generalizada en plantas, pero la utilidad comercial de este sistema de esterilidad es limitada por el coste de la propagación clonal y del descarte de las hileras femeninas de las plantas autofértiles.

La esterilidad masculina genética se puede subdividir en dos grupos amplios: (1) insensible al medio, es decir, la expresión genética de *ms* se ve mucho menos afectada por el medio, y (2) sensible al medio, es decir, la expresión genética de *ms* se da dentro de un intervalo específico de regímenes de temperaturas y/o fotoperiodos; este tipo de esterilidad se conoce en arroz, tomate, trigo, etc. La esterilidad masculina sensible al medio se divide adicionalmente en dos grupos: (1) esterilidad masculina genética sensible a la temperatura, p.ej. la línea TGMS de arroz Pei-Ai645 y (2) esterilidad masculina genética sensible al fotoperiodo, p.ej. arroz 5047S. Además, se han usado aproximaciones de ingeniería genética para producir esterilidad masculina transgénica, para lo cual se discute una aproximación nueva en este documento.

El segundo tipo de esterilidad masculina está condicionada por partículas hereditarias del citoplasma. La esterilidad masculina citoplasmática está provocada por el genoma extranuclear (mitocondrias o protoplastos) y muestra una herencia materna. La manifestación de la esterilidad masculina en este caso se puede controlar completamente mediante factores citoplásmicos o mediante la interacción entre factores citoplásmicos y nucleares. Muestran una herencia no mendeliana. Este no es un tipo muy habitual de sistema estéril masculino en el reino vegetal. La esterilidad masculina citoplasmática (CMS) de la línea germinal se puede llevar a cabo por medio del cruce con un germoplasma de CMS natural como progenitor femenino. Aquí, la esterilidad se transmite solamente por medio de la parte femenina, y toda la progenie será estéril. Esto no es un problema para cultivos tales como cebollas o zanahorias, en los que el producto recogido en la generación F1 se produce durante el crecimiento vegetativo. Pero en otros casos en los que la propagación clonal no es posible, las líneas CMS se deben mantener mediante cruzamiento repetido con una línea hermana (conocida como la línea de mantenimiento) que es genéticamente idéntica excepto porque posee un citoplasma normal y por lo tanto es fértil masculina. Esta aproximación de inducción de la esterilidad masculina en la línea germinal basándose en el citoplasma esterilizante se empleó en arroz, sorgo, girasol y mijo. Pero la descendencia de las plantas de este tipo solamente tiene valor comercial si el producto económico de la descendencia no es para el uso como semilla, sino para plantas tales como plantas ornamentales y remolacha azucarera.

Cuando los genes nucleares para la restauración de la fertilidad (*Rf*) están disponibles para el sistema de CMS en cualquier cultivo, se denomina esterilidad masculina genética citoplasmática (CGMS). Los genes restauradores de la fertilidad (*Rf*) son diferentes de los genes de la esterilidad masculina genética. Este tercer tipo de sistema de esterilidad masculina es el resultado de una combinación de esterilidad masculina codificada nuclear y esterilidad masculina codificada citoplasmáticamente. En este caso, la esterilidad se manifiesta por la influencia de genes tanto nucleares como citoplasmáticos. Los casos de esterilidad masculina citoplasmática se incluirían en el sistema citoplasmático-génico a medida y cuando se descubrieran los genes restauradores para ellos. Es probable que se descubriera un gen restaurador para todos los casos de esterilidad masculina citoplasmática si se llevase a cabo una investigación minuciosa. Normalmente hay dos tipos de citoplasmas, N (normales) y S (estériles). Los genes *Rf* no

tienen expresión por sí mismos a menos que esté presente el citoplasma estéril. Los genes *Rf* son necesarios para restaurar la fertilidad en el citoplasma S que provoca esterilidad. Así, una combinación de citoplasma N con *rff* y citoplasma S con *Rf* produce individuos fértiles; mientras el citoplasma S con *rff* produce solamente individuos estériles masculinos. El citoplasma N con *Rff* es el mejor para una fertilidad estable. La patente de Estados Unidos 6320098 describió un método para producir soja estéril masculina genética citoplasmática y un método para producir soja híbrida. La patente de Estados Unidos 5773680 utilizó un sistema de esterilidad masculina genética-citoplasmática en la producción de arroz natural híbrido.

En general, el uso de CMS para la producción de semillas comerciales implica el mantenimiento de tres líneas de mejora vegetal: una línea estéril masculina (progenitor femenino), una línea de mantenimiento que es isogénica respecto de la línea estéril masculina pero que contiene mitocondrias completamente funcionales y una línea de restauración que tiene genes nucleares (genes *Rf*) para la restauración de la fertilidad.

El descubrimiento de genes negativos dominantes que alterasen el desarrollo de las plantas sería especialmente útil en el desarrollo de métodos genéticos para inducir la esterilidad masculina, ya que otros métodos disponibles, que incluyen la esterilidad masculina citoplasmática y la esterilidad masculina nuclear, tienen defectos. Un gen negativo dominante es uno que, cuando se expresa, da como resultado un fenotipo dominante en la planta. Herskowitz (1987) usó el término "negativo dominante" para indicar un gen que codifica un polipéptido mutante que, cuando se sobreexpresa, altera la actividad del gen de tipo natural. Un gen de tipo natural es uno del que deriva el mutante. En la presente descripción, el gen negativo dominante se aplica a un gen que codifica un producto que altera un proceso genético endógeno de una célula hospedadora que recibe el gen, y que es eficaz en una única copia o que puede producir un efecto debido a la sobreexpresión del gen o mediante una producción incrementada del producto del gen. Son ejemplares de la clase de genes negativos dominantes los genes citotóxicos, genes de metilasa, y genes inhibidores del crecimiento. Los genes negativos dominantes incluyen el gen de la cadena A de la toxina de la difteria (Czako y An, 1991), los mutantes de la división del ciclo celular tales como CDC en maíz (Colasanti, et al., 1991) el gen WT (Farmer, et al., 1994) y P68 (Chen, et al., 1991). La biotecnología ha posibilitado el desarrollo de varios sistemas de control de la polinización nuevos que podrían ser útiles para la producción de semillas híbridas. Desde que se describió el primer sistema de esterilidad masculina transgénica (Mariani, 1990), se ha informado de muchas estrategias para producir plantas estériles masculinas. Ha habido un interés significativo en el uso de un sistema de ablación para controlar el desarrollo reproductivo en plantas. El control reproductivo se ha conseguido en varias especies vegetales mediante la ablación genética, que implica la unión de un promotor preferido reproductor con un gen negativo dominante para eliminar las células reproductivas. La técnica anterior relacionada con la invención propuesta es la siguiente:

- Las patentes EP344029, EP1135982 y WO89/10396 describieron un sistema para producir una planta estéril masculina transformando una planta con un ADN que codificaba barnasa bajo control de un promotor específico del tapete. La barnasa es una RNasa originaria de *Bacillus amiloiquefaciens*. Esta enzima tiene 110 residuos de aminoácidos e hidroliza el ARN. Cuando se expresa en las células, esta enzima degrada el ARN en las células y así inhibe las funciones de las células y finalmente en muchos casos provoca la muerte de las células. Mediante el uso de esta característica, se espera por tanto que la función del sitio específico se pueda controlar de manera selectiva mediante la expresión del gen de barnasa en un sitio específico de una planta. La transformación de plantas de tabaco y colza con dicha construcción promotor-gen impidió que las plantas produjeran polen fértil (Mariani et al., 1990). De forma similar, también se observó el colapso del tapete cuando se usaron los promotores A9 y A6 para controlar la expresión del gen de barnasa en plantas transgénicas (Hird et al., 1993; Paul et al., 1992).
- Cuando se empleó el gen de barnasa como gen de esterilidad masculina, sin embargo, se observó con frecuencia que las plantas transgénicas estériles masculinas resultantes exhibieron características desfavorables. La Publicación Internacional PCT WO96/26283 se refiere a este problema en arroz. También se informa que se observan fenómenos similares no solamente en arroz, sino también en lechuga (Reymaerts et al., 1993). La Solicitud de Patente 20020166140 informó que el gen de barnasa mutado al menos en parte y después el gen de barnasa mutante así obtenido, que tenía un efecto debilitado, se expresó de manera específica en las anteras en una planta para hacer que la planta fuera sustancialmente estéril masculina sin ningún efecto sustancialmente desventajoso en los tejidos diferentes de las anteras. En esta patente se reivindicó la producción de plantas estériles masculinas, exentas de cualquier característica desfavorable con una eficacia elevada.
- Las Patentes US 5763243, US 6072102, US 5792853, US 5837851 y US 5795753 han usado un gen de ADN adenina metilasa (DAM), aislado de *E. coli*, como gen negativo dominante. Los cambios en el patrón de metilación del ADN de genes o promotores específicos han supuesto cambios en la expresión génica. La metilación del ADN es un factor en la regulación de genes durante el desarrollo de plantas y animales. Los patrones de metilación se establecen mediante métodos tales como el uso de promotores (genes) que contienen CpG sensibles a metilo. En general, las secuencias transcritas de manera activa están poco metiladas. En los animales, los sitios de metilación se modifican en los sitios de CpG (residuos). El control genético de la metilación de adenina (A) y citosina (C) (nucleótidos presentes en el ADN) se ve afectado por genes en las especies bacterianas y mamíferas. En las plantas, sin embargo, existen restos metilo en la secuencia CXG, en la que X puede ser A, C o T, en la que C es el residuo metilado. La inactivación debida a la

metilación de A no se conoce en las plantas, en particular en sitios GATC que se sabe que están metilados en otros sistemas. La ADN adenina metilasa (DAM) de *E. coli* para la cual GATC es un objetivo inactiva una región genética crítica para la formación o función del polen, por lo que provoca que se forme una planta estéril masculina.

- 5
- La Patente EP0942965, la patente US 6177616 y la patente US 6384304 usaron moléculas de ADN que codifican desacetilasas o proteínas que tienen la actividad biológica de una desacetilasa. Estas moléculas se pueden usar para producir plantas que tienen partes que se pueden destruir deliberadamente, es decir, plantas que tienen esterilidad masculina, mediante la expresión específica de un gen de desacetilasa (Kriete et al. 1996, Bartsch 2001). Los genes de desacetilasa de *Streptomyces viridochromogenes* [N-acetil-L-fosfotricilalanilalanina (N-acetil-PTT) desacetilasa, *dea*] y *argE* de *Escherichia coli* (N-acetil-L-orнитina desacetilasa) codifican proteínas que tienen especificidad para N-acetil-L-PPT. Para ambos genes, en el caso de la expresión específica del tapete en plantas fue posible demostrar la existencia de flores estériles masculinas tras el tratamiento de capullos individuales con N-acetil-L-PPT. Para un uso eficaz de este sistema, en particular en el tratamiento de plantas completas con N-acetil-PPT en condiciones prácticamente relevantes, es ventajoso poder emplear desacetilasas que tienen una afinidad elevada hacia el sustrato. Por lo tanto, se buscaron desacetilasas adicionales que tuvieran una afinidad elevada hacia N-acetil-PPT. En la patente US 6177616 y la patente US 6384304, se usó un gen de N-acetil-PPT desacetilasa de *Stenotrophomonas* sp. para la producción de plantas estériles masculinas.
- 10
- La Patente EP0455690 informó de un método de inhibición de la respiración de una célula vegetal mediante el uso de un gen, que es expresable en las anteras de las plantas, para inhibir la función mitocondrial que conduce a la muerte de la célula y a la incapacidad de producir polen viable, por lo que se confiere una esterilidad masculina. El gen alterador se seleccionó de la proteína desacopladora (UCP) de mamíferos clonada a partir de tejido adiposo marrón de mamífero (normalmente de rata). La proteína alteradora propuesta, UCP, es decisiva en la termogénesis del tejido adiposo marrón de mamíferos, y existe en forma de un dímero en la membrana interna mitocondrial que forma un canal de protones, y así desacopla la fosforilación oxidativa mediante la disipación de las diferencias de potencial electroquímico de protones a través de la membrana.
- 15
- La patente US 5254801 informó de un gen de fosfonato monoesterasa (*pehA*) que se consideró adecuado para un propósito tal como la inducción de la esterilidad masculina para la producción de semillas híbridas en plantas. Se estudió una fosfonato monoéster hidrolasa bacteriana en plantas como un gen letal condicional útil para la ablación celular y la selección negativa. Se clonó un gen de fosfonato monoesterasa (*pehA*) que codificaba una enzima que hidroliza ésteres de fosfonato que incluyen el glifosato de glicerilo hasta glifosato y glicerol a partir de la bacteria que metaboliza glifosato, *Burkholderia caryophylli* PG2982. Como ejemplo de ablación celular específica de tejido, se demostró una esterilidad floral sin toxicidad vegetativa mediante la expresión del gen *pehA* con el uso de un promotor específico del tapete y el tratamiento de las plantas maduras con glifosato de glicerilo. (Dotson et al. 1996).
- 20
- El documento WO 99/04023 propuso un método para controlar la fertilidad de plantas mediante el uso de una molécula de ADN que codifica avidina, una glicoproteína. Un nivel elevado de expresión del gen de avidina en las anteras puede inducir la esterilidad masculina. La avidina, una glicoproteína, tiene una afinidad muy intensa hacia biotina (vitamina H), con una K_D (constante de disociación) de aproximadamente 10^{-15} M^{-1} , la afinidad conocida más alta entre una proteína y su ligando. Esta unión es básicamente irreversible. La fertilidad se puede restaurar pulverizando la planta con una disolución de biotina.
- 25
- La patente US 5955653 descubrió un gen de calasa (beta-1,3-glucanasa) específica del tapete, denominado A6, de *Brassica napus* y otros miembros de la familia Brassicaceae que incluyen *A. thaliana*. El gen A6 codifica una enzima calasa de 53 kDa de *Brassica napus* y proteínas equivalentes en otros miembros de la familia Brassicaceae. La secuencia codificante del gen puede ser controlada por un promotor adecuado para inducir la esterilidad masculina en plantas. La liberación de microesporas es el proceso mediante el cual se liberan microesporas inmaduras desde una cubierta protectora de beta-(1,3) poli-glucano (calosa) depositada por las células microsporogénicas antes de la meiosis (Rowley, (1959); Heslop-Harrison (1968)). La glucanasa expresada en las anteras responsable de la disolución de esta cubierta de calosa se conoce como calasa. La calasa es sintetizada por las células del tapete y secretada en el lóculo. La aparición de la actividad enzimática está regulada en el desarrollo para coincidir de manera precisa con una etapa específica del desarrollo de las microesporas. El fundamento del uso de una glucanasa como un ADN de esterilidad radica en el hecho de que un momento erróneo en la aparición de la actividad de calasa está asociado a ciertos tipos de esterilidad masculina (Warmke y Overman, 1972). Un atractivo importante de la glucanasa como ADN de esterilidad potencial es que ya se da en un sistema natural. Pero el momento de la aparición de la actividad de calasa es esencial.
- 30
- La patente US 7230168 describió la transformación de una célula vegetal con una construcción de ácido nucleico que codificaba citoquinina oxidasa, en la que la expresión de la citoquinina oxidasa inhibe la formación del polen o el desarrollo de los órganos masculinos en la planta transgénica. La restauración de la fertilidad en la planta se puede conseguir tras la restauración de niveles normales de citoquinina mediante la aplicación de
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

citoquininas o un inhibidor de citoquinina oxidasa, tal como un inhibidor de citoquinina oxidasa 1. La capacidad de la citoquinina oxidasa particular de eliminar de manera oxidativa las cadenas laterales de citoquinina para proporcionar adenina y el aldehído de isopentenilo correspondiente se utilizó para crear la esterilidad masculina.

- 5
- En los sistemas animales, los estudios de la apoptosis han revelado rutas en las que las proteínas de la familia de Bcl-2 desempeñan papeles clave. La familia de Bcl-2 incluye miembros pro-apoptóticos (p.ej. Bax, Bak y Bid) y anti-apoptóticos (p.ej. Bcl-2, Bcl-xl y Ced-9) que parecen controlar el inicio de la apoptosis por medio de las mitocondrias (Gross et al. 1999). Se ha demostrado que un gen Bax induce la PCD en las células vegetales (Lacomme y Cruz 1999, Kawai-Yamada et al. 2001). Se conectó un gen Bax de ratón al promotor específico del tapete, y la expresión del gen Bax provocó la muerte celular, lo que dio como resultado el aborto del polen (Tsuchiya et al. 1994, Ariizumi et al. 2002). Se ha identificado un inhibidor de la muerte celular inducida por Bax en plantas. La expresión de AtBI-1, un homólogo del inhibidor de Bax de mamíferos, en el tapete en la etapa de tétrada inhibe la degeneración del tapete y posteriormente da como resultado el aborto del polen, mientras la activación de AtBI-1 en la última etapa no lo hace (Patente JP2006345742-A, Kawanabe et. al. 2006).
- 10
- Se expresó el gen de la cadena A de la toxina de la difteria (DTA) en el tapete, lo que dio como resultado una esterilidad masculina dominante debido a la ablación de células específicas (Koltunow et al., 1990). De forma similar, cuando se fusionó el promotor del gen de la glicoproteína del locus S de *Brassica* al gen de DTA y se transfirió a tabaco (Thorness et al., 1991) y *A. thaliana* (Thorness et al 1993), dio como resultado plantas auto-estériles debido a la expresión del gen tanto en los pistilos como en las anteras. La fusión promotor de APETALA3 (AP3)-DTA dio como resultado la ablación completa de pétalos y estambre en tabaco transgénico (Day et al., 1995). El gen de la cadena A de la toxina de la difteria (DTA) sensible a la temperatura se usó también para conferir una esterilidad masculina condicional en *Arabidopsis thaliana* (Guerineau F et al., 2003).
- 15
- O' Kefee et al (1994) describió el sistema R7402/P450sU1, en el que la expresión de P450SU1 (gen de *Streptomyces griseolus* que codifica un citocromo metabolizante de herbicidas) y el tratamiento con R7402 se puede usar como sistema de selección negativa en plantas. En tabaco que expresaba P450SU1 a partir de un promotor específico del tapete, el tratamiento de los capullos florales inmaduros con R7402 provocó una viabilidad drásticamente reducida del polen. Tal tratamiento podría ser la base para un agente de hibridación química. Esto puede proporcionar una estrategia para el desarrollo de un agente esterilizante químico masculino para la producción de semillas híbridas.
- 20
- Se usó una proteína inactivante del ribosoma (RIP) de *D. sinensis* como gen citotóxico para inducir la esterilidad masculina en plantas de tabaco (Cho HJ et al. 2001). La proteína inactivante del ribosoma inactiva los ribosomas eucarióticos e inhibe la síntesis de proteínas en general. En realidad, inhibe su propia síntesis proteica (Boness et al. 1994). Debido a su acción suicida, Cho HJ. propuso su uso en la ablación celular genética y la mejora genética.
- 25
- Hofig et al. (2006) expresó un gen de estilbeno sintasa (STS) en anteras de plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum*, lo que dio como resultado una esterilidad masculina completa en un 70% de las plantas transformadas. Se ha demostrado que la estilbeno sintasa (STS) de vid compite con la enzima chalcona sintasa (CHS) por los sustratos malonil-CoA y cumaroil-CoA. Se cree que la esterilidad inducida por STS en tabaco es el resultado de una biosíntesis de flavonol reducida o suprimida. Esto se ha confirmado mediante experimentos en los que las plantas de tabaco con esterilidad por STS se pulverizaron regularmente con flavonoles, y en las que la fertilidad se restauró parcialmente. STS, cuando se expresa en células que no son del tapete, no se espera que tenga un impacto tóxico, ya que no hay presente CHS que compita con ella.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

La autofagia es un proceso ubicuo en las células eucarióticas, en la cual se captan porciones del citoplasma en vesículas de doble membrana para el transporte a un orgánulo degradativo, vacuola o lisosoma (Reggiori et al. 2002). Se sabe que la autofagia es activa a niveles basales en condiciones fisiológicas normales; se puede estimular mediante una plétora de agresiones, que incluyen la lesión celular, la privación de nutrientes y la infección por patógenos (Levine y Klionsky, 2004). Está bien establecido que la autofagia estimula la supervivencia celular durante la privación de nutrientes mediante la degradación y el reciclaje de los nutrientes (Seay M. et al. 2006). Los genes relacionados con la autofagia (ATG) son esenciales para la formación del autofagosoma. En la última década, con la identificación de aproximadamente 30 genes *ATG* en *Saccharomyces cerevisiae* y otros hongos (Klionsky et al. 2003), se han dilucidado gradualmente los mecanismos moleculares de la autofagia (Klionsky et al. 2005). La autofagia está conservada en todos los eucariotas, y recientemente se han identificado homólogos de muchos genes *ATG* de levadura en diversos sistemas eucarióticos, y los mecanismos moleculares de la autofagia también están conservados (Yang Cao et al. 2007). La formación del autofagosoma es un proceso complejo, y se ha demostrado que cada proteína *Atg* funciona en una etapa específica durante la formación del autofagosoma en levadura (Tsukada et al. 1993). Varias proteínas *Atg* se acumulan en una estructura perivacuolar denominada estructura pre-autofagosómica (PAS) (Kim et al. 2002). Entre los genes *ATG*, *ATG6* es relativamente único al no ser específico de la autofagia (Yang Cao et al. 2007). Por ejemplo, el producto del gen *ATG6/VPS30* de *S. cerevisiae* es la única proteína necesaria para la autofagia y clasificación de la hidrolasa carboxipeptidasa Y residente en la vacuola por medio de la ruta *Vps* (Kametaka et. al. 1998). *Atg6/Vps30* de levadura es una subunidad de dos complejos de fosfatidilinositol (PtdIns) 3-quinasa de clase III de rutas diferentes (Kihara et. al. 2001). El complejo I funciona en la

autofagia, mientras el complejo II está implicado en Vps, lo que explica porqué Atg6/Vps30 participa en ambas rutas, por otra parte diferentes.

BECLIN 1, el homólogo mamífero de *ATG6* de levadura, fue el primer gen mamífero identificado con un papel en la mediación de la autofagia (Liang et al., 1999). *BECLIN 1* se descubrió en un principio durante el transcurso de un cribado de doble híbrido en levadura de una biblioteca de cADN de cerebro de ratón mediante el uso de Bcl-2 humano como cebo (Liang et al. 1998). La sobreexpresión de *BECLIN 1* humano provoca la muerte celular autofágica en células de carcinoma de mama MCF7 humanas (Liang et al., 1999). Recientemente, se descubrió que *BECLIN 1* participa en la señalización de la apoptosis por medio de la caspasa-9; así, *BECLIN 1* puede ser el "interruptor molecular" crítico y desempeñar un papel importante para afinar la autofagia y la apoptosis (Wang et al. 2007). *BECLIN 1* está conservado en eucariotas superiores. La proteína Beclin 1 humana comparte un 36% de identidad y un 52% de similitud con Beclin 1 de *Nicotiana* (Liang et al., 1999).

Si una planta debe sobrevivir a una infección, la muerte celular (PCD) por respuesta hipersensible (HR) se debe controlar cuidadosamente de manera que no se extienda por toda la planta y la mate. El ortólogo vegetal de *BECLIN 1* se estudió por primera vez en plantas de *Nicotiana benthamiana* (Liu Y. et al. 2005), y se descubrió que era esencial para la restricción de PCD HR durante la resistencia a enfermedades (Seay M. et al. 2006, Liu Y. et al. 2005, Patel S. et al. 2006). Las plantas deficientes en *BECLIN 1* vegetal exhiben una PCD HR ilimitada en respuesta a una infección por patógenos (Liu Y. et al. 2005). Los autofagosomas se observaron raramente en las células de plantas con inactivación de *BECLIN 1* vegetal tras la infección con TMV (Liu Y. et al. 2005). Los autofagosomas se inducen en el sitio de infección por TMV durante la PCD HR y el *BECLIN 1/ATG6* vegetal es necesario para la inducción de la autofagia en las células infectadas por el patógeno y las células adyacentes sin infectar para limitar la PCD HR en el sitio infectado (Liu Y. et al. 2005). Así, existe(n) una(s) señal(es) pro-muerte moviéndose fuera del área infectada por el patógeno hacia los tejidos adyacentes y sitios distales que está regulada negativamente por la autofagia. Estos hallazgos proporcionan la prueba genética de que los genes *ATG* pueden funcionar in vivo como regulador negativo de la PCD HR. Estos resultados contrastan con los hallazgos de estudios en mamíferos en los que los genes *ATG* son necesarios para estimular la PCD en células que carecen de la maquinaria apoptótica intacta (Liu Y. et al. 2005).

Recientemente se informó que *AtBECLIN 1/ATG6* en plantas tiene funciones diferentes además de la autofagia: control del tránsito de vesículas y germinación del polen (Fujiki Y. et al. 2007, Qin G. et al. 2007). Se informó que las deleciones de *AtBECLIN 1/ATG6* influyeron de manera específica en los gametofitos masculinos, pero no en las estructuras reproductivas femeninas. Los pólenes que carecían de *AtBECLIN 1/ATG6* no pudieron germinar. Durante la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico, el control del tránsito celular es crítico para el depósito de la pared celular y la remodelación de la forma celular (Parton RM et al. 2003, Parton RM et al. 2001, y Helper PK et al. 2001). Es posible que las deleciones de *ATG6* alteren el sistema de control del tránsito celular, lo que da como resultado la incapacidad de germinación del polen (Qin G. et al. 2007). Las plantas deficientes de *AtBECLIN 1/ATG6* mostraron un crecimiento retrasado, enanismo y senescencia temprana, lo que sugiere que *AtBECLIN 1/ATG6* es necesario para el desarrollo de plantas normales (Qin G. et al. 2007).

El tapete es la capa esporofítica más interna de la pared de las anteras, y rodea las microesporas. Se sabe que el tapete proporciona nutrición a las microesporas en desarrollo, especialmente la exina de los granos de polen, los componentes estructurales principales de la pared del polen. El tapete degenera durante las últimas etapas del desarrollo del polen. Se ha especulado que la degeneración del tapete es un suceso de muerte celular programada (PCD) (Wu y Cheun 2000). [Se descubrió que los núcleos de las células del tapete y los tejidos de la pared de las anteras eran positivos para TUNEL (marcaje de extremos con dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal) por Wang et al. (1999)]. El momento adecuado de muerte celular en el tapete es esencial para una microesporogénesis normal. Kawanabe et al. (2006) demostró que la expresión del gen Bax de ratón en el tapete en una etapa temprana del desarrollo del polen puede provocar la degeneración temprana del tapete, lo que da como resultado el aborto del polen.

En la presente invención, el gen *AtBECLIN 1/ATG6* se expresa en el tapete en las etapas 2 y 3 del desarrollo del polen (lo cual no se ha informado previamente). Esto provoca la alteración del programa de muerte celular normal del tapete, y hay un retraso en la inducción de la muerte celular programada (PCD) del tapete. Por lo tanto, el polen formado es anormal al tener un tapete intacto, lo que da como resultado la esterilidad masculina.

Objetivos de la invención

El objetivo principal de la presente invención es proporcionar un método para producir plantas estériles masculinas mediante la expresión del gen *BECLIN 1* vegetal en la capa del tapete de las anteras durante las primeras etapas del desarrollo del polen.

En este método, la expresión del gen *BECLIN 1* en el tapete altera el programa de muerte celular normal del tapete, lo que da como resultado un polen anormal que tiene un tapete intacto.

También se describe en la presente memoria un vector de expresión que comprende el casete de expresión TA₂₉-*BECLIN 1* que es una herramienta útil para generar líneas estériles masculinas de diversas plantas de cultivo.

También se describe en la presente memoria un vector de expresión capaz de introducir dicho casete de expresión TA₂₉-*BECLIN 1* en un genoma celular vegetal cuando se coloca en células de plantas infectadas con *Agrobacterium*.

5 Otro objetivo de la presente invención es inducir la esterilidad masculina provocando una transformación en plantas seleccionadas de un grupo que consiste en tabaco, algodón, arroz, trigo, maíz, patata, tomate, colza, alfalfa, girasol, cebolla, trébol, soja, guisante.

Otro objetivo de la presente invención es obtener semillas de plantas de cultivo estériles masculinas.

Otro objetivo de la presente invención es usar un producto génico de origen vegetal para la inducción de esterilidad masculina en plantas, que evite los problemas de bioseguridad asociados a la expresión de otras proteínas bacterianas, virales, mamíferas para el mismo propósito.

10 Todavía otro objetivo de la presente invención es expresar el gen *BECLIN 1* que codifica un polipéptido no citotóxico, por lo que no plantea ningún problema si ocurre un escape a otras células.

Sumario de la invención

15 Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para producir plantas estériles masculinas mediante la expresión del gen *BECLIN 1* vegetal en la capa del tapete de las anteras durante las primeras etapas del desarrollo del polen.

En una realización de la presente invención, el método comprende las etapas de:

- a) Separar la tercera y cuarta hojas de la roseta de plantas de *Arabidopsis thaliana* de alrededor de 3 semanas de edad y ponerlas flotando sobre agua desionizada en placas de Petri, con el lado adaxial hacia arriba;
- 20 b) incubar las hojas de la roseta obtenidas en la etapa (a) a 22 ± 1 °C en la oscuridad durante alrededor de 48 horas para inducir artificialmente la autofagia;
- c) extraer el ARN total de las hojas a las que se indujo la autofagia obtenidas en la etapa (b) como se describe en la presente memoria;
- d) preparar el cADN a partir del ARN total extraído en la etapa (c) mediante métodos conocidos;
- 25 e) amplificar el gen *BECLIN 1/ATG6* vegetal a partir del cADN preparado en la etapa (d) mediante el uso de cebadores específicos del gen mediante PCR;
- f) clonar el gen *BECLIN 1/ATG6* vegetal amplificado obtenido en la etapa (e) en un vector como se describe en la presente memoria;
- 30 g) construir un casete de expresión mediante fusión génica entre un promotor específico del tapete que tiene la SEQ ID N° 3 y el gen *Beclin 1/ATG6* vegetal que tiene la SEQ ID N° 1 obtenido de la etapa (f) y la secuencia terminadora Nos en un vector de clonación;
- h) sub-clonar el casete de expresión como se construyó en la etapa (g) en un vector binario como se describe en la presente memoria;
- i) introducir el vector binario resultante de la etapa (h), que porta dicho casete de expresión, en *Agrobacterium tumefaciens*;
- 35 j) transformar la planta en la que se va a inducir la esterilidad masculina con la *Agrobacterium tumefaciens* recombinante obtenida en la etapa (i);
- k) desarrollar líneas transgénicas independientes.

En otra realización de la invención, la transformación se lleva a cabo en plantas seleccionadas de un grupo que consiste en tabaco, algodón, arroz, trigo, maíz, patata, tomate, colza, alfalfa, girasol, cebolla, trébol, soja, guisante.

40 La invención abarca las plantas, células, y tejidos obtenidos mediante el proceso anteriormente mencionado.

En otra realización de la invención, se describe un vector recombinante útil para inducir la esterilidad masculina en plantas mediante una transformación que consiste en:

- i. un promotor específico de la antera;
- ii. un gen *BECLIN 1* vegetal;
- 45 iii. una secuencia terminadora Nos;

En este vector recombinante, el promotor específico de la antera usado es un promotor específico del tapete, representado por SEQ ID N°: 3.

En este vector recombinante, el gen *BECLIN 1* vegetal tiene SEQ ID N°: 1 y codifica un polipéptido que tiene SEQ ID N°: 2 o su homólogo.

- 5 En otra realización de la invención, el casete de expresión comprende una fusión génica quimérica entre el promotor específico del tapete y el gen *Beclin 1/ATG6* vegetal que tiene la secuencia polinucleotídica representada por SEQ ID N°: 4.

En otra realización de la invención, una planta, célula o tejido se transforma con y comprende el vector recombinante como se mencionó anteriormente.

- 10 En otra realización de la invención se proporciona una planta transgénica que expresa/sobreexpresa el gen *BECLIN 1* vegetal en su antera.

En otra realización de la invención, el método se usa para inducir la esterilidad masculina en las plantas enumeradas anteriormente.

- 15 En otra realización de la invención se proporciona el uso del vector recombinante para inducir la esterilidad masculina en las plantas enumeradas anteriormente.

En otra realización de la invención se proporciona un equipo para inducir la esterilidad masculina en plantas, que consiste en

- a. Un vector que tiene un promotor específico de la antera de SEQ ID N°: 3 y un gen *BECLIN 1* vegetal;
- b. Reactivos adecuados;
- 20 c. Manual de instrucciones.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método para producir plantas estériles masculinas mediante la expresión del gen *BECLIN 1* vegetal en la capa del tapete de las anteras durante las primeras etapas del desarrollo del polen.

- 25 También se refiere al uso del gen *AtBECLIN 1/ATG6* en la inducción de la esterilidad masculina en plantas. En la presente invención, el gen *AtBECLIN 1/ATG6* se expresa en el tapete en las etapas 2 y 3 del desarrollo del polen. Esto provoca la alteración del programa de muerte celular normal del tapete, y hay un retraso en la inducción de la muerte celular programada (PCD) del tapete. Por lo tanto, los pólenes formados son anormales, y tienen un tapete intacto, lo que da como resultado la esterilidad masculina. La mayoría de las líneas transgénicas mostraron una producción de polen muy reducida en comparación con las plantas de tabaco de tipo natural. Los pólenes producidos estaban deformados, y la mayoría de ellos estaban vacíos. Incluso en un ensayo de germinación de polen in vitro, los granos de polen de estas líneas transgénicas no pudieron germinar, y aquellos que germinaron mostraron tubos polínicos cortos.
- 30

- 35 Se demostró por primera vez que la expresión del gen relacionado con la autofagia de plantas (gen *ATG6*) en células de la antera puede provocar esterilidad masculina. Se informa que la expresión del gen *BECLIN 1/ATG6* vegetal, controlada por un promotor adecuado expresado en el tapete en una etapa adecuada, da como resultado la esterilidad masculina en el tabaco transgénico.

- 40 La presente invención proporciona una construcción recombinante para transformar plantas para conferir la esterilidad masculina, en la que el casete de expresión comprende una secuencia reguladora unida de forma operable a una secuencia polinucleotídica, *BECLIN 1/ATG6* vegetal, como se muestra en SEQ ID N°: 1 o una variante funcional de la misma. La invención también se refiere a un método para producir plantas transgénicas que tienen partes de plantas que se pueden destruir de manera específica después de expresar dicho gen. Además, la invención proporciona un método para producir plantas transgénicas estériles masculinas mediante la expresión de dicho producto génico en el tapete.

- 45 En la presente invención, el término esterilidad masculina en plantas indica alrededor de un 90-100% de esterilidad con un 0-10% de producción de polen viable en las anteras.

- 50 Un "vector de clonación" es una molécula de ADN, tal como un plásmido, cósmido, o bacteriófago, que tiene la capacidad de replicarse de manera autónoma en una célula hospedadora. Los vectores de clonación contienen en general uno o un número pequeño de sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción en los que se pueden insertar secuencias de ADN exógenas de una forma determinable sin pérdida de una función biológica esencial del vector, así como un gen marcador que es adecuado para el uso en la identificación y la selección de las células transformadas con el vector de clonación. Los genes marcadores incluyen en general genes que proporcionan resistencia a antibióticos o herbicidas.

Un "casete de expresión" es una molécula de ADN que comprende un gen que se expresa en una célula hospedadora y un promotor, que controla su expresión. En general, la expresión del gen se coloca bajo control de ciertos elementos reguladores específicos del tejido.

5 El término "expresión" se refiere a la biosíntesis de un producto génico. Por ejemplo, en el caso de un gen estructural, la expresión implica la transcripción del gen estructural hasta mRNA y la traducción del mRNA hasta uno o más polipéptidos.

Un "vector recombinante" es un vector en el que se ha insertado un ADN exógeno.

Un "vector de expresión" es un vector en el que se ha modificado mediante ingeniería genética un casete de expresión.

10 Un "vector binario" es capaz de replicarse tanto en *E. coli* como en *Agrobacterium tumefaciens*. En general contiene un ADN exógeno en lugar de T-ADN, los extremos de T-ADN izquierdo y derecho, un marcador para la selección y el mantenimiento tanto en *E. coli* como en *Agrobacterium tumefaciens*, un marcador seleccionable para plantas. Se dice que este plásmido está desarmado, ya que se han eliminado los genes inductores de tumores localizados en el T-ADN.

15 Un "promotor adecuado" incluye un promotor específico de tejidos o de células que controla la expresión génica en las células particulares de un tejido particular. Un "promotor específico de la antera" es una secuencia de ADN que dirige un nivel más elevado de transcripción de un gen asociado en el tejido de la antera que en ciertos o todos los otros tejidos de una planta. En la presente invención, un promotor adecuado dirige la expresión solamente en las células que son críticas para la formación o función del polen, lo que incluye las células del tapete, las células madre del polen, y las microesporas tempranas.

Una "variante funcional de *BECLIN 1/ATG6* vegetal" es una variante que conserva la propiedad inductora de la autofagia y tiene un 80% de similitud de secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID N°: 1 y una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID N°: 2.

25 Los siguientes ejemplos se exponen como representativos de realizaciones específicas y preferidas de la presente invención, y no se deberían considerar limitantes del alcance de la invención.

Ejemplo 1

Aislamiento de un cADN que codifica el gen *BECLIN 1/ATG6* a partir de *Arabidopsis*

30 *Material vegetal:* Se usó el ecotipo Columbia (Col-O) de *Arabidopsis thaliana* a lo largo de los experimentos descritos en la presente memoria. Las plantas se cultivaron con una mezcla de tierra compuesta de vermiculita/turba rubia/perlita (1:1:1) en una cámara de cultivo con un ciclo de luz de 16 h de luz/8 h de oscuridad y un ciclo de temperaturas de 23 °C por el día/18 °C por la noche.

Inducción artificial de la autofagia: La tercera y cuarta hojas de la roseta de plantas de 3 semanas de edad se separaron y se hicieron flotar sobre agua desionizada en placas de Petri, con el lado adaxial hacia arriba. Las hojas se incubaron a 22 ± 1 °C en la oscuridad durante 48 horas.

35 *Clonación del gen *BECLIN 1/ATG6* vegetal:* Se extrajo el ARN total de hojas a las que se indujo la autofagia de *Arabidopsis* mediante el reactivo TRI (Sigma). La cantidad de ARN total se midió mediante un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 UV-Vis. La calidad del ARN se comprobó visualizando el rARN en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio con luz UV. Se usaron diez microgramos de ARN total en la preparación del cADN. El cADN se generó mediante el uso del equipo de transcriptasa inversa SuperScript™ (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El cADN se usó como molde para amplificar el gen *BECLIN 1/ATG6* vegetal mediante el uso de un grupo de cebadores, 5'-cta gtc tag aat gag gaa aga gga gat tcc aga-3' y 5'-cgt cga gct cct aag ttt ttt tac atg aag gct ta-3'. La reacción de PCR consistió en 30 ciclos a 94 °C durante 30 seg, 58 °C durante 30 seg y 72 °C durante 90 seg. El producto de PCR de 1,5 kb se clonó en el vector pBluescript SK+ (Stratagene, La Jolla, CA). La secuencia de nucleótidos del producto de PCR clonado se determinó mediante el uso del equipo de secuenciación cíclica Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). La homología de secuencias se analizó mediante el uso del programa BLAST.

Ejemplo 2

Construcción de una fusión génica quimérica entre el promotor específico del tapete y *BECLIN 1/ATG6* vegetal

50 En una primera etapa, se fusionó el promotor de 1 kb BamH1/Xba1 específico del tapete con el gen *BECLIN 1* vegetal de 1,5 kb Xba1/Sac1 y el terminador Nos de 250 pb Sac1/EcoR1 en el vector de clonación Sk+ BamH1/EcoR1.

El casete de expresión completo que contenía los fragmentos BamH1/EcoR1 se subclonó adicionalmente en el vector binario pBI101. El pBI101 resultante que portaba el casete de expresión se introdujo en la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* siguiendo el protocolo modificado (Cangelosi *et al.*, 1991).

Ejemplo 3

Transformación de plantas de tabaco

Como se describió en el Ejemplo 2, se usó el *Agrobacterium tumefaciens* recombinante que portaba el casete de expresión para la transformación de *Nicotiana tabacum* cv. *Petit Havana* mediante el protocolo descrito por Horsch et al., en 1985.

Brevemente, una única colonia aislada de *A. tumefaciens* LBA 4404 que albergaba el vector binario con los casetes de expresión anteriormente descritos se inoculó en medio YEP que contenía los antibióticos estreptomina (250 µg/ml), rifampicina (50 µg/ml), y kanamicina (100 µg/ml) y se cultivó (200 rpm, durante la noche, 28 °C). Cincuenta microlitros del cultivo de la noche se diluyeron hasta 100 ml en medio YEP y se cultivaron hasta que la DO₆₀₀ alcanzó un valor de 0,8. Las células se recuperaron mediante centrifugación en un rotor SS34 (5.000 rpm, 10 min, 4 °C). El sedimento se suspendió en medio de co-cultivo (sales MS, 2% de glucosa, MES 10 mM y acetosiringona 100 mM, pH 5,6) a una DO₆₀₀ de 0,6. Se co-cultivaron discos de hojas de tabaco con *A. tumefaciens* durante dos días en la oscuridad. Tras el co-cultivo, los discos de hojas se transfirieron a un medio de regeneración complementado con cefotaxima (250 µg/ml) y kanamicina (100 µg/ml). El cultivo se incubó a 25 °C con un ciclo de 16 hrs de luz y 8 hrs de oscuridad durante un periodo de cuatro semanas. Tras esto, los brotes transgénicos se recogieron y se transfirieron a un medio de enraizamiento que contenía kanamicina (50 µg/ml). Tras la incubación durante 2-4 semanas, las supuestas plántulas transgénicas se transfirieron a una disolución de Hoagland para su aclimatación, y después se transfirieron a vermiculita para el endurecimiento durante tres semanas. Las plantas se transfirieron de vermiculita a tierra en un invernadero. Se desarrollaron líneas transgénicas independientes para el casete de expresión (fusión génica quimérica).

Ejemplo 4

Análisis de las líneas transgénicas en busca de la integración del transgén

El ADN genómico de las líneas transgénicas y de las plantas de control se aisló mediante el uso del método CTAB de extracción de ADN. El ADN genómico se usó como molde para amplificar un fragmento de 2,5 kb que comprendía el promotor TA29 y el gen *BECLIN 1* vegetal mediante el uso de un grupo de cebadores, 5'cgc gga tcc aga tct tcc aac att tact cc aag gg 3' y 5'cgt cga gct cct aag ttt ttt tac atg aag gct ta 3'. La reacción de PCR consistió en 94 °C durante 4 min, 94 °C durante 1 min, 60 °C durante 1 min y 72 °C durante 2 min, repetición desde el punto 2 durante 30 ciclos, 72 °C durante 5 min. La banda deseada de 2,5 kb se obtuvo en la PCR de las líneas transgénicas y del control positivo, pero no en las plantas de control y el control negativo (sin molde). Este experimento se repitió tres veces como confirmación.

Ejemplo 5

Análisis de las líneas transgénicas en busca de la esterilidad masculina

Las plantas transgénicas crecieron bien hasta una madurez visible y mostraron una floración normal. La expresión del gen de autofagia en las anteras no condujo a ninguna anomalía morfológica, excepto por pólenes inviábiles y muy poca o ninguna formación de semillas. Así, las plantas transgénicas fueron estériles masculinas. La viabilidad del polen se estudió mediante tinción con diacetato de fluoresceína (Heslop-Harrison, 1970). Se recogieron muestras de polen en el momento de la floración y se ensayó su calidad mediante el procedimiento fluorocromático (FCR), que principalmente ensaya la integridad del plasmalema de la célula vegetativa. Esta integridad parece estar estrechamente correlacionada con la viabilidad. La mayoría de los pólenes de las plantas transgénicas no fueron viables. Como se muestra en la Tabla 1, las plantas de tres líneas transgénicas tuvieron un 5 a 14 % de polen viable, y el resto de los pólenes de las plantas no mostraron fluorescencia (Fig. 1). Por otra parte, las plantas de control (líneas transgénicas independientes para un casete de expresión que comprendía el gen indicador GUS controlado por el promotor específico del tapete), mostraron un 80 a 92 % de viabilidad del polen (Tabla 2, Fig. 1).

Se llevó a cabo un ensayo de germinación de polen in vitro mediante el uso de los medios líquidos artificiales propuestos por Kwack (1964). Se observó una germinación del polen extensa en los pólenes cultivados de una antera de las plantas de control (líneas transgénicas independientes para un casete de expresión que comprendía el gen indicador GUS controlado por el promotor específico del tapete), sin embargo los pólenes de las líneas transgénicas no pudieron germinar o, si germinaron, mostraron un crecimiento gravemente retrasado del tubo polínico. En las plantas transgénicas (líneas transgénicas independientes para el casete de expresión que comprendía el gen *BECLIN 1/ATG6* vegetal controlado por el promotor específico del tapete) de cuatro líneas diferentes, se observó un 0-1% de germinación del polen en comparación con un 62-75% en las plantas de control (Tabla 1 y Tabla 2).

Además, se observaron granos de polen mediante microscopía electrónica de barrido. Los granos de polen de las líneas transgénicas mostraron diferencias en el patrón de la estructura de la exina y la ausencia de poros germinativos (Fig 3).

La producción de frutos fue normal en las plantas transgénicas de las seis líneas, pero los bulbos fueron de un

tamaño más pequeño. La producción de semillas se vio muy afectada en los bulbos de las plantas transgénicas. El peso de las semillas por vaina de las plantas transgénicas de veinte líneas diferentes fue cero a 32,07 mg, mientras en las plantas de control fue 36,6 mg a 113,34 mg (Tabla 3 y Tabla 4).

Tabla 1: Evaluación de la viabilidad del polen y la germinación del polen

Líneas Transgénicas*	% de Viabilidad del Polen	% de Germinación del Polen
1354 (1)	2~6	0~0,03
1354 (2)	2~7	0~0,09
1354 (3)	9~14	0~1
1354 (4)	5~8	0~0,06
1354 (5)	7~10	0~0,08
1354 (6)	7~12	0~0,18

- 5 * Líneas transgénicas independientes para el casete de expresión que comprende el gen *BECLIN 1/ATG6* vegetal controlado por el promotor específico del tapete según la reivindicación 6.

Tabla 2: Evaluación de la viabilidad del polen y la germinación del polen

Líneas Transgénicas*	% de Viabilidad del Polen	% de Germinación del Polen
1351 (1)	85~90	65~75
1351 (2)	80~90	65~70
1351 (3)	80~92	62~71
1351 (4)	84~96	72~77
1351 (5)	80~92	74~79
1351 (6)	81~96	73~77

- * Líneas transgénicas independientes para un casete de expresión que comprende el gen indicador GUS controlado por el promotor específico del tapete.

10 Tabla 3: Producción de semillas

Línea Transgénica*	Peso de las Semillas (gm)	Número Total de Vainas	Peso de las Semillas Por Vaina (mg)
1354 (1)	Cero	9	Cero
1354 (2)	0,522	37	1,41
1354 (3)	0,7102	42	13,9
1354 (4)	Cero	23	Cero
1354 (5)	0,210	18	11,6
1354 (6)	0,822	49	16,7
1354 (7)	0,102	9	11,3
1354 (8)	0,091	23	3,95
1354 (9)	0,370	28	13,21
1354 (10)	0,834	26	32,07
1354 (11)	0,228	10	22,8

Línea Transgénica*	Peso de las Semillas (gm)	Número Total de Vainas	Peso de las Semillas Por Vaina (mg)
1354 (12)	0,658	68	9,67

* Líneas transgénicas independientes para el casete de expresión que comprende el gen *BECLIN 1/ATG6* vegetal controlado por el promotor específico del tapete.

Tabla 4: Producción de semillas

Control*	Peso de las Semillas (gm)	Número Total de Vainas	Peso de las Semillas Por Vaina (mg)
1351 (1)	1,7382	45	38,62
1351(2)	0,3815	6	63,58
1351 (3)	1,7134	29	59,08
1351 (4)	1,9002	29	65,08
1351 (5)	0,440	12	36,6
1351 (6)	0,336	7	48,07
1351 (7)	1,064	12	88,67
1351 (8)	1,182	17	69,52
1351 (9)	0,680	6	113,34
1351 (10)	2,085	22	94,77
1351 (11)	1,21	11	110,36
1355 (12)	0,5	7	71,42

* Líneas transgénicas independientes para un casete de expresión que comprende el gen indicador GUS controlado por el promotor específico del tapete.

5

Ventajas de la invención:

1. El vector de expresión reivindicado en la presente memoria es una buena herramienta para generar líneas estériles masculinas de diversas plantas de cultivo.
2. Es ventajoso usar *BECLIN1/ATG6* vegetal como gen de esterilidad masculina, ya que no tiene ningún producto que sea citotóxico fuera de la célula seleccionada como objetivo.
3. El *BECLIN1/ATG6* vegetal, como ADN de esterilidad masculina, imita los sistemas naturales y es intrínsecamente menos destructivo que, por ejemplo, ribonucleasa, toxina de la difteria, y así no presenta problemas si se da un "escape" hacia otras células.

10

LISTADO DE SECUENCIAS

Organización Solicitante
 5 Calle: RAFI MARG
 Ciudad: NUEVA DELHI
 País: INDIA
 Código Postal: 110001

<110> Nombre de la Organización: COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH

10 Proyecto de la Solicitud
 <120> Título: Un casete de expresión para inducir la esterilidad masculina en plantas.
 <130> Referencia del Expediente de Solicitud:
 <140> Número de Sol. en Trámite:
 15 <141> Fecha de Presentación de la Solicitud en Trámite:

Secuencia
 <213> Nombre del Organismo: *Arabidopsis thaliana*

20 <400> Cadena de Pre Secuencia:
 atgaggaaag aggagattcc agataaaagt cggactatcc cgatcgatcc gaatctgccc
 60
 aatgggtct gccaaaactg tcaccactcc cttaccatcg tcggcgctga ttcttacgcc
 120
 ggcaagttct tcaacgatcc cctccgctcc gctacgcagg gctcatctat ccatggagct
 180
 aacagtgttc ttggttcaac acgcatggac aactcttttg ttgttttacc tcgacataag
 240
 cctcctcaat ctcagggcat tctctcacgt cctcgcgggg cgtcctcacc tcagcctgat
 300
 gctactcaat ctggaaaggc gatggaggaa tcgttttag ttgtctataa gtctgagcct
 360
 gtttctgatt ctggtggttc tcacaatctg tctcttgaag tgggcaaaa cggtcctta
 420
 cattcaaata cttctggctt taatgcgaot atcaatgtct taactcgtgc ttttgatatt
 480
 gctagaactc agacacaggt tgaacagcca ttgtgcttag aatgcatgag ggtattgtct
 540
 gataaacttg aaaaagaagt cgaggatgtg acgagggacg tggaagcata cgaagcatgc
 600
 gttcagaggt tagaaggaga gacgcaagat gttcttagtg aagctgattt tctcaaggaa
 660
 aagaagaaga ttgaggaaga agaaagaaaa cttggtgcag ctatagaaga aacagagaaa
 720
 caaaatgctg aagtaaacca tcaactgaag gagctagaat tcaagggaaa tcgttttaac
 780
 gaacttgaag atcggatttg gcaagagttc aataatttc agtttcaatt aattgccat

840
caggaagaga gagatgcaat cttggcaaag attgaagttt cacaagcaca tttagagtta
900
ttaaataaga caaatgtact tattgatgcc ttccccatac ggaacgatgg ggaatttggt
960
acaattaaca attttcgact tggaagactc cctgccataa aagttgagtg ggatgagatc
1020
aatgctgctt ggggccaagc ctgtcttctc ctccatacga tgtgtaacta tttccggcca
1080
aagtttcaat gtcaagttaa aatacagccg atggggagtt atcctagaat tgtagacagc
1140
aacaacgaaa cttatgagct gtttggctct gtttaacttg tttggagcac tcggtacgat
1200
aaagccatga cactgtatct gatgtgtctt aaagactttg ctgattttgc aaattcaaag
1260
gaccaagaga acaatattcc accagataat tgctcaacc ttccatacaa gatcgaaaag
1320
gacaaagtat tggggatttc aataacacag agcttcaaca agcaagagag ttggaccaa
1380
gcactaaagt atactctctg caacctcaaa tgggctctct actggttcgt tggaaacact
1440
aatttccaac ctctctctgc gacggctctc ctgccttcta atatatcagc ggctggttcc
1500
ttgtacgcca agcgaggctc tgactctagt aagccttcat gtaaaaaaac ttag
1554

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 1554

Nombre de la Secuencia: SEQ. ID N° 1

Descripción de la Secuencia:

5

Característica

Secuencia: SEQ. ID N° 1:

<221> Característica/Clave: CDS

10

<222> Localización Desde: 1

<222> Localización Hasta: 1554

Otra Información:

Unión de CDS: No

15

Patente

Secuencia: SEQ. ID N° 1:

<302> Título: Un casete de expresión para inducir la esterilidad masculina en plantas.

<308> Número de Entrada en la Base de Datos:

<309> Fecha de Entrada en la Base de Datos:

20

<310> Número de Doc.:

<311> Fecha de Presentación de la Patente:

<312> Fecha de Publ.:

<313> Desde: 1

<313> Hasta: 1554

25

Organización Solicitante

Calle: RAFI MARG

Ciudad: NUEVA DELHI

País: INDIA

Código Postal: 110001

30

<110> Nombre de la Organización: COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH

Proyecto de la Solicitud

<120> Título: Un casete de expresión para inducir la esterilidad masculina en plantas.
 <130> Referencia del Expediente de Solicitud:
 <140> Número de Sol. en Trámite:
 <141> Fecha de Presentación de la Solicitud en Trámite:

5

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: *Arabidopsis thaliana*

<400> Cadena de Pre Secuencia:

MRKEEIPDKS RTIPIDPNLP KWVCQNCHHS LTIVGVDSYA GKFFNDPPPS ATQGSIIHGA
 60
 NSVLGSTRMD NSFVVLPRHK PPQSQGIPPR PRGASSPOPD ATQSGKAMEE SFVVVYKSEP
 120
 VDSGGSHNL SLEVGQNGPL HSNTSGFNAT INVLTRAFDI ARTQTQVEQP LCLECMRVL
 180
 DKLEKEVEDV TRDVEAYEAC VORLEGETQD VLSEADFLKE KKKIEEEERK LVAAIEETEK
 240
 QNAEVNHQLK ELEFKGNRFN ELEDRYWQEF NNFQFOLIAH QEERDAILAK IEVSQAHLEL
 300
 LNKTNLVIDA FPIRNDGEFG TINNFRLGRL PAIKVEWDEI NAAWGQACLL LHTMCNYFRP
 360
 KFQCQVKIQP MGSYPRIVDS NNETYEELFGP VNLFWSTRYD KAMTLYLMCL KDFADFANSK
 420
 DQENNIPPDN CLNLPYKIEK DKVLGYSITQ SFNKQESWTK ALKYTLCNLK WALYWFGNT
 480
 NEQPLSATVS LPSNISAAGS LYAKRGPDS KPSCKKT
 517

10

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 517

Nombre de la Secuencia: SEQ. ID N° 2

Descripción de la Secuencia:

15

Característica

Secuencia: SEQ. ID N° 2:

<221> Característica/Clave: PÉPTIDO

<222> Localización Desde: 1

20

<222> Localización Hasta: 517

Otra Información:

Unión de CDS: No

Patente

Secuencia: SEQ. ID N° 2:

<302> Título: Un casete de expresión para inducir la esterilidad masculina en plantas.

<308> Número de Entrada en la Base de Datos:

<309> Fecha de Entrada en la Base de Datos:

<310> Número de Doc.:

30

<311> Fecha de Presentación de la Patente:

<312> Fecha de Publ.:

<313> Desde: 1

<313> Hasta: 517

35

Organización Solicitante

Calle: RAFI MARG

Ciudad: NUEVA DELHI

País: INDIA

Código Postal: 110001

40

<110> Nombre de la Organización: COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH

Proyecto de la Solicitud

<120> Título: Un casete de expresión para inducir la esterilidad masculina en plantas.
 <130> Referencia del Expediente de Solicitud:
 <140> Número de Sol. en Trámite:
 <141> Fecha de Presentación de la Solicitud en Trámite:

5

Secuencia
 <213> Nombre del Organismo: *Nicotiana tabacum*

<400> Cadena de Pre Secuencia:

```
tccaacacca tttactccaa gggcactgta gtaaaaaaat aattaaatca tttttgaaat
60
ctaaaaaact cacttatfff ggaccataaa aaaagggcca aaaaataact tattgtggac
120
cggagagagt aatacactff ttggtttagcg aatgcaatta atttagacat tgtgttatgt
180
tccagttaac cgcttccctg cacttctfftc aatctatctc tcgatagaaa attgtgatac
240
tttgcgactt ctatcagagg actfftttgtt ttccatgtaa caatctgtca ttttcgatgg
300
ggagatttgc acaaataggc tattttatgtg tcccaattta aattttaacc ccatgtcgat
360
cagaacttag ccacgagcac cagaagtttg atggatatgt gactttgtca ctatccggtt
420
tactaatcaa gagctatfff tattcaaaat tggatatcta gctaagtata actggataat
480
ttgcattaac agattgaata tagtgccaaa caagaaggga caattgactt gtcactffat
540
gaaagatgat tcaaacatga ttttttatgt actaatatat acatcctact cgaattaaag
600
cgacataggc tcgaagtatg cacatfftagc aatgtaaatt aatcagfff ttgaatcaag
660
ctaaaagcag acttgcataa ggtgggtggc tggactagaa taaacatctt ctctagcaca
720
gcttcataat gtaatffcca taactgaaat cagggtgaga caaaatfftg gtactffttc
780
ctcacactaa gtccatgfff gcaacaaatt aatacatgaa acfftaatgt taccctcaga
840
ttagcctgct actcccccatt ffctctgaaa tgctccaaca aaagfftagff ttgcaagffg
900
ttgtgatgt cffgtgctct atatatgcc ttgtggtgca agtgtaacag tacaacatca
960
tcaactcaat caaagfffff acttaagaa attagctaaa
1000
```

10

<212> Tipo: ADN
 <211> Longitud: 1000
 Nombre de la Secuencia: SEQ. ID N° 3
 Descripción de la Secuencia:

15

Característica
 Secuencia: SEQ. ID N° 3:
 <221> Característica/Clave: Promotor
 <222> Localización Desde: 1
 <222> Localización Hasta: 1000
 Otra Información:

20

Unión de CDS: No

Patente

Secuencia: SEQ. ID N° 3:

- 5 <302> Título: Un casete de expresión para inducir la esterilidad masculina en plantas.
 <308> Número de Entrada en la Base de Datos:
 <309> Fecha de Entrada en la Base de Datos:
 <310> Número de Doc.:
 <311> Fecha de Presentación de la Patente:
 10 <312> Fecha de Publ.:
 <313> Desde: 1
 <313> Hasta: 1000

Organización Solicitante

- 15 Calle: RAFI MARG
 Ciudad: NUEVA DELHI
 País: INDIA
 Código Postal: 110001
 20 <110> Nombre de la Organización: COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH

Proyecto de la Solicitud

- <120> Título: Un casete de expresión para inducir la esterilidad masculina en plantas.
 <130> Referencia del Expediente de Solicitud:
 <140> Número de Sol. en Trámite:
 25 <141> Fecha de Presentación de la Solicitud en Trámite:

Secuencia

<213> Nombre del Organismo:

- 30 <400> Cadena de Pre Secuencia:
 ggatccgat cttccaacac catttactcc aagggcactg tagtaaaaaa ataattaat
 60
 catttttgaa atctaaaaaa ctcaacttatt ttggaccata aaaaaagggc caaaaaataa
 120
 cttattgtgg accggagaga gtaatacact ttttggttag cgaatgcaat taatttagac
 180
 attgtgttat gttccagtta accgcttccc tgcacttctt tcaatctatc tctcgataga
 240
 aaattgtgat actttgogac ttctatcaga ggactttttg ttttccatgt aacaatctgt
 300
 cattttcgat ggggagattt gcacaaatag gctattttatg tgtcccaatt taaattttaa
 360
 ccccatgtcg atcagaactt agccacgagc accagaagtt tgatggatat gtgactttgt
 420
 cactatccgg tttactaatc aagagctatt tttattcaaa attggatata tagctaagta
 480
 taactggata atttgcatta acagattgaa tatagtgcca aacaagaagg gacaattgac
 540
 ttgtcacttt atgaaagatg attcaaacat gattttttat gtactaatat atacatccta
 600
 ctogaattaa agcgacatag gctogaagta tgcacattta gcaatgtaaa ttaaatcagt
 660
 ttttgaatca agctaaaagc agacttgcac aaggtgggtg gctggactag aataaacatc
 720
 ttctotagca cagcttcata atgtaatttc cataactgaa atcaggggtga gacaaaattt
 780
 tggtaactttt tcctcacact aagtccatgt ttgcaacaaa ttaatacatg aaaccttaat
 840

ES 2 436 542 T3

gttaccctca gattagcctg ctactcccca ttttctcga aatgctcaa caaaagttag
 900
 ttttgcaagt tgttgtgtat gtcttgtgct ctatatatgc ccttgtgggtg caagtgtaac
 960
 agtacaacat catcactcaa atcaaagttt ttacttaaag aaattagcta aatctagaat
 1020
 gaggaagag gagattccag ataaaagtcg gactatcccc atcgatccga atctgccgaa
 1080
 atgggtctgc caaaactgtc accactccct taccatcgtc ggcgtcgatt cctacgccg
 1140
 caagttcttc aacgatcccc ctccgtccgc tacgcagggc tcatctatcc atggagctaa
 1200
 cagtgttctt ggttcaacac gcatggacaa ctcttttgtt gttttacctc gacataagcc
 1260
 tctcaatct cagggcattc ctccacgtcc tcgcggggcg tcctcacctc agcctgatgc
 1320
 tactcaatct ggaaaggcga tggaggaatc gttttagtct gctctataagt ctgagcctgt
 1380
 ttctgattct ggtggttctc acaatctgtc tcttgaagtg ggccaaaacg gtcccttaca
 1440
 ttcaaatact tctggcttta atgcgactat caatgtctta actcgtgctt ttgatattgc
 1500
 tagaactcag acacaggttg aacagccatt gtgcttagaa tgcattgaggg tattgtctga
 1560
 taaacttgaa aaagaagtcg aggatgtgac gagggacgtg gaagcatacg aagcatgcgt
 1620
 tcagaggtta gaaggagaga cgcaagatgt tcttagtgaa gctgatttct tcaaggaaaa
 1680
 gaagaagatt gaggaagaag aaagaaaact tgttgcagct atagaagaaa cagagaaaca
 1740
 aatgctgaa gtaaaccatc aactgaagga gctagaattc aagggaatc gttttaacga
 1800
 acttgaagat cggatattggc aagagttcaa taattttcag tttcaattaa ttgccatca
 1860
 ggaagagaga gatgcaatct tggcaaagat tgaagtttca caagcacatt tagagttatt
 1920
 aaataagaca aatgtactta ttgatgcctt cccatcacgg aacgatgggg aatttggtac
 1980
 aattaacaat tttcgacttg gaagactccc tgccataaaa gttgagtggg atgagatcaa
 2040
 tgctgcttgg ggccaagcct gtcttctcct ccatacgtg tgtaactatt tccggccaaa
 2100
 gtttcaatgt caagttaaaa tacagccgat ggggagttat cctagaattg tagacagcaa
 2160
 caacgaaact tatgagctgt ttggtcctgt taacttgttt tggagcactc ggtacgataa
 2220
 agccatgaca ctgtatttga tgtgtcttaa agactttgct gattttgcaa attcaaagga
 2280
 ccaagagaac aatattccac cagataattg cctcaacctt ccatacaaga tcgaaaagga

2340
 caaagtattg gggatttcaa taacacagag cttcaacaag caagagagtt ggaccaaacg
 2400
 actaaagtat actctctgca acctcaaatg ggctctctac tggttcgttg gaaacactaa
 2460
 tttccaacct ctctctgca cggctctctct gccttctaata atatacagcgg ctggttcctt
 2520
 gtacgccaaag cgaggtcctg actctagtaa gccttcatgt aaaaaaactt aggagctcga
 2580
 atttccccga tcggttcaaac atttggcaat aaagtttctt aagattgaat cctggtgccc
 2640
 gtcttgccgat gattatcata taatttctgt tgaattacgt taagcatgta ataattaaca
 2700
 tgtaatgcat gacgttattt atgagatggg tttttatgat tagagtcccg caattataca
 2760
 ttaatacgc gatagaaaac aaaatatagc gcgcaaacta ggataaatta tcgcgcgcgg
 2820
 tgtcatctat gttactagat cgggaatto
 2849

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 2849

5 Nombre de la Secuencia: SEQ. ID N° 4

Descripción de la Secuencia:

Característica

Secuencia: SEQ. ID N° 4:

10 <221> Característica/Clave: variación

<222> Localización Desde: 1

<222> Localización Hasta: 2849

Otra Información:

Unión de CDS: No

15

Patente

Secuencia: SEQ. ID N° 4:

<302> Título: Un casete de expresión para inducir la esterilidad masculina en plantas.

<308> Número de Entrada en la Base de Datos:

20 <309> Fecha de Entrada en la Base de Datos:

<310> Número de Doc.:

<311> Fecha de Presentación de la Patente:

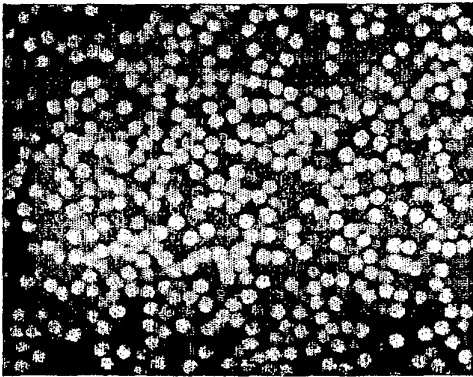
<312> Fecha de Publ.:

<313> Desde: 1

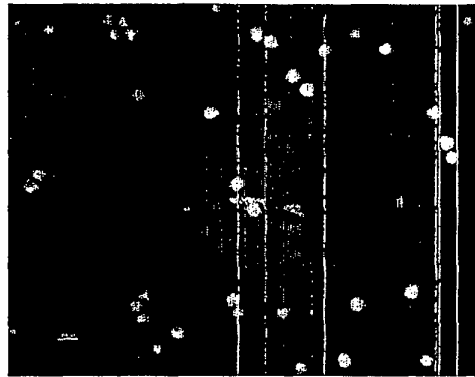
25 <313> Hasta: 2849

REIVINDICACIONES

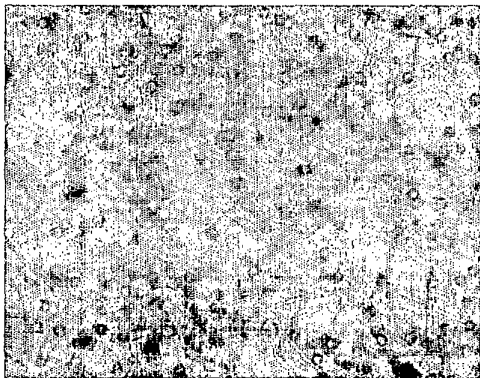
1. Un método para producir plantas estériles masculinas mediante la expresión del gen *BECLIN 1* vegetal en la capa del tapete de las anteras durante las primeras etapas del desarrollo del polen.
2. El método según la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
 - 5 a. separar la tercera y cuarta hojas de la roseta de plantas de *Arabidopsis thaliana* de alrededor de 3 semanas de edad y ponerlas flotando sobre agua desionizada en placas de Petri, con el lado adaxial hacia arriba;
 - b. incubar las hojas de la roseta obtenidas en la etapa (a) a 22 ± 1 °C en la oscuridad durante alrededor de 48 horas para inducir artificialmente la autofagia;
 - c. extraer el ARN total de las hojas a las que se indujo la autofagia obtenidas en la etapa (b);
 - 10 d. preparar el cADN a partir del ARN total extraído en la etapa (c);
 - e. amplificar el gen *BECLIN 1/ATG6* vegetal a partir del cADN preparado en la etapa (d) mediante el uso de cebadores específicos del gen mediante PCR;
 - f. clonar el gen *BECLIN 1/ATG6* amplificado obtenido en la etapa (e) en un vector;
 - 15 g. construir un casete de expresión mediante fusión génica entre un promotor específico del tapete que tiene la SEQ ID N°: 3 y el gen *BECLIN 1/ATG6* vegetal que tiene la SEQ ID N°: 1 obtenido de la etapa (f) y la secuencia terminadora Nos en un vector de clonación;
 - h. sub-clonar el casete de expresión como se construyó en la etapa (g) en un vector binario;
 - i. introducir el vector binario resultante de la etapa (h), que porta dicho casete de expresión, en *Agrobacterium tumefaciens*;
 - 20 j. transformar la planta en la que se va a inducir la esterilidad masculina con la *Agrobacterium tumefaciens* recombinante obtenida en la etapa (i); y
 - k. desarrollar líneas transgénicas independientes.
3. El método según la reivindicación 1, en el que la transformación se lleva a cabo en plantas seleccionadas de un grupo que consiste en tabaco, algodón, arroz, trigo, maíz, patata, tomate, colza, alfalfa, girasol, cebolla, trébol, soja, y guisante.
- 25 4. Un vector recombinante útil para inducir la esterilidad masculina en plantas mediante transformación que comprende:
 - i) un promotor específico de la antera, en el que dicho promotor específico de la antera usado es un promotor específico del tapete, representado por SEQ ID N°: 3;
 - 30 ii) un gen *BECLIN 1* vegetal en el que dicho gen tiene la secuencia SEQ ID N°: 1 y codifica un polipéptido que tiene SEQ ID N°: 2 o su homólogo; y
 - iii) una secuencia terminadora Nos.
5. El vector recombinante según la reivindicación 4, en el que el casete de expresión que comprende una fusión génica quimérica entre el promotor específico del tapete y el gen *BECLIN 1/ATG6* vegetal tiene la secuencia polinucleotídica representada por SEQ ID N°: 4.
- 35 6. Una planta, célula, o tejido que comprende un vector recombinante de la reivindicación 5.
7. El uso del método según la reivindicación 1 para inducir la esterilidad masculina en plantas seleccionadas del grupo de las plantas enumeradas en la reivindicación 3.
8. El uso del vector recombinante según la reivindicación 4, para inducir la esterilidad masculina en plantas seleccionadas del grupo de las plantas enumeradas en la reivindicación 3.
- 40 9. Un equipo para inducir la esterilidad masculina en plantas que consiste en:
 - a. un vector que tiene un promotor específico del tapete de SEQ ID N°: 3 y un gen *BECLIN 1* vegetal;
 - b. reactivos adecuados; y
 - c. manual de instrucciones.



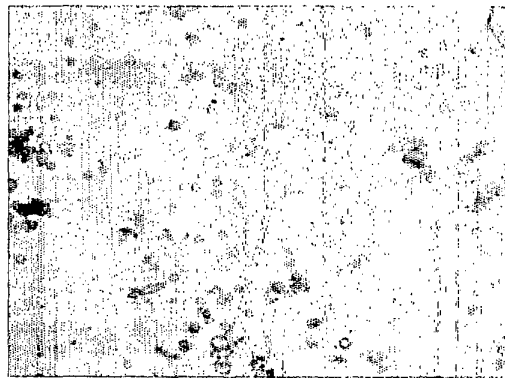
Pólenes de las plantas de control



Pólenes de las plantas transgénicas



Pólenes de las plantas de control



Pólenes de las plantas transgénicas

Figura 1. Ensayo de reacción fluorocromática (FCR) (que muestra la viabilidad del polen) y ensayo de germinación in vitro

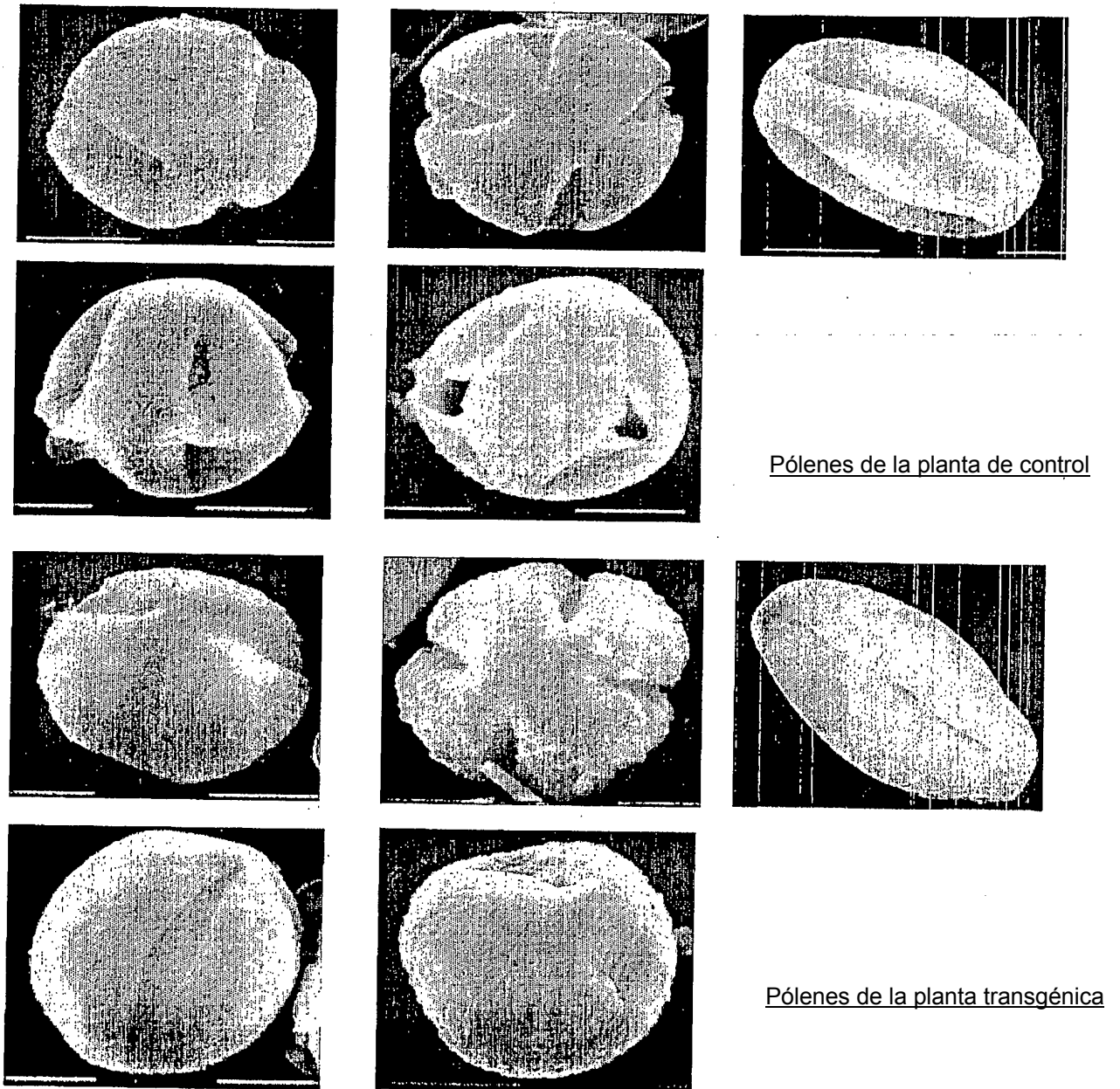


Figura 2. Fotografías de microscopía electrónica de barrido de los pólenes