

①9

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 164 599**

②1 Número de solicitud: 200000814

⑤1 Int. Cl.<sup>7</sup>: C12N 15/82

C12N 15/29

C12N 5/10

A01H 5/00

①2

PATENTE DE INVENCION

B1

②2 Fecha de presentación: **31.03.2000**④3 Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2002**Fecha de concesión: **23.04.2003**④5 Fecha de anuncio de la concesión: **16.05.2003**④5 Fecha de publicación del folleto de patente:  
**16.05.2003**⑦3 Titular/es:  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Serrano, 117  
28006 Madrid, ES**⑦2 Inventor/es: **Gómez Jiménez, María Dolores;  
Cañas Clemente, Luis Antonio;  
Madueño Albi, Francisco y  
Beltrán Porter, José Pío**⑦4 Agente: **No consta**⑤4 Título: **Promotor y secuencias reguladoras de *END1*, un gen de guisante que se expresa específicamente en anteras.**

⑤7 Resumen:

Promotor y secuencias reguladoras de *END1*, un gen de guisante que se expresa específicamente en anteras.Con la presente invención caracterizamos el promotor del gen *END1* de guisante que es capaz de dirigir la expresión específica de antera en estadios tempranos de su desarrollo. Por otro lado, se indica su uso para producir plantas transgénicas que expresen un gen específico en antera, por ejemplo, un gen que provoque la ablación de la antera y por tanto diera lugar a una planta androestéril. Estas plantas androestériles son de gran utilidad en programas de mejora genética para la obtención de semillas híbridas.

ES 2 164 599 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCION

Promotor y secuencias reguladoras de *END1*, un gen de guisante que se expresa específicamente en anteras.

5 **Sector de la técnica**

Agricultura. Esta invención se relaciona con la obtención de secuencias de DNA reguladoras (promotores) y la construcción, usando dichas secuencias, de nuevos genes quiméricos capaces de expresarse de forma específica en las anteras de plantas transgénicas.

10 **Estado de la técnica**

Para provocar la expresión específica de determinados genes en las anteras de plantas transgénicas, se han aislado, caracterizado y utilizado diversos promotores de genes cuya expresión es específica en un determinado tejido de la antera. Algunos de ellos se han utilizado en técnicas de ablación celular para producir plantas estériles de gran utilidad para la producción de semillas híbridas. En la actualidad, la ablación genética de células vegetales está siendo utilizada para realizar estudios de función y señalización celular dentro de tejidos u órganos específicos y para generar androesterilidad.

20 La ablación genética se basa en la inducción de la muerte celular mediante la expresión de cualquier enzima que sea capaz de destruir la integridad celular como proteasas, lipasas y RNasas (p.e. barnasa y RNasa T1). Resultados equivalentes pueden obtenerse expresando sustancias tóxicas para las células [Day CD e Irish VF. Trends Plant Sci., 2: 106-111, 1997]. Un ejemplo de este último método es el uso de péptidos que inactivan los ribosomas como es el caso de la cadena A de la toxina de *Corynebacterium diphtheria* (DTA) y de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. Varios grupos han sugerido la producción de androesterilidad *via* una sobreproducción de reguladores de crecimiento. La síntesis de auxinas o citoquininas usando genes de origen no vegetal, tal como los genes 1 y 2 del plásmido Ti, o los genes *rol A*, *B* y *C* del plásmido Ri, representan métodos donde estos factores se convierten en toxinas por la magnitud y momento inadecuado de su expresión.

30 También se han desarrollado métodos que no destruyen el tejido directamente, sino que dan lugar a células susceptibles a agentes ablativos específicos. Un ejemplo de esta aproximación es el uso de un RNA "antisentido" de un gen previamente establecido y que confiere resistencia constitutiva a un agente químico, como por ejemplo la tolerancia a un herbicida [Fabijanski SF *et al.*, *In vitro* Cell. Dev. Biol. 28: 46-52, 1992]. El efecto del RNA "en antisentido" es eliminar la resistencia química de forma específica, por ejemplo en polen, para que la aplicación del herbicida produzca la destrucción del polen. Este método convierte a un herbicida en un gametocida.

40 Para obtener una eficiente ablación genética es crucial disponer de un gen citotóxico que actúe sólo allí donde se exprese y de un promotor apropiado que controle la expresión espacio-temporal del gen citotóxico. Por ello, la caracterización de promotores de genes activos en diferentes tipos celulares y/o en diferentes momentos durante la diferenciación de la antera ha permitido examinar las funciones de distintos tejidos de la antera durante la gametogénesis mediante ablación celular [Mariani C *et al.* Nature, 347: 737-741, 1990; Paul W *et al.*, Plant Mol. Biol., 19: 611-622, 1992; Hird DL *et al.*, Plant J., 4: 1023-1033, 1993], con particular énfasis en las interacciones célula a célula [Roberts MR *et al.*, Sex. Plant Reprod., 8: 299-307, 1995]. Así mismo, esta técnica esta siendo empleada por grandes empresas productoras de semillas para el desarrollo de androesterilidad, característica deseable en los procesos de obtención de semillas híbridas [Williams ME, Trends Biotechnol., 13: 344-349, 1995].

50 En varios trabajos se ha analizado la función de las interacciones célula a célula durante el desarrollo de las estructuras reproductoras. Por ejemplo, se han usado varios promotores diferentes para dirigir la expresión de un gen citotóxico en las células del *tapetum* en la antera con el objetivo de determinar el efecto de la ablación en el desarrollo del polen [Mariani C *et al.*, Nature 347: 737-741, 1990; Roberts MR *et al.*, Sex. Plant Reprod. 8: 299-307, 1995]. La ablación de las células tapetales en diferentes estadios tiene efectos distintos en el desarrollo del polen. El uso de un promotor específico de células tapetales de tabaco (*TA29*) dirigiendo la expresión del gen *barnasa* (ribonucleasa) durante el estadio de tétrada del desarrollo del polen provoca androesterilidad, lo que indica que el *tapetum* es esencial para la producción de polen viable en este estadio [Mariani C *et al.*, Nature 347: 737-741]. En cambio, la sustitución del promotor *TA29* por el promotor APG de *Arabidopsis*, específico de *tapetum* en el estadio de microspora del polen, no tiene ningún efecto sobre el polen [Roberts MR *et al.*, Sex. Plant Reprod. 8: 299-307, 1995]. Este último dato indica que el *tapetum* no es esencial para la formación del polen a partir de la disgregación de las tétradas de microsporas. Un análisis histoquímico del desarrollo de la

antera en plantas transgénicas de *Brassica* con la construcción *TA29-barnasa* mostró la degradación del RNA dentro de las células tapetales junto con la desaparición del RNA de las microsporas [De Block M y Debrouwer D, Planta 189: 218-225, 1993]. Esta observación sugiere que las microsporas permanecen permeables a pequeñas moléculas después del inicio de la deposición de esporopolenina y en fases tardías de su desarrollo ya que el promotor *TA29* no dirige la expresión de genes en microsporas.

Beals TP y Goldberg RB [Plant Cell, 9: 1527-1545, 1997] pusieron en práctica una nueva estrategia de ablación celular para determinar qué tipos celulares de una antera están implicados en el proceso de dehiscencia. Transformaron plantas de tabaco con dos construcciones: la construcción formada por el promotor *TA56*, activo en el *septum*, en el estomio y en el tejido conectivo, y el gen *barnasa* junto con una de las siguientes construcciones de forma alternativa: a) el promotor *TP12*, activo en la mayoría de los tejidos de la antera, junto con el gen *barstar* (inhibidor de la barnasa), b) el promotor *TA20*, activo en la mayoría de los tejidos de la antera pero con un patrón de distribución distinto al de *TA12*, y el gen *barstar* y e) el promotor del gen de la lectina de soja, activo en las células del tejido conectivo, del *septum* y del estomio, más el gen *barstar*. El análisis de los diversos fenotipos de las plantas transgénicas demostró que el proceso de dehiscencia depende sólo de la presencia de un estomio funcional.

Shull [J. Ind. Abst. Vererb. 12: 97-149, 1914] fue el primero en introducir el término heterosis para describir las ventajas que ofrecía la heterocigosis con respecto a la división celular, crecimiento y otras actividades fisiológicas de un organismo. El resultado de estas ventajas: incremento en tamaño, vigor, rendimiento, adelanto en la fructificación y resistencia a enfermedades promovió hace décadas el interés por obtener variedades híbridas [Tsaftaris SA, Physiol. Plantarum 94: 362-370, 1995]. La mayoría de las plantas que contienen órganos reproductores tanto masculinos como femeninos se auto-polinizan (maíz, arroz, soja, tomate, etc.) lo que ocasiona problemas en los procesos de producción de semillas híbridas [Kriete G *et al.*, Plant J. 9: 809-818, 1996]. Para eludir este problema ha de usarse un sistema que controle la auto-polinización. Este sistema puede ser mecánico, químico o genético.

El sistema *mecánico* consiste en eliminar manualmente las anteras de las flores (emasculación), lo que supone una labor ardua y económicamente costosa.

El método *químico* se basa en el uso de productos químicos (gametocidas) que destruyen el polen específicamente produciendo una androesterilidad transitoria. Esta aproximación no es particularmente efectiva en cultivos con un periodo de floración muy extenso o con unas condiciones de floración variables e incontrolables. Además, la producción comercial de semillas híbridas *vía* gametocidas se caracteriza por un elevado coste y relativa efectividad de los productos químicos.

La mayoría de los sistemas de producción de semillas híbridas comerciales se apoyan en métodos *genéticos* para controlar la floración, de forma que usan plantas autoincompatibles o plantas androestériles, es decir, plantas que no producen polen, no son capaces de liberarlo o desarrollan polen que no es capaz de provocar auto-fertilización [Homer HT y Palmer RG, Crop Sci. 35: 1527-1535, 1995]. La producción de plantas androestériles es de gran utilidad para la obtención de semillas híbridas. La esterilidad masculina elimina la posibilidad de autofecundación de la planta, facilitando así la producción de híbridos los cuales son de gran aplicabilidad en los programas de mejora genética.

Los métodos de obtención de semillas híbridas descritos hasta ahora tienen limitaciones y no son aplicables en cultivos importantes de interés agronómico. Actualmente, se están desarrollando nuevas estrategias basadas en ingeniería genética para conseguir plantas androestériles [Gates P, Biotechnol. Genet. Engineering Rev. 13: 181-195, 1994]. El desarrollo de métodos basados en el DNA recombinante y la caracterización de genes implicados en el desarrollo del polen ha permitido la proliferación de sistemas moleculares que provocan androesterilidad nuclear (NMS), [Scott RJ *et al.*, Plant Sci. 80: 167-191, 1991]. Como ya se comentó anteriormente, la androesterilidad en los sistemas moleculares se consigue a través de procesos de ablación celular que impiden el desarrollo de las microsporas o los tejidos que conllevan su desarrollo (*tapetum* y paredes de los sacos polínicos). Además, es posible producir polen completamente funcional pero que no se libera a causa de defectos en la estructura de la antera. Para obtener plantas androestériles útiles en la producción de semillas híbridas es importante disponer de un promotor específico de tejidos implicados en el desarrollo del polen, un sistema para seleccionar la línea androestéril y un sistema para restaurar la androesterilidad en la línea híbrida F1.

#### *Promotores específicos*

El proceso de transcripción en la mayoría de los genes de plantas está controlado tanto temporal como espacialmente. La regulación de la actividad génica está mediada por la interacción entre factores en *trans*

y los elementos regulatorios en *cis* presentes en la región promotora del gen. Así pues, un promotor es una secuencia de DNA que dirige la transcripción de un gen estructural y que por tanto está situada en su región 5'.

5 Los genes que se expresan exclusivamente en los órganos reproductivos de la flor (estambres y carpelos) son particularmente interesantes ya que sus promotores serían potencialmente capaces de dirigir la expresión de otros genes hacia dichos órganos y provocar esterilidad masculina o femenina en la flor. Este es el caso de algunos promotores de genes que se expresan específicamente en las anteras los cuales ya se han utilizado, en combinación con agentes ablativos que sólo afectan al polen en desarrollo, en abordajes biotecnológicos encaminados a la producción de plantas androestériles incapaces de autopolinizarse. Por tanto, este tipo de abordajes dependen en gran manera de la existencia de promotores que proporcionen una adecuada expresión. Durante los últimos años, se han aislado y caracterizado numerosos genes que se expresan específicamente en tejidos y células relacionados con el desarrollo del polen, por tanto, se dispone de promotores para tal fin [Scott RJ *et al.*, Plant Sci. 80: 167-191, 1991].

15 Los promotores que se eligen para expresar agentes tóxicos o degenerativos del tejido suelen ser promotores regulados por el desarrollo y suficientemente activos y específicos de las células diana. Si la diana celular es tejido tapetal, el promotor debe ser activo tempranamente en el desarrollo de la microspora para romper el proceso antes de que las microsporas sean independientes del soporte del *tapetum*. Similarmente, el promotor debe actuar antes de la segregación meiótica para impedir la ausencia de actividad degenerativa en parte de las microsporas si el gen letal es hemicigótico.

20 Una alternativa al uso de promotores regulados por el desarrollo es el uso de promotores inducibles. Sin embargo, el número de promotores descritos que muestran inducción química específica es muy limitado. El uso de un promotor inducible para bloquear el desarrollo del polen tiene ventajas a la hora de mantener e incrementar la línea femenina ya que las plantas son fértiles y pueden ser multiplicadas por autocruce. También podrían usarse promotores activos constitutivamente o inducibles si la base de la androesterilidad reside en la supresión de un gen que se expresa en un tejido implicado en el desarrollo del polen, por ejemplo, *vía* "antisentido".

### 30 *Selección de la línea androestéril*

Para producir semillas híbridas en cantidades industriales es necesario incrementar la línea femenina. Aunque es posible producir muchas plantas androestériles a través de propagación *in vitro*, para las plantas de interés agronómico esto sería económicamente demasiado costoso. Una estrategia común para multiplicar la línea androestéril es unir el gen ablativo a un gen que confiere resistencia a un herbicida [Mariani C *et al.*, Nature 357: 384-387, 1992]. Después de cruzar la línea androestéril con una línea isogénica y fértil, las plantas que no han heredado la esterilidad son eliminadas con el herbicida. Por analogía, podría utilizarse cualquier gen que permitiera discriminar entre los dos fenotipos, como por ejemplo los que afectan a la pigmentación de las semillas.

### *Restauración de la fertilidad*

45 La restauración de la fertilidad en las plantas híbridas puede realizarse cruzándolas con líneas transgénicas que expresen un inhibidor específico del enzima tóxico empleado para obtener androesterilidad, como es el caso del gen *barstar* cuyo producto inhibe la acción de la bamasa [Mariani C *et al.*, Nature 357: 384-387, 1992] o un RNA "en antisentido" del gen letal usado [Schmülling T *et al.*, Mol. Gen. Genet. 237: 385-394, 1993].

### 50 *Sistemas moleculares usados para obtener plantas androestériles*

La primera estrategia de ablación diseñada para producir androesterilidad fue propuesta por Mariani *et al.*, [Nature 347: 737-7411, 1990]. El promotor del gen TA29 de tabaco, específico de *tapetum*, se usó para dirigir la expresión de dos diferentes RNAs (RNasa T1 de *Aspergillus oryzae* y barnasa de *Bacillus amyloliquefaciens*) en tabaco y *Brassica napus*. Las anteras transgénicas androestériles que se obtuvieron carecían de *tapetum* y contenían los sacos polínicos sin microsporas o granos de polen. La construcción TA29-barnasa se fusionó al gen *bar*, un gen que confiere tolerancia al herbicida glufosinato amónico, para poder seleccionar las plantas androestériles en una población. La aplicación del herbicida a la progenie de un cruce elimina las plantas fértiles masculinas e incrementa así la eficiencia con la que las plantas estériles pueden aislarse. A pesar de todo, estas plantas transgénicas no eran mejores que los mutantes espontáneos si no existía la posibilidad de revertir la androesterilidad. Mariani *et al.* [Nature 357: 384-387, 1992] resolvieron este problema con la producción de plantas transgénicas con una construcción que

contenía el gen inhibidor de la ribonucleasa barnasa (*barstar*) bajo el control del promotor *TA29*. Las plantas *TA29-barstar* actúan como una línea restauradora y cuando se cruzan con plantas transformadas con la construcción *TA29-barnasa* se obtienen plantas androfértiles.

5 A parte de este sistema, la bibliografía recoge otros métodos de producción de líneas androestériles:

En *Petunia hybrida* la androesterilidad nuclear se provocó suprimiendo la síntesis de flavonoides en la antera, lo que impide la maduración del polen. Esto se consiguió de dos formas distintas: a través del efecto de un RNA “en antisentido” [van der Meer IM *et al.*, Plant Cell 4: 253-262, 1992] y de una co-supresión [Taylor LP y Jorgensen R, J. Hered. 83: 11-17, 1992] del gen de la chalconsintetasa, enzima implicado en la ruta de síntesis de flavonoides. Para restaurar la fertilidad se pueden aplicar flavonoides sobre el estigma o mezclados con el polen lo que permite multiplicar la línea androestéril por autopolinización y por tanto, obtener líneas homocigotas para el fenotipo androestéril que no requieren del uso de ningún marcador para su selección [Ylstra B *et al.*, Plant J. 6: 201-212, 1994].

15 En tabaco, la androesterilidad ha sido también inducida por la expresión del gen *rol C* de *Agrobacterium rhizogenes* fusionado al promotor *CaMV* 35S. Desafortunadamente, el fenotipo androestéril fue acompañado por otras alteraciones fenotípicas en la planta transgénica [Schmülling T *et al.*, EMBO J. 7: 2621-2629, 1988]. La restauración de la esterilidad se llevó a cabo por la expresión de un RNA “en antisentido” del gen *rol C* en los híbridos F1 [Schmülling T *et al.*, Mol. Gen. Genet. 237: 385-394, 1993].

O’Keefe *et al.* [Plant Physiol. 105: 473-482, 1994] describieron un sistema de androesterilidad inducible basado en la expresión del citocromo P450<sub>SU1</sub> en las células tapetales de tabaco. Esta proteína es capaz de transformar un derivado inofensivo del gametocida R7402, añadido de forma exógena, en su forma activa (500 veces más tóxica). Sin embargo, posiblemente debido al rápido metabolismo de R7402, la androesterilidad es limitada a flores en un determinado estadio de desarrollo durante la aplicación del compuesto. Adicionalmente, R7402 es en sí mismo tóxico y comienza a inhibir el crecimiento cuando es aplicado en cantidades cuatro veces más altas que las usadas para producir androesterilidad de manera clásica.

30 Otro sistema de obtención de androesterilidad inducible se basa en la utilización del promotor *TA29* de *tapetum* junto con el gen *argE* de *E. coli*. El producto de este gen desacetila el compuesto N-acetil-L-fosfinotricina y lo transforma en glufosinato, un compuesto citotóxico. Cuando se aplica sobre la planta de tabaco la N-acetil-L-fosfinotricina el *tapetum* degenera y se obtienen plantas androestériles [Kriete G *et al.*, Plant J. 9: 809-818, 1996]. Por último, queremos indicar que la androesterilidad, además de ser una importante herramienta en la obtención de híbridos, es también una característica deseable en plantas capaces de desarrollar frutos en ausencia de fertilización (frutos partenocárpicos). En este tipo de frutos las semillas están ausentes con lo que se aumenta su consumo o su aceptación por los consumidores [Rotino G *et al.*, Nat. Biothechnol. 15: 1398-1401, 1997]. Algunos cultivos partenocárpicos de interés agronómico son: el peral, los cítricos, el pepino, la uva o los dátiles.

## Descripción de la invención

### Breve descripción de la invención

45 Con la presente invención caracterizamos el promotor del gen *END1* de guisante (*Pisum sativum* L.) que es capaz de dirigir la expresión específica de antera en estadios tempranos de su desarrollo. Por otro lado, se indica su uso para producir plantas transgénicas que expresen un gen específico en antera, por ejemplo, un gen que provoque la ablación de la antera y por tanto diera lugar a una planta androestéril. Estas plantas androestériles son de gran utilidad en programas de mejora genética para la obtención de semillas híbridas.

### Descripción detallada de la invención

55 En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, aislamos y caracterizamos un gen de guisante (*Pisum sativum* L.) que se expresaba exclusivamente en determinados tejidos de las anteras. Su aislamiento y caracterización se realizó mediante la purificación e identificación previa de la proteína que codifica. Para ello, se comenzó realizando un proceso de inmunosustracción de extractos de estambres con un suero policlonal obtenido por inmunización de un conejo con extractos de los demás órganos florales (sépalos, pétalos y carpelos). El resultado de este proceso fue la obtención de un extracto enriquecido con proteínas específicas de los estambres, eliminándose aquellas que estos órganos poseen en común con el resto de los órganos florales. Dicho extracto enriquecido se utilizó para inmunizar ratones y obtener

líneas de hibridomas que producían anticuerpos monoclonales específicos para una determinada proteína estaminal. Uno de ellos (MAbA1) reconocía una proteína de 26kDa (END1) bastante abundante en los extractos de estambres y cuya inmunolocalización nos indicó que se acumulaba exclusivamente en los tejidos que conforman la arquitectura de los sacos polínicos de la antera. Mediante cromatografía de afinidad purificamos una cierta cantidad de dicha proteína, microsecuenciamos 20 aas de su extremo N-terminal y la secuencia obtenida mostró una elevada homología con otra proteína (ALB2) previamente descrita [Higgins *et al.*, Plant Mol Biol. 8: 37-45, 1987]. La secuencia obtenida mostró una elevada homología con otra proteína (PA2) descrita previamente en cotiledones de guisante y cuya función es desconocida. La utilización del cDNA de PA2 como sonda en el escrutinio de una genoteca de flores de guisante nos permitió el aislamiento de un clon con la secuencia codificante completa (910 pb, y que denominamos END1, SEQ ID NO 2), la cual presenta un 72% de homología con la de PA2. Los ensayos de Northern mostraron la especificidad de la expresión de esta nueva proteína ya que se restringía a extractos de anteras, no detectándose en otros órganos florales, cotiledones y tejidos vegetativos. Por otra parte, los ensayos de hibridación *in situ* corroboraron la especificidad de la expresión del gen END1 en los tejidos de la antera del guisante durante los diferentes estadios de su desarrollo (Figura 1). Su expresión comenzaba en estadios muy tempranos del desarrollo (diferenciación de primordios comunes en pétalos y estambres) y continuaba hasta la dehiscencia de la antera, expresándose exclusivamente en la epidermis, tejido conectivo, capa intermedia y endotecio. No se detectó expresión del gen ni en el tejido germinal (*tapetum*) ni en el polen. Los ensayos realizados con otros órganos florales, otras partes de la planta (tallos, hojas, raíces, etc.) o con semillas (cotiledones) resultaron negativos.

La expresión específica del gen END1 en aquellos tejidos que conforman los sacos polínicos de las anteras, nos sugirió el aislamiento y análisis del promotor de dicho gen. El estudio de este promotor es interesante por diversos motivos. En primer lugar, podríamos determinar qué motivos de un promotor determinan la expresión específica de un gen en anteras. Así mismo, sería interesante analizar qué factores transcripcionales regulan la expresión del gen END1 y determinar si éstos están relacionados con los genes homeóticos MADS-box que regulan la identidad de los órganos florales, en particular con los genes de clase B y C que están implicados en el desarrollo de estambres. Con estos objetivos rastreamos una genoteca genómica de DNA de guisante, utilizando como sonda el fragmento completo de cDNA de END1 (SEQ ID NO 2). Se realizó un primer escrutinio con 500.000 calvas fágicas en el que encontramos un clon positivo (clon 162). Éste fue purificado y aislado tras tres escrutinios más. Mediante el cultivo y lisis del fago positivo purificamos su DNA. Este DNA fue digerido con HindII ya que este enzima cortaba el fragmento de cDNA a 210 pb de su inicio y podríamos obtener de la digestión fágica un fragmento de DNA que contuviese las primeras 210 pb del cDNA más secuencias promotoras corriente arriba de éstas. Con el DNA digerido se realizó un análisis Southern utilizando como sonda para hibridar las 210 pb del extremo 5' del fragmento de cDNA del clon 162. Este fragmento fue empleado como sonda para determinar qué fragmento resultante de la restricción sería el constituido por estas 210 pb y parte o toda la secuencia promotora. El análisis Southern mostró que un fragmento de aproximadamente 3 Kb derivado de la digestión del DNA fágico con HindII hibridaba con la sonda. El fragmento de 3 Kb fue purificado mediante el método de QUIAEXII, clonado en el vector Bluescript-KS(-) en el sitio HindII del sitio de clonación y posteriormente secuenciado. La secuencia nucleotídica completa del promotor de END1 se encuentra representada en la Figura 2 y en la SEQ ID NO 1 (los nucleótidos de -2736 y 1 de la Figura 2 se correlacionan con los nucleótidos 1 y 2766 de la SEQ ID NO 1, respectivamente).

Tras la secuenciación del fragmento clonado comprobamos que habíamos aislado un fragmento de 2946 pb. De éstas, las 210 pb del extremo 3' correspondían a las primeras 210 pb del fragmento del clon de cDNA 162. En posiciones -263 (SEQ ID NO 1, 2474) y -56 (SEQ ID NO 1, 2681), tomando como nucleótido +1 el primero del cDNA 162 aislado (en la SEQ ID NO 1 el nucleótido +1 corresponde al nucleótido 2377) se encuentran dos posibles cajas TATA, en posiciones -347 (SEQ ID NO 1, 2390) y -66 (SEQ ID NO 1, 2671) dos putativas cajas CCAAT, y en posición -401 una caja CAAT (SEQ ID NO 1, 2336) (Figura 2). Además de estas cajas, comunes en promotores de eucariotas, también se han encontrado cajas típicas de promotores de plantas. En la Tabla I están definidos todos los motivos de promotores de plantas encontrados entre el nucleótido -400 (SEQ ID NO 1, 1977) y +1 de la región promotora de END1 utilizando la base de datos del Instituto Nacional de Recursos Agrobiológicos de Japón. Seleccionamos esta área basándonos en que las distancias en que se encuentran las cajas funcionales en los promotores con respecto al inicio de transcripción no superan normalmente los 400 nucleótidos según las referencias bibliográficas de las diferentes cajas estudiadas.

60

TABLA 1

Descripción de los elementos *cis* localizados en el fragmento comprendido entre los nucleótidos -400 y -1 de la región promotora de *end1*

Motivo	Posición (cadena)	Secuencia consenso	Referencia
ELEMENTO-300	-157(+)	TGHAAARK	Thomas y Flavell, 1990
AP3	-209(+)	TGTGGWWW	Mercurio y Karin, 1989
ASF1	-122(-)	TGACG	Terzaghi y Cashmore, 1995
G-BOX	-84(+)	CACGTG	Foster <i>et al.</i> , 1994
E-BOX	-333, -295, -30(+)	CANNTG	Kawagoe <i>et al.</i> , 1994
GATA	-265, -205(+)	GATA	Gilmartin <i>et al.</i> , 1990
GT1	-278, -156(+)	GRWAAW	Lawton <i>et al.</i> , 1991
HEXMOTIF1	-127(+)	ACGTCA	Mikami <i>et al.</i> , 1989
I-BOX	-356(-), -194(-)	GATAA	Giuliano <i>et al.</i> , 1988
MYB-PH3	-234(+)	CNGTTA	Solano <i>et al.</i> , 1995
MYB-ST1	-206(+)	GGATA	Baranowskij <i>et al.</i> , 1994
ROOTMOTIF1	-202(+), -96(+)	ATATT	Elmayan y Tepfer, 1995
RY	-34(+)	CATGCAY	Fujiwara y Beachy, 1994
SIF	-215(+)	ATGGTA	Zhou <i>et al.</i> , 1992
SEF1	-392(+)	ATATTTAWW	Lessard <i>et al.</i> , 1991
SEF4	-276(+)	RTTTTTR	Lessard <i>et al.</i> , 1991
MYB-P	-349(+)	CCAACC	Grotewold <i>et al.</i> , 1994
SBF1	-150(+)	TTAA	Lawton <i>et al.</i> , 1991
CarG	-103(+)	CC(A/T) <sub>6</sub> GG	Shiraishi <i>et al.</i> , 1993

Por otra parte, analizando visualmente la secuencia de la región promotora hemos detectado la presencia de otros motivos reguladores. Dos de ellos son cajas CARG ( $^{-329}\text{TGAAAATACC}^{-320}$  (SEQ ID NO 1  $^{2408}\text{TGAAAATACC}^{2417}$ ) y  $^{-300}\text{GGTTTCAACT}^{-291}$  (SEQ ID NO 1  $^{2437}\text{GGTTTCAACT}^{2446}$ )), que aunque no tan semejantes como la primera a la secuencia consenso, también podrían actuar como tales. Un ejemplo de cajas CARG que son funcionales aunque difieren de la secuencia consenso lo representan dos de las tres cajas CARG (CCTTTCATGG y CCATTTTATAG) del promotor del gen *AP3* de *Arabidopsis* (Tilly JJ *et al.*, Development 125: 1647-1657, 1998). Otros motivos que hemos identificados son: el motivo  $^{-290}\text{GTCAAAA}^{-284}$  (SEQ ID NO 1  $^{2447}\text{GTCAAAA}^{2453}$ ) presente en los genes *Zm13* y *LAT52* (Zou JT *et al.*, Am. J. Bot. 81: 552-561, 1994), el motivo  $^{-127}\text{ACGTCA}^{-122}$  (SEQ ID NO 1  $^{2610}\text{ACGTCA}^{2615}$ ) localizado en el gen *Bp19* [Zou JT *et al.*, Am. J. Bot. 81: 552-561, 1994] y el elemento C(A)<sub>6/8</sub> repetido tres veces (en posiciones -507 (SEQ ID NO 2230 -2236), -288 (SEQ ID NO 2449-2457) y -247 (SEQ ID NO 2490-2496)) como en los promotores de los genes *OlnB4* y *OlnB19* [Hong HP *et al.*, Plant Mol. Biol. 34: 549-555, 1997].

Los diferentes motivos encontrados en la región promotora de *END1* pueden agruparse en función del tipo de genes donde han sido descritos. Los motivos SEF1, SEF4, E-box, RY y Elemento -300 se caracterizan por estar presentes en promotores de genes que codifican proteínas de reserva de la semilla. Los motivos GATA, GT1, I-box y ASF-1 están presentes en genes cuya expresión está regulada por luz. Las cajas que reconocen los factores homólogos a proteínas Myb de animales: MYB-P, MYB-PH3 y MYB-ST1 han sido encontradas en genes implicados en la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides. El motivo G-box está localizado en multitud de genes vegetales regulados por diversos factores ambientales y fisiológicos. SBF1 ha sido descrito en el gen de defensa *chs15* de *Phaseolus vulgaris*. Rootmotif1 ha sido identificado en la secuencia promotora de dos genes de raíz de maíz *rolD* y *pox1*. Y los elementos GTCAAAA, ACGTCA y C(A)<sub>6/8</sub> están presentes en genes específicos de anteras de *Brassica napus*, como el *Bp19* [Zou JT *et al.*, Am. J. Bot. 81: 552-561, 1994; Hong HP *et al.*, Plant Mol. Biol. 34: 549-555, 1997]. Todos estos motivos están señalados en la SEQ ID NO 1.

Finalmente, el motivo CArG es una secuencia consenso de DNA que es reconocida por el dominio MADS (referencia de las siglas) que caracteriza a los genes homeóticos de plantas implicados en el desarrollo de los órganos florales [Huang H *et al.*, Nuc. Acids Res. 21: 4769-4776, 1993; Shiraisi H *et al.*, Plant J. 4: 385-398, 1993]. Los genes *APETALA-1* [*AP1*; Mandel MA *et al.*, Nature 360: 273-277, 1992], *APETALA-3* [*AP3*, Jack T *et al.*, Cell 68: 683-697, 1992], *PISTILLATA* [*PI*, Goto K *et al.*, Genes Dev. 8: 1548-1560, 1994] y *AGAMOUS* [*AG*, Yanofsky MF *et al.*, Nature 346: 35-39, 1990] son genes homeóticos que regulan la identidad de los órganos florales en *Arabidopsis*. Estos genes pertenecen a la familia de proteínas que contiene un dominio MADS en su secuencia. El dominio MADS lo componen 56 aminoácidos y está implicado en la dimerización de los genes MADS consigo mismos o con otros genes MADS y la posterior unión a DNA de estos dímeros [Shore P y Sharrocks AD, E. J. Biochem. 229: 1-13, 1995].

Los genes homeóticos de tipo B (*AP3* y *PI* en *A. thaliana*) controlan el desarrollo de pétalos y estambres, y los de tipo C (*AG* en *A. thaliana*) controlan la formación de estambres y carpelos. El gen *END1* se expresa en estambres y por tanto, podría ser un gen diana de los genes MADS de tipo B y C. Esta hipótesis es apoyada por la existencia de estas putativas cajas CArG en la región promotora de *END1*. Huang *et al.* [Nuc. Acids Res. 21: 4769-4776, 1993] y Shiraisi *et al.* [Plant J. 4: 385-398, 1993] determinaron que el gen *ag* requería de unas secuencias consenso flanqueantes a la caja CArG para su unión a DNA. La secuencia consenso de unión a DNA para el dominio MADS de *AG* fue identificada como: 5'-TT(A/T/G)CC(A/T)<sub>6</sub>GG(A/T/C)AA-3' según Shiraisi *et al.* [Plant J. 4: 385-398, 1993] y TT(A/T)CC(A/T)(A/t)<sub>2</sub>(T/A)NNGG (-G)(A/t)<sub>2</sub> según Huang *et al.* [Nuc. Acids Res. 21: 4769-4776, 1993]. Las secuencias que flanquean la caja CArG en posición -103 en el promotor de *END1*, a excepción de dos nucleótidos, cuadran con las que reconoce el dominio MADS del gen *AGAMOUS* elucidadas por los autores anteriores (Figura 3). Dato que confirmaría la hipótesis de que *END1* podría ser una diana directa de un gen homeótico floral, en concreto podría serlo del gen *AGAMOUS*.

Con el fin de comprobar si la secuencia promotora clonada de *END1* dirigía la expresión específica de un gen en anteras y si era capaz de hacerlo en plantas distintas al guisante (*P. sativum*), transformamos plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y *Arabidopsis thaliana* con la secuencia promotora fusionada a la secuencia codificante del gen de la  $\beta$ -glucuronidasa (*uidA*, GUS-intrón). Se realizaron dos construcciones distintas utilizando el plásmido pBI101: pBI101-F3 y pBI101-F1. 5 (Figura 4). La primera construcción contiene la secuencia de nucleótidos comprendida desde el nucleótido -2736 al -6 (SEQ ID NO 1, 1 al 2731) y la segunda contiene la secuencia desde el residuo -1531 al -6 (SEQ ID NO 1, 1206 al 2731). Esta última construcción fue ensayada para delimitar, en un primer intento, la secuencia que constituye la región promotora en el fragmento clonado. Ambas construcciones fueron introducidas en *Arabidopsis* empleando la cepa C58 de *Agrobacterium tumefaciens*, y la construcción pBI101-F3 en tabaco mediante la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*. Todas estas plantas fueron transformadas a su vez con el plásmido pBI101 como control y analizadas posteriormente la expresión del gen reportero en los distintos tejidos.

Los resultados de las transformaciones descritos en los ejemplos posteriores demuestran que la secuencia promotora aislada del gen *END1* es totalmente funcional ya que dirige la expresión heteróloga de un gen de manera específica en anteras de plantas distintas al guisante. Además, se ha circunscrito esta capacidad a la secuencia de nucleótidos comprendida entre la posición - 1531 y - 6 del promotor (SEQ ID NO 4). Por otro lado, se puede definir con experimentos similares la secuencia de nucleótidos mínima que mantendría sustancialmente esta capacidad reguladora de la expresión específica de antera. Así, forman parte de la presente invención todas estas secuencias de nucleótidos, ya sea la región completa del promotor *END1* o cualquier fragmento de la misma que mantengan sustancialmente esta capacidad de dirigir la expresión específica de antera. Por otro lado, a partir de esta secuencia del promotor del gen *END1* del guisante pueden obtenerse la región promotora de los genes homólogos del *END1* en otras especies vegetales merced al conocimiento general existente de las técnicas de biología molecular. Todas estas secuencias de nucleótidos homólogas a la descrita en la presente invención y que mantengan sustancialmente la capacidad de regular la expresión específica de antera forman parte de la presente invención.

Estas secuencias reguladoras pueden utilizarse en el desarrollo de construcciones génicas que incluyan además secuencias codificantes de genes de interés que a su vez pueden integrarse en vectores recombinantes de expresión. Para ello se pueden utilizar distintas técnicas ampliamente conocidas en el estado del arte [Sambrook et al, "Molecular cloning, a Laboratory Manual", 2<sup>nd</sup> de., Cold spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 Vol 1-3] algunas de los cuales se muestran en la presente invención. Estos vectores recombinantes permitirían la expresión de distintos genes codificantes de polipéptidos o RNA que, como se describe en el estado de la técnica de la presente invención, al ser tóxicos para los tejidos donde se expresen inducirían la ablación de los mismos y en nuestro caso producirían la androesterilidad de la planta resultante. Ejemplos de estos genes están descritos en la patente europea 90402196 (número de



publicación 04120006) y que pueden tomarse como referencia junto con los que se describen en el estado de la técnica de la presente invención. Por otro lado, estas construcciones pueden contener otros elementos reguladores de la expresión específica de antera dependiendo del vector recombinante utilizado, la planta a transformar, etc. Todas estas posibles construcciones genéticas conteniendo como denominador común un fragmento de la secuencia promotora del gen *END1* de guisante u homólogos así como el uso de las mismas para la transformación de plantas androestériles forman parte de la presente invención.

La transformación de plantas mediante vectores de expresión está ampliamente conocida en área técnica en la que nos movemos y pueden utilizarse múltiples sistemas: vectores plasmídicos, liposomas, electroporación microinyección, etc. En la presente invención se describe la transformación de plantas mediante un vector plasmídico como un ejemplo de las múltiples posibilidades técnicas, todas las cuales forman parte de la presente invención. Por otra parte, en la presente invención se ha descrito la transformación de la planta del tabaco (*Nicotiana tabacum*) y *Arabidopsis thaliana* como ejemplos transformación de plantas. Por otro lado, tanto el uso de secuencias del promotor del gen *END1* como las formas homólogas de otras plantas puede permitir utilizar cualquiera de ellas en la regulación de la expresión específica de antera de cualquier otra planta distinta de la de origen. El uso de estas construcciones genéticas para la transformación de plantas, entre otras la planta del tabaco (*Nicotiana tabacum*), *Arabidopsis thaliana*, el tomate, el melón, la sandía y el pepino, así como las plantas transgénicas androestériles obtenidas y el uso de las mismas para producir semillas híbridas forman parte de la presente invención.

Por tanto, podemos concluir que, con los conocimientos existentes en el estado de la técnica actual, se podría utilizar el promotor *END1* para obtener plantas androestériles y producir semillas híbridas dirigiendo la expresión de genes que codifican para determinados enzimas que producen ablación celular en aquellos tejidos que conforman los sacos polínicos, tal y como se explicó anteriormente. Este sistema, en combinación con otro similar que restaure la fertilidad al producir un inhibidor del enzima utilizado para provocar la ablación celular, sería de gran utilidad en programas de mejora genética basados en la producción de híbridos (heterosis). Con idéntica finalidad se han probado con anterioridad diversos promotores, pero no con todos ellos se ha conseguido una población de plantas estériles al 100% [Zhan X *et al.*, Sex. Plant Reprod.9: 35-43, 1996; Roberts MR *et al.*, Sex. Plant Reprod. 8: 299-307, 1995]. Este fenómeno es debido a que estos promotores se activan en etapas tardías del desarrollo donde el polen está ya parcialmente desarrollado, de manera que el tejido que sufre la ablación (*tapetum*) ya no es estrictamente imprescindible para la completa maduración del polen. Esta metodología presenta un grave problema porque como resultado final se obtiene una población mixta de semillas híbridas y no híbridas. Nuestro promotor puede ser una alternativa a dichos promotores ya que es activado cuando se inicia la diferenciación de los primordios estaminales. En esta fase temprana, una proteinasa o una nucleasa impediría el desarrollo correcto de la antera al destruir en una etapa muy temprana las líneas celulares que darán lugar a los tejidos que conforman los sacos polínicos. Los tejidos donde se expresa *END1* son tejidos que proporcionan el soporte y la estructura (arquitectura) a la antera por lo que es difícil imaginar una antera capaz de producir polen sin estos tejidos.

## Figuras

Figura 1.- *Análisis espacio-temporal de la expresión de END1 en secciones longitudinales de flores de guisante en diferentes estadios.* El precipitado de color púrpura señala la localización de la expresión.

A. Yema floral en la que los primordios comunes (▲) todavía no se han diferenciado en primordios petaloides y estaminales junto con una flor en día 12 antes de la antesis donde comienza a expresarse *END1*. B. Flor en día 10 antes de la antesis. C. Control de la hibridación *in situ*: secciones hibridadas con la ribosonda "en sentido". D. Flor en día 8 antes de la antesis. E y F. Flores en día 6 antes de la antesis fotografiadas con menor y mayor aumento respectivamente. G y H. Secciones seriadas de una flor en día 5 antes de la antesis hibridadas con la ribosonda "en sentido" (control) y "en antisentido" respectivamente. C, carpelo; E, estambres; P, pétalos; Co, tejido conectivo; M, microsporas; T, *tapetum*; 1, 2, 3 y 4, verticilos 1, 2, 3 y 4 de la flor.

Figura 2.- *Secuencia de la región promotora de END1.* Aparecen de forma subrayada dos posibles cajas TATA (tataaat y tatatata), una caja CAAT y dos cajas CCAAT. En color azul se representan tres posibles cajas CArG, en verde un motivo GTCAAAA, un elemento ACGTCA en rosa y tres motivos C(A)<sub>6/8</sub> en rojo. La caja GTCAAAA comparte sus últimos cinco nucleótidos con una de las cajas C(A)<sub>6/8</sub>. La anotación +1 indica el inicio de la secuencia de cDNA del clon 162. En negrita se señala el codón de inicio de traducción (ATG).

Figura 3.- *Apilamiento de la secuencia consenso de unión a DNA de AGAMOUS (caja CArG más secuencias flanqueantes) con una putativa secuencia equivalente encontrada en la región promotora de END1.*

Figura 4.- Representación esquemática de las construcciones pBI101-F3 y pBI101-F1.5 utilizadas para transformar plantas de *Arabidopsis* y tabaco. El plásmido pBI101 empleado para realizar las construcciones consta de: el promotor constitutivo de la nopalina sintetasa (nos-pro) fusionado al gen *nptII* que confiere resistencia a kanamicina, el gen *uidA* que codifica el enzima  $\beta$ -glucuronidasa (GUS-intrón) y la señal de poliadenilación del gen de la nopalina sintetasa (*nos-ter*) en los extremos 3' de ambos genes.

Figura 5.- Resultados de la expresión del promotor *END1* de guisante fusionado con el gen *uidA* (GUS-intrón) en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. A y B: Tras realizar los correspondientes ensayos histoquímicos de actividad  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) con flores en diferentes estadios de desarrollo, dicha actividad sólo se detectó en las anteras (azul) y nunca en otros órganos florales ni en el resto de la planta. C: Sección longitudinal de un estambre con actividad GUS incluido en parafina. La actividad GUS (azul) se aprecia en los tejidos que conforman la epidermis, el conectivo y el endotecio. No se detectó actividad GUS ni en el *tapetum* ni en el polen. Aunque en la figura algunos granos de polen aparecen azules se trata de un artefacto ya que sólo aparece la coloración azul en la cubierta de exina y nunca en su interior. Co: conectivo, En: endotecio, Ep: Epidermis.

Figura 6.- Resultados de la expresión del promotor *END1* de guisante fusionado con el gen *uidA* (GUS-intrón) en plantas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). A, B y C: Ensayos histoquímicos de actividad GUS en flores de tabaco en diferentes estadios de desarrollo mostrando actividad sólo en las anteras (azul). D: Sección transversal en fresco de una antera mostrando los granos de polen y restos del *tapetum* sin coloración azul. E: estambres, C: carpelo, P: pétalos, S: sépalos, Po: polen.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Estudios de funcionalidad del promotor *END1* en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* y tabaco (*Nicotiana tabacum*)

#### 1.1 Diseño de las construcciones pBI101-F3 y pBI101-F1.5

La región promotora del gen *END1* se amplificó mediante la técnica de PCR a partir del fragmento genómico de DNA clonado en el plásmido pBluescript KS(+), utilizando los oligos TB1, TB2 y TB3 (Tabla 2). TB1 introduce un sitio de restricción *Bam*HI, y TB2 y TB3 introducen un sitio de restricción *Sa*II. Se amplificaron dos fragmentos: uno de 2731 pb que contiene casi toda la región promotora aislada (-2736/-6) y otro de 1526 pb próximo a la zona codificante del gen (-1531/-6 en la Figura 1) (SEQ ID NO 4). Ninguno de estos dos fragmentos contenía secuencia codificante. Ambos fragmentos se clonaron en el vector plasmídico PCR<sub>2.1</sub>. [Clar, J.M. (1998) Nuc. Acids. Res. 16: 9677-9686; Mead, D., et al. (1991) Bio Technology 9: 657-663]. Posteriormente, los insertos clonados se liberaron con los enzimas de restricción *Bam*HI y *Sa*II, y se clonaron en el plásmido pBI101 dirigiendo la expresión del gen *uidA* (GUS-intrón) de la  $\beta$ -glucuronidasa (Vancanneyt G *et al.*, Mol. Gen. Genet. 220: 245-250, 1990). Al final del proceso se lograron dos construcciones distintas: pBI101-F3 y pBI101-F1.5. La primera contenía el fragmento de 2731 pb y la segunda el fragmento de 1526 pb (Figura 4).

TABLA 2

Cebadores empleados en las amplificaciones por PCR

Cebadores	Secuencia (5'→3')	DNA molde
TB1	GAGAGCCTAGGAAGGTTATGTTGTGAGC	clon F3
TB2	GACTCGAGGTCGACTTCAACCTTATTAGTG	clon F3
TB3	GACTCGAGGTCGACAACCAGTGTGCATATATC	clon F3

#### 1.2.- Transformación de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum*

Para la obtención de plantas transgénicas de tabaco se utilizaron las variedades de *Nicotiana tabacum* cvs. Samsun y Pettit Habane SRI. La transformación se realizó con discos de hojas en cocultivo con *A. tumefaciens* (cepa LBA4404) durante tres días a 24°C en oscuridad en medio MSS (medio Murashige y Skoog 4.4 g/l, sacarosa 2%, Mes 100 mg/l, phytigel 3.5 g/l, pH 5.9) siguiendo el método descrito por Horsch *et al.* (Science, 223: 496-498, 1984) con modificaciones de Fisher y Guiltinan (Plant Mol. Biol.

Reporter 13: 278-289, 1995). Tras la incubación, los discos foliares fueron transferidos a placas con medio de regeneración y selección (medio MSS con IAA 0.2 mg/l, 6-BAP 2.2 mg/l, carbenicilina 400 mg/l y kanamicina 100 mg/l), y los brotes que iban apareciendo eran transferidos a medio de enraizamiento (medio MSS con IAA 0.2 mg/l, carbenicilina 200 mg/l y kanamicina 100 mg/l). Las plantas regeneradas se pasaban a macetas con turba:vermiculita (1:1) donde se mantenían hasta que producían semillas. Las condiciones de cultivo durante todo el proceso fueron de 12 h de fotoperiodo y 24°C de temperatura.

Para la producción de plantas transgénicas de *A. thaliana* se utilizó la variedad Columbia. Se siguió el protocolo de transformación por infiltración a vacío y selección de plantas resistentes a kanamicina descrito por Bechtold *et al.* (C R Acad. Sci. Paris, Life Sci., 316: 1194-1199, 1993). La cepa de *A. tumefaciens* que se utilizó fue la C58. Las plantas resistentes a kanamicina se pasaron a macetas con vermiculita: perlita: turba (1:1:1) y crecidas en cámara de cultivo a 22°C en condiciones de día largo hasta que finalmente se recogieron las semillas.

### 1.3. Análisis histoquímico (*GUS*) de las plantas transgénicas

La primera generación de plantas transformadas se sometió a análisis histoquímico de la actividad del gen de la  $\beta$ -glucuronidasa. Los tejidos estudiados se infiltraron mediante dos pulsos de vacío de 5 min en una solución con tampón fosfato 0.1 M pH 7.0, ferricianida 0.5 mM, ferrocianida 0.5 mM, tritón X-100 al 0.1% y ácido X-GlcA 2 mM y se incubaron en ella a 37°C durante 16 h. Posteriormente, se destiñeron con lavados sucesivos de etanol de 50°, 70° y 96°. Se identificaron como zonas GUS positivas aquellas coloreadas de azul. Los tejidos que presentaron coloración azul se fijaron e incluyeron en parafina (Cañas LA *et al.*, Plant J. 6: 597-604, 1994) antes de ser deshidratados para identificar sobre secciones qué tipos celulares en concreto eran responsables de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa. Las fotografías de los tejidos sin procesar se realizaron con una lupa MZ8 (Leica) y las de las secciones de tejidos incluidos en parafina en un microscopio óptico Eclipse 600 (Nikon).

### 1.4.- Análisis de las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*

El estudio de la expresión del gen *uidA* (*GUS*-intrón) se realizó mediante ensayo histoquímico de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa en tejidos de la primera generación de plantas transformadas resistentes a kanamicina. Los órganos ensayados fueron: flores, hojas, tallos, raíces y plántulas germinadas de semilla.

Analizamos 26 plantas transformadas con la construcción pBI101-F3, de las cuales 24 mostraron actividad específica de  $\beta$ -glucuronidasa en anteras y las dos restantes no mostraron actividad en ninguno de los tejidos estudiados (Figura 5). De 19 plantas transformadas con la construcción pBI101-F1.5 y resistentes a kanamicina sólo dos presentaron ausencia de actividad GUS. En las 17 restantes se observó coloración azul específicamente en anteras. Los tejidos de antera que presentaban actividad GUS eran los mismos en los que el gen *END1* de guisante se expresa: epidermis, conectivo, capa intermedia y endotecio. El filamento estaminal, el haz vascular central, tejido germinal (*tapetum*), las células madres del polen y el polen adulto no mostraron actividad GUS en ningún caso. Las plantas que fueron transformadas con el plásmido pBI101 (control negativo) no mostraron actividad GUS en ninguno de los tejidos analizados.

No se observaron diferencias en la actividad GUS entre plantas transformadas con una u otra construcción. Sin embargo, sí que observamos variabilidad en la intensidad de coloración entre flores de una misma planta, independientemente de la construcción utilizada, ya que podíamos distinguir flores en un determinado estadio que no mostraban actividad GUS y otras en el mismo estadio que sí la presentaban. Posiblemente este fenómeno sea debido a la diferente penetrabilidad que presentan los reactivos del ensayo frente a unos tejidos y otros. La similitud en los resultados obtenidos con ambas construcciones indican que en el fragmento comprendido entre los residuos -1531 al -6 se encuentran todas las secuencias reguladoras necesarias para su actividad, si bien serán necesarios estudios posteriores para determinar el fragmento mínimo que sea capaz de mantener la actividad promotora.

### 1.5. Análisis de las plantas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*)

El estudio de la expresión del gen *uidA* se realizó en la primera generación de plantas transformadas con la construcción pBI101-F3. Los tejidos que se ensayaron fueron: flores, hojas, tallos y raíces.

Analizamos 12 plantas de tabaco resistentes a kanamicina, de éstas 10 presentaron actividad GUS en sus anteras y dos no mostraron actividad en ninguno de los tejidos ensayados (Figura 6). Entre flores de una misma planta encontramos la misma variabilidad en la coloración azul que la observada en *A. thaliana*. Las plantas transformadas con el plásmido pBI101 (control negativo) no presentaron actividad  $\beta$ -glucuronidasa en ninguno de sus tejidos como se esperaba.

**REIVINDICACIONES**

1. Secuencia de nucleótidos reguladora de la expresión específica en antera de un gen **caracterizada** porque es la secuencia promotora del gen *END1* del guisante (*Pisum sativum* L.) y está constituida por la SEQ ID NO 1.

2. Secuencia de nucleótidos reguladora según la reivindicación 1 **caracterizada** porque es un fragmento cualquiera de la SEQ ID NO 1 y mantiene la capacidad reguladora de la expresión específica en antera.

3. Secuencia de nucleótidos reguladora según la reivindicación 2 **caracterizada** porque está constituida por la SEQ ID NO 4.

4. Secuencia de nucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 3 **caracterizada** porque es una secuencia homóloga de otra especie distinta del guisante.

5. Construcción génica **caracterizada** porque contiene la secuencia de nucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4 y una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido o de un RNA.

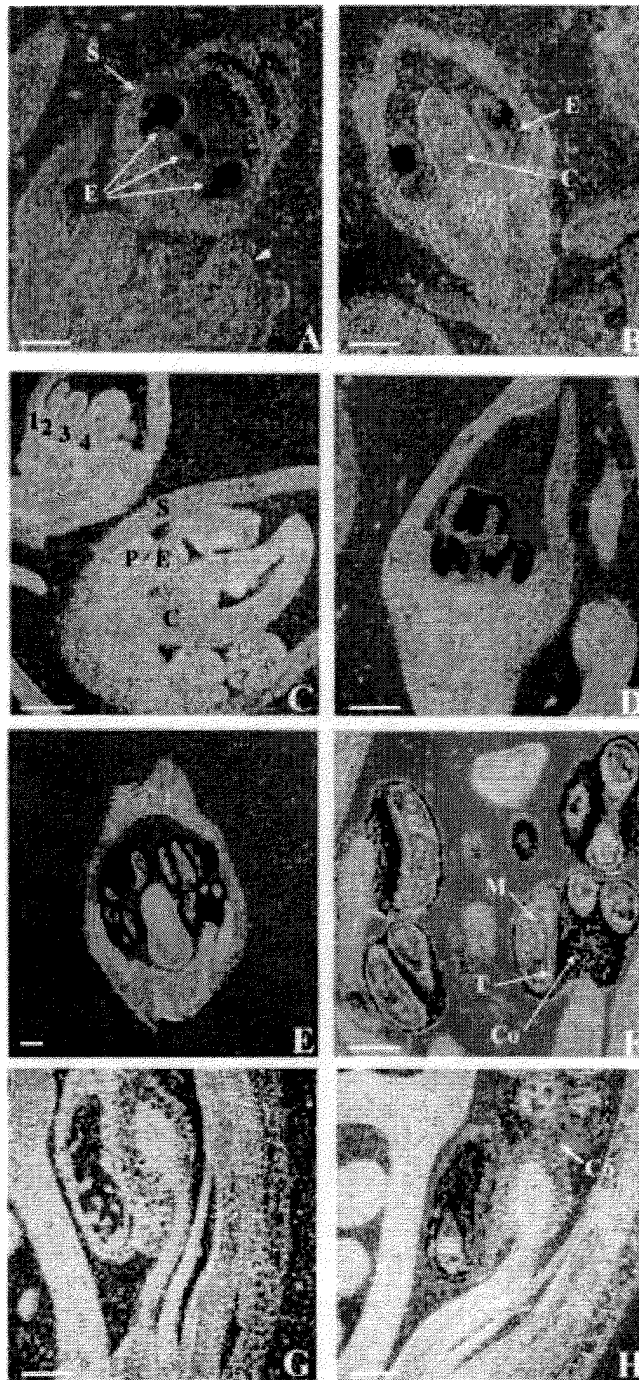
6. Transformación de una célula **caracterizada** porque se introduce en ella la construcción génica según la reivindicación 5 y se lleva a cabo mediante una técnica seleccionada, entre otras, del siguiente grupo de sistemas de transformación: sistema de infección procariota, liposomas, electroporación, difusión, bombardeo de partículas (“gene gun”), microinyección, coprecipitación con fosfato cálcico, o por un vector viral.

7. Planta transgénica **caracterizada** porque se obtiene a partir de una célula transformada según la reivindicación 6 y contiene integrado en su genoma la construcción génica según la reivindicación 5.

8. Planta transgénica según la reivindicación 7 **caracterizada** porque el gen codifica un polipéptido o un RNA que es citotóxico y su expresión induce la ablación de la antera.

9. Planta transgénica según la reivindicación 8 **caracterizada** porque pertenece a cualquier especie en la que se optimice la obtención de híbridos en la generación F1 en plantas hortícolas, como tabaco, tomate, melón, sandía y pepino.

10. El uso de la planta transgénica según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a la 9 para producir semillas híbridas.



**Figura 1**

## ES 2 164 599 B1

```

-2736 gacttcaacc ttattagtga atggacaata aaggttataa gtccttttac
-2686 tgtgaaagcc caccagtaac atcaccttgc ttatatcatt cagcttcttt
-2636 ctagtaacat ttggaacgtg tttataacag aaaaaaaccc aaaaactctg
-2586 aaaagactca cacttttctt atctccagtc cacctctcaa aaggaacaat
-2536 ttccttcagc ttcttggttg gacacctggt gacacatat gctgcagtgg
-2486 caacagtttc tccccacaaa gtgttaggaa gcttcttctc cttcagcatg
-2436 ttccttgca tatcaagcaa agttcggttt tcaacaagac cattatggtg
-2386 aggagtatat ggatcagtc cttcatgctc aattccattc tctttacaga
-2336 acttcttgaa ctctgtagag ttatactcac ctccaccatc agttctgaga
-2286 atcttcagaa gtctgaccac tttatttctc agccttgatt atgaatttct
-2236 taaattcagc aaacacctcg tgtttgaatt ttataaggga taccatgtc
-2186 atccttgta actcatccat aaatgacata aagtattatt ccctcctagt
-2136 gaaaggtttg taatgggcca cacacataag aatgcactac tcctaaagca
-2086 tgttttgctc tttgagctac ttttgatgaa aatggcagtc ttggttgctt
-2036 cccttccatg cacacattac atgacttttt tggtttctta attgtaggaa
-1986 ttccacgtac cagtttcttt gaattcaaat tccctaagct cctaaagttc
-1936 aaatgaccaa atcttttgtt ccacaactca ctttcttca caacacttgt
-1886 tgcgctaagg cattcagagt ctgcagtttt aacattcggc ttgaatggtt
-1836 tactccttcc atgttctgac tccataatca acttctgata acagtcatac
-1786 agcttcaaaa gaatgtcatt catggtaact ggaaatccct tttcaattaa
-1736 ttgacctaca ctcatcagat tgctcttcat gccaagaacg taccagacg
-1686 ttctgaatta atgcagattt tctattatctc ataatcactc taacattccc
-1636 cattccttta gcatttagtt acttatcatc agcacatcta atcttggtt
-1586 tcttccctaga gtcaaatca accagccatt tcttatttcc agtatgatgg
-1536 tttgaacaac cagtgtccat atatcaccag tcttctatag acgcactatc
-1486 ataactagaa gccattaata gcacatgttc atcatggtgc tcagatcctc
-1436 agaatgttca attgctacaa cgatgtaatc aaactgatga gtaagagatc
-1386 taagtacctt ctcaatgata ctttctctcat aaagagtttc tccatgagc
-1336 ttcattctcat ttgtgatcag aatcactcta gagatgtagt cagataactt
-1286 ctcatgttgc ttcattgctta gattctcata ctgctcagct agagactgaa
-1236 gtttcacctt ctacactgat gcatcactat cgtagcaca caccagtctg
-1186 tctcacacaa ccttttccgt cattgaaatca acgattttct taaacagctg
-1136 cacatccaca cactgatgga tgtagaacaa cgcattctga tcttcttcc
-1086 tcatatcaca ctgagcattt ctttgccgat ccggttcatt tctagaagt
-1306 gaagcataaa cttcgttgat gagatcaaga acatcttgag caccaataaa
-986 cacacacatc tgaatcatcc aacgattcca gttggtgtog tgaacaatg
-936 gnagcntggt gcacagattc acaacgatat attataantt ttgtttatg
-886 aaatthaaga acaaatttcc attattctta aaatgtttac aactgatgt
-836 agactgcaaa aggaataaag atacaatttg ttcacaccac tcaactgogt
-786 aaatataagt gagagttaat gagaaatact aaaataccct ctaaaattat
-736 gaattaatc taacaatctc taatgttagt ataatccatt aaacctttg
-686 atggcaggta taacaagggt gtaagttagt gtatacatat taggctctta
-636 ttatttttat attatctctg ctttcttctc tcatgttctc actaatatga
-586 tattatctcc ctccctaaa ttatttatat ttattagaaa aagagtttca
-536 tttttataaa atatattacc gtaatttttc aaaaaataaa atttaaatat
-486 atttataaaa aaaattattt aataatttat ttacattaat gcataaatat
-436 aaataaatac tgtcatttaa tatttaacct tttacaata aattatattt
-386 atttaattca actaatataa gctaagttat ctcatccaac caattaaaaa
-336 gatcatttga aaataccttt ttatttagtt tgtggcgggt tcaactgtca
-286 aaaaaagga atttttacga cgatataaat ttaaaccagc aaaaaattga
-236 agcagttaag cgaaccaact catggtagt ggatatattt atctttgtcg
-186 tttatatcgg attogaatct ctataatgat gaaaaattaa tatcaaacct
-136 taaataagaa cgtcatttat agagccattt tgggaaacac atatttcatg
-86 tacacgtgat tcgcaaattt ccaataactc tatatatagc cctcctcagt
-36 ttcatgcatt tgctcacaac ataaccttcc ttgaatTCGA TATCTACCTA
AGATGACAAA ACCAGG +1

```

**Figura 2**

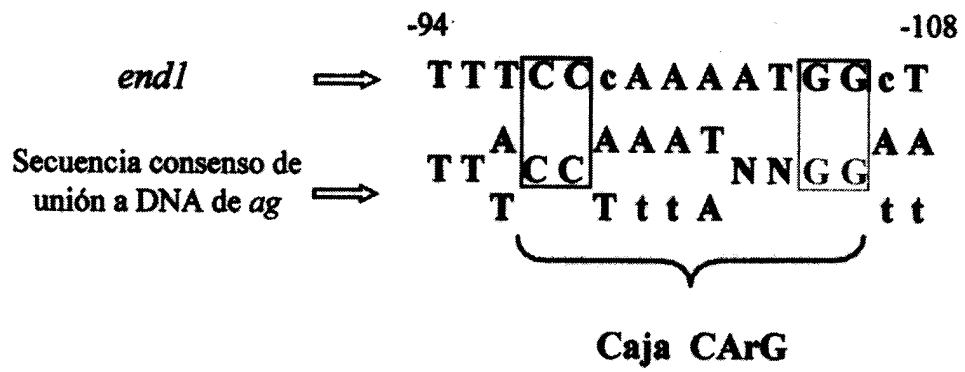


Figura 3

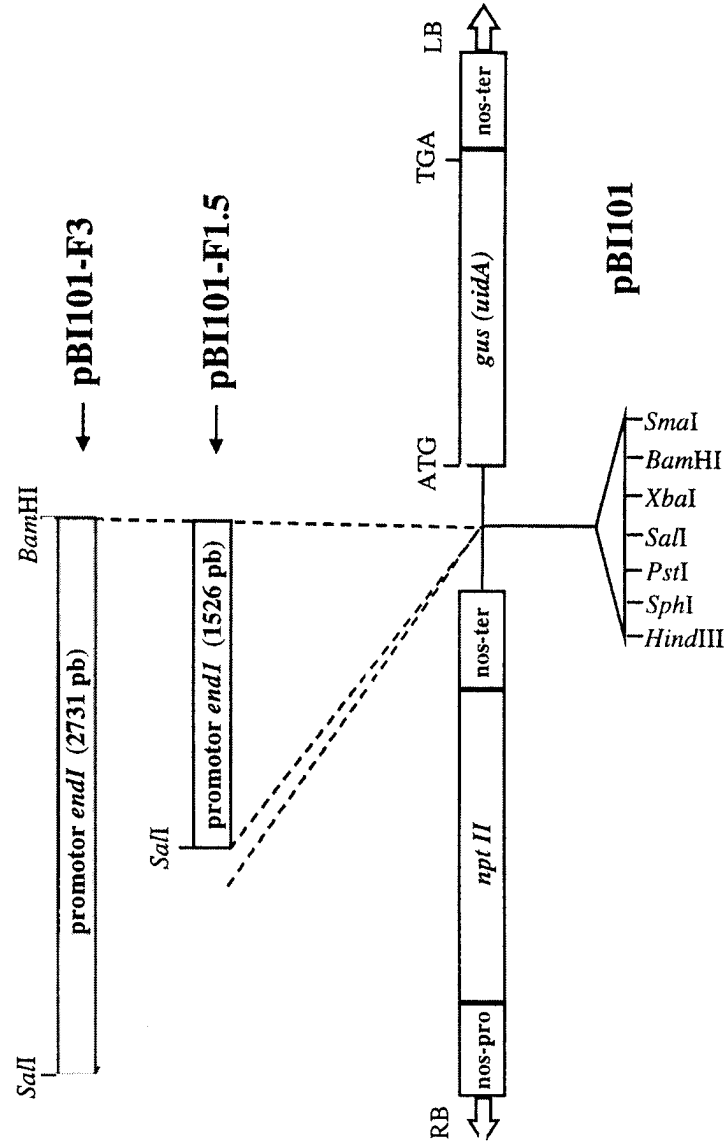
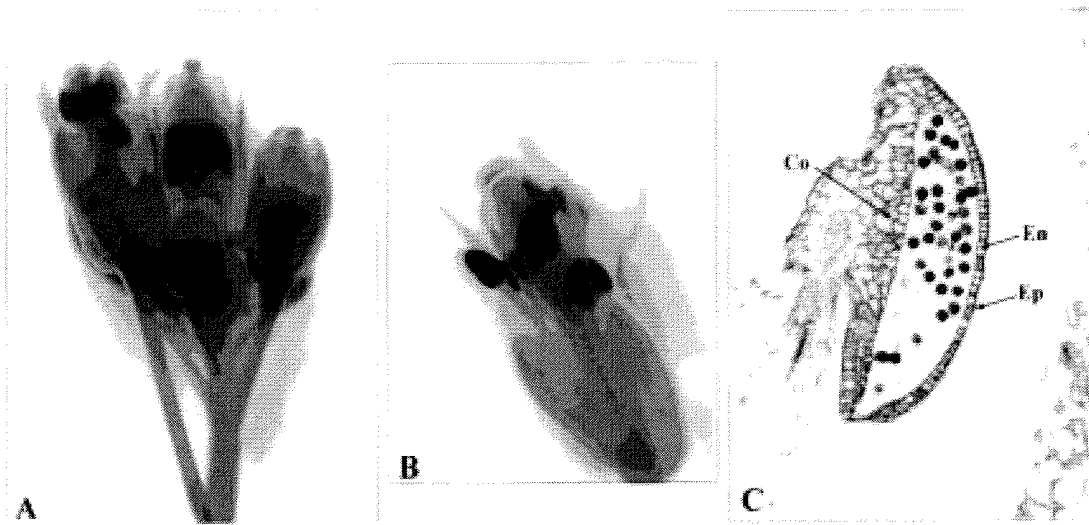
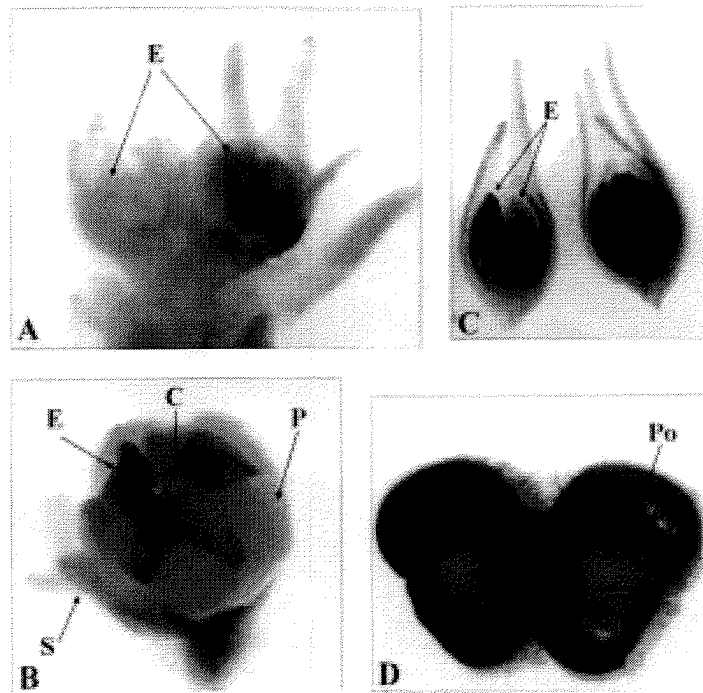


Figura 4





**Figura 5**



**Figura 6**

# ES 2 164 599 B1

## LISTAS DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

5 <120> Promotor y secuencias reguladoras de *end1*, un gen de guisante que se expresa específicamente en anteras.

<130> región promotora de expresión antera

10 <140>

<141>

<160> 4

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2766

<212> ADN

20 <213> Pisum sativum

<220>

<221> promoter

25 <222> (1)..(2736)

<220>

<221> TATA\_signal

<222> (2474)..(2479)

30

<220>

<221> TATA\_signal

<222> (2681)..(2688)

35

<220>

<221> CAAT\_signal

<222> (2336)..(2339)

40

<220>

<221> CAAT\_signal

<222> ()..(2394)

45

<220>

<221> CAAT\_signal

<222> ()..(2675)

50

<220>

<221> C\_region

<222> (2408)..(2417)

<220>

<221> C\_region

<222> (2437)..(2446)

55

<220>

<221> C\_region

<222> Complement ((2625)..(2634)),

60

<220>

<221> GC\_signal

<222> (2447)..(2453)

## ES 2 164 599 B1

<220>  
 <221> allele  
 <222> (2610)..(2615)

5 <220>  
 <221> STS  
 <222> (2230)..(2236)

10 <220>  
 <221> STS  
 <222> (2449)..(2457)

15 <220>  
 <221> STS  
 <222> (2490)..(2496)

20 <220>  
 <221> gene  
 <222> (2737)..(2766)

<400> SEQ ID NO 1

```

25  gacttcaacc ttattagtga atggacaata aaggttataa gctcctttac tgtgaaagcc 60
    caccagtaac atcaccttgc ttatatcatt cagcttcttt ctagtaacat ttggaacgtg 120
    tttataacag aaaaaaaccc aaaaactctg aaaagactca cacttttctt atctccagtc 180
    cacctctcaa aaggaacaat ttccttcagc ttcttggttg gacacctggt gagcacatat 240
    gctgcagtgg caacagtttc tccccacaaa gtgttaggaa gcttcttctc cttcagcatg 300
    ttcttgtca tatcaagcaa agttcggttt tcaacaagac cattatggtg aggagtatat 360
30  ggatcagtca cttcatgctc aattccattc tctttacaga acttcttgaa ctctgtagag 420
    ttatactcac ctccaccatc agttctgaga atcttcagaa gtctgaccac tttatctctc 480
    agccttgatt atgaatttct taaattcagc aaacacctcg tgtttgaatt ttataaggga 540
    taccatgctc atccttgtga actcatccat aaatgacata aagtattatt ccctcctagt 600
35  gaaaggtttg taatgggcca cacacataag aatgcactac tcctaaagca tgttttgctc 660
    tttgagctac ttttgatgaa aatggcagtc ttggttgctt ccctttcatg cacacattac 720
    atgacttttt tggtttctta attgtaggaa ttccacgtac cagtttcttt gaattcaaat 780
    tccctaagct cctaaagttc aaatgaccaa atcttttgtt ccacaactca ctttccttca 840
    caacacttgt tgcgctaagg cattcagagt ctgcagtttt aacattcgcc ttgaatgttt 900
40  tactccttcc atgttctgac tccataatca acttctgata acagtcatac agcttcaaaa 960
    gaatgtcatt catggtaact ggaaatccct tttcaattaa ttgacctaca ctcatcagat 1020
    tgctcttcat gccagaacg taccaagacg ttctgaatta atgcagattt tctattattc 1080
    ataatcactc taacattccc cattccttta gcatttagtt acttatcatc agcacatcta 1140
45  atcttggttt tcttctaga gtcaaaatca accagccatt tcttatttcc agtatgatgg 1200
    tttgaacaac cagtgctccat atatcaccag tcttctatag acgcaactac ataactagaa 1260
    gccattaata gcacatgttc atcatggtgc tcagatcctt agaatgttca attgctacaa 1320
    cgatgtaatc aaactgatga gtaagagatc taagtacctt ctcaatgata ctttcctcat 1380
    aaagagtffc tccatgcgac ttcattctcat ttgtgatcag aatcactcta gagatgtagt 1440
50  cagataactt ctattgttc ttcattgctta gattctcata ctgctcacgt agagactgaa 1500
    gtttcacctt ctacactgat gcactactat cgtagcacca caccagtctg tctcacacaa 1560
    cttttccgct cattgaatca acgattttct taaacacggt cacatccaca cactgatgga 1620
    tgtagaacaa cgcattctga tcttcttcc tcatatcaca ctgagcattt ctttgcgcat 1680
55  ccgttgcat tcttagaagt gaagcataaa ctctggtgat gagatcaaga acatcttgag 1740
    caccaaataa cacacacatc tgaatcatcc aacgattcca gttggtgtcg tcgaacaatg 1800
    gnagcntggt gcacagattc acaacgatat attataantt ttgttttatg aaatttaaga 1860
    acaaatttcc attattctta aaatgtttac aactgatgt agactgcaaa aggaataaag 1920
  
```

60

# ES 2 164 599 B1

```

atacaatttg ttcacaccac tcacttgcgt aaatataagt gagagttaat gagaaatact 1980
aaaataccct ctaaaattat gaattaattc taacaatctc taatgtagt ataatccatt 2040
aaacactttg atggcaggta taacaagggt gtaagtagt gtatacatat taggctctta 2100
5 ttatTTTTat attatctctg cttttcttct tcatgttctc actaatatga tattatctcc 2160
cttccctaaa ttatttataat ttattagaaa aagagtttca ttttttaaaa atatattacc 2220
gtaatttttc aaaaaataaa atttaaatat attttataaa aaaattattt aataatttat 2280
ttacattaat gcataaatat aaataaatac tgtcatttaa tatttaacct tttacaata 2340
aattatattt atttaattca actaatataa gctaagttat ctcatccaac caattaaanaa 2400
10 gatcatttga aataaccttt ttatttagtt tgtggcggtt tcaactgtca aaaaaagga 2460
atTTTTacga cgatataaat ttaaaccagc aaaaaattga agcagttaag cgaaccaact 2520
catggtagtg ggatatattt atctttgtcg tttatatcgg attcgaatct ctataatgat 2580
gaaaaattaa tatcaaactt taataagaa cgtcatttat agagccattt tgggaaacac 2640
15 atatttcatg tacacgtgat tcgcaaattt ccaataactc tatatatagc cctcctcagt 2700
ttcatgcatt tgctcacaac ataaccctcc ttgaattcga tatctaccta agatgacaaa 2760
accagg 2766

```

```

20 <210> 2
    <211> 910
    <212> ADN
    <213> Pisum sativum

```

```

25 <220>
    <221> CDS
    <222> (17)..(706)

```

```

30 <400> SEQ ID NO 2

```

```

35 tcgatatcta cctaag atg aca aaa cca ggt tac att aat gct gct ttt cgt 52
    Met Thr Lys Pro Gly Tyr Ile Asn Ala Ala Phe Arg
    1 5 10
40 tca tct ttc aac ggc gaa cgt tac tta ttc atc gat gat aag tat gtg 100
    Ser Ser Phe Asn Gly Glu Arg Tyr Leu Phe Ile Asp Asp Lys Tyr Val
    15 20 25
45 ttg gta gat tat gca ccg gga acc cgc gac gat aag ctc tta aac ggg 148
    Leu Val Asp Tyr Ala Pro Gly Thr Arg Asp Asp Lys Leu Leu Asn Gly
    30 35 40
50 cct ctt cct ctt cct gct ggg ttt aaa tca ctt gat ggt aca gta ttt 196
    Pro Leu Pro Leu Pro Ala Gly Phe Lys Ser Leu Asp Gly Thr Val Phe
    45 50 55 60
55 gga acc tac gga gtt gac tgt gcc ttt gac acc gat aac gac gaa gca 244
    Gly Thr Tyr Gly Val Asp Cys Ala Phe Asp Thr Asp Asn Asp Glu Ala
    65 70 75
60 ttc atc ttt tat gag aac ttt act gct ctc ata aac tat gct cca cat 292
    Phe Ile Phe Tyr Glu Asn Phe Thr Ala Leu Ile Asn Tyr Ala Pro His
    80 85 90

```

## ES 2 164 599 B1

```

act tac aat gac aaa atc atc tcg ggt ccg aag aaa atc tcg gac atg 340
Thr Tyr Asn Asp Lys Ile Ile Ser Gly Pro Lys Lys Ile Ser Asp Met
5           95                100                105

ttt cct ttt ttc aaa gga acc gtg ttt gaa aac ggg att gac gct gca 388
Phe Pro Phe Phe Lys Gly Thr Val Phe Glu Asn Gly Ile Asp Ala Ala
10          110                115                120

ttc agg tca act aag gag aaa gaa gtt tat tta ttc aaa gga gac ttg 436
Phe Arg Ser Thr Lys Glu Lys Glu Val Tyr Leu Phe Lys Gly Asp Leu
15          125                130                135                140

tat gct cgt ata gac tat gga aaa aac tat ctg gtt caa agt atc aag 484
Tyr Ala Arg Ile Asp Tyr Gly Lys Asn Tyr Leu Val Gln Ser Ile Lys
20          145                150                155

aac att agc act ggg ttc cct tgt ttc act gga acc gtc ttt gaa aat 532
Asn Ile Ser Thr Gly Phe Pro Cys Phe Thr Gly Thr Val Phe Glu Asn
25          160                165                170

gga gtg gat gct gct ttt gct tct cac agg acc aat gaa gca tac ttt 580
Gly Val Asp Ala Ala Phe Ala Ser His Arg Thr Asn Glu Ala Tyr Phe
30          175                180                185

ttc aaa gga gat tac tat gca ctt gtc aag att agc ccg ggc gga ata 628
Phe Lys Gly Asp Tyr Tyr Ala Leu Val Lys Ile Ser Pro Gly Gly Ile
35          190                195                200

gat gac tat att atc ggt ggt gtg aag ccc att ctt gag aat tgg cct 676
Asp Asp Tyr Ile Ile Gly Gly Val Lys Pro Ile Leu Glu Asn Trp Pro
40          205                210                215                220

tct ctt cgt ggt ata ata cct cag aaa agt taaatgtggc tctctgtgtg 726
Ser Leu Arg Gly Ile Ile Pro Gln Lys Ser
45          225                230

tgtgtgatat catcagtcaa gtatggtatt aagaataaag actattgttg tcgttgttgt 786
45          240                245                250                255                260

gtgtttcttt ttcattgtgt ttctagttct taatgtttgc ttatgttggt catgtgaact 846
45          265                270                275                280                285

atgtaatgac atgcactgtg tacgcgcaga gtgaaaataa tatattactg tgtatgttga 906
50          285                290                295                300

ttac 910

50 <210> 3
    <211> 230
    <212> PRT
    <213> Pisum sativum

55 <400> SEQ ID NO 3

60 Met Thr Lys Pro Gly Tyr Ile Asn Ala Ala Phe Arg Ser Ser Phe Asn
    1      5      10      15

    Gly Glu Arg Tyr Leu Phe Ile Asp Asp Lys Tyr Val Leu Val Asp Tyr
    20      25      30

```

## ES 2 164 599 B1

```

Ala Pro Gly Thr Arg Asp Asp Lys Leu Leu Asn Gly Pro Leu Pro Leu
      35                                40                                45
5
Pro Ala Gly Phe Lys Ser Leu Asp Gly Thr Val Phe Gly Thr Tyr Gly
      50                                55                                60
10
Val Asp Cys Ala Phe Asp Thr Asp Asn Asp Glu Ala Phe Ile Phe Tyr
      65                                70                                75                                80
15
Glu Asn Phe Thr Ala Leu Ile Asn Tyr Ala Pro His Thr Tyr Asn Asp
      85                                90                                95
Lys Ile Ile Ser Gly Pro Lys Lys Ile Ser Asp Met Phe Pro Phe Phe
      100                               105                               110
20
Lys Gly Thr Val Phe Glu Asn Gly Ile Asp Ala Ala Phe Arg Ser Thr
      115                               120                               125
Lys Glu Lys Glu Val Tyr Leu Phe Lys Gly Asp Leu Tyr Ala Arg Ile
      130                               135                               140
25
Asp Tyr Gly Lys Asn Tyr Leu Val Gln Ser Ile Lys Asn Ile Ser Thr
      145                               150                               155                               160
30
Gly Phe Pro Cys Phe Thr Gly Thr Val Phe Glu Asn Gly Val Asp Ala
      165                               170                               175
Ala Phe Ala Ser His Arg Thr Asn Glu Ala Tyr Phe Phe Lys Gly Asp
      180                               185                               190
35
Tyr Tyr Ala Leu Val Lys Ile Ser Pro Gly Gly Ile Asp Asp Tyr Ile
      195                               200                               205
40
Ile Gly Gly Val Lys Pro Ile Leu Glu Asn Trp Pro Ser Leu Arg Gly
      210                               215                               220
Ile Ile Pro Gln Lys Ser
      225                               230

```

45

```

<210> 4
<211> 1561
50 <212> ADN
    <213> Pisum sativum L.

```

```

<220>
55 <221> promoter
    <222> (1)..(1561)

```

```

<400> SEQ ID NO 4

```

60

## ES 2 164 599 B1

	acaaccagtg	tccatatatc	accagtcttc	tatagacgca	ctatcataac	tagaagccat	60
	taatagcaca	tgttcatcat	ggtgctcaga	tccttagaat	gttcaattgc	tacaacgatg	120
5	taatcaaact	gatgagtaag	agatctaagt	accttctcaa	tgatactttc	ctcataaaga	180
	gtttctccat	gcgacttcat	ctcatttgtg	atcagaatca	ctctagagat	gtagtccagat	240
	aacttctcat	tgttcttcat	gcttagattc	tcatactgct	cacgtagaga	ctgaagtttc	300
	accttctaca	ctgatgcac	actatcgtag	caccacacca	gtctgtctca	cacaaccttt	360
	tccgtcattg	aatcaacgat	tttcttaaac	acgttcacat	ccacacactg	atggatgtag	420
10	aacaacgcat	tctgatcctt	cttcctcata	tcacactgag	catttctttg	cgcatccggt	480
	gcattttcta	gaagtgaagc	ataaacttcg	ttgatgagat	caagaacatc	ttgagcacca	540
	aataacacac	acatctgaat	catccaacga	ttccagttgt	tgctcgcgaa	caatggnagc	600
	ntggtgcaca	gattcacaac	gatataattat	aanttttgtt	ttatgaaatt	taagaacaaa	660
15	tttccattat	tcttaaaatg	tttacacact	gatgtagact	gcaaaaggaa	taaagatata	720
	atltgttcac	accactcact	tgcgtaaata	taagtgcagag	ttaatgagaa	atactaaaaat	780
	accctctaaa	attatgaatt	aattctaaca	atctctaata	ttagtataat	ccattaaaca	840
	ctttgatggc	aggtataaca	aggggtgaag	ttagtgtata	catattaggc	tcttattatt	900
	tttatattat	ctctgctttt	cttcttcatg	ttctcactaa	tatgatatta	tctcccttcc	960
20	ctaaattatt	tatatttatt	agaaaaagag	tttcattttt	taaaaatata	ttaccgtaat	1020
	ttttcaaaaa	ataaaattta	aatataatfff	ataaaaaaat	tatttaataa	tttattttaca	1080
	ttaatgcata	aatataaata	aatactgtca	tttaatatff	aaccttttaa	caataaatta	1140
	tatttatffta	attcaactaa	tataagctaa	gttatctcat	ccaaccaatt	aaaaagatca	1200
25	tttgaaaata	cctttttatt	tagtttgtgg	cggtttcaac	tgtcaaaaaa	aaggaatfff	1260
	tacgacgata	taaattttaa	ccagcaaaaa	attgaagcag	ttaagcgaac	caactcatgg	1320
	tatgtggata	tatttatctt	tgctgtttat	atcggattcg	aatctctata	atgatgaaaa	1380
	attaatatca	aacttttaat	aagaacgtca	tttatagagc	cattttggga	aacacatatt	1440
	tcatgtacac	gtgattcgca	aatttccaat	aactctatat	atagccctcc	tcagtttcat	1500
30	gcatttgctc	acaacataac	cttccttgaa	ttcgatatct	acctaagatg	acaaaaccag	1560
	g						1561

35

40

45

50

55

60





OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA

- ① ES 2 164 599  
② N.º solicitud: 200000814  
③ Fecha de presentación de la solicitud: 31.03.2000  
④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>: C12N 15/82, 15/29, 5/10, A01H 5/00

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 578611 A1 (CIBA-GEIGY AG) 12.01.1994	1-10
A	WO 9325695 A1 (PLANT GENETIC SYSTEMS N.V.) 23.12.1993	1-10
A	WO 9626283 A1 (PLANT GENETIC SYSTEMS N.V.) 29.08.1996	1-10

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

20.11.2001

Examinador

M. Hernández Cuéllar

Página

1/1