



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 265 232**

② Número de solicitud: 200401761

⑤ Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **17.07.2004**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2007**

Fecha de la concesión: **21.05.2008**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.06.2008**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

⑰ Titular/es: **NEWBIOTECHNIC, S.A.**
Avda. Américo Vespucio, 69
41092 Sevilla, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

⑱ Inventor/es: **Roque Mesa, Edelín Marta;**
Ellul, Phillipe;
Gómez Jiménez, María Dolores;
Madueño Albi, Francisco;
Beltrán Porter, José Pío y
Cañas Clemente, Luis Antonio

⑳ Agente: **No consta**

㉔ Título: **Tomates partenocárpicos y procedimiento para su producción.**

㉖ Resumen:

Tomates partenocárpicos y procedimiento para su producción.

Los tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) partenocárpicos carecen de semillas, son de menor tamaño menor que los silvestres y, en estado maduro, muestran un color rojo más intenso que los tomates silvestres. Dichos tomates se obtienen cultivando una planta de tomate transgénica productora de dichos tomates partenocárpicos obtenida mediante un procedimiento que comprende (a) introducir en una célula o tejido de una planta de tomate una construcción de DNA que comprende (i) el promotor del gen *END1* de guisante o un fragmento funcional del mismo y (ii) un gen citotóxico, operativamente unido a dicho promotor o fragmento del mismo; y (b) regenerar dicha célula o tejido de planta de tomate transformado de la etapa (a) para producir una planta de tomate transgénica productora de tomates partenocárpicos. De aplicación en alimentación e industrias agroalimentarias.

ES 2 265 232 B1

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

DESCRIPCIÓN

Tomates partenocárpicos y procedimiento para su producción.

5 **Campo de la invención**

La invención se relaciona con frutos partenocárpicos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y con un procedimiento para su producción. La invención también se relaciona con un procedimiento para producir una planta de tomate transgénica que produce tomates partenocárpicos.

10 **Antecedentes de la invención**

Tomate y partenocarpia

15 El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, produciéndose millones de toneladas anualmente. La importancia económica de este cultivo requiere un esfuerzo continuo para mejorar las variedades cultivadas.

20 El tomate constituye una cosecha de frutos que se obtienen mediante autopolinización de sus flores. Para que la polinización y fertilización de las flores tenga éxito las plantas deben crecer dentro de un intervalo de temperaturas comprendido entre 15°C y 21°C durante la noche y entre 30°C y 35°C durante el día. En condiciones climáticas distintas, se produce una falta de producción de frutos debido al insuficiente y/o incorrecto desarrollo del polen.

25 El fruto de tomate silvestre contiene semillas. Aunque la presencia de semillas en el tomate no suele ser un problema *per se* importante para los consumidores, se ha descrito que los frutos de tomate sin semillas tienen más sabor, mayor contenido en materia seca, azúcares y sólidos solubles y menor acidez y menor celulosa que los frutos con semillas [Lukyanenko, A.N. (1991). Parthenocarpy in Tomato. En Genetic Improvement of Tomato. Monographs on Theoretical and Applied Genetics 14. pp. 167-178. Ed. G. Kalloo, Springer-Verlag, ISBN 3-540-53062-2]. Por otra parte, en los procesos de preparación de alimentos derivados del tomate a escala industrial, como por ejemplo purés, sopas, zumos o salsas, la posibilidad de partir de frutos sin semillas haría innecesaria la eliminación de las mismas por tamizado antes de procesar las muestras, de la misma forma que facilitaría las prácticas culinarias domésticas que frecuentemente incluyen la eliminación de las semillas antes del cocinado. Por tanto, uno de los objetivos de los mejoradores de tomate consiste en la producción de tomates sin semillas.

35 La partenocarpia es la producción de frutos sin fertilización y permite obtener frutos sin semillas. Ciertas condiciones medioambientales favorecen la partenocarpia, tales como temperaturas altas o bajas diurnas o nocturnas, una baja intensidad luminosa y una humedad elevada.

40 La partenocarpia en tomate se puede producir de forma natural o bien puede inducirse artificialmente. La partenocarpia natural se produce por causas genéticas y puede ser obligatoria o facultativa, es decir, dependiente de las condiciones ambientales. Artificialmente, la partenocarpia se puede inducir como resultado del tratamiento del ovario con agentes exógenos tales como extracto de polen muerto, o mediante la aplicación de sustancias reguladoras del crecimiento tanto naturales como sintéticas. De hecho, con objeto de evitar pérdidas de producción en condiciones adversas y en cultivo bajo invernadero, frecuentemente se utilizan aplicaciones exógenas de reguladores de crecimiento para inducir la formación de frutos partenocárpicos. Sin embargo, estas prácticas, además de suponer el coste añadido de los agroquímicos y de la mano de obra asociada con los tratamientos, lleva aparejada la aparición frecuente de malformaciones de los frutos.

50 Se han identificado diversos cultivares de tomate que producen frutos partenocárpicos debido a mutaciones en los genes *parthenocarpic fruit* o genes *pat* [Baggett, J.R., Kean, D., Mansour, N.S. (1997). Siletz parthenocarpic tomato. *HortScience* 32, 1299-1300]. El mutante *pat*, además de producir frutos partenocárpicos, muestra algunos efectos pleiotrópicos tales como esterilidad masculina y femenina y malformaciones en los estambres. De la misma forma, la expresión antisentido del gen de la familia MADS box *TM8* de tomate además de producir alteraciones morfológicas y cambios en la identidad de órganos florales, esterilidad masculina y femenina, provocó el desarrollo de frutos partenocárpicos [Lifschitz, E., Brodai, L., Hareven, D., Hurwitz, C., Prihadash, A., Pnueli, L., Samach, A., Zamir, D. (1993). Molecular mapping of flower development in tomato. En Molecular Biology of Tomato, (ed.) J. Yoder, pp. 175-184. Technomic, Lancaster PA, USA. ISBN 0877629927]. Asimismo, la represión de la expresión de *TM29*, gen también perteneciente a la familia MADS box de tomate, provoca alteraciones de los estambres y ovarios y además se asocia a la producción de frutos partenocárpicos y a la reversión floral [Ampomah-Dwamena, C., Monis, B.A., Sutherland, P. Veit, B. Y Yao, J-L. (2002). Down-Regulation of *TM29*, a tomato *SEPALLATA* homolog, causes parthenocarpic fruit development and floral reversion. *Plant Physiol.* 130, 605-617]. La caracterización del mutante de tomate *stamenless* muestra que presenta conversiones homeóticas similares a las que muestran los mutantes de clase B de *Arabidopsis thaliana* y de *Antirrhinum majus* y que los frutos carecen de semillas [Gómez, P., Jamilenz, M., Capel, J., Zurita, S., Angosto, T y Lozano, R. (1999). *Stamenless*, a tomato mutant with homeotic conversions in petal and stamens. *Planta.* 209, 172-179]. La asociación de transformaciones homeóticas que afectan a los estambres con el desarrollo de frutos partenocárpicos se ha descrito también en manzano [Yao, J-L., Dong, Y-H., Morris, B.A.M. (2001). Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor. *PNAS*, 30, 1306-1311]. En general, se puede estimar que dada las funciones de los genes homeóticos, su utilización

biotecnológica encaminada a interferir con el desarrollo de los estambres estaría supeditada a la aparición de otros efectos fenotípicos no deseados.

Por tanto, el desarrollo de cultivares de tomates partenocárpicos (sin semillas) con interés comercial es un objetivo permanente de los mejoradores de tomate. De hecho, tomates partenocárpicos serían especialmente apreciados por consumidores a los que no les agrada la presencia de semillas en los frutos y, además, serían beneficiosos para las industrias agroalimentarias ya que permitirían obtener ciertos productos, tales como zumos, salsas, pastas, purés, sopas, etc., de forma más eficiente y económica ya que se evitaría el tener que retirar las semillas por tamizado de las pastas de tomate antes de su procesado.

Promotor del gen *END1* de guisante

El promotor del gen *END1* de guisante (*Pisum sativum* L.) es un promotor capaz de dirigir la expresión específica en antera en estadios tempranos del desarrollo de la planta tal como se describe y pone de manifiesto en la solicitud de patente WO 01/073088.

Compendio de la invención

Ahora se ha encontrado, sorprendentemente, que es posible producir frutos partenocárpicos (sin semillas) de tomate a partir de plantas transgénicas de tomate obtenidas mediante la regeneración de células o tejidos de plantas de tomate transformados mediante la introducción de una construcción de DNA que comprende un gen citotóxico bajo el control del promotor del gen *END1* de guisante o un fragmento de dicho promotor que mantiene la capacidad reguladora de la expresión específica en antera. Dicho procedimiento está, por tanto, asociado a la obtención de plantas androestériles de tomate mediante la expresión específica en las anteras de un gen citotóxico, tal como un gen que produce esterilidad, por ejemplo, el gen de la barnasa, bajo el control del promotor del gen *END1* de guisante o un fragmento funcional del mismo.

Se han obtenido de plantas de tomate androestériles por transformación mediada por *Agrobacterium* de *Lycopersicon esculentum*, var Micro-Tom con una construcción que comprende el gen de la barnasa bajo el control del promotor del gen *END1* de guisante. Se obtuvieron plantas transgénicas (*END1::barnasa*) que muestran alteraciones morfológicas y funcionales en los estambres que impiden la formación de polen viable y que, por tanto, son androestériles. Dado que las flores de tomate son autógamias, esto es, se autofertilizan, dichas plantas androestériles, en principio, no deberían desarrollar frutos. Sin embargo, todas las plantas transgénicas de tomate *END1::barnasa* producen frutos. La caracterización de los mismos reveló la ausencia de semillas mostrando que su desarrollo se había producido por partenocarpia, una vía alternativa al cuajado y desarrollo normal del fruto, donde el ovario crece sin la formación de semillas.

De forma más concreta, se transformaron, mediante transformación mediada por *Agrobacterium*, células y tejidos de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) var. Micro-Tom con una construcción que comprende el gen de la barnasa bajo el control del promotor del gen *END1* de guisante. Se generaron 72 brotes transgénicos primarios (T1) de entre los que se escogieron 25. Se evaluó el nivel de ploidía de las plantas seleccionadas mediante técnicas asociadas a la citometría de flujo. De las 25 plantas T1, 24 resultaron diploides y sólo una tetraploide. El análisis por PCR de muestras de tejido de las plantas diploides permitió detectar el transgén en todas ellas. Se seleccionaron 14 plantas para aclimatarlas y crecerlas en invernadero y llevar a cabo su caracterización fenotípica. Las plantas transgénicas mostraron un patrón de desarrollo similar al de las plantas silvestres. Las flores de ambas desarrollaron normalmente cinco sépalos alternando con cinco pétalos y dos carpelos fusionados formando un pistilo. Sin embargo, mientras que los cinco estambres de las plantas control formaban el cono estaminal característico alrededor del estilo, el fenotipo de los estambres de las plantas transgénicas varió de una planta a otra. Se observaron transformantes que mostraban una ligera reducción del tamaño de los estambres y una pequeña separación entre ellos y otras plantas con fenotipo severo que mostraban los estambres atrofiados dejando al descubierto el estilo. Estas plantas eran androestériles, sin embargo, a diferencia de las plantas androestériles de *Arabidopsis* o de tabaco producidas mediante esta misma aproximación experimental y que son incapaces de formar frutos por ellas mismas, en tomate todas las plantas *END1::barnasa* producen frutos. Todos los frutos producidos carecen de semillas siendo, por tanto, frutos partenocárpicos, independientemente de la severidad del fenotipo en las anteras y de la presencia de los escasos granos de polen observada en algunos transformantes de fenotipo leve. Dichos granos de polen se mostraron inviables, es decir, no germinan y, por tanto, son incapaces de producir la fertilización. Los frutos transgénicos, partenocárpicos, son de tamaño algo menor que los silvestres y en estado maduro muestran un color rojo más intenso que los correspondientes silvestres. Cuando las plantas transgénicas se polinizan manualmente, con polen de plantas silvestres, se obtienen frutos con características similares a los producidos por las plantas silvestres.

Por tanto, un aspecto de la presente invención se relaciona con un procedimiento para la producción de una planta de tomate transgénica que produce tomates partenocárpicos. Esto puede realizarse mediante la introducción estable en el genoma de la planta de tomate de una construcción de DNA en la que un gen citotóxico se encuentra bajo el control del promotor del gen *END1* de guisante o un fragmento funcional del mismo que media la expresión de dicho gen citotóxico en la región apropiada de la planta en el momento apropiado del desarrollo. En una realización particular dicho gen citotóxico es el gen de la barnasa.

En otro aspecto la invención se relaciona con un procedimiento para producir un tomate partenocárpico que comprende cultivar una planta de tomate transgénica que produce tomates partenocárpicos obtenida según el procedimiento proporcionado por esta invención bajo condiciones que permiten la floración y desarrollo del tomate.

- 5 Los tomates partenocárpicos obtenidos según el procedimiento previamente indicado constituyen un aspecto adicional de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

10 La Figura 1 muestra esquemáticamente diversas construcciones utilizadas por los inventores, en concreto, la construcción utilizada para comprobar la funcionalidad del promotor *END1* en otras plantas diferentes del guisante mediante la expresión de un gen marcador (GUS) (Figura 1A); la construcción utilizada en la producción de plantas transgénicas androestériles de *Arabidopsis*, tabaco y tomate (Figura 1B); y la construcción usada para la restauración de la fertilidad en plantas androestériles de *Arabidopsis* (Figura 1C).

15 La Figura 2 muestra la expresión del gen GUS en anteras de tomate bajo la dirección del promotor *END1*. Figura 2A: Sección de una flor de tomate *in vivo* mostrando la expresión GUS en los tejidos de la antera implicados en la arquitectura del saco polínico. Figura 2B: Idem pero en una sección de una flor incluida en parafina. Se, sépalos, Pe, pétalos, St, estambres, Ca, carpelo, En, endotecio, Ep, epidermis, Co, conectivo, Po, polen (no hay expresión GUS).

20 La Figura 3 muestra el resultado de la amplificación por PCR del fragmento *barnasa-barstar* del genoma de plantas *END1::barnasa* de tomate (cv. Micro-Tom).

25 La Figura 4 muestra el fenotipo de flores de tomate de plantas transgénicas *END1::barnasa*. A: Flor de una planta de tomate no transformada; B: Flor de la planta *END1::barnasa* 4S, fenotipo leve de malformación de las anteras; C: Flor de la planta *END1::barnasa* 14C, fenotipo leve de malformación de las anteras; D: Flor de la planta *END1::barnasa* 9L, Fenotipo medio de malformación de las anteras; E: Flor de la planta *END1::barnasa* 12B, fenotipo medio de malformación de las anteras; y F: Flor de la planta *END1::barnasa* 1E, fenotipo severo de malformación de las anteras.

30 La Figura 5 muestra el desarrollo de la antera de tomate en plantas no transformadas y en plantas *END1::barnasa* con fenotipo severo de malformación en las anteras. A: Desarrollo de antera en plantas silvestres de tomate (cv. Micro-Tom). B: Desarrollo de antera en plantas de tomate (Micro-Tom) *END1::barnasa* que mostraron un fenotipo severo de malformación en las anteras. E (epidermis), En (endotecio), C (conectivo), Pa (células parietales), Csp (células esporógenas), Hv (haz vascular), Sp (tejido esporógeno), Te (tétradas), Ca (callosa), T (*tapetum*), Msp (microsporas), St (estomio), P (granos de polen).

35 La Figura 6 muestra el resultado de la comparación entre ovarios de día 0 (antesis) de plantas transgénicas de tomate *END1::barnasa* y plantas control. A: Ovario de una flor control en antesis, B: Ovario de una flor *END1::barnasa* en antesis.

40 La Figura 7 muestra unos frutos partenocárpicos desarrollados por plantas *END1::barnasa* de tomate (cv. Micro-Tom). A: Frutos enteros de plantas no transformadas y plantas *END1::barnasa*. B: Frutos seccionados transversalmente de plantas no transformadas y plantas *END1::barnasa*.

45 La Figura 8 muestra el resultado de la tinción vital con acetato de carmín en granos de polen de plantas de tomate (cv. Micro-Tom) *END1::barnasa*. A: Granos de polen de una antera de una planta no transformada. B: Granos de polen de la planta *END1::barnasa* 14C. C: Granos de polen de la planta *END1::barnasa* 2E. D: Granos de polen de la planta *END1::barnasa* 12B. E: Granos de polen de la planta *END1::barnasa* 15E. F: Granos de polen de la planta *END1::barnasa* 4S.

50 La Figura 9 muestra la secuencia de la región promotora del gen *END1* de guisante. La anotación +1 indica el inicio del codón de iniciación (ATG).

55 Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para producir una planta de tomate transgénica que produce tomates partenocárpicos, en adelante procedimiento de la invención, que comprende las etapas de:

- 60 a) introducir en una célula o en un tejido de una planta de tomate una construcción de DNA que comprende:
- (i) el promotor del gen *END1* de guisante (*Pisum sativum* L.) o un fragmento de dicho promotor capaz de regular la expresión específica en antera; y
 - 65 (ii) un gen citotóxico, operativamente unido a dicho promotor o fragmento del mismo,
- para producir una célula o un tejido de una planta de tomate transformado; y

ES 2 265 232 B1

- b) regenerar dicha célula o tejido de planta de tomate transformado de la etapa a) para producir una planta de tomate transgénica;

5 en donde dicha planta de tomate transgénica produce tomates partenocárpicos cuando se crece bajo condiciones que permiten la floración y desarrollo del tomate.

10 El término “planta de tomate transgénica”, tal como se utiliza en esta descripción, se refiere a una planta que ha sido manipulada genéticamente para contener y expresar un DNA heterólogo. En esta invención, una planta de tomate transgénica es manipulada genéticamente para contener y expresar de forma estable y consistente, un fenotipo partenocárpico que normalmente no está presente en las plantas tipo silvestre. Asimismo, el término planta de tomate transgénica incluye la progenie de la planta de tomate transgénica inicial que porta y es capaz de expresar dicho fenotipo partenocárpico en sus frutos.

15 “Tomate partenocárpico”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un tomate (fruto) obtenido en ausencia de fecundación del ovario, lo que impide por completo la formación de semillas, y, por tanto, carece completamente de semillas. Los tomates partenocárpicos, transgénicos, proporcionados por la presente invención son de tamaño algo menor que los silvestres y, en estado maduro, muestran un color rojo más intenso que los correspondientes silvestres (Figura 7).

20 El procedimiento de la invención comprende la preparación de una construcción de DNA que comprende (i) el promotor del gen *END1* de guisante (*Pisum sativum* L.) o un fragmento de dicho promotor capaz de regular la expresión específica en antera, y (ii) un gen citotóxico, operativamente unido a dicho promotor o fragmento del mismo.

25 El promotor del gen *END1* de guisante (*Pisum sativum* L.), en adelante *pEND1*, es un promotor capaz de dirigir la expresión específica en antera en estadios tempranos del desarrollo de la planta tal como se describe y pone de manifiesto en la solicitud de patente WO 01/073088. Efectivamente, los ensayos de hibridación *in situ* descritos en dicha solicitud de patente confirmaron la especificidad de la expresión del gen *END1* en los tejidos de la antera del guisante, en particular, en los tejidos que conforman los sacos polínicos de las anteras, durante los diferentes estadios de su desarrollo. 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 nutritivo (*tapetum*) ni en el germinal (polen). Asimismo, los ensayos realizados con otros órganos florales, otras partes de la planta (tallo, hojas, raíces, etc.) o con semillas (cotiledones) resultaron negativos. Por tanto, el empleo de dicho promotor permite producir plantas transgénicas que expresan un gen específico en antera.

35 La secuencia completa de nucleótidos de *pEND1* se muestra en dicha solicitud de patente WO 01/073088 (SEQ ID NO: 1), así como en la Figura 9 y en la SEQ ID NO: 1 que acompañan a esta descripción.

40 En una realización particular, el *pEND1* presente en la construcción de DNA comprende la secuencia de nucleótidos mostrada comprendida desde el nucleótido - 2736 hasta el nucleótido -1 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 9 (SEQ ID NO: 2), que constituye la secuencia completa de dicho promotor.

45 En otra realización particular, la construcción de DNA utilizada para transformar células o tejidos de plantas de tomate comprende un fragmento de *pEND1* que tiene la secuencia de nucleótidos comprendida desde el nucleótido -2736 hasta el nucleótido -6 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 9 (SEQ ID NO: 3). Dicho fragmento de *pEND1* mantiene la capacidad reguladora de la expresión específica en antera y es capaz de dirigir la expresión específica de antera en estadios tempranos del desarrollo de la planta de tomate, tal como se pone de manifiesto en los Ejemplos que acompañan a esta descripción.

50 En otra realización particular, la construcción de DNA utilizada para transformar células o tejidos de plantas de tomate comprende un fragmento de *pEND1* que comprende, al menos, la secuencia de nucleótidos comprendida desde el nucleótido -336 hasta el nucleótido -1 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 9 (SEQ ID NO: 4). Al igual que en el caso anterior, el fragmento de *pEND1* previamente definido mantiene la capacidad reguladora de la expresión específica en antera y es capaz de dirigir la expresión específica de antera en estadios tempranos del desarrollo de la planta de tomate.

60 El *pEND1* puede obtenerse por métodos convencionales a partir de una planta de guisante (*Pisum sativum* L.) o bien a partir de un organismo hospedador transformado con una secuencia de DNA que comprende dicho promotor, tal como se menciona en WO 01/073088. Asimismo, los fragmentos de *pEND1* que mantienen la capacidad reguladora de la expresión específica en antera pueden obtenerse, en base a la información facilitada, por métodos convencionales, por ejemplo, a partir del *pEND1*, efectuando las delecciones apropiadas. Para comprobar si un fragmento de *pEND1* mantiene la capacidad reguladora de la expresión específica en antera se pueden realizar los ensayos descritos en WO 01/073088 (Ejemplo 1).

65 La construcción de DNA utilizada para transformar células o tejidos de plantas de tomate comprende, además de *pEND1* o un fragmento funcional del mismo, es decir, capaz de regular la expresión específica en antera, un gen citotóxico, operativamente unido a dicho promotor o fragmento funcional del mismo.

ES 2 265 232 B1

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “gen citotóxico” incluye a cualquier gen que codifica una proteína que causa la muerte celular en el tejido donde se expresa, por ejemplo, un gen que codifica una proteína o actividad enzimática que provoca la ablación de la antera. En plantas se han usado diversas proteínas que producen muerte celular, por ejemplo, la toxina A de la difteria (DTA) producida naturalmente por *Corynebacterium diphtheriae*, la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, la ribonucleasa T de *Aspergillus oryzae*, la bamasa de *Bacillus amyloliquefaciens*, etc.

En una realización particular, dicho gen citotóxico que se expresa en antera debido a que está bajo el control de *pEND1* es el gen de la barnasa, una ribonucleasa de *Bacillus amyloliquefaciens* [Mariani C, DeBeuckeleer M, Truettner J, Leemans J, Goldberg RB (1990) Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* 347:737-741] que provoca la ablación completa de la antera, desde estadios muy tempranos de su desarrollo, impidiendo la formación del polen en las mismas, dando lugar de este modo a una planta androestéril. Este gen es particularmente interesante porque dispone de un potente inhibidor específico de la actividad ribonucleasa de la barnasa, concretamente de la proteína barstar, que puede usarse para restaurar la fertilidad en líneas androestériles [Mariani *et al.*, (1992) *Nature* 357:384-387] para obtener plantas androfértiles.

En una realización particular, el gen citotóxico presente en la construcción de DNA utilizada para transformar células o tejidos de plantas de tomate es un gen que provoca androesterilidad en plantas y dicha construcción de DNA comprende, además de (i) *pEND1* o un fragmento funcional del mismo, y (ii) dicho gen que provoca androesterilidad en plantas, (iii) un gen que revierte dicha esterilidad. A modo ilustrativo, dicho gen que provoca androesterilidad en plantas puede ser el gen de la barnasa y dicho gen que revierte dicha esterilidad es el gen que codifica barstar y dichos genes pueden estar fusionados [Hartley, R.W. (1989). Barrase and Barstar: two small proteins to fold and fit together. *Trends Biochem. Sci.* 14, 450-454].

Ejemplos adicionales de genes citotóxicos se citan en la solicitud de patente europea EP 412006 así como en la solicitud de patente WO 01/073088, cuyos contenidos se incorporan por referencia a la presente descripción.

La construcción de DNA utilizada para transformar células o tejidos de plantas de tomate según el procedimiento de la invención puede obtenerse por métodos convencionales utilizando técnicas ampliamente conocidas [Sambrook *et al.*, “Molecular cloning, a Laboratory Manual”, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 Vol 1-3]. Dicha construcción de DNA también puede contener, operativamente enlazados, unos elementos reguladores de la expresión, por ejemplo, secuencias de terminación de la transcripción, secuencias potenciadoras de la transcripción y/o traducción, etc.

La construcción de DNA utilizada para transformar células o tejidos de plantas de tomate según el procedimiento de la invención puede ser insertada en el genoma de una célula o tejido de una planta de tomate por cualquier método apropiado para obtener células y tejidos de planta de tomate transformados. Dichos métodos pueden implicar, por ejemplo, el empleo de liposomas, electroporación, difusión, bombardeo de partículas, microinyección, balas génicas (“gene gun”), compuestos químicos que incrementan la captación de DNA libre, por ejemplo, coprecipitación con fosfato cálcico, vectores virales, etc. Vectores apropiados para la transformación de plantas incluyen aquellos derivados del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*, tales como los descritos en EP 120516. Además, de los vectores de transformación derivados de los plásmidos Ti o Ri de *Agrobacterium*, se pueden utilizar métodos alternativos para insertar la construcción de DNA en células y tejidos de plantas de tomate. En una realización particular, dicha construcción de DNA es introducida, mediante un vector viral apropiado en las células o protoplastos de plantas de tomate.

La construcción de DNA puede estar incorporada en un vector que incluya un replicón procariótico, es decir, una secuencia de DNA capaz de dirigir la replicación autónoma y mantener la molécula de DNA recombinante extracromosómicamente cuando se introduce en una célula hospedadora procariota, tal como una bacteria. Dichos replicones son conocidos en la técnica. En una realización preferida, dicho replicón procariótico incluye, además un gen cuya expresión confiere una ventaja selectiva, tal como resistencia a una droga (fármaco), a la célula hospedadora transformada. Ejemplos ilustrativos de genes bacterianos que confieren resistencia a drogas incluyen aquellos que confieren resistencia a ampicilina, tetracilina, etc. El gen de la neomicina fosfotransferasa tiene la ventaja de que es expresado tanto en células eucarióticas como procarióticas. Los vectores que incluyen un replicón procariótico incluyen, además, generalmente, unos sitios de restricción para la inserción de la construcción de DNA utilizada para la puesta en práctica del procedimiento de la invención. Estos vectores son conocidos [US 6.268.552].

Entre los vectores de expresión capaces de expresar una secuencia de DNA recombinante en células vegetales y capaces de dirigir la integración estable en el genoma de la célula vegetal hospedadora se encuentran los vectores derivados del plásmido Ti de *A. tumefaciens* descritos por Rogers y colaboradores [Rogers *et al.*, (1987) *Meth. in Enzymol.* 153:253-277] y varios otros sistemas de expresión conocidos que funcionan en 1 J plantas [véase, por ejemplo, WO 87/00551; Cocking and Davey *Science* (1987) 236:1259-1262].

En una realización preferida los vectores de expresión en células vegetales utilizados incluyen un marcador de selección efectivo en células eucarióticas, tal como un marcador de selección de resistencia a una droga. En una realización concreta, el marcador de resistencia a droga preferido es el gen cuya expresión confiere resistencia a la kanamicina, es decir, un gen quimérico que contiene el promotor de la nopalina sintetasa, el gen de la neomicina fosfotransferasa II y el terminador de la nopalina sintetasa, tal como se muestra en los Ejemplos que acompañan a esta descripción.

El procedimiento de la invención para obtener plantas de tomate transgénicas que producen tomates partenocárpicos comprende la introducción, en una célula o en un tejido de una planta de tomate, de la construcción de DNA previamente definida para producir una célula o un tejido de una planta de tomate transformado y generar una planta de tomate transgénica mediante regeneración de dicha célula o tejido de planta de tomate transformado, en donde dicha planta de tomate transgénica produce tomates partenocárpicos cuando se crece bajo condiciones que permiten la floración y desarrollo del tomate.

La introducción de dicha construcción de DNA para transformar material vegetal y generar una planta transgénica puede llevarse a cabo, tal como se ha mencionado previamente, por cualquier medio conocido en el estado de la técnica, incluyendo, pero sin limitarse, a la transferencia de DNA mediada por *A. tumefaciens*, preferiblemente con un vector T-DNA desarmado, electroporación, transferencia directa de DNA, bombardeo de partículas, etc. (véase Davey *et al.* (1989) *Plant Mol. Biol.* 13:275; Walden and Schell (1990) *Eur. J. Biochem.* 192:563; Joersbo and Burnstedt (1991) *Physiol. Plant.* 81:256; Potrykus (1991) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:205, Gasser and Fraley (1989) *Science* 244:1293; Leemans (1993) *Bio/Technology.* 11:522; Beck *et al.* (1993) *Bio/Technology.* 11:1524; Koziel *et al.* (1993) *Bio/Technology.* 11:194; Vasil *et al.* (1993) *Bio/Technology.* 11:1533).

Las técnicas para cultivar las células y tejidos de plantas de tomate transformadas y regenerar las plantas de tomate transgénicas son bien conocidas [Ellul, P., García-Sogo, B., Pineda, B., Ríos, G., Roig, L.A., Moreno, V. (2003). The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.) is genotype and procedure dependent. *Theor. Appl. Genet.* 106, 231-238] al igual que las condiciones de cultivo y crecimiento de dichas plantas de tomate con el fin de producir tomates partenocárpicos.

Asimismo, los sistemas y agentes para introducir y seleccionar marcadores para comprobar la presencia de DNA heterólogo en células y/o tejidos vegetales son bien conocidos. Entre los marcadores genéticos que permiten la selección de DNA heterólogo en células vegetales se encuentran los genes que confieren resistencia a antibióticos, por ejemplo, kanamicina, higromicina, gentamicina, etc. El marcador permite la selección de las plantas transformadas satisfactoriamente que crecen en un medio que contiene el antibiótico correspondiente porque llevan el gen de resistencia apropiado.

Muchas de las técnicas útiles para llevar a cabo la invención son convencionales y conocidas por los técnicos en biotecnología vegetal. A modo ilustrativo, tales técnicas convencionales se recogen en Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, N.Y.; Maniatis *et al.* (1982) *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, N.Y.; Wu (ed.) (1993) *Meth. Enzymol.* 218, Part I; Wu (ed.) (1979) *Meth. Enzymol.* 68; Wu *et al.* (eds.) (1983) *Meth. Enzymol.* 100 and 101; Grossman and Moldave (eds.) *Meth. Enzymol.* 65; Miller (ed.) (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; Old and Primrose (1981) *Principles of Gene Manipulation*, University of California Press, Berkeley; Schleif and Wensink (1982) *Practical Methods in Molecular Biology*; Glover (ed.) (1985) *DA Cloning Vol. I and II*, IRL Press, Oxford, UK; Hames and Higgins (eds.) (1985) *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, UK; Setlow and Hollaender (1979) *Genetic Engineering: Principles and Methods*, Vols. 1-4, Plenum Press, New York, Kaufman (1987) en *Genetic Engineering Principles and Methods*, J. K. Setlow, ed., Plenum Press, NY, pp. 155-198; Fitchen *et al.* (1993) *Annu. Rev. Microbiol.* 47:739- 764; Tolstoshev *et al.* (1993) en *Genomic Research in Molecular Medicine and Virology*, Academic Press.

La presente invención permite obtener tomates partenocárpicos sin necesidad de tener que aplicar hormonas (giberelinas, auxinas, citoquininas) a flores no fertilizadas, evitando de esta manera la necesidad de tener que utilizar productos agroquímicos para la producción de frutos partenocárpicos. Una ventaja añadida del procedimiento de la invención radical en que no es necesario la polinización para producir el fruto (tomate) mejorando de este modo la eficiencia de la producción de tomates. Como es conocido, una polinización pobre es una de las causas principales de producción de frutos incompletos y de tamaño reducido tanto en invernadero como en campo.

El procedimiento proporcionado por esta invención supone la posibilidad de introducir el carácter de androesterilidad, en forma dominante, en cualquier cultivar de tomate susceptible de transformación genética. De hecho, una de las principales ventajas del procedimiento proporcionado por esta invención respecto de otros radica en su potencial aplicabilidad sobre cualquier cultivar de tomate. La producción de plantas androestériles de líneas puras de las variedades cultivadas es fundamental para la obtención de híbridos con mayor productividad. Además, en cultivos en los que el interés de los mismos se limita a la utilización de las partes vegetativas, disponer de plantas androestériles supone poder evitar la transferencia horizontal indeseada de genes, especialmente relevante en lo que se refiere a cultivares silvestres susceptibles de sufrir polinización cruzada, transferencia que supone una de las preocupaciones mayores de los grupos ecologistas y de parte de los ciudadanos que hoy en día se oponen a los cultivos de plantas transgénicas.

En otro aspecto la invención se relaciona con un procedimiento para producir un tomate partenocárpico que comprende cultivar una planta de tomate transgénica que produce tomates partenocárpicos obtenida según el procedimiento de la invención previamente descrito, bajo condiciones que permiten la floración y desarrollo del tomate. Dichas condiciones son conocidas por los expertos en la materia [Lifschitz, E., Brodai, L., Hareven, D., Hurwitz, C., Prihadash, A., Pnueli, L., Samach, A., Zamir, D. (1993). Molecular mapping of flower development in tomato. En *Molecular Biology of Tomato*, (ed.) J. Yoder, pp. 175-184. Technomic, Lancaster PA, USA. ISBN 0877629927; Ampomah-Dwamena, C., Morris, B.A., Sutherland, P. Veit, B. Y Yao, J-L. (2002). Down-Regulation of *TM29*, a tomato *SEPALLATA* homolog, causes parthenocarpic fruit development and floral reversion. *Plant Physiol.* 130, 605-617].

ES 2 265 232 B1

Los tomates partenocárpicos obtenidos según el procedimiento arriba indicado constituyen un aspecto adicional de la presente invención. Dichos tomates carecen de semillas, son de tamaño algo menor que los silvestres y, en estado maduro, muestran un color rojo más intenso que los correspondientes silvestres (Figura 7).

5 Los tomates partenocárpicos proporcionados por esta invención pueden ser utilizados en alimentación y en la las industrias agroalimentarias en la producción de zumos, salsas, pastas, purés, sopas, etc., de forma eficiente y económica sin necesidad de tener que retirar las semillas por tamizado de las pastas de tomate antes de su procesado.

10 Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo de la misma.

Ejemplo 1

15 *Estudios de funcionalidad del pEND1 en plantas transgénicas de Arabidopsis thaliana, tabaco (Nicotiana tabacum) y tomate (Lycopersicon esculentum)*

20 La especificidad que confiere el promotor del gen *END1* de guisante para la expresión de genes foráneos en la antera (WO 01/073088; y Gómez M.D., Beltrán J.P., Cañas L.A. 2004. The pea *END1* promoter drives anther-specific gene expression in different plant species. Planta. En prensa (publicado online: DOI 10.1007/s00425-004-1300-z), ofrece la posibilidad de utilizarlo en ensayos de ablación celular de tejidos específicos de la misma. El promotor dirigiría la expresión de un gen citotóxico en aquellos tejidos donde *END1* es activo y se comprobaría si la destrucción de éstos producía esterilidad masculina en aquellas plantas donde dicho gen se expresase.

25 Previamente (véase el Ejemplo 1 de WO 01/073088) los inventores realizaron estudios de funcionalidad de dicho promotor en especies diferentes del guisante transformando genéticamente plantas de *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* y *Lycopersicon esculentum* mediante la expresión específica en anteras del gen marcador *uidA* utilizando la construcción pBI101-F3 (Figura 1A). Para comprobar si p*END1* pudiera ser una herramienta eficaz para la producción de plantas androestériles, transformaron dichas plantas con la construcción pBI101-*END1::barnasa-barstar*, donde la secuencia del promotor utilizado (SEQ ID NO: 3) [desde el nucleótido (nt) -2736 al nt -6 (WO 01/073088, Figura 2)] dirigía la expresión específica del gen citotóxico de la barnasa a las anteras de esas plantas (Figura 1B). Este agente citotóxico se seleccionó entre todos los posibles debido a que se dispone de un potente inhibidor específico de su actividad (barstar) que puede usarse para restaurar la fertilidad en líneas androestériles.

35 Asimismo, se realizó el diseño de una construcción pBI101-*END1::barstar* (Figura 1C) que portaba el gen que codifica para el inhibidor específico de la barnasa con objeto de restaurar la fertilidad al utilizarse como línea parental masculina en los híbridos obtenidos mediante la polinización controlada de las plantas androestériles (línea parental femenina).

40 La funcionalidad de p*END1* en tomate se comprobó utilizando la construcción que porta el gen *uidA* (Figura 1A) bajo el control de dicho promotor. Como puede comprobarse en la Figura 2A-B, la expresión del gen GUS se realiza específicamente en aquellos tejidos de la antera de tomate que están implicados en la arquitectura del saco polínico (epidermis, endotecio, capa intermedia, conectivo).

Ejemplo 2

45 *Obtención de frutos partenocárpicos de tomate (cv. Micro-Tom) asociada a la producción de plantas androestériles mediante la ablación específica de anteras con una ribonucleasa (barnasa) controlada por el promotor END1 de guisante*

50 *Materiales y métodos*

Material vegetal

55 Como material inicial se utilizaron semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) de la variedad Micro-Tom.

Cultivo in vitro de plantas de tomate

60 El cultivo de tomate en frascos de cristal se llevó a cabo para germinar semillas estériles, para obtener los cotiledones que servirían como explantes para la transformación y para realizar el análisis genotípico de la generación T₁ que se llevó a cabo en cabinas con temperatura constante de 25°C, bajo condiciones de fotoperiodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad), con una intensidad de luz de 90 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$ suministrada por tubos fluorescentes de luz tipo GroLux 36W (Sylvania).

65 Las semillas de tomate se pusieron en bolsitas de malla dentro de un frasco de cristal de 9 cm de diámetro y 10 cm de altura, que contenía etanol 70%, durante 1 minuto y 30 segundos manteniendo constante la agitación. Luego se pasaron a una solución de lejía a 30 g/l (a partir de la lejía comercial a 40 g Cl₂/l tomando 75 ml de la misma y llevándolo a 100 ml con agua estéril) que contenía además 0,02% de Tween® 20 (SIGMA), que ayuda a romper la tensión superficial entre los tejidos, mejorando el contacto entre el tejido y el agente desinfectante. A continuación, se

ES 2 265 232 B1

eliminó la solución desinfectante y se hicieron 4 lavados sucesivos con agua destilada estéril (5, 10, 15, 20 minutos respectivamente). Por último, se eliminó el agua y se dejaron las bolsitas con semillas dentro del mismo recipiente.

Tras la desinfección de las semillas, se abrieron las bolsitas que las contenían con unas pinzas estériles, y se tomaron una por una para ser depositadas sobre la superficie del medio de germinación que estaba contenido en un bote de cristal de 9 cm de diámetro y 10 cm de altura. La composición del medio de germinación era de 15 g/l de sacarosa, 2,2 g/l de sales MS [MS= Medio Murashige and Skoog (DUCHEFA)], 0,1 g/l de MES (ácido 4-morfolino-etano-sulfónico) pH 5,9, 3 g/l de agar. Cuando las semillas esterilizadas eran destinadas para el análisis genotípico, el medio de germinación contenía además kanamicina 50 mg/l.

Las plantas de tomate provenientes del cultivo *in vitro* se extrajeron del frasco y se lavaron las raíces para eliminar restos de agar procurando no dañarlas. A continuación, se transplantaron a macetas de plástico de 13 cm de diámetro que contenían una mezcla de turba:vermiculita (1:1) previamente esterilizada y se aclimataron en una cabina de invernadero bajo condiciones controladas, con una temperatura de 24°C durante el día y 18°C durante la noche. La luz natural se suplementó con luz artificial mediante lámparas de vapor de mercurio de 400 W [Phillips HDK/ 400 HPI®, N], para mantener un fotoperiodo de día largo. El riego consistió en solución de Hoagland n° 1 suplementada con oligoelementos [Hewitt, Y. M. (1966). *Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition*. Farnham Royal, Bucks. Commonwealth Agricultura) Bureaux] aportada mediante un sistema de riego por goteo automatizado durante 2 minutos, 4 veces al día.

Polinización cruzada

Se ha realizado la polinización cruzada en plantas estériles masculinas de tomate para mantener las líneas que por sí mismas no podían reproducirse al ser androestériles.

El procedimiento consistió en aplicar directamente el polen de la flor donadora (estadio en el que las anteras están dehiscentes) sobre el estigma del carpelo de la flor receptora (madre).

En el caso de las plantas *END1::barnasa* con fenotipo severo de malformación en las anteras de tomate, no fue necesario emasculación la flor receptora antes de la antesis por la esterilidad masculina que estas presentaban. No sucedió así para las plantas *END1::barnasa* de fenotipo medio y leve de malformación de las anteras de tomate, a las que fue necesario emasculación antes de la polinización.

Extracción de DNA genómico de tomate

Para confirmar la presencia de los genes foráneos en plantas presuntas transgénicas, se ha utilizado el análisis molecular basado en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, se requiere la extracción de DNA genómico, para ser utilizado como DNA molde en la reacción de PCR.

La extracción de DNA genómico se realizó empleando el protocolo de Rogers and Bendich (1984) [Rogers, S.O.; and Bendich, A.J. (1984). *Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Mol. Biology*, 5, 69-76]. Se congelaron aproximadamente 200 mg de tejidos de hoja verde utilizando nitrógeno líquido y se trituraron en un tubo eppendorf mediante un émbolo metálico hasta obtener un polvo muy fino. Se añadieron 300 µl de tampón CTAB×2 [2% (p/v) CTAB (N-Cetil-N,N,N-Trimetilamonio Bromuro), Tris-HCl 100 mM pH 8,0, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 20 mM, NaCl 1,4 M, 1% PVP (polivinilpirrolidona) (Mr 40.000)] que se calentó previamente a 65°C para poder pipetearlo correctamente. Se mezcló por inversión del tubo y se dejó incubando a 65°C. Cuando se terminó de añadir este tampón a la última muestra se mantuvo la incubación de todas ellas durante 10 minutos adicionales, tras los cuales se dejaron enfriar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 300 µl de cloroformo isoamílico (24:1), se mezcló y se centrifugó durante 10 minutos a 11.000 rpm para separar las fases. Se recogieron aproximadamente 300 µl de sobrenadante y se añadieron 30 µl de tampón CTAB×10 [10% (p/v) CTAB, 0,7 M NaCl] precalentado a 65°C. Se mezcló y se añadieron nuevamente 300 µl de cloroformo isoamílico (24:1), y se centrifugaron las muestras en las condiciones anteriores. A los sobrenadantes obtenidos se les añadió el mismo volumen del tampón de precipitación CTAB [1% (p/v) CTAB, Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM], tras lo cual apareció enseguida el precipitado que fue recogido mediante centrifugación durante 10 minutos a 11.000 rpm. Se descartaron los sobrenadantes y se resuspendieron los precipitados en 0,3 ml de tampón TE salino (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 1 M). Se volvió a precipitar con 0,6 ml de etanol absoluto y finalmente se recogió el precipitado que contiene el DNA tras centrifugación a 11.000 rpm durante 10 minutos. Se precipitó con etanol 80% y se dejó secar. El DNA de cada muestra se disolvió en 50 µl de TE × 0,1 (Tris-HCl 1 mM pH 8,0, EDTA 0,1 mM) y se almacenó a -20°C.

La concentración de DNA se estimó mediante electroforesis en un gel de agarosa 0,8% utilizando las técnicas y reactivos habituales de análisis de DNA [Maniatis, T.; Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Ny].

ES 2 265 232 B1

Cultivo de microorganismos

Los cultivos líquidos de bacterias de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* se incubaron durante toda la noche a 37°C y 28°C respectivamente con agitación de 200 rpm. Los cultivos de *E. coli* y *A. tumefaciens* en cajas con medio sólido se incubaron toda la noche en estufa a 37°C y tres días a 28°C respectivamente.

Cepas bacterianas utilizadas

Cepa	Referencia / origen	Uso
DH5 α (<i>E.coli</i>)	Hanahan (1983)	Transformación de bacterias
LBA4404 (<i>A. tumefaciens</i>)	Hoekema <i>et al</i> (1983).	Transformación de tomate

Hanahan, D. (1983). Studies of transformation of *Escherichia coli*. J. Mol. 166, 557-560. Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J y Schilperoort, R.A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir and T region of the *Agrobacterium tumefaciens* tiplasmid. *Nature*. 303, 179-180.

El medio utilizado para el crecimiento de los microorganismos fue medio LB (Luria-Bertani-Medium): 1% triptona, 0,5% extracto de levadura, 1% NaCl, pH 7,0. Cuando se utilizó el medio sólido, éste se solidificaba mediante la adición de 1,5% de agar (Pronadisa).

Aislamiento de DNA plasmídico de *Agrobacterium tumefaciens*

Para las preparaciones a pequeña escala de DNA plasmídico de *A. tumefaciens* se utilizó el método de la lisis alcalina descrito por Sambrook *et al.*, (1989) [Sambrook, J., Fritsch, E, F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York] con ligeras modificaciones. Se partía de un cultivo de 3 ml, crecido durante una noche en medio líquido LB suplementado con 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de kanamicina. El sedimento de células resultante de centrifugar el cultivo se resuspendió en 100 μl de solución I [método de la lisis alcalina descrito por Sambrook *et al.*, (1989) citado *supra*] y se trató tal como se describe en Sambrook *et al.*, (1989). Al sobrenadante resultante de la centrifugación a que se somete el lisado obtenido tras añadir la solución III [método de la lisis alcalina descrito por Sambrook *et al.*, (1989) citado *supra*] se le añadió 900 μl de etanol absoluto y se incubó durante 30 minutos a -80°C. Tras centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, el precipitado se lavó con etanol 70%, se secó y se resuspendió en 25 μl de TE (EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8).

La pureza de la preparación de DNA obtenida por este procedimiento no fue lo suficientemente alta como para realizar un análisis de restricción del plásmido. Para solventar este problema, una alícuota de 1 μl de esta preparación de DNA se utilizó para transformar *E. coli*. De uno de los clones transformantes de *E. coli* obtenidos de ese modo, se hizo una nueva preparación de DNA plasmídico que se utilizó para los análisis pertinentes.

Transformación por electroporación

La preparación de células competentes para su transformación mediante electroporación se llevó a cabo según los protocolos descritos en el catálogo Pulse Controller, Accessory for bacterial and fungal electro-transformation (BioRad), en el caso de *E. coli*, y según Wen-Jun y Forde (1989) [Wen-jun, S. y Forde, B. G. (1989). Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. By high voltage electroporation. *Nucleic Acid Res.* 17. 4415] en el caso de *A. tumefaciens*.

Tras descongelar en hielo una alícuota de 40 μl de células competentes preparadas mediante sucesivos lavados de glicerol, se añadió 1 μl de vector transformante. La mezcla se introdujo en una cubeta de 0,1 cm de separación entre electrodos (BioRad), previamente enfriada en hielo, y se sometió a un pulso eléctrico con un aparato Gene Pulser[®] (BioRad). Las condiciones de electroporación fueron 200 Ω , 25 μF y 1,8 kV, para *E. coli*, y 400 Ω , 25 μF y 1,8 kV, para *A. tumefaciens*. Después del pulso eléctrico se adicionó 1 ml de LB y se incubó durante 1 hora a 37°C y a 200 rpm para *E. coli* y durante 3 horas a 28°C y a 200 rpm para *A. tumefaciens*.

Selección de recombinantes bacterianos

La selección de recombinantes bacterianos se llevó a cabo mediante la siembra de las células bacterianas transformadas en placas con medio LB (medio Luria-Bertani) suplementado con el antibiótico al cual confería resistencia el plásmido en estudio, y en el caso que el plásmido permitiese selección por color, se añadía 40 μl (25 mg/ml) de IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactósido) y 25 μl (20 mg/ml) de X-Gal al medio de cultivo sólido. Los antibióticos utilizados para la selección de recombinantes bacterianos y la concentración a la que fueron usados, aparecen en la siguiente tabla:

ES 2 265 232 B1

Antibióticos utilizados y sus concentraciones

	Antibiótico	Concentración
5	Ampicilina	100 µg/µl para <i>E. coli</i> .
	Kanamicina	25 µg/µl para <i>E. coli</i> .
		50 µg/µl para <i>A. tumefaciens</i> .

10

Diseño de la construcción pBI101-END1::barnasa-barstar

15 Para ensayar si la expresión del gen citotóxico *barnasa* en aquellos tejidos de la antera donde *END1* es activo, era capaz de producir androesterilidad en plantas transgénicas de tomate, se realizó la construcción pBI101-*END1::barnasa-barstar*.

20 Para ello se partió de la construcción pBI101-F3 (Figura 1A). Esta construcción contenía la secuencia de la región promotora de *END1* (SEQ ID NO: 3) [desde el nt -2736 al nt -6 (Figura 9)] aislada del rastreo de la genoteca genómica de guisante, dirigiendo la expresión del gen *uidA* que codifica la enzima β-glucuronidasa (GUS). Este gen fue liberado con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sac*I, y el fragmento correspondiente al plásmido pBI101 más el promotor de *END1* fue extraído del gel de agarosa. El fragmento *barnasa-barstar* (Figura 1B) previamente clonado en el sitio *Bam*HI del plásmido pBluescript KS (+) (Stratagene) fue amplificado utilizando los oligos:

25 Ribo I (5' TAGGATCCCGACCATGGCACAGGTTATC 3') [SEQ ID NO: 5] e

Inhi II (5' GCGAGCTCTTAAGAAAGTTGATGGTGATG 3') [SEQ ID NO: 6].

30 Con el primero (Ribo I) se mantiene el sitio de corte para la enzima *Bam*HI del clon original a nivel del ATG de la *barnasa*, mientras que el último (Inhi II) crea un sitio de corte para *Sac*I a nivel del codón de parada del gen *barstar*. El fragmento producto de la reacción de PCR, se ligó al vector pGEM-T Easy (Promega), y se liberó posteriormente con las enzimas *Bam*Ht y *Sac*I. Este inserto fue clonado en el sitio que crearon esas mismas enzimas en la construcción pBI101-*END1*, creándose así la construcción pBI101-*END1::barnasa-barstar* (Figura 1B).

35 La *barnasa* es una ribonucleasa muy activa y, para la manipulación de ese gen en organismos procariotas, se ha incluido en la construcción el gen *barstar*, inhibidor específico de la acción ribonucleasa de la *barnasa*. Este gen funciona solamente como un gen bacteriano. La capacidad del ribosoma procariótico de traducir todos los cistrones de un RNA mensajero cada vez que encuentra algún codón de iniciación, permite que en estos organismos, en caso de expresión accidental de la *barnasa*, pueda expresarse de la misma manera su inhibidor específico, contrarrestando así su acción destructiva. En esta característica de la traducción difieren los organismos eucariotas.

40

Transformación de Lycopersicon esculentum (Micro-Tom) y análisis de las plantas transgénicas

45 La transformación genética de plantas de *Lycopersicon esculentum* (cv. Micro-Tom) se realizó utilizando el protocolo optimizado descrito por Ellul *et al.*, (2003) [Ellul, P., García-Sogo, B., Pineda, B., Ríos, G., Roig, L.A., Moreno, V. (2003). The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.) is genotype and procedure dependent. *Theor. Appl. Genet.* 106, 231-238].

50 Brevemente, se tomaron los cotiledones de plantas estériles de 12 días, cultivadas en medio de germinación (MG), y se cortaron transversalmente en dos segmentos eliminando los extremos para aumentar la superficie de infección. Los explantes de cotiledón se transfirieron a placas Petri (24 explantes/placa), que contenían medio de precultivo (MPC), en las que permanecieron 48 horas en estufa de oscuridad a 28°C. Transcurrido ese tiempo, los explantes se sumergieron durante 6-8 minutos en 30 ml del cultivo bacteriano y posteriormente se secaron con papel de filtro estéril para eliminar el exceso de bacterias. Se colocaron con el envés del cotiledón en contacto con el medio de cocultivo (MCC). Los explantes se incubaron con el *A. tumefaciens* durante 48 horas en estufa de oscuridad a 26°C. Concluido el período de cocultivo, los explantes se transfirieron durante 10-12 minutos a botes de cristal estériles con 150 ml de medio de lavado (ML) más cefotaxima (500 mg/l) que detiene el crecimiento de *A. tumefaciens*. Tras el lavado, los explantes se secaron sobre papel de filtro estéril y se colocaron en placas Petri de 15 mm × 90 mm, que contenían medio organogénico sin presión selectiva (IK 4,0/4,0 + cefotaxima 400 mg/l), donde permanecieron 48 horas en cámara de cultivo. Al finalizar ese periodo de tiempo, los explantes se transfirieron a placas Petri de 25 mm × 90 mm, que contenían unos 20 ml de medio selectivo de inducción organogénica, y se subcultivaron cada tres semanas en estas condiciones. Los callos formados se separaron de los explantes a las 7-8 semanas aproximadamente eliminando las zonas friables, y se subcultivaron cada 3 semanas en el medio de inducción de organogénesis IKZ 4,0/4,0/1,0 hasta que fueron apareciendo los brotes individuales que se separaron del callo y se transfirieron a medio de enraizamiento (ME). Estos brotes una vez enraizados desarrollaron estructuras vegetativas que permitieron obtener nuevas plantas mediante propagación clonal. Sobre estas estructuras vegetativas se realizaron los análisis moleculares y el análisis de ploidía a los transformantes primarios.

65

ES 2 265 232 B1

Las soluciones minerales, vitamínicas y medios de cultivos empleados se describen a continuación.

Soluciones minerales y vitamínicas

5	Macronutrientes	(mg/l)
	NH ₄ NO ₃	1.650
10	KNO ₃	1.900
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
15	KH ₂ PO ₄	170
	Micronutrientes	(mg/l)
20	KI	0,83
	H ₃ BO ₃	6,20
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3

Medio de germinación (MG)

30	MG	(g/l)
	Solución mineral	100%
	Sacarosa	10
35	Agar	8

Medio de precultivo (1 litro) (MPC)

40	Solución mineral (MS)	100%
	Sacarosa (g)	30
	Myo-inositol (mg)	100
45	Vitaminas SH (ml)	10
	Acido indolacético (AIA) (mg)	4
	Kinetina (mg)	4
50	Agar (g)	8

Medio de cocultivo (1 litro) (MCC)

55	Solución mineral (MS)	100%
	Sacarosa (g)	30
	Myo-inositol (mg)	100
60	Vitaminas SH (ml)	10
	Acido indolacético (AIA) (mg)	4
	Kinetina (mg)	4
	Acetociringona (μM)	200
65	Agar (g)	8

ES 2 265 232 B1

Medio de lavado (1 litro) (ML)

5	Solución mineral (MS)	100%
	Sacarosa (g)	20
	Myo-inositol (mg)	100
	Cefotaxima (mg)	600

10

Medios de inducción de organogénesis (MIO) (1 litro)

15	IK 4,0/4,0 (para precultivo)	
	Solución mineral (MS)	100%
	Sacarosa (g)	30
20	Myo-inositol (mg)	100
	Vitaminas SH (ml)	10
	Acido indolacético (AIA) (mg)	4
	Kinetina (mg)	4
25	Agar (g)	8

	IKZ 4,0/4,0/1,0 (para cultivo)	
30	Solución mineral (MS)	100%
	Sacarosa (g)	30
	Myo-inositol (mg)	100
	Vitaminas SH (ml)	10
35	Acido indolacético (AIA) (mg)	4
	Kinetina (mg)	4
	Zeatina (mg)	1
40	Agar (g)	8

Medio de enraizamiento (ME)

45	ME	(g/l)
	Solución mineral (MS)	100%
	Sacarosa	20
50	Myo-inositol	0.1
	Tiamina-HCl	0,001
	Acido indolacético (AIA) (mg)	0,0001
55	Agar	8

Notas

1. El pH del medio se ajusta a 5,7 con KOH antes de añadir el agente gelificante (agar).
2. Los medios de cultivo se esterilizan por calor húmedo en autoclave, a 115°C durante 30 minutos.
3. Las vitaminas se disuelven en agua, se preparan soluciones stock concentradas 100 X, se almacenan a -20°C y se añaden al medio antes de ajustar el pH.
4. La zeatina se añade estéril por microfiltración en cabina de flujo tras la esterilización del medio de cultivo, a razón de 1 mg/l.

ES 2 265 232 B1

Evaluación del nivel de ploidía en la generación T₁ de plantas pEND1::barnasa de tomate (Micro-Tom)

El nivel de ploidía se analizó mediante citometría de flujo, utilizando para el aislamiento de núcleos hojas proce-
dentes de transformantes primarios cultivados en medio de enraizamiento libre de antibiótico. El tejido de aproxima-
5 damente 1 cm² se colocó en una placa Petri de 50 mm de diámetro, a la que se añadió 200 µl de tampón de extracción
de núcleos (Partec), y se troceó con una cuchilla. Una vez troceado, el suspendido resultante se pasó a través de una
malla de nylon de 50 µl (Nybolt), y se añadieron 800 µl de una solución colorante que contenía 1 mg/l de DAPI (4,6-
diamino-2-fenil-indol), consiguiendo así la tinción fluorescente del DNA. El DNA de los núcleos aislados se midió
10 utilizando un citómetro de flujo Partec PAS-II, provisto de una lámpara de mercurio. El resultado aparece trazado so-
bre una escala semilogarítmica, en la que el histograma que alcanza desde 2C a 32C se distribuye a lo largo del eje de
abscisas. Para calibrarlo se utilizó el pico 2C de núcleos de hojas jóvenes de plántulas de tomate diploides cultivadas
in vitro.

Test de germinación del polen in vitro

15 Para realizar el test de germinación de los granos de polen de plantas transgénicas de tomate (Micro-Tom), se llevó
a cabo el procedimiento que se describe a continuación.

Brevemente, se preparó el medio líquido de germinación del polen (sacarosa 0,292 M, Ca (NO₃)₂ 1,27 mM, H₃BO₃
20 1,62 mM, KNO₃ 1 mM, KH₂PO₄ 0,1 mM). Se añadió agarosa al 0,5% y se fundió en el microondas. Con una pipeta
se distribuyó uniformemente sobre portaobjetos de vidrio y una vez solidificado el medio se espolvoreó sobre cada
porta los granos de polen correspondientes a una antera de una flor de tomate extendida. Para cada planta se realizó
este proceso por triplicado.

25 Los portas se incubaron en oscuridad a una temperatura de 25°C durante 2 horas tras las cuales se procedió al
recuento de los granos de polen en un microscopio invertido de contraste de fases (Nikon Diaphot). Se consideró que
un grano de polen había germinado cuando el tamaño de su tubo polínico había alcanzado un tamaño mayor o igual
al diámetro del grano. Debido a la variabilidad de la concentración de granos de polen encontrada en cada porta, se
utilizaron diferentes técnicas de recuento para cada caso.

30 En el caso de los portas que contenían los granos de polen de las plantas silvestres, se realizó el recuento seleccio-
nando 10 campos aleatorios. A los resultados obtenidos se les calculó la media y se multiplicó por 12 y por 27, que
son el número de campos transversal y longitudinal respectivamente del área del porta.

35 Para los portas que contenían los granos de polen de las plantas 9L, 12B y 4S, se hizo el recuento haciendo 5 pases
longitudinales. La media de estos resultados se multiplicó por 12. En el caso de la planta 14C, el recuento se realizó
en el porta completo debido a la poca cantidad de polen encontrado.

Análisis de la viabilidad de los granos de polen y observación de los resultados por microscopia óptica

40 Para comprobar la viabilidad de los granos de polen de plantas transgénicas *END1::barnasa* de tomate (cv. Micro-
Tom), se utilizó el método de fijación y teñido de los cromosomas con una solución de acetato de carmín. Para ello,
se presionaron las anteras de cada flor de tomate con el objetivo de que las células sufriesen una separación mecánica.
El contenido de las anteras (granos de polen) fue colocado sobre un porta objetos y fue teñido con una solución de
45 acetato de carmín. La solución de acetato de carmín se preparó diluyendo 0,5 g de carmín en ácido acético glacial
al 45%, y fue calentada hasta ebullición. Luego se diluyó 1:1 en glicerol al 30%. Las muestras fueron observadas y
fotografiadas con un microscopio óptico Eclipse 600 Nikon.

Resultados

50 *Transformación de Lycopersicon esculentum (cv. Micro-Tom) con la construcción pBI101-END1::barnasa-barstar*

La transformación de tomate con la construcción *END1::barnasa* generó 72 brotes transgénicos primarios (T₁),
de los que se escogieron 25 brotes. Las plantas seleccionadas se analizaron mediante citometría de flujo con el fin de
55 evaluar el nivel de ploidía. De los 25 transformantes, 24 eran diploides y solo la planta 7A resultó ser tetraploide (Tabla
1). El análisis mediante PCR de muestras de tejido de los transformantes diploides permitió detectar la presencia del
transgén en todos ellos (Figura 3). Se escogieron 14 plantas para ser transferidas al invernadero y poder analizar sus
características fenotípicas (Tabla 1).

60 Las plantas transgénicas mostraron un desarrollo similar al de plantas no transformadas crecidas bajo las mismas
condiciones. Las flores de las plantas control, al igual que las de las plantas *END1::barnasa*, desarrollaron los órganos
característicos de la flor de tomate: sus cinco sépalos alternando con cinco pétalos y dos carpelos fusionados formando
un pistilo.

65 Sin embargo, mientras que los cinco estambres de las plantas control formaban el cono estaminal característico
alrededor del estilo (Figura 4A), el fenotipo de los estambres de las plantas transgénicas variaba de una planta a otra. Se
observaron transformantes con estambres muy parecidos a los estambres silvestres (Tabla 1; Figuras 4B y 4C, fenotipo
leve), otros mostraban una ligera reducción de su tamaño y una pequeña separación entre ellos (Tabla 1; Figuras 4D

ES 2 265 232 B1

y 4E, fenotipo medio), y por último otras plantas mostraron estambres atrofiados que dejaban el estilo al descubierto (Tabla 1; Figura 4F, fenotipo severo).

5 Las anteras transgénicas de fenotipo leve contenían granos de polen en su interior y esto se podía observar realizando una incisión en las mismas y golpeando sobre un portaobjetos.

TABLA 1

10 *Características genotípicas y fenotípicas de plantas de tomate END1::barnasa de la generación T₁*

Callos independientes	Planta en medio con kanamicina	Nivel de Ploidia	PCR Barnasa-barstar	Plantas invernadero	Fenotipo antera
	1a	2x	+		
	1d	2x	+	X	Severo
20	1e	2x	+	X	Severo
	1 f	2x	+	X	Severo
	2d	2x	+	X	Leve
	2e	2x	+	X	Leve
25	4a	2x	+		
	4p	2x	+	X	Leve
	4s	2x	+	X	Leve
30	5b	2x	+	X	Medio
	7a	4x	-	-	-
35	9b	2x	+	X	Medio
	9h	2x	+		
	9g	2x	+		
	9l	2x	+	X	Medio
40	11c	2x	+		
	11d	2x	+	X	Severo
	12b	2x	+	X	Medio
45	12c	2x	+		
	12d	2x	+		
	14c	2x	+	X	Medio
	14d	2x	+		
50	15d	2x	+		
	15e	2x	+	X	Leve
	15f	2x	+		

55

Estudio comparativo del desarrollo de una antera silvestre de tomate (cv. Micro-Tom) y una antera END1::barnasa de fenotipo severo

60 Se realizó un estudio comparativo entre el desarrollo de una antera silvestre de tomate (cv. Micro-Tom) y el de una antera transgénica de fenotipo severo. Para ello se incluyeron en resina y parafina anteras de diferentes estadios de desarrollo y se realizaron secciones transversales con el objetivo de observar los tejidos afectados por la acción del gen citotóxico y determinar el momento en que éste comienza a afectar el desarrollo de los mismos.

65 En la Figura 5 se muestran cinco estadios representativos del desarrollo de la antera silvestre de tomate (cv. Micro-Tom) en comparación con los estadios equivalentes de las anteras transgénicas. La explicación de los estadios de desarrollo de la antera silvestre de tomate se ha realizado teniendo en cuenta los definidos por Koltunow *et al.*, 1990

ES 2 265 232 B1

[Koltunow, A. M., Truettner, J., Cox, K. H., Wallroth, M., Goldberg, R. B. (1990). Different Temporal and Spatial Gene Expression Patterns Occur during Anther Development. *Plant Cell*. 2, 1201-1224] para el desarrollo de la antera de tabaco y los descritos por Brukhin *et al.*, 2003 [Brukhin, V., Hernould, M., Gonzáles, N., Chevalier, C., Mouras, A. (2003). Flower development schedule in tomato *Lycopersicon esculentum* cv. sweet cherry. *Sex Plant Reprod.* 15, 311-320] para la variedad cherry dulce de tomate.

Estadio 1

Silvestre: El primer estadio analizado muestra un primordio de antera donde las células arquesporales ya se han diferenciado en células parietales primarias y esporogéneas. Se empieza a establecer el tejido conectivo, la epidermis y el haz vascular. La antera comienza a alcanzar su configuración bilobular.

END1::barnasa: Para este mismo estadio, la antera transgénica ya muestra una apariencia anormal. Su forma es diferente a la que adquiere una antera silvestre en el estadio equivalente. Esta morfología recuerda a la que tendría una antera silvestre en un estadio de desarrollo inferior. Las principales diferencias se concentran en las cuatro esquinas del primordio, donde no se observan marcados los futuros sacos polínicos.

Estadio 2

Silvestre: Se han formado los tejidos epidermis, conectivo y haz vascular. Se están formando las paredes de los sacos polínicos que incluye el endotecio, el *tapetum* y la capa intermedia y se ha diferenciado el tejido esporógeno.

END1::barnasa: Las células que conforman la epidermis muestran diferencias con las correspondientes a una antera silvestre: son más redondas y pequeñas. Hay menor número de células dentro del tejido conectivo y también son menos y con una disposición diferente las que darían lugar a los tejidos que rodean el saco polínico. La antera silvestre en este estadio de desarrollo está alcanzando su forma externa característica. Comienzan a observarse sus cuatro lóculos donde se establecerán los sacos polínicos y se diferenciarán en su interior las células que darán lugar a los granos de polen. Esto no se observa en la antera transgénica en el estadio equivalente.

Estadio 3

Silvestre: Se observa el *tapetum* rodeando las tétradas de microsporas que a su vez están rodeadas de callosa. Los demás tejidos de la antera están completamente diferenciados.

END1::barnasa: La morfología externa de la antera muestra signos de malformación: los sacos polínicos están dispuestos de manera diferente a los de una antera silvestre, más cerca unos de otros y en su interior el *tapetum* rodea a posibles tetrasporas recubiertas de callosa. Esto se debe quizás, a que el tejido conectivo está colapsado y hace que los microsporangios converjan en un punto.

Estadio 4

Silvestre: La antera muestra señales de haber entrado en dehiscencia: el *tapetum* y las células adyacentes al estomio han degenerado, ha desaparecido el tejido conectivo por la región que dividía los dos sacos polínicos de un mismo lóbulo, convirtiendo a la antera en bilocular. Se observan microsporas vacuoladas en el interior de los sacos polínicos.

END1::barnasa: Se siguen manteniendo las diferencias en la morfología externa: el tejido conectivo está colapsado y no hay señales de haber entrado en dehiscencia. En lugar de granos de polen maduro se observa una estructura amorfa en el interior de los sacos polínicos y ésta parece rodeada de *tapetum*.

Estadio 5

Silvestre: La antera se ha abierto por la región del estomio y los granos de polen maduro están siendo liberados por la abertura que se ha producido.

END1::barnasa: La antera se ha hecho bilocular pero los sacos polínicos están deformados y en su interior aparecen estructuras amorfas en lugar de granos de polen maduro. El tamaño de la antera es mucho menor y su morfología externa sigue siendo diferente a la de una antera silvestre en un estadio equivalente. Aunque hay algunas señales de haber entrado en dehiscencia como la disposición bilocular de la antera, ésta no ha llegado a término para dar lugar a la completa degradación del tejido conectivo por la región del estomio y provocar su apertura.

Desarrollo partenocárpico de frutos en plantas transgénicas de tomate *END1::barnasa*

Los resultados obtenidos hasta el momento en cuanto a fertilidad de plantas *END1::barnasa* de *Arabidopsis* y tabaco, muestran que la malformación en las anteras por la acción del gen citotóxico *barnasa* genera plantas estériles masculinas que no llegan nunca a formar fruto.

Sin embargo, en tomate, todas las plantas *END1::barnasa* producen frutos. Todos los frutos producidos carecían de semillas y eran, por tanto, partenocárpicos, independientemente de la severidad del fenotipo en las anteras y de la

presencia de granos de polen observada para algunos transformantes de fenotipo leve. El desarrollo de los frutos en las plantas transgénicas comenzaba antes de lo que lo hacen las plantas silvestres. Los ovarios transgénicos de flores de día 0 (antesis) alcanzaban un tamaño mayor que los de las flores silvestres en el mismo estadio de desarrollo (Figura 6).

Los frutos transgénicos eran de menor tamaño y tenían un color rojo más intenso que el mostrado por frutos silvestres (Figura 7). Cuando estas plantas eran emasculadas y polinizadas con polen de anteras de plantas no transformadas, se obtenían frutos que alcanzaban un tamaño normal y que tenían semillas similares en número y morfología a las producidas por plantas silvestres. Datos referentes a las diferencias en el tamaño y peso entre frutos partenocárpicos y frutos obtenidos por polinización cruzada en 4 líneas transgénicas independientes aparecen representados en la Tabla 2.

TABLA 2

Diferencias entre los frutos partenocárpicos generados por plantas END1::barnasa y frutos obtenidos por polinización cruzada de estas mismas plantas

Genotipo	Frutos Partenocárpicos		Frutos obtenidos por polinización	
	Peso (g)	Diámetro (cm)	Peso (g)	Diámetro (cm)
Silvestre	-	-	10	2,9
1e	4,25	2,05	9,35	2,55
4s	3,60	2,00	9,76	2,76
11c	6,61	2,33	9,48	2,88
12b	7,04	2,70	9,25	2,60

Los datos de peso y tamaño de los frutos mostrados corresponden a la media de 6 frutos por cada planta.

Análisis de la viabilidad y germinación del polen en anteras END1::barnasa de fenotipo medio y leve

La presencia de frutos partenocárpicos en plantas END1::barnasa se observó en todas las plantas de la generación T₁, independientemente del grado de malformación mostrado por las anteras y de la presencia de granos de polen. Para comprobar si estos granos de polen eran funcionales, se realizó el test de germinación de los granos de polen *in vitro*. Además, se realizó una tinción de los mismos con acetato de carmín para observar su viabilidad.

La Tabla 3 muestra que en las condiciones de cultivo ensayadas una antera silvestre de tomate (cv. Micro-Tom) tenía una media de aproximadamente 18.000 granos de polen, de los que el 88% fueron capaces de germinar. En cambio, las anteras de plantas END1::barnasa analizadas tenían entre 10 y 100 veces menos de granos de polen (entre 28 y 972 granos/antera según genotipo) que las anteras silvestres y, de éstos, solo germinaron entre el 4% y el 8% de los mismos.

En la Figura 8, donde se muestra la tinción de los granos de polen con acetato de carmín, se puede observar que la cantidad granos de polen de las plantas transgénicas analizadas es muy inferior a la cantidad de granos de polen viables dentro de una antera silvestre.

A pesar de constatar la presencia de un cierto número muy pequeño de granos de polen viable y con aptitud germinativa en anteras de plantas END1::barnasa, nunca se observó en ninguno de los frutos transgénicos la presencia de una sola semilla.

La disminución de la cantidad, viabilidad y capacidad germinativa de los granos de polen de anteras transgénicas, así como las alteraciones morfológicas de los estambres (estilo casi fuera del cono estaminal), son los factores probablemente responsables de la ausencia de semillas en los frutos de las plantas END1::barnasa.

ES 2 265 232 B1

TABLA 3

Resultados del test de germinación de granos de polen *in vitro* de tomate (cv. Micro-Tom)

Genotipo	Muestra ***	N° Medio de Granos de Polen/Antera			%			
		Germinados	No germinados	Total	Germinados	ES	No germinados	ES
Silvestre	1	19.213	3.110	22.324	86,1%	0,002	13,9%	0,002
	2	14.645	2.236	16.880	86,8%	0,003	13,2%	0,003
	3	12.604	1.296	13.900	90,7%	0,002	9,3%	0,002
	Media	15.487	2.214	17.701	87,8%	0,189	12,2%	0,189
14 C	1	0	5	5	0,0%	0,000	100,0%	0,000
	2	9	43	52	17,3%	0,052	82,7%	0,052
	Media	5	24	29	8,7%	0,162	91,3%	0,162
9 L	1	2	34	36	6,7%	0,042	93,3%	0,042
	2	2	53	55	4,3%	0,027	95,7%	0,027
	3	0	55	55	0,0%	0,000	100,0%	0,000
	Media	2	47	49	3,7%	0,109	96,3%	0,109
12 B	1	0	55	55	0,0%	0,000	100,0%	0,000
	2	12	96	108	11,1%	0,030	88,9%	0,030
	3	0	154	154	0,0%	0,000	100,0%	0,000
	Media	4	102	106	3,7%	0,109	96,3%	0,109
4 S	1	88	916	1.004	8,8%	0,009	91,2%	0,009
	2	80	880	960	8,3%	0,009	91,7%	0,009
	3	76	876	952	8,0%	0,009	92,0%	0,009
	Media	81	891	972	8,4%	0,160	91,6%	0,160

***, Cada muestra representa el porta objetos donde se realizó el conteo del número de granos de polen.

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento para producir una planta de tomate transgénica que produce tomates partenocárpicos que comprende las etapas de:

- a) introducir en una célula o en un tejido de una planta de tomate una construcción de DNA que comprende:
- 10 (i) el promotor del gen *END1* de guisante (*Pisum sativum* L.) o un fragmento de dicho promotor capaz de regular la expresión específica en antera; y
- (ii) un gen citotóxico, operativamente unido a dicho promotor o fragmento del mismo,
- 15 para producir una célula o un tejido de una planta de tomate transformado; y
- b) regenerar dicha célula o tejido de planta de tomate transformado de la etapa a) para producir una planta de tomate transgénica;

20 en donde dicha planta de tomate transgénica produce tomates partenocárpicos cuando se crece bajo condiciones que permiten la floración y desarrollo del tomate.

25 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho promotor del gen *END1* de guisante comprende la secuencia de nucleótidos comprendida desde el nucleótido -2736 hasta el nucleótido -1 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 9.

30 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha construcción de DNA comprende un fragmento del promotor del gen *END1* de guisante que tiene la secuencia de nucleótidos comprendida desde el nucleótido -2736 hasta el nucleótido -6 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 9.

35 4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha construcción de DNA comprende un fragmento del promotor del gen *END1* de guisante que comprende, al menos, la secuencia de nucleótidos comprendida desde el nucleótido -336 hasta el nucleótido -1 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 9.

40 5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho gen citotóxico es un gen que provoca androesterilidad en plantas cuando se expresa en anteras.

45 6. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 5, en el que dicho gen citotóxico es un gen que codifica una actividad ribonucleasa o un gen que codifica una proteína que causa la muerte celular en el tejido donde se expresa.

50 7. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que dicho gen citotóxico se selecciona entre el gen de la barnasa, el gen que codifica la toxina A de la difteria (DTA) producida naturalmente por *Corynebacterium diphtheriae*, el gen que codifica la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, el gen que codifica la ribonucleasa T de *Aspergillus oryzae* y el gen que codifica la barnasa de *Bacillus amyloliquefaciens*.

55 8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho gen citotóxico es un gen que provoca androesterilidad en plantas y en donde dicha construcción de DNA comprende, además, del (i) promotor del gen *END1* de guisante o un fragmento de dicho promotor capaz de regular la expresión específica en antera y (ii) dicho gen que provoca androesterilidad en plantas, (iii) un gen que revierte dicha esterilidad.

60 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicho gen que provoca androesterilidad en plantas es el gen de la barnasa y dicho gen que revierte dicha esterilidad es el gen que codifica barstar.

65 10. Un procedimiento para producir un tomate partenocárpico que comprende cultivar una planta de tomate transgénica que produce tomates partenocárpicos obtenida según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, bajo condiciones que permiten la floración y desarrollo del tomate.

60 11. Un tomate partenocárpico, obtenible mediante un método según la reivindicación 10.

60

65

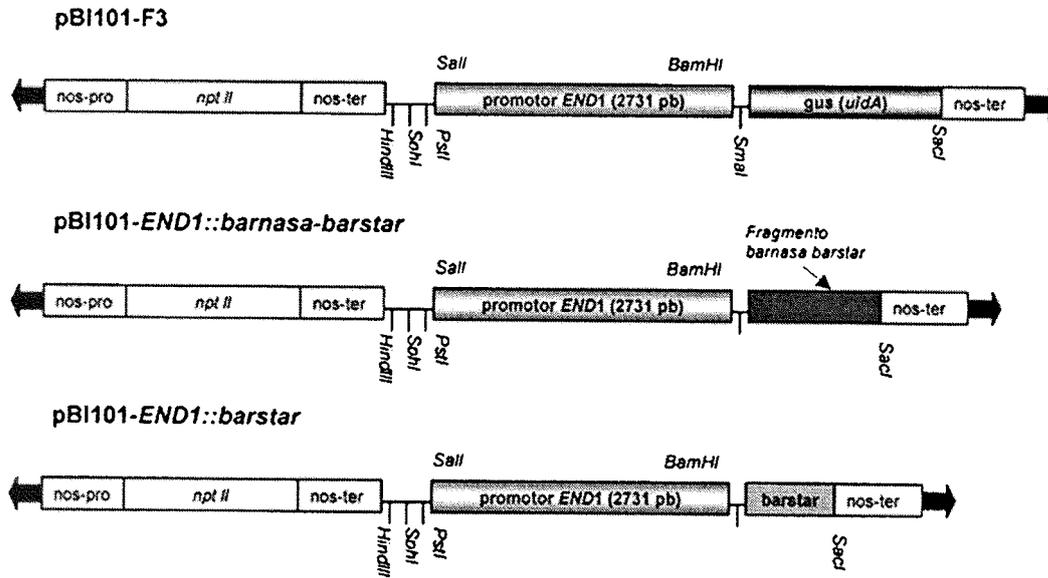


Figura 1

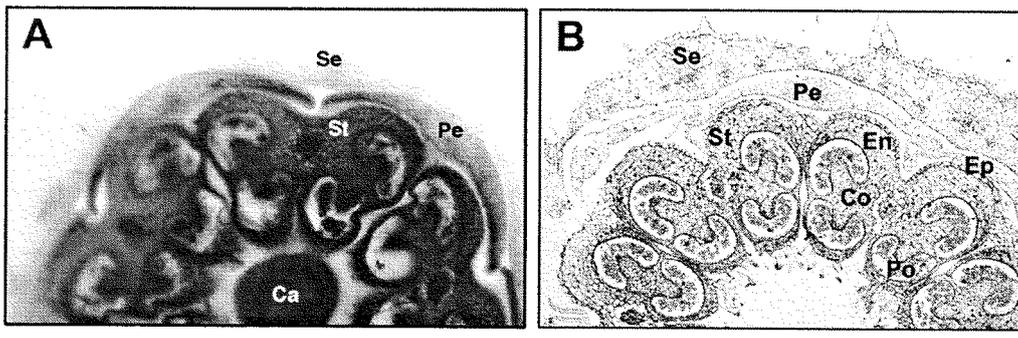


Figura 2



1a 1b 1e 1f 2d 2e 4a 4p 4s 7a 9b 9h 9g 9l 11c 11d 12b 12c 12d 14c 14d 15d 15e 15f

Figura 3

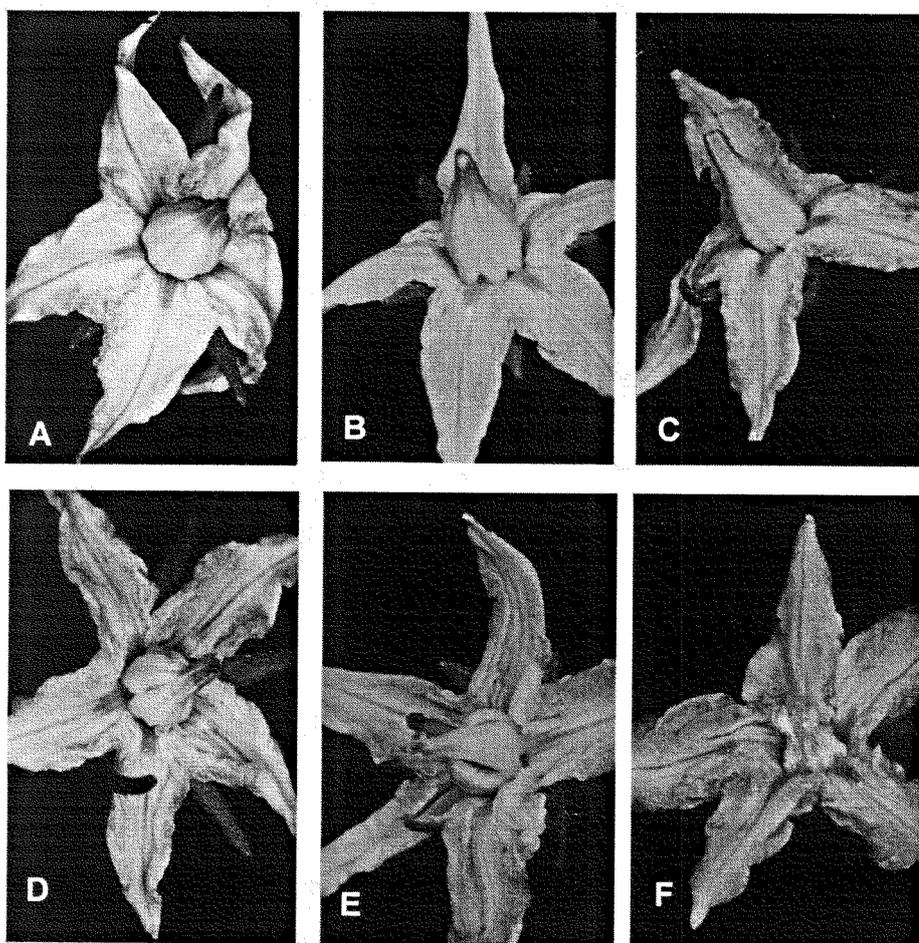


Figura 4

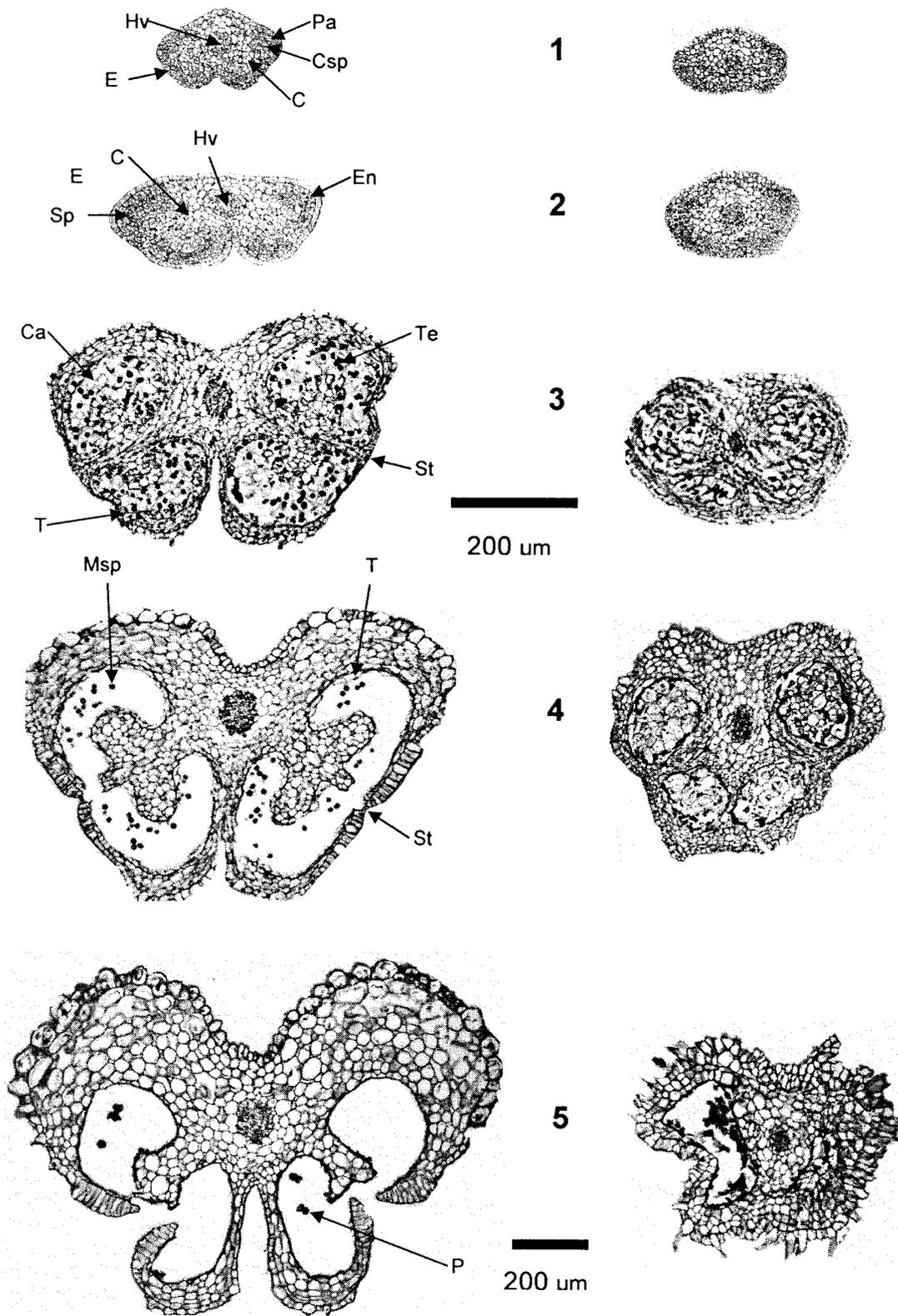


Figura 5

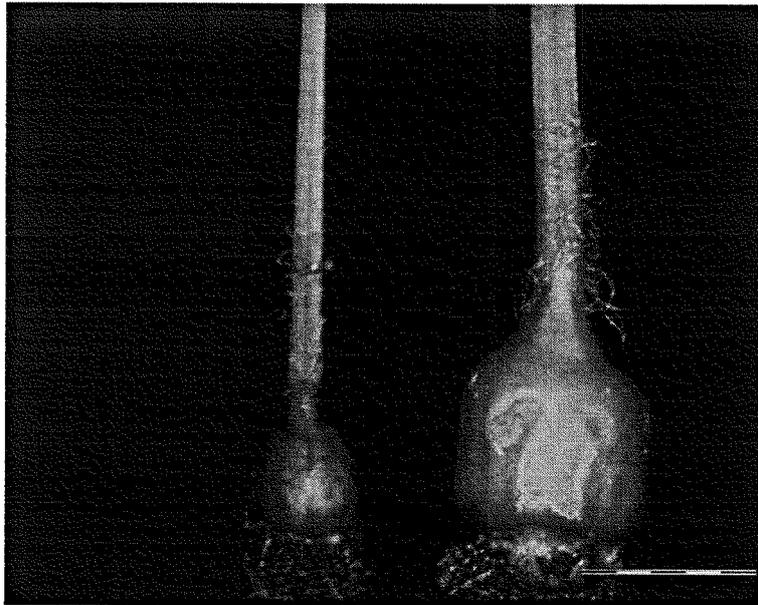


Figura 6

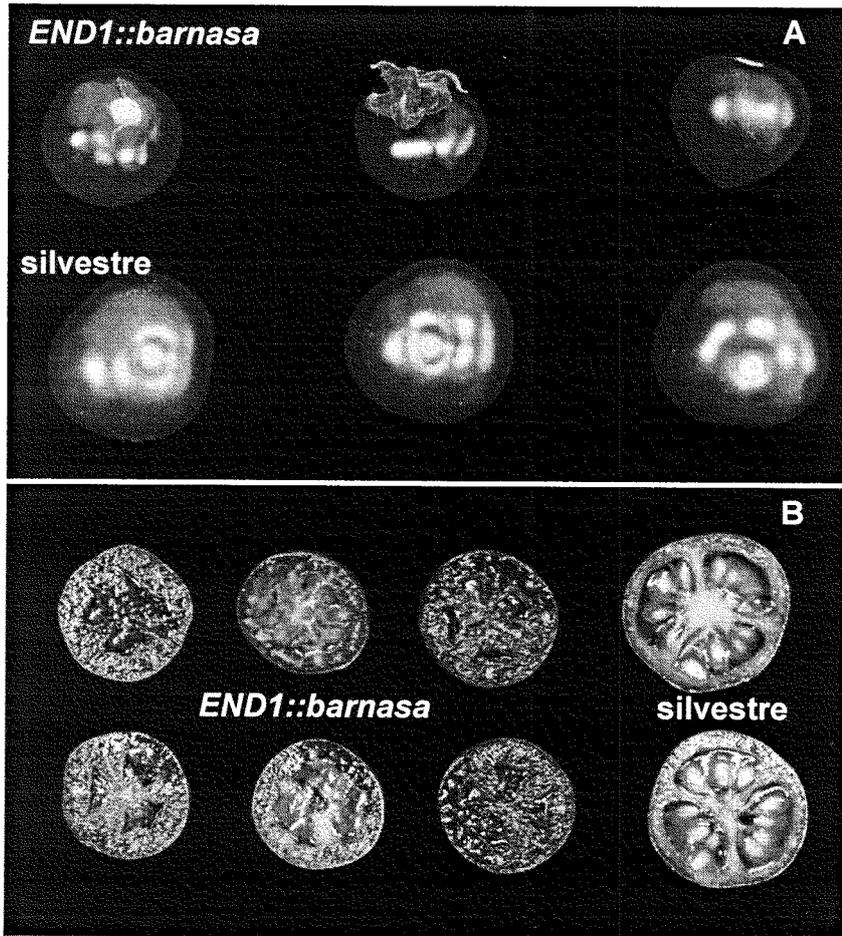


Figura 7

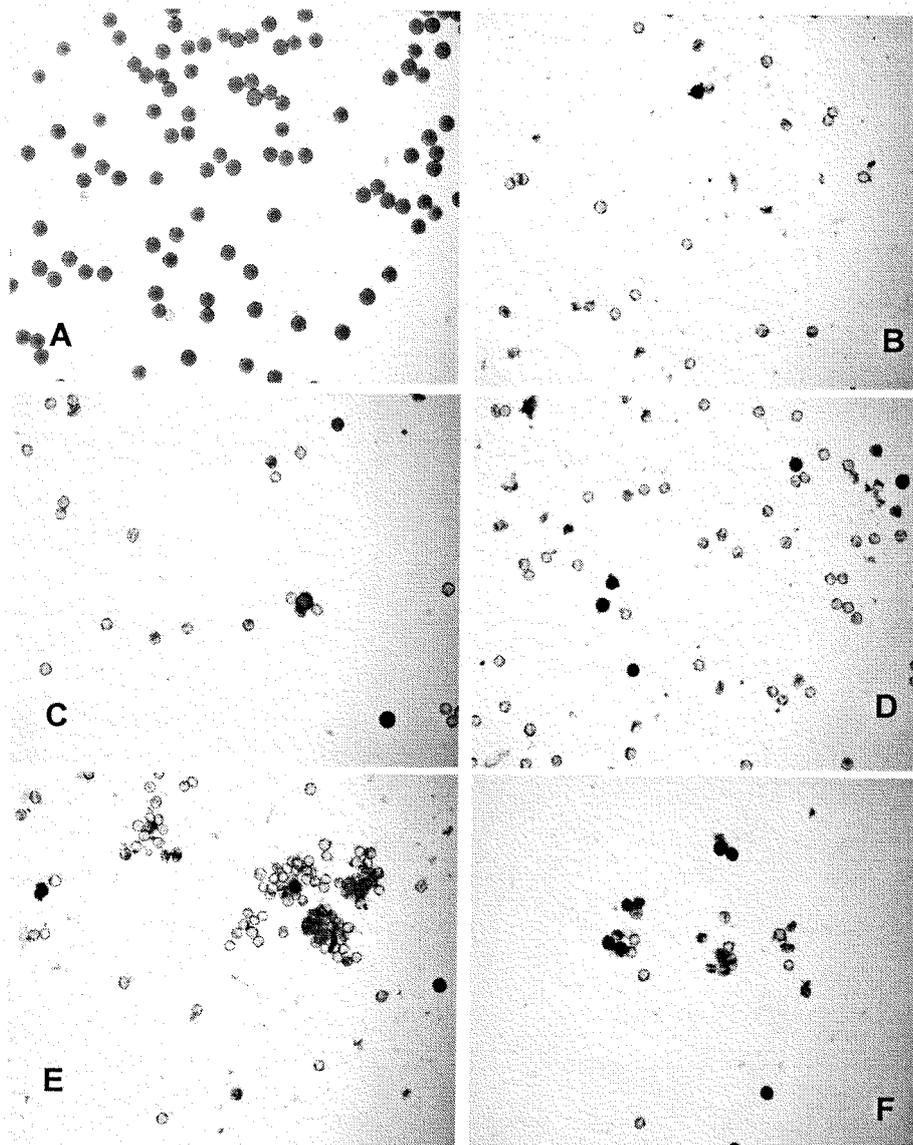


Figura 8

ES 2 265 232 B1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Newbiotechnic, S.A y Consejo Superior de Investigaciones Científicas
- 5 <120> Tomates partenocárpicos y procedimiento para su producción
- <130> región promotora de expresión en antera
- 10 <140> P200401761
<141> 17.07.2004
- <160> 6
- 15 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- 20 <211> 2766
<212> ADN
<213> *Pisum sativum*
- 25 <220>
<221> promoter
<222> (1)..(2736)
- 30 <220>
<221> TATA_signal
<222> (2474)..(2479)
- 35 <220>
<221> TATA_signal
<222> (2681)..(2688)
- 40 <220>
<221> CAAT_signal
<222> (2336)..(2339)
- 45 <220>
<221> CAAT_signal
<222> () .. (2394)
- 50 <220>
<221> CAAT_signal
<222> ()..(2675)
- 55 <220>
<221> C_region
<222> (2408)..(2417)
- 60 <220>
<221> C region
<222> (2437)..(2446)
- 65

ES 2 265 232 B1

<220>

<221> C_region

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

5

<220>

<221> GC signal

<222> (2447)..(2453)

10

<220>

<221> allele

<222> (2610)..(2615)

15

<220>

<221> STS

<222> (2230)..(2236)

20

<220>

<221> STS

<222> (2449)..(2457)

25

<220>

<221> STS

<222> (2490)..(2496)

30

<220>

<221> gene

<222> (2737)..(2766)

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 265 232 B1

<400> 1

```

5      gacttcaacc ttattagtga atggacaata aaggttataa gctcctttac tgtgaaagcc 60
      caccagtaac atcaccttgc ttatatcatt cagcttcttt ctagtaacat ttggaaagtg 120
      ttataacag aaaaaaaccc aaaaactctg aaaagactca cacttttctt atctccagtc 180
      cacctctcaa aaggaacaat ttcttccagc ttcttggttg gacacctggt gagcacatat 240
      gctgcagtgg caacagtttc tccccacaaa gtggttaggaa gcttcttctc ctccagcatg 300
10     ttctttgtca tatcaagcaa agttcggttt tcaacaagac cattatggtg aggagtatat 360
      ggatcagtcg ctccatgctc aattccattc tctttacaga acttcttgaa ctctgtagag 420
      ttatactcac ctccaccatc agttctgaga atcttcagaa gtctgaccac tttatctctc 480
      agccttgatt atgaatttct taaattcagc aaacacctcg tgtttgaatt ttataagggg 540
      tacccatgtc atctttgtga actcatccat aaatgacata aagtattatt cctctcctagt 600
15     gaaaggtttg taatgggcca cacacataag aatgcactac tcttaaagca tgttttgctc 660
      tttgagctac ttttgatgaa aatggcagtc ttggttgctt ccttttcatg cacacattac 720
      atgacttttt tggtttctta attgtaggaa ttccacgtac cagtttcttt gaattcaaat 780
      tcctaagct cctaaagtcc aatgaccaa atcttttgtt ccacaactca ctttccctca 840
20     caacacttgt tgcgctaagg cattcagagt ctgcagtttt aacattcggc ttgaatgttt 900
      tactccttcc atgttctgac tccataatca acttctgata acagtcatac agcttcaaaa 960
      gaatgtcatt catggttaact ggaaatccct tttcaattaa ttgacctaca ctcatcagat 1020
      tgetcttcat gccagaagcg taccaagacg ttctgaatta atgcagattt tctattattc 1080
      ataatcactc taacattccc cattccttta gcatttagtt acttatcctc agcacatcta 1140
25     atcttggttt tcttctaga gtcaaaatca accagccatt tcttatttcc agtatgatgg 1200
      tttgaacaac cagtgtccat atatcaccag tcttctatag acgcactatc ataactagaa 1260
      gccathtaata gcacatgttc atcatggtgc tcagatcctt agaatgttca attgtcaca 1320
      cgatgtaatc aaactgatga gtaagagatc taagtacctt ctcaatgata ctttccctcat 1380
30     aaagagtttc tccatgcgac ttcatctcat ttgtgatcag aatcactcta gagatgtagt 1440
      cagataactt ctcatgttcc ttcatgctta gattctcata ctgctcacgt agagactgaa 1500
      gtttcacctt ctacactgat gcactactat cgtagcacca caccagtctg tctcacacaa 1560
      ccttttccgt cattgaaatc acgattttct taaacaggtt cacatccaca cactgatgga 1620
35     tgtagaacaa cgcattctga tcttcttcc tcatatcaca ctgagcattt ctttgcgcat 1680
      ccgttgcatt ttctagaagt gaagcataaa ctctggtgat gagatcaaga acatcttgag 1740
      caccaataaa cacacacatc tgaatcatcc aacgattcca gttgttgctg tcgaacaatg 1800
      gnagcntggt gcacagattc acaacgatat attataantt ttgttttatg aaatttaaga 1860
40     acaaatttcc attattctta aaatgtttac acactgatgt agactgcaaa aggaataaag 1920
      atacaatttg ttcacaccac tcaactgctg aaatataagt gagagttaat gagaaatact 1980
      aaaataccct ctaaaattat gaattaattc taacaatctc taatgtagt ataatccatt 2040
      aaacactttg atggcaggta taacaagggt gtaagtagt gtatacatat taggctctta 2100
      ttatftttat attatctctg cttttcttct tcatgttctc actaatatga tattatctcc 2160

45     cttccctaaa ttatttatat ttattagaaa aagagtttca ttttttaaaa atatattacc 2220
      gtaatftttc aaaaaataaa atttaaatat attttataaa aaaattattt aataatttat 2280
      ttacattaat gcataaatat aaataaatac tgtcatttaa tatttaacct tttaacaata 2340
      aatttatatt atttaattca actaatataa gctaagttat ctcatccaac caattaaaaa 2400
50     gatcatttga aaataccttt ttatttagtt tgtggcggtt tcaactgtca aaaaaaagga 2460
      atttttacga cgatataaat ttaaaccagc aaaaaattga agcagttaag cgaaccaact 2520
      catggtatgt ggatatattt atctttgtcg tttatatcgg attcgaatct ctataatgat 2580
      gaaaaattaa tatcaaactt taataagaa cgtcatttat agagccattt tgggaaacac 2640
55     atatttcatg tacacgtgat tcgcaaatc ccaataactc tatatatagc cctcctcagt 2700
      ttcatgcatt tgetcacaac ataaccttcc ttgaattcga tatctaccta agatgacaaa 2760
      accagg
  
```

60 <210> 2

<211> 2736

<212> ADN

65 <213> *Pisum sativum*

ES 2 265 232 B1

<400> 2

```

5      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
10     ggatcagtca cttcatgctc aattccatcc tctttacaga acttcttgaa ctctgtagag 420
      ttatactcac ctccaccatc agttctgaga atcttcagaa gtctgaccac tttatttctc 480
      agccttgatt atgaatttct taaattcagc aaacacctcg tgtttgaatt ttataaggga 540
      taccatgctc atccttgtga actcatccat aatgacata aagtattatt cctcctagt 600
15     gaaaggtttg taatgggcca cacacataag aatgcactac tcctaaagca tgttttgcctc 660
      tttgagctac ttttgatgaa aatggcagtc ttggttgctt ccctttcatg cacacattac 720
      atgacttttt tggtttctta attgtaggaa ttccacgtac cagtttcttt gaattcaaat 780
      tcctaaagct cctaaagttc aaatgaccaa atcttttggt ccacaactca ctttccttca 840
      caacacttgt tgcgctaagg cattcagagt ctgcagtttt aacattcgcc ttgaatgttt 900
20     tactccttcc atgttctgac tccataatca acttctgata acagtcatac agcttcaaaa 960
      gaatgtcatt catggtaact ggaaatccct tttcaattaa ttgacctaca ctcatcagat 1020
      tgccttctat gccaagaacg taccaagacg ttctgaatta atgcagattt tctattattc 1080
      ataatcactc taacattccc gatccttcta gcatttagtt acttatcctc agcacatcta 1140
25     atcttggttt tcttcctaga ctcaaaatca accagccatt tcttatttcc agtatgatgg 1200
      tttgaacaac cagtgtccat atatcaccag tcttctatag acgcactatc ataactagaa 1260
      gccattaata gcacatgttc atcatggtgc tcagatcctt agaatgttca attgctacaa 1320
      cgatgtaatc aaactgatga gtaagagatc taagtacctt ctcaatgata ctttctctat 1380
      aaagagtttc tccatgagac ttcatctcat ttgtgatcag aatcactcta gagatgtagt 1440
30     cagataactt ctcatgttcc ttcatgctta gattctcata ctgctcacgt agagactgaa 1500
      gtttcacctt ctacactgat gcatcactat cgtagcacca caccagtctg tctcacacaa 1560
      ccttttccgt cattgaatca acgattttct taaacacggt cacatccaca cactgatgga 1620
      tgtagaacaa cgcattctga tccttcttcc tcatatcaca ctgagcattt ctttgagcat 1680
35     ccgttgcatt ttctagaagt gaagcataaa cttcgttgat gagatcaaga acatcttgag 1740
      caccaaataa cacacacatc tgaatcatcc aacgattcca gttgttgctg tcgaacaatg 1800
      gnagcntggg gcacagattc acaacgatat attataantt ttgttttatg aaatttaaga 1860
      acaaatttcc attattctta aaatgtttac acactgatgt agactgcaaa aggaataaag 1920
40     atacaatttg ttcacaccac tcacttgctg aaatataagt gagagttaat gagaaatact 1980
      aaaataccct ctaaaattat gaattaatc taacaatctc taatgttagt ataatccatt 2040
      aaacactttg atggcaggta taacaagggt gtaagttagt gtatacatat taggctctta 2100
      ttatttttat attatctctg cttttcttct tcatgttctc actaatatga tattatctcc 2160
45     cttccctaaa ttatttatat ttattagaaa aagagtttca ttttttaaaa atatattacc 2220
      gtaatttttc aaaaaataaa attttaatat attttataaa aaaattattt aataatttat 2280
      ttacattaat gcataaatat aaataaatac tgtcatttaa tatttaacct tttaacaata 2340
      aattatattt atttaattca actaatataa gctaagttat ctcatccaac caattaaanaa 2400

50     gatcatttga aaataccttt ttatttagtt tgtggcgggt tcaactgtca aaaaaagga 2460
      atttttacga cgatataaat ttaaaccagc aaaaaattga agcagttaag cgaaccaact 2520
      catggatagt ggatatattt atctttgctg tttatatcgg attcgaatct ctataatgat 2580
      gaaaaattaa tatcaactt taaataagaa cgtcatttat agagccattt tgggaaacac 2640
55     atatttcatg tacacgtgat tcgcaaattt ccaataactc tatatatagc cctcctcagt 2700
      ttcatgcatt tgctcacaac ataaccttcc ttgaat 2736

```

60 <210> 3

<211> 2731

<212> ADN

65 <213> *Pisum sativum*

ES 2 265 232 B1

<400> 3

```

5      gacttcaacc ttattagtga atggacaata aaggttataa gctcctttac tgtgaaagcc 60
      caccagtaac atcaccttgc ttatatcatt cagcttcttt ctagtaacat ttggaacgtg 120
      ttataaacag aaaaaaaccc aaaaactctg aaaagactca cacttttctt atctccagtc 180
      cacctctcaa aaggaacaat ttccttcagc ttcttgggtg gacacctggt gagcacatat 240
      gctgcagtgg caacagtttc tccccacaaa gtgttaggaa gcttcttctc cttcagcatg 300
      ttccttgtca tatcaagcaa agttcggttt tcaacaagac cattatggtg aggagtatat 360
10     ggatcagtca cttcatgctc aattccattc tctttacaga acttcttgaa ctctgtagag 420
      ttatactcac ctccaccatc agttctgaga atcttcagaa gtctgaccac tttatttctc 480
      agccttgatt atgaatttct taaattcagc aaacacctcg tgtttgaatt ttataagggg 540
      taccatgctc atccttgtga actcatccat aaatgacata aagtattatt ccctcctagt 600
15     gaaagggttg taatgggcca cacacataag aatgcactac tcctaaagca tgttttgctc 660
      tttgagctac ttttgatgaa aatggcagtc ttgggtgctt ccctttcatg cacacattac 720
      atgacttttt tgggttctta attgtaggaa ttccacgtac cagtttcttt gaattcaaat 780
      tcctaagct cctaaagttc aatgaccaa atcttttggt ccacaactca ctttccttca 840
      caacacttgt tgcgctaagg cattcagagt ctgcagtttt aacattcgcc ttgaaatggtt 900
20     tactccttcc atgttctgac tccataatca acttctgata acagtcatac agcttcaaaa 960
      gaatgtcatt catggtaact ggaaatccct tttcaattaa ttgacctaca ctcatcagat 1020
      tgctcttcat gccagaacg taccaagacg ttctgaatta atgcagattt tctattattc 1080
      ataactactc taacctccc cattccttta gcatttagtt acttatcatc agcacatcta 1140
25     atcttgggtt tcttctaga gtcaaaatca accagcatt tcttatttcc agtataggg 1200
      tttgaacaac cagtgtccat atatcaccag tcttctatag acgcactatc ataactagaa 1260
      gccattaata gcacatgttc atcatggtgc tcagatcctt agaatgttca attgctacaa 1320
      cgatgtaatc aaactgatga gtaagagatc taagtacctt ctcaatgata ctttctcat 1380
      aaagagtffc tccatgagac ttcattctcat ttgtgatcag aatcactcta gagatgtagt 1440
30     cagataactt ctcatgttcc ttcattgctta gattctcata ctgctcacgt agagactgaa 1500
      gtttcacctt ctacactgat gcactactat cgtagcacca caccagtctg tctcacacaa 1560
      ccttttccgt cattgaaatc acgattttct taaacacggt cacatccaca cactgatgga 1620
      tgtagaacaa cgcattctga tcttcttcc tcatatcaca ctgagcattt ctttgcgcat 1680
35     ccgttgcat tcttagaagt gaagcataaa ctctgttgat gagatcaaga acatcttgag 1740
      caccaaataa cacacacatc tgaatcatcc aacgattcca gttgttgcg tcgaacaatg 1800
      gnagcntggt gcacagattc acaacgatat attataantt ttgttttatg aaatttaaga 1860
      acaaatffc attattctta aaatgtttac aactgatgt agactgcaaa aggaataaag 1920
40     atacaatttg ttcacaccac tcaactgctt aaatataagt gagagttaat gagaaatact 1980
      aaaataccct ctaaaattat gaattaattc taacaatctc taatgttagt ataattcatt 2040
      aaacactttg atggcaggta taacaagggg gtaagttagt gtatacatat taggctctta 2100
      ttatTTTTat attatctctg cttttcttct tcatgttctc actaatatga tattatctcc 2160
      cttccctaaa ttattttatat ttattagaaa aagagtttca ttttttaaaa atatattacc 2220
45     gtaatttttc aaaaaataaa atttaaatat attttataaa aaaattattt aataatttat 2280
      ttacattaat gcataaatat aaataaatac tgtcatttaa tatttaacct tttacaata 2340
      aattatattt attttaattca actaatataa gctaagttat ctcatccaac caattaaana 2400
      gatcatttga aaataccttt ttatttagtt tgtggcgggt tcaactgtca aaaaaagga 2460
      atttttacga cgatataaat ttaaacagc aaaaaattga agcagttaag cgaaccaact 2520
50     catggtatgt ggatatattt atctttgtcg tttatatcgg attcgaatct ctataatgat 2580
      gaaaaattaa tatcaaactt taaataagaa cgtcatttat agagccattt tgggaaacac 2640
      atatttcatg tacacgtgat tcgcaaat tccaataactc tatatatagc cctcctcagt 2700
55     ttcatgcatt tgctcacaac ataaccttcc t 2731

```

<210> 4

<211> 336

60 <212> ADN

<213> *Pisum sativum*

65

ES 2 265 232 B1

<400> 4

```
5   gatcatttga aaataccttt ttatttagtt tgtggcggtt tcaactgtca aaaaaaagga 60
    atttttacga cgatataaat ttaaaccagc aaaaaattga agcagttaag cgaaccaact 120
    catgggatgt ggatatatgt atctttgtcg tttatatacgg attcgaatct ctataatgat 180
    gaaaaattaa tatcaaacct taaataagaa cgtcatttat agagccattt tgggaaacac 240
    atatttcatg tacacgtgat tcgcaaattt ccaataactc tatatatagc cctcctcagt 300
10  ttcatgcatt tgctcacaac ataaccttc ttgaat 336
```

<210> 5

15 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220> ADN sintético

<223> oligo Ribo I diseñado para amplificar el fragmento *barnasa-barstar*

<400> 5

25

taggatcccg accatggcac aggttatc

18

<210> 6

30 <211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220> ADN sintético

<223> oligo Inhi II diseñado para amplificar el fragmento *barnasa-barstar*

<400> 6

40

gcgagctctt aagaaagtg atggtgatg

19

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 265 232

② Nº de solicitud: 200401761

③ Fecha de presentación de la solicitud: 17.07.2004

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MAZZUCATO A. et al. "The parthenocarpic fruit (pat) mutant of tomato (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development". Development, 1998, 125, 107-104.	11
A		1-10
A	WO 0173088 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 04.10.2001	1-10
A	EP 578611 A1 (CIBA-GEIGY AG) 12.01.1994	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 nº:

Fecha de realización del informe

18.12.2006

Examinador

M. Hernández Cuéllar

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)