



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 319 842**

② Número de solicitud: 200700618

⑤ Int. Cl.:  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**C12N 15/29** (2006.01)  
**A01H 5/00** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **08.03.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.2009**

Fecha de la concesión: **27.01.2010**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.02.2010**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**16.02.2010**

⑲ Titular/es:  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
c/ Serrano, 117  
28006 Madrid, ES  
Universidad Politécnica de Valencia**

⑳ Inventor/es: **Cañas Clemente, Luis Antonio;  
Medina Herranz, Mónica;  
Roque Mesa, Edelín Marta;  
Castellbanque Soriano, Lourdes;  
Pineda Chaza, Benito;  
García-Sogo, Begoña;  
Moreno Ferrero, Vicente y  
Beltrán Porter, José Pío**

㉑ Agente: **Arias Sanz, Juan**

㉒ Título: **Procedimiento para modificar la arquitectura de la inflorescencia de las plantas.**

㉓ Resumen:

Procedimiento para modificar la arquitectura de la inflorescencia de las plantas.

El procedimiento comprende transformar material vegetal con una construcción génica que comprende un gen citotóxico bajo el control del promotor del gen PsEND1 de guisante, específico de anteras, regenerar las plantas y seleccionar las plantas transgénicas que exhiban una arquitectura de su inflorescencia modificada en comparación con la que presenta la correspondiente planta silvestre. La planta transgénica resultante presenta un patrón de ramificación más complejo, con mayor número de ramas y ramas de mayor orden, todas ellas productoras de flores. De aplicación en Agricultura, en particular, en la producción de plantas ornamentales.

ES 2 319 842 B1

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para modificar la arquitectura de la inflorescencia de las plantas.

5 **Campo de la invención**

La invención se relaciona, en general, con un procedimiento para modificar la arquitectura de la inflorescencia de las plantas, y, en particular, con un procedimiento para obtener plantas transgénicas que presentan una arquitectura de su inflorescencia modificada con respecto a la de las plantas silvestres correspondientes, basado en el empleo de una construcción que comprende un gen citotóxico bajo el control de un promotor específico de anteras. Las plantas transgénicas muestran una arquitectura de su inflorescencia más compleja y con mayor número de ramas que las plantas silvestres correspondientes. Dichas ramas inician y desarrollan un mayor número de meristemos florales que las silvestres.

15 **Antecedentes de la invención**

La arquitectura de las plantas, esto es su organización tridimensional, es una característica sometida a estricto control genético por lo que es específica de cada especie vegetal (Reinhardt, D. & Kuhlemeier, C. (2002). *Plant architecture*. *EMBO reports* 3:846-851). No obstante, se puede producir alguna modificación del patrón estructural básico por efecto de condiciones ambientales tales como la luz, la temperatura, la humedad o el estado nutricional de las plantas.

La arquitectura de la parte aérea de las plantas viene definida por el patrón de distribución de las hojas a lo largo del tallo o filotaxis, la determinación de los meristemos apicales del tallo, y por los patrones de ramificación de las partes vegetativas y de las partes reproductivas, este último factor también denominado arquitectura de la inflorescencia.

Las plantas producen ramas laterales a partir de los meristemos que se inician en las axilas de las hojas. El patrón de ramificación está condicionado por el patrón filotático del tallo de la planta. En muchas plantas, la iniciación de los meristemos axilares está, inicialmente, suprimida por el meristemo apical, fenómeno que se denomina dominancia apical. En el caso del maíz se sabe que la dominancia apical está mediada principalmente por el gen *TEOSINTE BRANCHEND1* (Doebley *et al.*, (1997). *The evolution of apical dominance in maize*. *Nature* 386:485-488). De hecho en el mutante *tb1* se desarrollan todos los meristemos axilares dando lugar a plantas muy ramificadas que muestran una arquitectura vegetativa nueva. Sin embargo, la estructura de la inflorescencia en cada una de las ramas que se desarrollan en el mutante no muestra proliferaciones florales, lo que sugiere que la arquitectura de la parte vegetativa y la arquitectura de la inflorescencia de las plantas están reguladas de forma diferente.

A nivel genético también están descritas mutaciones, tales como *lateral suppressor* en tomate, que dan lugar a la supresión de los meristemos axilares y que se pone de manifiesto por la producción de plantas de tomate sin ramas laterales (Schumacher *et al.*, (1999). *The Lateral suppressor (Ls) gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:290-295).

La transición floral afecta a la arquitectura de la planta de varias formas ya que se suelen producir cambios en la filotaxis además de los que afectan al destino y a la identidad de los meristemos. Muchas plantas tienen un meristemo apical del tallo que es indeterminado, esto es, permanece activo durante toda la vida de la planta diferenciando primero hojas y luego flores. Este patrón de crecimiento se denomina monopodial y es el característico de *Arabidopsis* o *Antirrhinum*.

El patrón de crecimiento monopodial en *Arabidopsis* se establece en distintas etapas: primero se forman metámeros vegetativos de tipo 1, formados por entrenudos muy cortos, una hoja y una yema, que se organizan en forma de roseta; y en segundo lugar, y previa transición floral, el tallo principal de la inflorescencia se compone al principio de metámeros de tipo 2, que tienen entrenudos alargados, una hoja caulinar y una yema, y después por metámeros tipo 3 que contienen entrenudos de longitud intermedia y una yema floral. Los meristemos axilares se detectan en el tallo, primero en las axilas de las hojas caulinares y posteriormente en las de las rosetas, una vez producida la transición floral. Dichos meristemos axilares forman tallos laterales inflorescentes con un patrón de desarrollo también monopodial (Alvarez *et al.*, (1992). *Terminal flower: a gene affecting inflorescence development in Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 2:103-116). Así, el número de meristemos axilares tiene un gran impacto y condiciona la arquitectura de la planta. La formación de meristemos axilares en *Arabidopsis* está controlada, en parte, por tres genes *R2R3* de la familia *Myb* denominados genes *RAX* (*REGULADORES DE MERISTEMOS AXILARES*) que son homólogos del gen *Blind* de *Solanum lycopersicon* (Müller *et al.*, (2006). *Blind homologous R2R3 Myb genes control the pattern of lateral meristem initiation in Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:586-597).

Otras plantas como las que pertenecen a la familia de las *Solanaceae*, caso del tomate, tienen un desarrollo determinado o simpodial, esto es el meristemo apical termina formando una flor y el desarrollo continúa a partir de los meristemos laterales (Schmitz, G. & Theres, K. (1999). *Genetic control of branching in Arabidopsis and tomato*. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2:51-559. En las *Solanaceae*, la arquitectura de las inflorescencias muestra mucha diversidad entre las especies. En general, el meristemo apical forma una flor terminal cuando se produce la transición floral. A partir de aquí, el tabaco, por ejemplo, inicia varias ramas simpodiales que consisten en una hoja o bráctea, un meristemo simpodial nuevo y una flor terminal, mientras que en tomate se inician sólo dos meristemos simpodiales de los cuales

el inferior forma tres hojas antes de florecer mientras que el superior se divide sucesivamente formando cada vez una flor terminal y un meristemo simpodial nuevo. Por su parte, en la petunia se inicia sólo una rama simpodial, la cual forma dos hojas y un meristemo simpodial nuevo (Huber, K.A. (1980). Morphologische and entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an Blüten and Blütenständen von *Solanaceae* und von *Nolana paradoxa* Lindl. (*Nolanaceae*). *Dissertationes Botanicae* 55: 1-252).

El análisis genético y molecular del control de la morfología de las inflorescencias ha desvelado algunas claves que determinan su arquitectura. En *Arabidopsis* se han caracterizado los genes *REV*, *KNATI* y *ERECTA* que son esenciales para determinar la arquitectura de la inflorescencia (Otsuga *et al.*, (2001). REVOLUTA regulates meristem initiation at lateral positions. *Plant Journal* 25:223-236; Douglas *et al.*, (2002). *KNATI* and *ERECTA* regulate inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14:547-558; Venglat *et al.*, (2002). The homeobox gene *BREVIPEDICELLUS* is a key regulator of inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 131:1491-1591). También se han caracterizado en arroz y maíz genes ortólogos de *CLAVATA1* de *Arabidopsis* que contribuyen al establecimiento de la arquitectura de la inflorescencia en dichas especies así como diversos genes que afectan a los patrones de ramificación vegetativos y reproductivos en *Arabidopsis* (*LAS*), tomate (*LS* y *BL*), arroz (*MOCI*) o maíz (*BIF2*) (Wang, Y. & Li, J. (2006). Genes controlling plant architecture. *Current Opinion in Biotechnology*. 17:1-7).

Recientemente, se han aislado varios genes que controlan la arquitectura de la inflorescencia en maíz (Vollbrecht *et al.*, (2005). Architecture of floral branch systems in maize and related grasses. *Nature* 436:1119-1126). En plantas de cosecha, la arquitectura de la inflorescencia puede condicionar la producción de semillas y la adecuación de la estrategia de recolección. En maíz, el patrón de ramificación de la inflorescencia parece estar controlado por los genes *RAMOSA* (Bortiri *et al.*, (2006). *Ramosa2* Encodes a LATERAL ORGAN BOUNDARY domain protein that determines the fate of stem cells in branch meristems of maize. *Plant Cell* 18:574-585). Recientemente, se ha caracterizado el gen *RAMOSA 3* que codifica para el enzima trealosa-6-fosfato fosfatasa y que se expresa en dominios discretos cercanos a los meristemos axilares. El gen *RAMOSA 3* podría controlar el patrón de ramificación de las inflorescencias del maíz modificando una señal de azúcar que alcanzaría a los meristemos axilares (Satoh-Nagasawa *et al.*, (2006). A trehalose metabolic enzyme controls inflorescence architecture in maize. *Nature* 441: 227-230). Estas hipótesis podrían constituir bases científicas de futuras aplicaciones biotecnológicas.

En conclusión, se sabe que la estructura tridimensional de las plantas está regulada a distintos niveles mediante procesos como la filotaxis, dominancia apical, determinación de meristemos y crecimiento diferencial de los tallos y de los órganos laterales. Mediante el análisis genético se han identificado proteínas reguladoras que controlan la identidad y determinación de los meristemos (Wang & Li, 2006, citado *at supra*). También se ha descrito la implicación de las hormonas vegetales en el control de la arquitectura de las plantas (Kuhlemeier, C. & Reinhardt, D. (2001). Auxin and phyllotaxis. *Trends Plant Sci.* 6:187-189; Schmitz & Theres, 1999, citado *at supra*; Booker *et al.*, (2005). *MAX1* encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of *MAX3/4* to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Dev. Cell* 8: 443-449; Ashikari *et al.*, (2005). Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* 309:741-745; Ueguchi-Tanaka *et al.*, (2005). *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1* encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437:693-698). No obstante, queda pendiente el establecer cómo interaccionan las proteínas reguladoras y las hormonas para acercarse a la comprensión sobre cómo el control del crecimiento a nivel celular conduce al establecimiento de la arquitectura de la planta genéticamente determinada (Woodward *et al.*, (2005). Interaction of auxin and *ERECTA* in elaborating *Arabidopsis* inflorescence architecture revealed by the activation tagging of a new member of the *YUCCA* family putative flavin monooxygenases. *Plant Physiol.* 139:192-203). Más lejana aparece la posibilidad de utilizar estos conocimientos para alterar la arquitectura de las inflorescencias de manera que se puedan diseñar plantas de cosecha u ornamentales con características mejoradas (Wang & Li, 2006, citado *at supra*).

Por otra parte, la disponibilidad de genotipos de plantas androestériles es crucial para la obtención de semillas híbridas y abre la posibilidad del manejo de las plantas de forma más respetuosa con el medio ambiente. En algunos cultivos, el uso de plantas androestériles evitaría la contaminación por polen o la transferencia horizontal de genes entre especies compatibles. En trabajos previos se han desarrollado herramientas biotecnológicas para la producción de plantas androestériles de interés agronómico mediante el uso de la región promotora del gen *PsEND1* de guisante (*Pisum sativum* L.) para dirigir la expresión de agentes citotóxicos específicamente a los tejidos estructurales de las anteras (WO 01/73088).

La ablación de anteras producida mediante transformación genética con genes citotóxicos que se expresan únicamente en las anteras, utilizando promotores específicos de algún tejido estaminal (como la región promotora del gen *PsEND1* citada anteriormente) ha permitido obtener plantas transgénicas androestériles y plantas transgénicas con androfertilidad restaurada en especies de importancia agronómica como maíz, colza o trigo. La ablación genética se basa en la inducción de la muerte celular mediante la expresión de cualquier enzima que sea capaz de destruir la integridad celular como proteasas, lipasas y ARNasas. Los mismos resultados se pueden obtener expresando sustancias tóxicas para las células, por ejemplo, péptidos que inactivan los ribosomas como la cadena A de la toxina (DT-A) de *Corynebacterium diphtheria*. También es posible la ablación de flores completas en plantas transgénicas en las que el gen que codifica D1-A se expresa bajo el control riel promotor del gen *LEAFY* (Nilsson, O., *et al.* (1998). Genetic ablation of flowers in transgenic *Arabidopsis*. *Plant J.* Vol. 15(6):799-804). Se han desarrollado métodos que no destruyen el tejido directamente, sino que dan lugar a células susceptibles a agentes ablativos específicos. Un ejemplo de esta estrategia es el uso de ARN "antisentido" de un gen que confiere tolerancia a un herbicida. El efecto del ARN

“antisentido” es eliminar la resistencia química de forma específica en polen, para que la aplicación del herbicida produzca la destrucción del mismo. Este método convierte a un herbicida en un gametocida.

La primera estrategia de ablación diseñada para producir androesterilidad fue propuesta por Mariani en 1990 (Mariani, C., *et al.* (1990). Induction of male sterility by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature*. Vol. 347:737-741). El promotor del gen *TA29* de tabaco, específico de *tapetum*, se usó para dirigir la expresión de dos ARNasas (ARNasa T1 de *Aspergillus oryzae* y barnasa de *Bacillus amyloliquefaciens*) en tabaco y *Brassica napus*. Las anteras transgénicas androestériles que se obtuvieron carecían de *tapetum* y sus sacos polínicos no producían microsporas ni granos de polen.

Por otro lado, la industria de la floricultura se esfuerza por conseguir nuevas y diferentes variedades de plantas ornamentales con características mejoradas que van desde la resistencia a patógenos/enfermedades a la modificación de la arquitectura de la planta, incluyendo la arquitectura floral (inflorescencias alteradas) o modificaciones en el color y en el número de flores. Las técnicas clásicas de mejora van dirigidas al cruce de plantas con características deseables para obtener híbridos que incorporen dichas características, o al empleo de hormonas para alterar el fenotipo de la planta. Sin embargo, la tecnología del ADN recombinante se ha convertido en la estrategia alternativa a la mejora clásica para desarrollar plantas con un fenotipo alterado y que presenten determinadas características mejoradas. En la solicitud de patente WO 02/45486, se emplean secuencias genéticas capaces de alterar el fenotipo de las plantas cuando dichas secuencias son incorporadas al genoma; en la patente norteamericana US 6.025.544, las plantas son modificadas genéticamente con secuencias de ácido nucleico que codifican para proteínas capaces de alterar el comportamiento floral: e incluso se puede llegar a alterar el color de las flores introduciendo secuencias de ADN que interfieran en la ruta de los pigmentos florales, tal como se describe en la solicitud de patente WO 94/28140, o alterar la arquitectura floral de las plantas de cultivo para generar plantas transgénicas más productivas (WO 02/079463). Todos estos esfuerzos están dirigidos a la producción de plantas transgénicas que exhiban unas características físicas deseables y apreciadas en la industria de la floricultura que incrementen el valor de mercado de las plantas en la industria de las plantas ornamentales.

Dada la complejidad de factores genéticos que intervienen en la determinación de la estructura tridimensional de las inflorescencias, los inventores se propusieron estudiar el posible efecto del bloqueo del desarrollo floral normal mediante la ablación biotecnológica de las anteras de las flores sobre el patrón de ramificación de las mismas.

### Compendio de la invención

La presente invención va dirigida a solventar la necesidad del sector de las plantas ornamentales de disponer de plantas con arquitecturas inflorescentes complejas que supongan un valor añadido por su vistosidad o por la mejora de los costes de producción.

El empleo de las técnicas de ADN recombinante para obtener plantas transgénicas con unas características deseables mejoradas es un recurso utilizado habitualmente en el estado de la técnica y conocido por el experto en la materia.

Ensayos previos realizados por los inventores utilizando unas construcciones génicas basadas en la expresión de un gen citotóxico bajo el control de un promotor específico de anteras, tal como el promotor del gen *PsEND1* de guisante, o un fragmento funcional del mismo, para obtener plantas androestériles, pusieron de manifiesto que las plantas que poseían androesterilidad presentaban una mayor complejidad en la estructura tridimensional de las inflorescencias. La modificación de la arquitectura de las inflorescencias en las plantas transgénicas parecía conllevar un aumento de la producción en el número de flores. Para comprobar que dicho fenómeno no era producto del azar, se procedió a transformar plantas de interés científico/agronómico tales como *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum*, con una construcción génica que contenía un gen citotóxico que produce androesterilidad. Los resultados obtenidos con *A. thaliana* y *N. tabacum* demostraron que la construcción génica empleada puede utilizarse en la obtención de plantas con una arquitectura de su inflorescencia modificada, de tal forma que se produce un aumento de la complejidad del patrón de ramificación de las plantas que conlleva a su vez un aumento en el número de ramas. Así, tal como se pone de manifiesto en el Ejemplo que acompaña a esta descripción mientras que las plantas silvestres de *A. thaliana* cv. Columbia empleadas en los experimentos muestran un patrón de ramificación en el que a partir del tallo principal se derivan ramas de primer orden y de éstas se derivan ramas de segundo orden tanto en las axilas de las hojas de roseta como en las de las hojas caulinares, en las plantas transgénicas se producen ramificaciones de primer, segundo, tercer y cuarto orden, tanto desde las axilas de las hojas de roseta como desde las de las hojas caulinares, como puede observarse esquemáticamente en los diagramas de las Figuras 7A y 7B.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de plantas transgénicas con una arquitectura de su inflorescencia modificada respecto de la que presenta la planta silvestre correspondiente que, entre otras etapas, comprende transformar una célula o tejido vegetal susceptible de ser transformado con una construcción génica que comprende un gen citotóxico bajo el control del promotor del gen *PsEND1*, o un fragmento del mismo con capacidad de regular específicamente la expresión génica de dicho gen citotóxico en anteras.

Además de obtener plantas más vistosas y con una reducción de los costes de producción de flores cortadas, las plantas transgénicas obtenidas por el procedimiento de la presente invención, al ser androestériles, tienen la ventaja adicional de que no producen dispersión horizontal de genes al no generar ni polen ni semillas, con lo que su autorización de uso a nivel de campo no supondría una dificultad.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una planta transgénica obtenible por el procedimiento descrito en la presente invención que presenta una arquitectura de su inflorescencia modificada en comparación con la de la planta silvestre correspondiente. En una realización particular, dicha planta transgénica presenta una arquitectura compleja, distinta, con mayor número de ramas y ramas de mayor orden, todas ellas capaces de producir flores, que la planta silvestre.

Además, en otro aspecto de la invención, se describe un procedimiento para producir flores que comprende cultivar una planta transgénica obtenida según el procedimiento anteriormente descrito bajo condiciones que permitan la floración y el desarrollo de flores.

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la representación esquemática de la construcción pBI-END1::barnasa-barstar y la construcción de partida pBI101-F3. El plásmido PBI101 consta del promotor constitutivo de la nopalina sintetasa (nos-pro) fusionado al gen *nptII* que confiere resistencia a kanamicina, el gen *uidA* que codifica la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) y la señal de poliadenilación del gen de la nopalina sintetasa (nos-ter) en los extremos 3' de ambos genes. En la construcción pBI101-END1::barnasa-barstar el gen *uidA* ha sido sustituido por el fragmento que contiene los genes barnasa-barstar. La utilización combinada de ambos genes se hace para evitar la acción citotóxica del gen *barnasa* en los microorganismos utilizados como vectores (*Agrobacterium*) ya que en dichos organismos la expresión del gen *barstar* (inhibidor de la barnasa) se realiza sin dificultad. Sin embargo, dicho gen no se expresa en la planta.

La Figura 2 muestra fotografías de plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres (Figura 2A) y plantas de *A. thaliana* transgénicas obtenidas según el procedimiento descrito en la presente invención (Figura 2B). Por otro lado, en la esquina superior derecha de la Figura 2C se muestran las flores presentes en las plantas de *Arabidopsis* silvestres (flor izquierda) y las flores mostradas en la plantas de *Arabidopsis* transgénicas (flor derecha). En el resto de la Figura 2C, se muestran dos plantas de *Arabidopsis*: una transgénica obtenida por el procedimiento de la invención (derecha) y otra silvestre (izquierda). Las plantas transgénicas muestran un mayor desarrollo que las silvestres, un mayor número de ramificaciones y un número mayor de flores cuando se comparan con las silvestres. Las flores de las plantas silvestres se fecundan y producen frutos (silicuas) deteniendo su crecimiento, mientras que las transgénicas no producen frutos y continúan produciendo flores. Las Figuras 2D y 2E muestran la disección longitudinal de una flor silvestre y una transgénica, respectivamente. En la flor silvestre se observa la presencia de anteras normales mientras que en la transgénica las anteras están sin desarrollar.

La Figura 3 muestra plantas de *Nicotiana tabacum* transgénicas obtenidas según el procedimiento de la invención y plantas de *N. tabacum* silvestres. En la Figura 3A se muestra una planta silvestre (izquierda) frente a dos plantas transgénicas según el procedimiento de la invención (centro y derecha). La Figura 3B muestra un detalle de las ramas de una planta transgénica de *N. tabacum* y la Figura 3C muestra la correspondiente planta silvestre. Las plantas transgénicas muestran un mayor desarrollo que las silvestres, un mayor número de ramificaciones y un número mayor de flores cuando se comparan con las silvestres. En la Figura 3D se puede observar cómo las flores de las plantas silvestres se fecundan y producen frutos (cápsulas) deteniendo su crecimiento (izquierda), mientras que las transgénicas no producen frutos y continúan produciendo flores que van senesciendo sobre las ramas sin fecundarse.

Las Figuras 4A y 4B muestran una antera de una planta silvestre de *N. tabacum* completa y una sección transversal de uno de sus sacos polínicos respectivamente observadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Se observa cómo contiene granos de polen en su interior. En las Figuras 4C y 4D se muestra una antera transgénica de *N. tabacum* mostrando sus sacos polínicos colapsados y una sección transversal de uno de ellos mostrando que no existen granos de polen en su interior respectivamente.

La Figura 5 muestra la secuencia de nucleótidos de la región 5' del gen de guisante *PsEND1*. Los posibles elementos reguladores dentro de la secuencia aparecen representados en diferentes colores en función del tipo de elemento regulador.

Las Figuras 6A y 6B muestran el número de ramas producidas en las plantas silvestres frente a las transgénicas (A) y el número de flores producidas en las plantas silvestres frente a las plantas transgénicas (B). En ambas gráficas el número 1 corresponde a plantas silvestres y el número 2 a plantas transgénicas.

Las Figuras 7A y 7B muestran un diagrama representativo del número de ramificaciones producidas en las plantas silvestres (A) y en las plantas transgénicas (B) de *A. thaliana*.

Las Figuras 8A y 8B muestran un diagrama representativo del número de flores producidas en las plantas silvestres (A) y en las plantas transgénicas (B) de *A. thaliana*.

### Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para obtener una planta transgénica con una arquitectura de su inflorescencia modificada respecto de la que presenta la planta silvestre (wt), que comprende:

## ES 2 319 842 B1

(a) transformar una célula o tejido vegetal susceptible de ser transformado con una construcción génica que comprende:

(i) una *primera secuencia de ácido nucleico* que comprende la secuencia de nucleótidos del promotor del gen *PsEND1*, o un fragmento del mismo con capacidad de regular específicamente la expresión génica de una segunda secuencia de ácido nucleico en anteras, y

(ii) una *segunda secuencia de ácido nucleico* que comprende la secuencia de nucleótidos de un gen citotóxico, o un fragmento funcional del mismo, bajo el control de dicha primera secuencia de ácido nucleico,

para producir una célula o tejido vegetal transformado,

(b) regenerar dicha célula o tejido vegetal transformado en la etapa (a) para producir una planta transgénica, y

(c) seleccionar las plantas transgénicas de la etapa (b) que exhiban una arquitectura de su inflorescencia modificada en comparación con la que presenta la correspondiente planta silvestre.

Tal como se utiliza en esta descripción, una “planta transgénica con una arquitectura de su inflorescencia modificada” respecto de la que presenta la planta silvestre se refiere a una planta transgénica capacitada para desarrollar un patrón de ramificación más complejo, que produce un mayor número de ramas y ramas de mayor orden, todas ellas capaces de producir flores, que la planta silvestre (wt) correspondiente gracias a la incorporación en su genoma de la construcción génica descrita en la presente invención; en general, dicha planta transgénica con una arquitectura de su inflorescencia modificada presenta un patrón de ramificación más complejo y es productora de mayor número de ramas y ramas de mayor orden, todas ellas productoras de flores, que la planta silvestre correspondiente. Asimismo, dicha planta transgénica no sólo es capaz de producir mayor número de ramas que la correspondiente planta silvestre, sino que dichas plantas transgénicas presentan un aumento en el número de flores producidas y en su vida media con respecto a las plantas silvestres. Mientras que las plantas silvestres senescen a los tres meses, las plantas transgénicas lo hacen transcurridos seis meses. En general, dicha planta transgénica posee una estructura tridimensional que le proporciona una apariencia más vistosa. En esta invención, una planta de interés es manipulada genéticamente para contener y expresar de forma estable y consistente un fenotipo que normalmente no está presente en las plantas silvestres. Dicho fenotipo consiste en un mayor número de ramas y ramas de mayor orden, todas ellas capaces de producir flores, y de flores que la planta silvestre.

Aunque prácticamente cualquier planta de interés puede ser manipulada genéticamente según la invención para obtener plantas transgénicas con una arquitectura de su inflorescencia modificada respecto de la que presenta la planta silvestre; en una realización particular, dicha planta es una planta ornamental. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas plantas de interés susceptibles de ser manipuladas genéticamente según la invención para obtener plantas transgénicas con una arquitectura de su inflorescencia modificada respecto de la que presenta la planta silvestre, incluyen plantas pertenecientes a los géneros *Aeschynanthus*: *Canna*: *Columnea*: *Anemone*: *Azalea*: *Begonia*: *Calceolaria*: *Camelia*: *Dianthus*: *Freessia*: *Gerbera*: *Hibiscus*: *Hypoestes*: *Kalanchoe*: *Nicotiana*: *Pelargonium*: *Petunia*: *Príkmula*: *Rannunculus*: *Rhipsalidopsis*: *Rosa*: *Saintpaulia*: *Sinningia-gloxinia*: *Streptocarpus*: *Tigridia*: *Verbena*: y *Zinnia*.

El procedimiento de la invención comprende la preparación de una construcción génica que comprende (i) una primera secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos del promotor del gen *PsEND1*, o un fragmento del mismo con capacidad de regular específicamente la expresión génica de una segunda secuencia de ácido nucleico en antenas, y (ii) una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de un gen citotóxico, o un fragmento funcional del mismo, bajo el control de dicha primera secuencia de ácido nucleico.

El promotor del gen *PsEND1* 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 *PsEND1* en los tejidos de la antera del guisante, en particular, en los tejidos que conforman los sacos polínicos de las antenas, 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 (tallos, hojas, raíces, etc.) o con semillas (cotiledones) resultaron negativos. Por tanto, el empleo de dicho promotor permite producir plantas transgénicas que expresen específicamente en la antera cualquier gen que se encuentre bajo su control.

La secuencia completa de nucleótidos del *pEND1* (región 5' del gen *PsEND1*) se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 1 y en la citada solicitud de patente WO 01/073088, así como en la Figura 5 que acompaña a esta descripción.

En una realización particular, el *pEND1* presente en la construcción génica comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 6, que comprende desde el nucleótido -2.736 hasta el nucleótido -6 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 5, que constituye la secuencia completa de dicho promotor.

## ES 2 319 842 B1

En otra realización particular, la construcción génica utilizada para transformar células o tejidos vegetales comprende un fragmento de pEND1 que comprende, al menos, la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7, que comprende desde el nucleótido -366 hasta el nucleótido -6 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 5. 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.

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 ADN 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 deleciones 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 el Ejemplo 1 de WO 01/073088.

La construcción génica utilizada para transformar células o tejidos vegetales comprende, además del 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.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “gen citotóxico” incluye a cualquier gen que codifica una proteína o actividad enzimática 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 barnasa de *Bacillus amyloliquefaciens*, etc. Los genes que codifican dichas proteínas pueden ser utilizados como genes citotóxicos en la construcción génica aquí descrita para la puesta en práctica de la presente invención.

No obstante, 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 *et al.*, (1990), citado *at supra*] 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. 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 génica utilizada para transformar células o tejidos vegetales según el procedimiento de la invención puede obtenerse por métodos convencionales utilizando técnicas ampliamente conocidas [Sambrook, J., *et al.*, 2001. Molecular cloning: a Laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3]. Dicha construcción génica 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 génica utilizada para transformar células o tejidos vegetales según el procedimiento de la invención puede ser insertada en el genoma de una célula o tejido vegetal por cualquier método apropiado para obtener células y tejidos vegetales 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 ADN 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 génica en células y tejidos vegetales. En una realización particular, dicha construcción génica es introducida, mediante el protocolo de infiltración a vacío.

La construcción génica aquí descrita puede emplearse para transformar cualquier célula o tejido vegetal susceptible de ser transformado. En una realización particular, dicha célula o tejido vegetal pertenece a una planta de tipo ornamental. Tal como aquí se utiliza, el término “planta ornamental” incluye a toda planta cultivada por su valor generalmente estético. Entre dichos valores estéticos se incluyen caracteres visualmente atractivos tales como flores o inflorescencias vistosas, coloridas o perfumadas. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas plantas ornamentales incluyen plantas pertenecientes a los géneros *Aeschynantus*: *Canna*; *Columnnea*; *Anemone*; *Azalea*; *Begonia*; *Calceolaria*; *Camelia*; *Dianthus*; *Freessia*; *Gerbera*; *Hibiscus*; *Hypoestes*; *Kalanchoe*; *Nicotiana*; *Pelargonium*; *Petunia*; *Príkmula*; *Rannunculus*; *Rhipsalidopsis*; *Rosa*; *Saintpaulia*; *Sinningia-gloxinia*; *Streptocarpus*; *Tigridia*; *Verbena*; y *Zinnia*. De acuerdo con la presente invención es posible obtener plantas transgénicas con valor ornamental mejorado, que presentan un mayor número de ramas y ramas de mayor orden, teniendo todas esas ramas la capacidad para producir flores, independientemente de su número.

La construcción génica puede estar incorporada en un vector que incluya un replicón procariótico, es decir, una secuencia de ADN capaz de dirigir la replicación autónoma y mantener la molécula de ADN 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.

5 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 génica utilizada para la puesta en práctica del procedimiento de la invención. Estos vectores son conocidos (US 6.268.552).

10 Entre los vectores de expresión capaces de expresar una secuencia de ADN 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* y varios otros sistemas de expresión conocidos que funcionan en plantas (véase, por ejemplo, WO 87/00551).

15 El procedimiento de la invención para obtener plantas transgénicas con una arquitectura de su inflorescencia modificada respecto de la que presenta la planta silvestre correspondiente comprende la introducción, en una célula o en un tejido de una planta, de la construcción génica previamente definida para producir una célula o un tejido vegetal transformado y generar una planta transgénica con una arquitectura de su inflorescencia modificada en comparación con la que presenta la planta silvestre mediante regeneración de dicha célula o tejido vegetal transformado, en donde dicha planta transgénica con una arquitectura de su inflorescencia modificada respecto de la que presenta la planta silvestre produce mayor número de ramas y ramas de mayor orden, todas ellas productoras de flores, que la planta silvestre correspondiente así como un mayor número de flores que la planta silvestre cuando se crece bajo condiciones que permiten la floración y desarrollo de las flores. La planta transgénica con una arquitectura de su inflorescencia modificada así obtenida presenta un patrón de ramificación más complejo y no sólo es capaz de producir mayor número de ramas que la correspondiente planta silvestre, sino que, además dichas ramas son capaces de producir flores y la planta presenta una vida media superior a la de las plantas silvestres.

20 La introducción de dicha construcción génica 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 ADN mediada por *A. tumefaciens*, preferiblemente con un vector T-DNA desarmado, electroporación, transferencia directa de ADN, bombardeo de partículas, etc.

25 Las técnicas para cultivar las células y tejidos vegetales transformados y regenerar las plantas transgénicas con una arquitectura de su inflorescencia modificada respecto de la que presenta la planta silvestre son bien conocidas en el estado de la técnica al igual que las condiciones de cultivo y crecimiento de dichas plantas transgénicas con el fin de producir un mayor número de flores.

30 Asimismo, los sistemas y agentes para introducir y seleccionar marcadores para comprobar la presencia de ADN heterólogo en células y/o tejidos vegetales son bien conocidos. Entre los marcadores genéticos que permiten la selección de ADN 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.

35 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.* (2001) [citado *at supra*] y Maniatis, T., *et al.*, (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

40 La presente invención permite obtener flores sin necesidad de tener que aplicar hormonas (giberelinas, auxinas, citoquininas, etc.) o productos agroquímicos. Por otro lado, una ventaja añadida del procedimiento de la invención radica en que permite obtener plantas no sólo más vistosas sino también incrementar la producción de flores cortadas, con lo que se consigue una reducción de los costes de producción. Asimismo, las plantas transgénicas así obtenidas poseen una mayor vida media de varios meses con respecto a las plantas silvestres.

45 El procedimiento proporcionado por esta invención supone la posibilidad adicional de que las plantas así obtenidas presenten androesterilidad en forma dominante. Una de las ventajas del procedimiento proporcionado por esta invención radica en que ofrece la posibilidad de disponer de plantas androestériles productoras de flores, con mayor número de ramas y ramas de mayor orden, capaces todas ellas de producir flores, que la planta silvestre, con lo que se evita la transferencia horizontal indeseada de genes al no producir ni polen ni semillas, lo que es especialmente relevante en su autorización de uso a nivel de campo, pues la transferencia horizontal de genes 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. Por otro lado, la disponibilidad de genotipos androestériles de plantas puede ser relevante para evitar la contaminación por polen en áreas urbanas o disminuir la producción de alérgenos polínicos.

**Ejemplo**

Obtención de plantas de *A. thaliana* y *N. tabacum* con una arquitectura de su inflorescencia modificada respecto de la especie silvestre mediante la ablación específica de anteras con el gen *barnasa* controlada por el promotor del gen *PsEND1* de guisante

**I. Materiales y métodos****1. Cultivo de plantas en cámara e invernadero**

Las especies vegetales empleadas en el ejemplo de la presente invención se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

*Plantas utilizadas en esta invención y su uso*

Planta	Variedad /ecotipo	Uso
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia (Col)	Expresión del transgén END1::barnasa
<i>Nicotiana tabacum</i>	cv. Petite Havana SR1	

Las muestras de los tejidos vegetales utilizadas en la presente invención para la extracción de ácidos nucleicos se recogieron directamente de la planta, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización. Las muestras destinadas a estudios de microscopia se fijaron para ser procesadas posteriormente.

**1.1 Cultivo de *A. thaliana*****1.1.1 Cultivo en alvéolos y macetas**

Las plantas de *Arabidopsis* se cultivaron en fitotrones bajo condiciones de crecimiento controladas de fotoperiodo y temperatura. La temperatura fue de 21°C y la iluminación procedía de tubos fluorescentes de luz blanca fría con una intensidad de 150  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$  (Sylvania Standard F58W/I33-T8). Las plantas se cultivaron bajo condiciones de fotoperiodo inductivo, que eran 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (día largo, DL) y de fotoperiodo no inductivo que fueron 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad (día corto, DC).

Las semillas se sembraron en alvéolos o en macetas dependiendo del posterior uso de las plantas generadas. Las semillas se sembraron en alvéolos de plástico de 6,5 x 6,5 x 5 cm para cultivos de día largo o día corto en una mezcla de turba: perlita: vermiculita (1:1:1). Se colocaron en bandejas dentro de cámaras de cultivo y se regaron por inmersión con solución de Hoagland número 1 suplementada con oligoelementos. Tras la siembra, las bandejas se cubrieron con plástico para mantener la humedad y evitar contaminaciones con otras semillas procedentes de plantas próximas. Se mantuvieron en oscuridad a 4°C durante 3 días a fin de sincronizar la germinación y al cabo de esos días se pasaron a cabinas.

Al aparecer el primer par de hojas aproximadamente o ver condensación en el plástico que las recubría, se agujereó el mismo en distintos puntos de la bandeja que fueron incrementándose hasta que se eliminó el plástico por completo al cabo de tres días.

La siembra en macetas se llevó a cabo en macetas de plástico de 11 cm de diámetro, para cultivos de DL o DC y se realizó el mismo proceso que para la siembra en alvéolos.

Para la evaluación del número de flores producidas en relación con las producidas por una planta sin transformar. Se sembraron un total de 78 semillas de *Arabidopsis thaliana*: 18 de las cuales pertenecían al ecotipo silvestre Columbia y, las 60 restantes eran semillas resultantes del cruce de líneas independientes *END1::barnasa* con plantas de genotipo silvestre. Las semillas fueron sembradas en alveolos de plástico de 6.5 x 6.5 x 5 cm en una mezcla de turba: perlita: vermiculita (1:1:1). Se colocaron en bandejas dentro de cámaras de cultivo y se regaron por inmersión en una solución de Hoagland número 1 suplementada con oligoelementos (Hewitt, Y. M. 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Farnham Royal, Bucks. Commonwealth Agricultural Bureaux.). Tras la siembra, las bandejas se cubrieron con plástico para mantener la humedad. Se mantuvieron en oscuridad a 4°C durante 72 horas a fin de sincronizar la germinación y al cabo de esos días se pasaron a cabinas. Al aparecer el primer par de hojas, se

## ES 2 319 842 B1

agujereó el plástico que recubría las bandejas y, terminó eliminándose por completo al cabo de tres días. Las plantas de *Arabidopsis* se cultivaron en fitotrones bajo condiciones de crecimiento controladas de fotoperiodo y temperatura. La temperatura fue de 21°C y la iluminación procedía de tubos fluorescentes de luz blanca fría con una intensidad de  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-2}$ . Las plantas se cultivaron bajo condiciones de fotoperiodo inductivo, que eran 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (día largo, DL).

### 1.1.2 Cultivo en cajas Petri

El cultivo *in vitro* de *Arabidopsis* en cajas Petri, se realizó en cabinas con temperatura constante de 25°C bajo condiciones de día largo (DL). La luz fue suministrada por tubos fluorescentes de tipo GroLux 36 W (Sylvania) con una intensidad de  $90 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-2}$ .

Las semillas se esterilizaron por inmersión durante 3 minutos en una solución de etanol 70% (v/v) y 0,005% Tritón X-100. Durante este tiempo, las semillas se mezclaron con la solución anterior moviendo el tubo que las contenía. Posteriormente, se eliminó la solución y se añadió etanol 96% agitando durante 1 minuto. Inmediatamente después las semillas con el etanol se colocaron en papel de filtro estéril hasta que se secaron. Para la selección de transformantes primarios, las semillas esterilizadas (30 mg de semillas aproximadamente) se repartieron uniformemente en cajas Petri de 15 cm de diámetro que contenían medio de selección con kanamicina [2,2 g/l de sales MS (medio de cultivo Murashige v Skoog) (Duchefa), 20 g/l sacarosa, 0,1 g/l MES (ácido morfolinoetano sulfónico) pH 5,9, 0,6% agar (Pronadisa), 50 mg/l kanamicina, 300 mg/l timentina]. Las cajas con las semillas se almacenaron durante tres días a 4°C en oscuridad tras los cuales se trasladaron a una cabina de cultivo *in vitro*. Al cabo de 7-10 días de la siembra de los transformantes que se distinguían por su color verde y raíz elongada, se transplantaron con ayuda de pinzas a alvéolos de plástico.

### 1.2 Cultivo de *N. tabacum*

#### 1.2.1 Cultivo en macetas

Las plantas de tabaco provenientes del cultivo *in vitro* se cultivaron individualmente en macetas de plástico de 13 cm de diámetro que contenían una mezcla de turba:vermiculita (1:1) previamente esterilizada, en una cabina de invernadero bajo condiciones controladas y 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 número 1 aportada mediante un sistema de riego por goteo automatizado durante 2 minutos, 4 veces al día.

#### 1.2.2 Cultivo en cajas Petri

El cultivo *in vitro* de tabaco se realizó en cabinas con temperatura constante de 25°C, bajo condiciones de fotoperiodo de día largo (16 horas de luz y 8 horas 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).

Las plantas resistentes a kanamicina (transformantes primarios, T1) cuyo cultivo se había iniciado en cajas Petri, fueron posteriormente transplantadas a alvéolos de plástico de 6,5 x 6,5 x 5 cm con una mezcla de turba:vermiculita (1:1). Estos cultivos permanecieron cubiertos con un plástico transparente, en el que progresivamente se fueron haciendo agujeros a fin de evitar una excesiva condensación de agua durante 9 días. Tras el período de aclimatación, las plántulas se transplantaron a macetas individuales, donde se cultivaron en cabinas de invernadero bajo condiciones controladas de temperatura y fotoperiodo.

## 2. Cultivo de microorganismos

Los microorganismos empleados en el ejemplo de la presente invención se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

*Cepas bacterianas utilizadas en la presente invención*

<i>Cepa</i>	<i>Referencia / origen</i>	<i>Uso</i>
DH5α ( <i>E. coli</i> )	Hanahan (1983)	Transformación de bacterias
C58 pMP90 ( <i>A. tumefaciens</i> )	Koncz y Schell (1986)	Transformación de plantas
LBA4404 ( <i>A. tumefaciens</i> )	Hoekema <i>et al</i> (1983).	Transformación de plantas

- Hananhan, D. (1983). Studies of transformation of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. Vol. 166: 557-560.
- Koncz, C., Schell, J. (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. Mol. Gen. Genet. Vol. 204: 383-396.
- Hoekema, A., *et al.*, (1993). A binary plant vector strategy based on separation of *vir* and T region of *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. Nature. Vol. 303: 179-180.

## 2.1 Condiciones de cultivo de microorganismos

Los cultivos líquidos de bacterias de *E. coli* y *A. 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.

## 2.2 Medio de cultivo de microorganismos

El medio utilizado para el crecimiento de los microorganismos fue:

- Medio LB (medio Luria-Bertani): 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).

## 3. Manipulación de ácidos nucleicos

## 3.1 Clonación

Las donaciones se hicieron en diferentes plásmidos en función de la procedencia de los fragmentos de ADN y de los fines requeridos.

1. Los productos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se clonaron en el plásmido pGEM-T Easy (Promega), que contiene un sitio de clonación específico para productos de PCR con una adenina libre en los extremos 3'.

2. El plásmido pBI101 [Vancanneyt, G., *et al.*, (1990). Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. Mol. Gen. Genet. Vol. 220(2):245-50] fue empleado para la obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis* y tabaco mediante la transformación con *Agrobacterium tumefaciens*. Este plásmido contiene el gen *nptII* que ofrece resistencia a la kanamicina y el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa que permitió realizar análisis histoquímico de las plantas transformadas. El plásmido pBI101 se utilizó llevar a cabo la expresión del transgén END1:: barnasa en las dos plantas citadas.

## ES 2 319 842 B1

### 4. Reacciones enzimáticas

#### 4.1 Reacciones de ligación

5 Las reacciones de ligación se realizaron manteniendo una proporción molar entre vector e inserto de 1:2 en el caso del plásmido pGEM-T Easy (Promega) y de 1:5 en el caso del vector pBI101. El volumen final de las reacciones fue de 10 ó 20  $\mu$ l. Este volumen incluía el volumen de vector/inserto, 1 unidad de ADN ligasa del fago T4 (Roche Molecular Biochemicals) y el tampón de ligación (MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 1 mM, ATP 1 mM, Tris-HCl 66 mM pH 7,5). Las reacciones de ligación se realizaron a 4°C durante toda la noche en el caso de utilizar el plásmido pGEM-T Easy y a 16°C durante toda la noche en el caso de utilizar pBI101.

#### 4.2 Digestión con enzimas de restricción

15 Para cada enzima de restricción se utilizó el tampón y las condiciones recomendadas por las distintas casas comerciales. Las digestiones se llevaron a cabo en tubos de 1,5 ml con 5-10 u/ $\mu$ g ADN, durante al menos 3 horas a la temperatura óptima para cada enzima.

#### 4.3 Defosforilación de extremos cohesivos (5' protuberantes)

20 Las reacciones de destoslorilación se realizaron con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP, Boehringer Mannheim). Las reacciones se llevaron a cabo mezclando 5  $\mu$ g de vector plasmídico linearizado, 10  $\mu$ l de tampón 10x (0,5 M Tris-HCl, EDTA 1 mM, pH 8,5), CIP 0,5 u/ $\mu$ g ADN y H<sub>2</sub>O hasta completar un volumen de 100  $\mu$ l. La mezcla se incubó 30 minutos a 37°C, añadiendo nuevamente 0,5 u/ $\mu$ g ADN CIP tras ese tiempo e incubando de nuevo 30 minutos a 37°C. La reacción se paró con 2  $\mu$ l de EDTA 0,5 M por cada 100  $\mu$ l de volumen total de reacción, calentando 20 min a 70°C. La solución se extrajo 2 veces con fenol/cloroformo, se precipitó con 1/10 v acetato sódico (NaOAc) 3 M pH 5,2, 2,5 v etanol (EtOH) absoluto y 1  $\mu$ l de glicógeno (Boehringer Mannheim) y el precipitado de ADN se resuspendió en un volumen adecuado (unos 15  $\mu$ l) procediendo a su cuantificación mediante electroforesis en gel de agarosa.

#### 4.4 Amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

30 Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar fragmentos de ADN que posteriormente serán ligados a los vectores plasmídicos.

35 Las reacciones de amplificación de ADN plasmídico, se llevaron a cabo en un volumen total de 50  $\mu$ l, a partir de 10-50 ng de ADN molde, 1  $\mu$ M de cebadores específicos del fragmento a amplificar o del plásmido donde éste se encontraba donado, dN<sub>4</sub>TPs 200  $\mu$ M, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,3 y 2,5 unidades de polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa, Roche Molecular Biochemicals).

40 Para la amplificación del fragmento que contenía los genes *barnasa* y *barstar* insertados en el genoma de plantas transgénicas, se llevó a cabo la reacción de PCR usando los cebadores Ribo 1 e Inhi 2 (Tabla 3). Estas reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 20  $\mu$ l, a partir de 50-100 ng de ADN genómico, 0,6  $\mu$ M de cebadores específicos, dN<sub>4</sub>TPs 200  $\mu$ M, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,3, 2,5 unidades de polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa, Roche Molecular Biochemicals). Las reacciones se desarrollaron en un termociclador Perkin Elmer 2400 en las siguientes condiciones: 1 ciclo a 94°C 2 minutos; 30 ciclos de 94°C 30 s; temperatura de anillamiento (T) en grados centígrados durante 30 s: 72°C T<sub>ext</sub> minutos, y 1 ciclo final a 72°C durante 10 minutos. En cada reacción la temperatura de anillamiento se estimó en función de la temperatura T<sub>m</sub> (temperatura de fusión estimada) de los cebadores empleados (Tabla 3): el tiempo de extensión utilizado dependía de la longitud del fragmento a amplificar: en general se utilizó 1 minuto por cada kb de producto esperado.

50 TABLA 3

Cebadores empleados en las amplificaciones por PCR reacciones de secuenciación (levadas a cabo en este trabajo)

Cebador	Secuencia (5' → 3') [SEQ ID NO]	ADN molde	Posición
Ribo 1	<i>TAGGATCCCGACCATGGCACAGGTTATC</i> [2]	Fragmento barnasa – barstar	-12 → 15
Inhi 2	<i>GCGAGCTCTTAAGAAAGTTGATGGTGATG</i> [3]	Fragmento barnasa – barstar	876 → 847
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC [4]	pGEM- T Easy (Promega)	3016 → 2099
SP6	GATTTAGGTGACACTATAGAATAC [5]	pGEM- T Easy (Promega)	158 → 136

65 Las secuencias en cursiva corresponden a los nucleótidos que no forman parte del ADN molde, y de ellas, las subrayadas, corresponden a las dianas de restricción introducidas para subclonar los ADNc en los plásmidos correspondientes.

## ES 2 319 842 B1

### 4.5 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Tras separar las muestras de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa/TBE (Tris-Borato: 0,045 M tris-borato; EDTA (sal disódica del ácido etilen diamino tetracético) 1 mM) las bandas de interés se cortaron del gel con una cuchilla y el ADN contenido en las mismas se purificó mediante el sistema QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La extracción y purificación de los fragmentos de ADN por este método se basa en la solubilización de la agarosa y la adsorción selectiva de los ácidos nucleicos en una membrana de silicagel, en presencia de una elevada concentración de sal. La elución del ADN se llevó a cabo en Tris-HCl 10 mM pH 8.

### 4.6 Secuenciación

La secuenciación de fragmentos de ADN donados se llevó a cabo según el protocolo de secuenciación enzimática desarrollado por Sanger *et al.*, (Sanger, F., Nicklen, S., Coulso, A. R. 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *PNAS*. USA. 74, 5463-5467) de modo automático en un secuenciador "ABI PRISM 377" (Perkin Elmer). Para ello, el ADN extraído según el protocolo de aislamiento y purificación de ADN plasmídico del sistema QIAGEN-tipl00 descrito en el apartado 5.1 se llevó a una concentración de 02  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , y se amplificó con Ampli Taq ADN polimerasa en presencia de ddNTPs, cada uno de ellos marcado con un fluoróforo diferente (Perkin Elmer). Se utilizaron los cebadores propios del vector plasmídico pGEM- T Easy, T7 y SP6.

## 5. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos

### 5.1 Aislamiento de ADN plasmídico en *Escherichia coli*

Para las preparaciones de ADN plasmídico a pequeña escala se utilizó el método de la lisis alcalina tal como se describe en Sambrook, J., *et al.*, (1989) [citado *at supra*], partiendo de un cultivo de 3 ml crecido durante una noche en medio líquido LB suplementado con el correspondiente antibiótico. Las preparaciones de ADN plasmídico a media o gran escala, se realizaron a partir de cultivos, crecidos durante una noche en 100 ml ó 500 ml de medio líquido LB suplementado con antibiótico, según el procedimiento de extracción y purificación de ADN plasmídico de los sistemas de Qiagen Plasmid Midi Kit (columnas Qiagen tip-100) y Qiagen Plasmid Maxi Kit (columnas Qiagen tip-500), respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 5.2 Aislamiento de ADN plasmídico de *Agrobacterium tumefaciens*

Para las preparaciones a pequeña escala de ADN plasmídico de *Agrobacterium* se utilizó el método de la lisis alcalina descrito por Sambrook, J., *et al.*, (1989) [citado *at supra*] con ligeras modificaciones. Se partía de un cultivo de 3 ml, crecido durante una noche en medio líquido LB suplementado con 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  kanamicina. Tras centrifugar el cultivo, el sedimento de células se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de solución I (glucosa 50 mM; Tris-HCl 50 mM (pH 8,0); EDTA 10 mM) tras lo cual se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de solución II (NaOH 0,2 N, 1% SDS) y se mezcló invirtiendo el tubo rápidamente. Posteriormente se añadió la solución III (60 ml de KAc 5 M; 11,5 ml de ácido acético glacial; 28,5 ml de agua) y se mezcló usando el vortex. Tras 5 minutos en hielo se procedió a centrifugar la muestra a 12.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Al sobrenadante resultante de la centrifugación se le añadieron 900  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto y se incubó 30 minutos a -80°C. Tras centrifugar a 12.000 rpm, 5 minutos a temperatura ambiente, el precipitado se lavó con etanol 70%, se secó y se resuspendió en 25  $\mu\text{l}$  de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM).

La pureza de la preparación de ADN obtenida por este procedimiento no fue suficientemente alta como para realizar un análisis de restricción del plásmido. Para solventar este problema, una alícuota de 1  $\mu\text{l}$  de esta preparación de ADN 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 ADN plasmídico que se empleó en los análisis pertinentes.

## 6. Transformación de bacterias

Las cepas que se emplearon en las transformaciones fueron la DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* y las cepas *Agrobacterium tumefaciens* C58 pMP90 (Koncz y Schell, 1986) y LBA4404 (Hoekma *et al.*, 1983) [ambas citadas *at supra*].

### 6.1 Preparación de células competentes y 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, S., y Forde, B. G., (1989). Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. By high voltage electroporation. *Nucleic Acid Res.* Vol. 17: 4415, en el caso de *A. tumefaciens*.

Tras descongelar en hielo una alícuota de 40  $\mu\text{l}$  de células competentes preparadas mediante sucesivos lavados de glicerol, se añadió 1  $\mu\text{l}$  de vector transformante. La mezcla se introdujo en una cubeta de 0,1 cm de separación entre

## ES 2 319 842 B1

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  $\Omega$ , 25  $\mu$ F y 1,8 kV, para *E. coli*, y 400  $\Omega$ , 25  $\mu$ F y 1,8 kV, para *A. tumefaciens*. Después del pulso eléctrico se adicionó 1 ml de LB y se incubó 1 hora a 37°C y a 200 rpm para *E. coli*, y 3 horas a 28°C y a 200 rpm para *A. tumefaciens*.

### 6.2 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 suplementado con el antibiótico al cual confería resistencia el plásmido en estudio, y en el caso de que el plásmido permitiese la selección por color, se añadía 40  $\mu$ l (25 mg/ml) de IPTG y 25  $\mu$ l (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 Tabla 4.

TABLA 4

*Antibióticos utilizados y sus concentraciones*

Antibiótico	Concentración
Ampicilina	100 $\mu$ g/ $\mu$ l para <i>E. coli</i> .
Kanamicina	25 $\mu$ g/ $\mu$ l para <i>E. coli</i> . 50 $\mu$ g/ $\mu$ l para <i>A. tumefaciens</i> .

### 7. Diseño de la construcción pBI-END1::barnasa-barstar

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 *Arabidopsis* y tabaco, se realizó la construcción pBI-END1::barnasa-barstar.

Para ello se partió de la construcción pBI101-F3 [descrito en la solicitud de patente WO 01/73088] (Figura 1). Esta construcción contenía 2.731 pb de la región promotora de del gen *PsEND1* aislada del rastreo de una genoteca genómica de guisante. La región comprendía desde el fragmento -2.736 hasta el nucleótido -6 de la región 5', tomándose como nucleótido +1 el primer nucleótido del ADNc aislado previamente (clon 162) de una genoteca de ADNc de flores de guisante [Gómez, M.D., *et al.*, (2004). The pea END1 promoter drives anther-specific gene expression in different plant species. *Planta* Vol. 219: 967-981]. El fragmento -2.736/-6 de la región promotora del gen *PsEND1* estaba fusionado al gen *uidA* que codifica la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (GUS), (Gómez *et al.*, 2004) [citado *at supra*]. Este gen fue liberado con las enzimas de restricción *BamHI* y *SacI* y el fragmento correspondiente al plásmido pBI101 más el promotor del gen *PsEND1* fue extraído del gel de agarosa.

El fragmento barnasa-barstar previamente donado en el sitio *BamHI* del plásmido pBluescript KS (+) (Stratagene), fue amplificado utilizando los cebadores Ribo 1 e Inhi 2 [Tabla 3]. Con el primero se mantiene el sitio de corte para la enzima *BamHI* del clon original a nivel del ATG de la barnasa, y con el último se crea un sitio de corte para *SacI* 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 *BamHI* y *SacI*. Este inserto fue donado en el sitio que crearon estas mismas enzimas en la construcción pBI-END1, creándose así la construcción pBI-END1::barnasa-barstar (Figura 1).

### 8. Transformación y análisis de las plantas transgénicas

#### 8.1 Transformación de *Arabidopsis thaliana* y análisis de las plantas transgénicas

Para la transformación de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* se ha utilizado la planta silvestre del ecotipo *Columbia* (Col). La transformación se realizó siguiendo el protocolo de infiltración al vacío descrito por Bechtold (Bechtold, N., *et al.*, (1993). In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sci.* Vol. 316:1194-1199). Aproximadamente 60 semillas de *Arabidopsis* se cultivaron en macetas de 11 cm de diámetro. Transcurridas unas 2 semanas desde la siembra, se eliminaron algunas plantas con el fin de facilitar el crecimiento homogéneo y adecuado de la población. Una vez las plantas habían producido el escapeo floral, cuando la última hoja caulinar se había separado unos 2-3 cm del ápice de la inflorescencia

## ES 2 319 842 B1

principal (altura de las plantas de 9 a 11 cm), éste se decapitó para eliminar la dominancia apical e inducir así la proliferación de las inflorescencias laterales. El tiempo aproximado que transcurría desde la siembra hasta la decapitación era aproximadamente un mes y 5-6 días. Una vez decapitadas, las plantas se cultivaron unos 4 días más antes de la infiltración.

5

Tres días antes de la infiltración (día -3), se inoculó un tubo con 10 ml de medio LB, conteniendo 100 µg/ml de rifampicina y 50 µg/ml de kanamicina, a partir de un glicerinado con la cepa C58 pMP90 de *A. tumefaciens* (Koncz y Schell, 1986) [citado *at supra*] portadora de las construcciones de interés. Este se incubó durante toda la noche en oscuridad a 28°C con agitación de 200 rpm. Al cabo de este tiempo (día -2), se inoculó un matraz con 600 ml de medio LB con kanamicina (50 µg/ml) con los 10 ml del precultivo anterior y se incubó en las mismas condiciones durante 48 horas. El día de la infiltración (día 0) el cultivo se recogió por centrifugación y el sedimento con las bacterias se resuspendió en 200 ml de medio de infiltración (2.2 g/l sales MS (Duchefa). 5% sacarosa, 1 mg] 6-BAP (citoquina 6 benzil amino purina), 100 mg/l MES, pH 5,9). Antes de la infiltración, se les quitaron a las plantas todas las silicuas fertilizadas así como las flores abiertas. Para la infiltración a vacío, las macetas se invertían y se introducían en una fiambra que contenía los 200 ml de la suspensión de *Agrobacterium* en medio de infiltración, de manera que no sólo los ápices florales sino también las hojas de roseta quedaban sumergidos en el líquido. El montaje se colocaba en una campana de vacío conectada a una bomba (Bomba EDWARDS RV3, 110-120/220-240 V, 50-60 Hz, monofásica A652-01-903) y se sometía a vacío durante 30 minutos en posición de alto vacío y caudal bajo "posición I" (presión total final:  $3 \times 10^{-2}$  mbar, 3 Pa). El tiempo se empezaba a contar cuando la suspensión de *Agrobacterium* comenzaba a burbujear. Pasado el tiempo de infiltración se sacaban las plantas de la campana y se secaban ligeramente, escurriéndolas sobre un trozo de papel absorbente. Las plantas así tratadas se cubrían con bolsas de plástico y se devolvían a las cabinas de cultivo donde se les permitía que continuaran creciendo bajo las condiciones descritas en el apartado 1.1. Durante los 2-3 días siguientes a la infiltración se iban haciendo agujeros en las bolsas, con el fin de aclimatar las plantas a las condiciones de humedad habituales, hasta que éstas se eliminaban definitivamente. Las plantas se cultivaron hasta obtener semillas maduras.

25

Alternativamente a la transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* con el método de Bechtold *et al.*, (1993) [citado *at supra*], en algunas ocasiones se utilizó una versión modificada de este método basado en la utilización del detergente Silwet L.77 (LEHLE SEEDS). En el momento de la infiltración, las plantas se mantienen sumergidas durante 8 s en la suspensión de *Agrobacterium* en medio de infiltración a la que se le había adicionado dicho detergente hasta una concentración final de 0,05%; inmediatamente después, se les sometía a un pulso de vacío de 1 minuto utilizando las mismas condiciones que el procedimiento anterior. El tratamiento de las plantas antes y después de la infiltración, así como la preparación de los cultivos de *Agrobacterium*, fueron iguales al tratamiento descrito en el procedimiento anterior.

35

Cuando las silicuas de las plantas transformadas estuvieron maduras se recogieron las semillas, se guardaron en bolsas de celofán y se incubaron en una estufa a 37°C durante al menos una semana. Para la selección de los transformantes primarios ( $T_1$ ), las semillas procedentes de plantas individuales  $T_1$  se esterilizaron, se sembraron en cajas Petri de 15 cm de diámetro con medio de selección con kanamicina y se cultivaron en cabinas de cultivo *in vitro*. Después de 7-10 días desde la siembra, los transformantes eran claramente identificables por su color verde y sus raíces desarrolladas: en ese momento se transplantaron a alvéolos (6,5 X 6,5 x 5 cm) con una mezcla turba:vermiculita:perlita (1:1:1) y se trasladaron a un fitotrón para su cultivo bajo las condiciones descritas en el apartado 1.1.

40

Se analizó el fenotipo de la población correspondiente a la primera ( $T_1$ ) y segunda generación ( $T_2$ ) de plantas transformadas con la construcción pBI-END1::barnasa-barstar. Las plantas se fotografiaron con una cámara Nikon F-601 M, acoplada a una lupa MZ8 (Leica). Las anteras de las plantas END1::barnasa fueron fijadas y observadas por SEM (microscopía electrónica de barrido) y microscopía óptica. Para el análisis fenotípico de dichas plantas END1::barnasa de la generación  $T_2$ , se realizó un análisis de segregación del fenotipo androestéril para determinar el índice de la segregación del transgén para 4 líneas transgénicas independientes en función de la proporción de plantas estériles frente a plantas fértiles obtenidas. Para ello, las semillas provenientes del cruce de líneas independientes  $T_1$  con plantas silvestres, se sembraron en alvéolos individuales para cada una. Se observó el fenotipo de las plantas resultantes en cuanto a morfología de las anteras y formación de frutos para cuantificar el porcentaje de esterilidad de las plantas germinadas.

50

### 55 8.2. Transformación de *Nicotiana tabacum* y análisis fenotípico de las plantas transformadas

La transformación de plantas de *Nicotiana tabacum* se realizó siguiendo el método descrito por Horsh, R.B., *et al.*, (1984). Inheritance of functional foreign genes in plants. Science. Vol. 223: 496-498, con las modificaciones propuestas por Fisher y Gultinan (1995) [Fisher, D.K., Gultinan, J., (1995). Rapid, efficient production of homozygous transgenic tobacco plants with *Agrobacterium tumefaciens*: a seed to seed protocol. Plant Mol. Biol. Rep. Vol. 13: 278-289].

60

Se inoculó un tubo con 5 ml de medio LB. 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 100 µg/ml rifampicina y 50 µg/ml kanamicina a partir de un glicerinado con la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* portadora de la construcción de interés. Éste se incubó toda la noche en oscuridad a 28°C con agitación de 200 rpm. Al cabo de este tiempo, alícuotas de 500 µl de ese cultivo se utilizaron para inocular dos matraces de 250 ml con 50 ml de medio LB. 10 mM MgSO<sub>4</sub> y 50 µg/ml kanamicina que se incubaron en las mismas condiciones hasta que la DO<sub>600</sub> alcanzó un valor comprendido entre 0,5-0,6. El cultivo

65

## ES 2 319 842 B1

resultante se recogió por centrifugación y el sedimento con las bacterias se resuspendió en la mitad de volumen de medio MSS líquido [4,4 g/l sales MS (Duchefa), 2% sacarosa, 100 mg/l MES, pH 5,9].

Secciones de hoja de *Nicotiana tabacum* cv. Petite Havana SRI de 1 cm<sup>2</sup>, provenientes de plantas jóvenes (aproximadamente 4 semanas) propagadas en medio sólido MSS a partir de entrenudos, se sumergieron en la suspensión de *Agrobacterium*, dispuesta en una caja Petri de 9 cm de diámetro durante 10 minutos. A continuación, los discos foliares se sacaron de la suspensión de *Agrobacterium*, se escurrieron, se colocaron con el envés hacia arriba sobre medio sólido MSS (3,5 g/l phytigel) y se cocultivaros durante tres días a 25°C en oscuridad para facilitar la infección por *Agrobacterium*. Tras el cocultivo los discos foliares infectados se transfirieron a cajas con medio de regeneración y selección MSSABCK [medio MSS con 0,2 mg/l IAA (ácido indol acético), 2,2 mg/l 6-BAP, 400 mg/l carbenicilina (para inhibir el crecimiento del *Agrobacterium*) y 130 mg/l kanamicina (para seleccionar el crecimiento de las células que hubieran incorporado el ADN-T)].

Las placas con los explantes se incubaron en cabinas de cultivo *in vitro* a 25°C, bajo condiciones de fotoperiodo de día largo (ver apartado 1.2.2.), y cada 7-10 días se cambiaron a nuevas cajas con el mismo medio. Los brotes regenerados (uno de cada explante, para asegurar que se seleccionaban sucesos de transformación independientes) que iban apareciendo se cortaban evitando el callo y se transferían a frascos de 6 cm de diámetro por 9,5 cm de altura con medio de enraizamiento MSSACK (medio MSS sólido con 0,2 mg/l de IAA, 200 mg/l de carbenicilina y 130 mg/l de kanamicina). De cada brote enraizado, se aislaban dos entrenudos, cada uno con una hoja, que se transferían a frascos de medio MSSABCK, a partir de los cuales se regeneraban dos plantas completas. Una de ellas se utilizo para mantener una réplica en cultivo *in vitro*, mientras que la otra, una vez enraizada, se transfería a tierra. Para ello, los brotes enraizados se extrajeron de los fiascos, se les eliminó los restos de medio de las raíces, se transplantaron a macetas de 13 cm de diámetro con una mezcla de turba:vermiculita (1:1) y se trasladaron al invernadero, donde se cultivaron bajo las condiciones descritas en el apartado 1.2.1. El análisis fenotípico de la primera generación (T<sub>1</sub>) de plantas ENDI::barnasa se llevó a cabo mediante del análisis de la morfología de las anteras de estas plantas por medio de fotografías realizadas con una cámara Nikon F-601 M, acoplada a una lupa MZ8 (Leica) y mediante la observación de las anteras a través de SEM y microscopía óptica.

### 9. Preparación de muestras vegetales para microscopía electrónica de barrido (SEM)

#### 9.1 Fijación

Las muestras vegetales se introdujeron en p-formaldehído al 4% (p/v) en 1 XPBS pH 7,0 inmediatamente después de su recolección. Posteriormente, fueron sometidas a dos o tres pulsos de vacío de 3 minutos cada uno, se les cambió la solución fijadora por una fresca y se mantuvieron en ella durante toda la noche a 4°C. Tras el proceso de fijación de los tejidos se lavaron con 1 XPBS y se deshidrataron hasta etanol absoluto mediante una serie de lavados sucesivos de 30 minutos a 4°C en soluciones crecientes de etanol (15%, 30%, 50%, 70%, 85%, 96%, 100%). A partir de este punto, las muestras sufrieron un proceso distinto en función si fueron incluidas en parafina (Paraplast Plus, Sigma), resina (Historesin, Leica) o usadas para ser analizadas por microscopía electrónica de barrido.

#### 9.2 Punto crítico y análisis de las muestras

Las muestras almacenadas en etanol del 100%, se desecaron con CO<sub>2</sub> líquido en un aparato secador de punto crítico Polaron E300, se montaron en portaobjetos metálicos con cinta adhesiva de carbono activado sobre los que fueron orientadas y diseccionados convenientemente. Después del montaje, las muestras fueron recubiertas con un sombreado de partículas de oro-paladio de 200 nm, en atmósfera de argón ionizado en un Sputter Coater SCD005 (BALTEC).

Las imágenes se obtuvieron mediante el programa Autobeam de la plataforma ISIS (Oxford Instruments), con una velocidad de barrido de 200 s por imagen, en un microscopio electrónico de barrido JEOL.ISM-5410 operando bajo las condiciones de microanálisis de 10 kV y distancia de trabajo de 25 mm.

## II. Resultados

La característica más importante de las plantas androestériles de *Arabidopsis thaliana* y de *Nicotiana tabacum* obtenidas utilizando la tecnología anteriormente descrita, es el aumento de la complejidad del patrón de ramificación de sus inflorescencias que además del cambio en la vistosidad de las plantas conlleva la producción continuada de flores en comparación con una planta silvestre control, así como el alargamiento de su vida media. De hecho como se describe más arriba, los patrones de desarrollo de las inflorescencias de las plantas están determinados genéticamente aunque sujetos a la acción de factores ambientales. En *Arabidopsis* dicho patrón es de los definidos como monopodiales, tanto en su tallo principal como en las ramas laterales. La ablación biotecnológica de las anteras en *Arabidopsis* interfiere fuertemente el complejo sistema de control genético de la arquitectura de la inflorescencia, lo que se pone de manifiesto porque, aunque el patrón de desarrollo del tallo principal es monopodial, se retrasa en el tiempo el agotamiento de la producción de meristemas florales y el patrón de desarrollo de las ramas laterales de la inflorescencia adquiere características simpodiales, ya que se producen ramas inflorescentes de hasta cuarto orden tanto en las ramas adyacentes a las hojas de roseta como a las adyacentes a las hojas caulinares. Una posible explicación a este fenómeno

## ES 2 319 842 B1

sería el hecho de que mientras que las plantas silvestres producen un determinado número de ramas y de flores que tras su fecundación producen los correspondientes frutos, en las plantas androestériles al no producirse frutos no se produce alguna sustancia que debería interferir con el sistema genético y de señalización que controla la proliferación de los meristemos axilares. Las plantas transgénicas continuarían produciendo flores sin cesar, ya que la sacarosa u otras moléculas señalizadoras circulante en las mismas sigue llegando a los meristemos inflorescentes al no desviarse su uso hacia el desarrollo de los frutos producidos. De este modo, las inflorescencias de las plantas androestériles continuarían con un crecimiento indeterminado al no producirse una inhibición de este fenómeno por algún tipo de señalización procedente de los frutos en desarrollo (Hensel. L.L., *et al.*, (1994). The fate of inflorescence meristems is controlled by developing fruits in *Arabidopsis*. Plant Physiol. Vol. 106: 863-876).

### 1. Plantas androestériles de *Arabidopsis thaliana*

Las plantas transgénicas generadas mostraron desde la transición floral una serie de características que las diferenciaban de las plantas control:

- Mientras que en las plantas control (Figura 2A) las flores se fecundaban y producían frutos (silicuas) normales, en las transgénicas al no producirse fecundación por la ablación de las anteras, las flores entraban en senescencia y en los pedicelos de las flores sólo permanecían los carpelos sin fecundar (Figura 2B).
- Las flores presentes en las plantas control (WT) poseen anteras normales con polen en su interior (Figura 2C, flor izquierda) y el filamento del estambre posee su longitud normal (Figura 2D). Las flores transgénicas no muestran anteras (Figura 2C, flor derecha) y si quitamos sépalos y pétalos podemos observar unas estructuras en forma de gancho en lugar de los sacos polínicos de la antera y un filamento muy corto en comparación con el de los estambres control (Figura 2E).
- Las plantas transgénicas continúan desarrollándose y produciendo ramas y flores (Figura 2C derecha) mientras que las plantas control entran en senescencia y sus frutos se abren para liberar las semillas de su interior (Figura 2C izquierda). La vida media de estas plantas aumentó tres meses con respecto al control.

### 2. Plantas androestériles de *Nicotiana tabacum*

Las plantas transgénicas generadas mostraron, al igual que en el caso anterior, las mismas características en cuanto a desarrollo y floración:

- Mientras que en las plantas control (Figura 3A izquierda) las flores se fecundaban y producían frutos (cápsulas) normales, en las transgénicas al no producirse fecundación por la ablación de las anteras, las flores entraban en senescencia y en los pedicelos de las flores permanecían las flores sin fecundar (Figura 3A centro y derecha). Muchas veces las flores senescentes permanecen sobre los tallos que se alargan continuamente al producirse flores en sus meristemos inflorescentes. En la figura 3D se puede observar una de estas ramas florales en comparación con una de una planta control que ha producido un número determinado de flores, se han fecundado y producido cápsulas con semillas en su interior.
- Las plantas transgénicas continúan desarrollándose y produciendo ramas y flores (Figura 3B) mientras que las plantas control entran en senescencia y sus frutos (cápsulas) se abren para liberar las semillas de su interior (Figura 3C). Algunas plantas estuvieron produciendo ramas y flores durante más de un año.
- Las flores presentes en las plantas control (WT) poseen anteras normales con polen en su interior (Figura 4A y 4B) y el filamento del estambre posee su longitud normal. Las flores transgénicas muestran anteras deformes y necrosadas con abundantes tricomas recubriendo sus sacos polínicos colapsados, los cuales no muestran polen en su interior (Figura 4C y 4D).

### 3. Evaluación del número total de ramas producidas por las plantas androestériles de *Arabidopsis thaliana* en relación con una planta normal

En la Tabla 5 se observa que el porcentaje de germinación mostrado para las seis líneas estudiadas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>14</sub>, B<sub>20</sub>) oscila entre 30-100%, mientras que el porcentaje de germinación de las semillas silvestres es de 88,88%.

Posteriormente se seleccionaron, de las semillas germinadas, las plantas que mostraban un fenotipo androestéril, eliminando las plantas con fenotipo silvestre. En la última columna de la Tabla 5 se indica el número de plantas con fenotipo androestéril que se evaluaron de cada uno de los cruzamientos empleados.

# ES 2 319 842 B1

TABLA 5

Análisis de la germinación de plantas de *Arabidopsis ENDI::barnasa* y número de plantas con fenotipo androestéril

LÍNEA	SEMILLAS SEMBRADAS	SEMILLAS GERMINADAS	PORCENTAJE GERMINACIÓN (%)	PLANTAS FENOTIPO ANDROESTÉRIL
<i>Columbia</i>	18	16	88,88	0
B1 x Wt	10	8	80	4
B2 x Wt	10	3	30	1
B3 x Wt	10	9	90	5
B8 x Wt	10	10	100	7
B14 x Wt	10	6	60	2
B20 x Wt	10	5	50	2

Se calculó el número de ramas y se determinó su orden y el número de flores totales así como los valores medios de ambos parámetros, tanto para las plantas silvestres como para todas las plantas androestériles de cada uno de los cruzamientos independientes *ENDI::barnasa*. Para éstas últimas, el valor medio de ambos parámetros se ha calculado realizando el promedio de las medias obtenidas para cada uno de los cruces evaluados. Dichos resultados están reflejados en la Tabla 6 (A y B). Tabla 7 y Figuras 6A y 6B.

TABLA 6A

Número y complejidad de las ramas de las plantas silvestres evaluadas

PLANTAS SILVESTRES	RAMAS 1 <sup>ER</sup> ORDEN ROSETA	RAMAS 2 <sup>º</sup> ORDEN ROSETA	RAMAS 1 <sup>ER</sup> ORDEN CAULINARES	RAMAS 2 <sup>º</sup> ORDEN CAULINARES	Nº RAMAS TOTAL
MEDIA	5,25	17,38	4,06	8,75	36
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	1,00	2,10	1,12	2,02	3,95

TABLA 6B

Número y complejidad de las ramas de las plantas transgénicas evaluadas

PLANTAS TRANSGÉNICAS	RAMAS 1 <sup>ER</sup> ORDEN ROSETA	RAMAS 2 <sup>º</sup> ORDEN ROSETA	RAMAS 3 <sup>ER</sup> ORDEN ROSETA	RAMAS 4 <sup>º</sup> ORDEN ROSETA
MEDIA	30	40	119,14	20
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	6,86	9,29	17,1	7,74

PLANTAS TRANSGÉNICAS	RAMAS 1 <sup>ER</sup> ORDEN CAULINARES	RAMAS 2 <sup>º</sup> ORDEN CAULINARES	RAMAS 3 <sup>ER</sup> ORDEN CAULINARES	RAMAS 4 <sup>º</sup> ORDEN CAULINARES
MEDIA	5	16,10	34,33	24,29
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	1,26	6,90	9,64	9,76

PLANTAS TRANSGÉNICAS	Nº RAMAS TOTAL
MEDIA	288
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	25,74

## ES 2 319 842 B1

En las Tablas 6A y 6B se puede observar que las plantas silvestres del cultivar Columbia empleado en este estudio producen un total de 36 ramas y que estas ramas corresponden a ramas de primer y de segundo orden producidas en las axilas de las hojas de roseta y en las de las caulinares. Sin embargo, las plantas transgénicas muestran una modificación drástica de su arquitectura ya que producen ramas de primer, segundo, tercer y cuarto orden tanto en las axilas de las hojas de roseta como en las de las caulinares. Se observa un aumento drástico en el número de ramas, 288 en las transgénicas frente a 36 en las silvestres. Dicho aumento se produce en el número de ramas de todos los órdenes.

En las Tablas 7A y 7B se puede observar que la modificación drástica del número y orden de las ramas que caracterizan la nueva arquitectura de la inflorescencia de las plantas transgénicas conlleva que dichas ramas son capaces de desarrollar un mayor número de flores. Así, mientras que el número de flores totales de las plantas silvestres del cultivar Columbia es de 659, el de las correspondientes plantas transgénicas resultó ser de 3.001. Además, se observa que se producen aumentos en la capacidad de desarrollar flores en las ramas de todos los órdenes.

TABLA 7A

*Número de flores de las ramas de las plantas silvestres evaluadas*

PLANTAS SILVESTRES	FLORES DE RAMAS 1 <sup>ER</sup> ORDEN ROSETA	FLORES DE RAMAS 1 <sup>ER</sup> ORDEN ROSETA	FLORES DE RAMAS 1 <sup>ER</sup> ORDEN CAULINARES	FLORES DE RAMAS 2 <sup>º</sup> ORDEN CAULINARES	Nº FLORES TOTALES
<b>MEDIA</b>	<b>122</b>	<b>252</b>	<b>130</b>	<b>155</b>	<b>659</b>
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>	<b>26,72</b>	<b>60,65</b>	<b>48,28</b>	<b>49,43</b>	<b>119,80</b>

TABLA 7B

*Número de flores de las ramas de las plantas transgénicas evaluadas*

PLANTAS TRANSGÉNICAS	FLORES DE RAMAS 1 <sup>ER</sup> ORDEN ROSETA	FLORES DE RAMAS 2 <sup>º</sup> ORDEN ROSETA	FLORES DE RAMAS 3 <sup>ER</sup> ORDEN ROSETA	FLORES DE 4 <sup>º</sup> RAMAS ORDEN ROSETA
<b>MEDIA</b>	<b>430</b>	<b>728</b>	<b>494</b>	<b>315</b>
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>	<b>65,70</b>	<b>72,10</b>	<b>104,38</b>	<b>44,33</b>

PLANTAS TRANSGÉNICAS	FLORES DE RAMAS 1 <sup>ER</sup> ORDEN CAULINARES	FLORES DE RAMAS 2 <sup>º</sup> ORDEN CAULINARES	FLORES DE RAMAS 3 <sup>ER</sup> ORDEN CAULINARES	FLORES DE RAMAS 4 <sup>º</sup> ORDEN CAULINARES
<b>MEDIA</b>	<b>276</b>	<b>351</b>	<b>307</b>	<b>100</b>
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>	<b>69,50</b>	<b>76,69</b>	<b>26,68</b>	<b>60,95</b>

PLANTAS TRANSGÉNICAS	Nº FLORES TOTAL
<b>MEDIA</b>	<b>3.001</b>
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>	<b>167,30</b>

# ES 2 319 842 B1

TABLA 8A

*Valores totales, valores medios y desviaciones estándar del número de ramas y número de flores para las plantas androestériles de las líneas transgénicas. Wt: plantas silvestres, TR: plantas transgénicas*

CRUCES	PLANTAS	Nº RAMAS	Nº FLORES
<b>B1 x Wt</b>	1	242	2900
	5	291	2745
	7	316	2620
	10	297	3067
Total		1146	11332
<b>Media</b>		286,50	2833
Desv. Est.		31,52	193,53
<b>B2 x Wt</b>	9	246	2938
Total		246	2938
<b>Media</b>		246	2938
Desv. Est.		0	0
<b>B3 x Wt</b>	2	248	2789
	3	263	2894
	4	307	2964
	6	304	3020
	7	300	2863
Total		1422	14530
<b>Media</b>		284,40	2906
Desv. Est.		27,02	89,50
<b>B8 x Wt</b>	1	315	3218
	2	289	3124
	5	240	2677
	6	298	3050
	7	313	2476
	8	319	3045
	10	303	2324
Total		2077	19914
<b>Media</b>		296,71	3319
Desv. Est.		27,12	349,96
<b>B14 x Wt</b>	3	298	3243
	6	332	3277
Total		576	6520
<b>Media</b>		314,89	3260
Desv. Est.		24,04	24,04
<b>B20 x Wt</b>	4	288	2542
	10	311	2948
Total		599	5490
<b>Media</b>		299,50	2745
Desv. Est.		16,26	287,09
<b>TOTAL TR</b>		<b>6066</b>	<b>18000</b>
<b>MEDIA TR</b>		<b>288</b>	<b>3001</b>

## ES 2 319 842 B1

TABLA 8B

*Valores totales, valores medios y desviaciones estándar del número de ramas y número de flores para las plantas silvestres estudiadas*

5

10

15

20

25

30

PLANTAS	Nº RAMAS	Nº FLORES
1	41	530
2	31	795
3	32	748
4	42	628
5	35	513
6	38	850
7	30	752
8	29	793
9	32	817
10	36	583
11	34	464
12	36	594
13	35	601
14	39	670
15	40	658
16	37	557
<b>TOTAL WT</b>	<b>567</b>	<b>10553</b>
<b>MEDIA WT</b> Desv. Stand.	<b>36</b> <b>3,95</b>	<b>659</b> <b>119,8</b>

Resumiendo lo anterior:

35

40

El número de ramificaciones producido por las plantas con fenotipo androestéril es 1 aproximadamente 8 veces mayor que en las plantas silvestres, ya que, mientras que en éstas el valor medio de ramificaciones obtenido es de 36 ramas, en las plantas transgénicas, el valor medio de ramificaciones obtenido es de 288. En las plantas androestériles se observa un mayor número de órdenes de ramificaciones (llegando a obtenerse ramificaciones terciarias y cuaternarias) mientras que en las plantas silvestres sólo se observan ramificaciones primarias y secundarias (Figuras 7A y 7B). En lo que respecta al número de flores (Tablas 8A y 8B), en las plantas androestériles se observa que el número de flores es, aproximadamente 4,5 veces mayor que en las plantas silvestres (Figuras 8A y 8B). Aunque no se quiere estar vinculado a ninguna teoría, este hecho podría explicarse mediante los siguientes aspectos:

45

1. Al no producirse frutos en las plantas androestériles no se produce alguna sustancia que debería interferir con el sistema genético y de señalización que controla la proliferación de los meristemos axilares.

50

2. En las plantas transgénicas los meristemos laterales se mantienen activos durante más tiempo que en las plantas silvestres: así pues, mientras que las plantas silvestres son capaces de vivir durante tres meses, las plantas transgénicas se mantienen vivas en el invernadero durante el doble de tiempo (seis meses).

55

3. Una posible explicación parcial a este fenómeno podría basarse en la hipótesis de que en las plantas transgénicas no existe el consumo de sacarosa (energía) destinado en una planta silvestre al desarrollo de los frutos tras la fecundación. Dicha energía es utilizada por la planta transgénica para soportar más ramificaciones e inflorescencias, aumentando con ello su desarrollo y el número total de flores producidas.

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento para obtener una planta transgénica con una arquitectura de su inflorescencia modificada respecto de la que presenta la planta silvestre (wt) y que comprende:

(a) transformar una célula o tejido vegetal susceptible de ser transformado con una construcción génica que comprende:

10 (i) una *primera secuencia de ácido nucleico* que comprende la secuencia de nucleótidos del promotor del gen PsEND1, o un fragmento del mismo con capacidad de regular específicamente la expresión génica de una segunda secuencia de ácido nucleico en anteras, y

15 (ii) una *segunda secuencia de ácido nucleico* que comprende la secuencia de nucleótidos de un gen citotóxico, o un fragmento funcional del mismo, bajo el control de dicha primera secuencia de ácido nucleico,

para producir una célula o tejido vegetal transformado,

20 (b) regenerar dicha célula o tejido vegetal transformado en la etapa (a) para producir una planta transgénica, y

(c) seleccionar las plantas transgénicas de la etapa (b) que exhiban una arquitectura de su inflorescencia modificada en comparación con la que presenta la correspondiente planta silvestre.

25 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en donde dicha primera secuencia de ácido nucleico comprende el promotor del gen PsEND1 de guisante (*Pisum sativum* L.).

3. Procedimiento según la reivindicación 1, en donde dicha primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 6.

30 4. Procedimiento según la reivindicación 1, en donde dicha primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 7.

35 5. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 4, en donde el 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.

40 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en donde el gen citotóxico se selecciona entre el gen de la barnasa, el gen que codifica para la toxina A de la difteria (DTA) producida naturalmente por *Corynebacterium diphtheriae*, el gen que codifica para 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*.

45 7. Una planta transgénica obtenible según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que presenta una arquitectura compleja, distinta, con un mayor número de ramas y de mayor orden, todas ellas capaces de producir flores, que la de la planta silvestre (wt).

50 8. Un procedimiento para producir flores que comprende cultivar una planta transgénica obtenida según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una planta transgénica según la reivindicación 7, bajo condiciones que permitan la floración y el desarrollo de las flores.

50

55

60

65

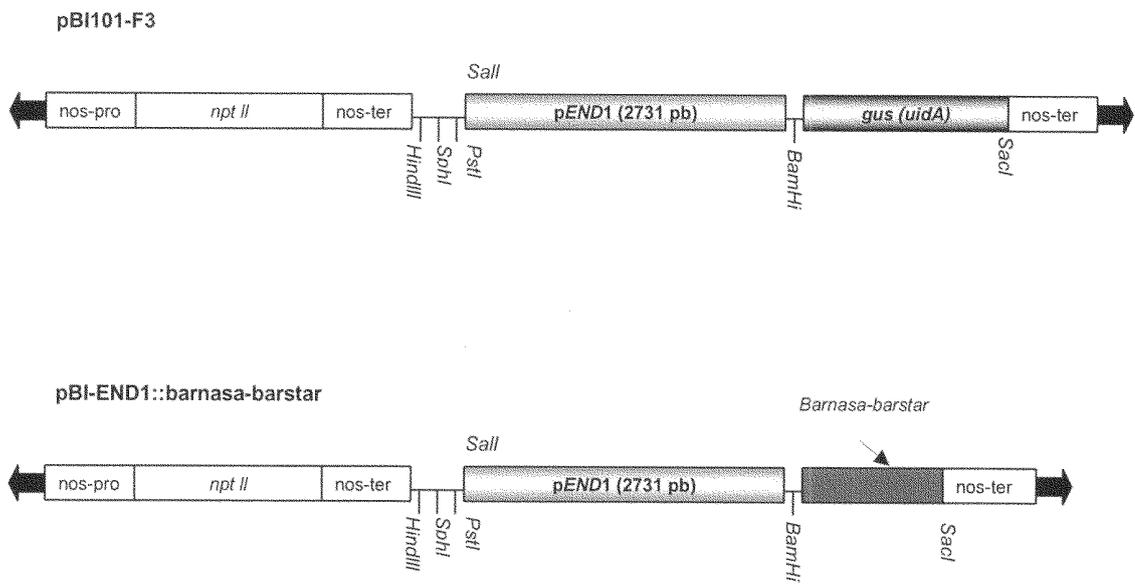


FIGURA 1

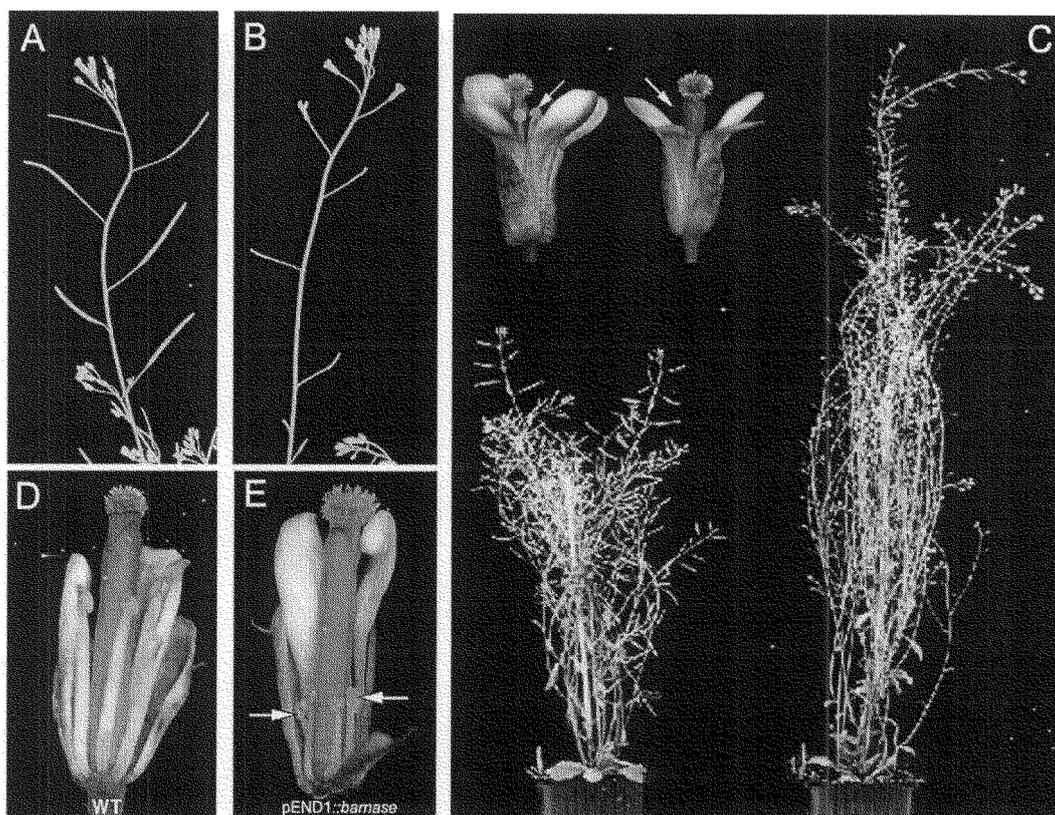


FIGURA 2

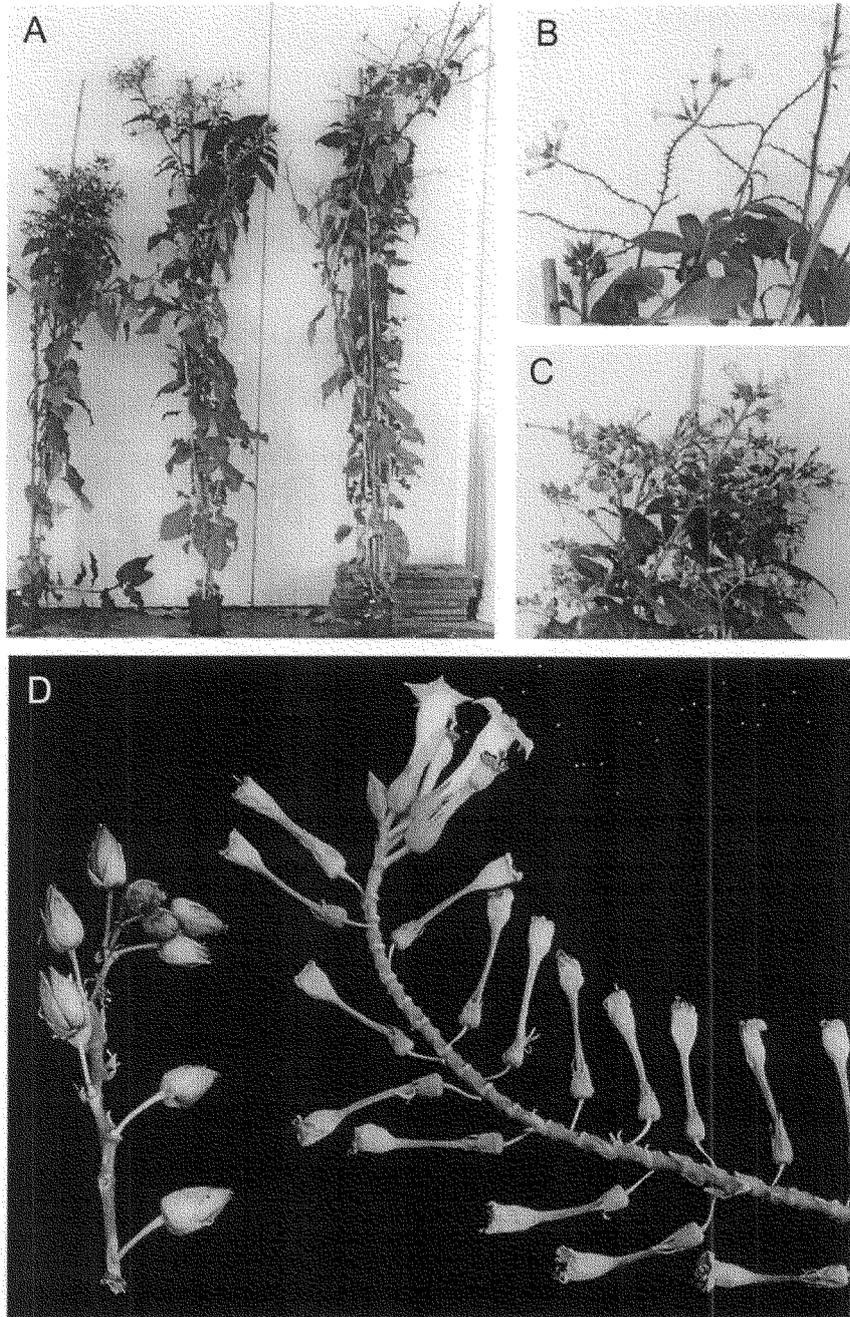


FIGURA 3

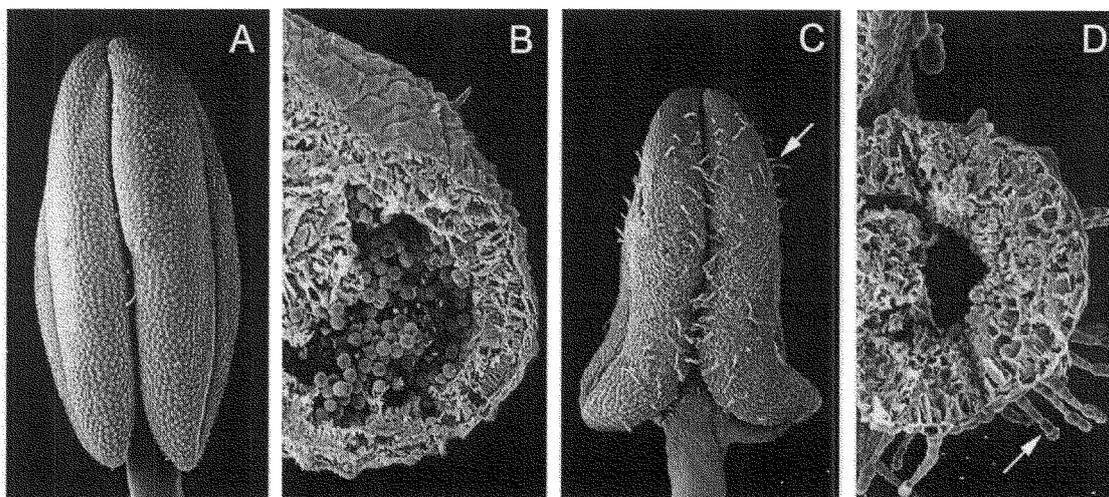


FIGURA 4

## ES 2 319 842 B1

### FIGURA 5

-2736 gacttcaacc ttattagtga atggacaata aaggttataa gctcctttac  
-2686 tgtgaaagcc caccagtaac atcaccttgc ttatatcatt cagcttcttt  
-2636 ctagtaacat ttggaacgtg tttataacag aaaaaaaccc aaaaactctg  
-2586 aaaagactca cacttttctt atctccagtc cacctctcaa aaggaacaat  
-2536 ttccttcagc ttcttggttg gacacctggt gagcacatat gctgcagtgg  
-2486 caacagtttc tccccacaaa gtgttaggaa gcttcttctc cttcagcatg  
-2436 ttccttgcca tatcaagcaa agttcggttt tcaacaagac cattatggtg  
-2386 aggagtatat ggatcagtc cttcatgctc aattccattc tctttacaga  
-2336 acttcttgaa ctctgtagag ttatactcac ctccaccatc agttctgaga  
-2386 atcttcagaa gtctgaccac tttatttctc agccttgatt atgaatttct  
-2236 taaattcagc aaacacctcg tgtttgaatt ttataagga taccatgctc  
-2186 atccttgcca actcatccat aatgacata aagtattatt cctcctagtc  
-2136 gaaaggtttg taatgggcca cacacataag aatgcactac tctaaagca  
-2086 tgttttgctc tttgagctac tttgatgaa aatggcagtc ttggttgctt  
-2036 ccttttcagc cacacattac atgacttttt tggtttctta attgtaggaa  
-1986 ttccacgtac cagtttcttt gaattcaaat tccctaagct cctaaagttc  
-1936 aatgaccaa atcttttggt ccacaactca ctttcttca caacacttgt  
-1886 tgcgctaagg cattcagagt ctgcagtttt aacattegcc ttgaatgttt  
-1836 tactccttcc atgttctgac tccataatca acttctgata acagtcatac  
-1786 agcttcaaaa gaatgtcatt catggtaact ggaaatccct tttcaattaa  
-1736 ttgacctaca ctcatcagat tgctcttcat gccagaacg taccaagacg  
-1686 ttctgaatta atgcagattt tctattatc ataactctc taacattccc  
-1636 cattccttta gcatttagtt acttatcatc agcacatcta atcttggttt  
-1586 tcttcttaga gtcaaaatca accagccatt tcttatttcc agtatgatgg  
-1536 tttgaacaac cagtgtccat atatcaccag tcttctatag acgcactatc

## ES 2 319 842 B1

-1486 ataactagaa gccattaata gcacatgttc atcatgggtgc tcagatcctt  
-1436 agaatgttca attgctacaa cgatgtaatc aaactgatga gtaagagatc  
-1386 taagtacctt ctcaatgata ctttctcat aaagagtttc tccatgcgac  
-1336 ttcattctcat ttgtgatcag aatcactcta gagatgtagt cagataactt  
-1286 ctcatgttgc ttcattgctta gattctcata ctgctcacgt agagactgaa  
-1236 gtttcacctt ctacactgat gcatcactat cgtagcacca caccagtctg  
-1186 tctcacacaa ctttttccgt cattgaatca acgattttct taaacacggt  
-1136 cacatccaca cactgatgga tgtagaacaa cgcattctga tcctttctcc  
-1086 tcatatcaca ctgagcattt ctttgccgat ccgttgcatt ttctagaagt  
-1036 gaagcataaa cttcgttgat gagatcaaga acatcttgag caccaaataa  
-986 cacacacatc tgaatcatcc aacgattcca gttggtgtcg tcgaacaatg  
-936 gaagcttggt gcacagatc acaacgatat attataattt ttgttttatg  
-886 aaatttaaga acaaatttcc attattctta aatgttttac aactgatgt  
-836 agactgcaaa aggaataaag atacaatttg ttcacaccac tcaactgocgt  
-786 aaatataagt gagagttaat gagaaatact aaaataccct ctaaattat  
-736 gaattaattc taacaatctc taatgttagt ataatccatt aacactttg  
-686 atggcaggta taacaagggt gtaagttagt gtatacatat taggctctta  
-636 ttatttttat attatctctg ctttcttct tcatgttctc actaatatga  
-586 tattatctcc cttccctaaa ttatttatat ttattagaaa aagagtttca  
-536 ttttttaaaa atatattacc gtaattttt **aaaaa**taaa atttaaata  
-486 attttataaa aaaattattt aataatttat ttacattaat gcataaatat  
-436 aaataaatac tgtcatttaa tatttaacct tttaa**caata** aattatattt  
-386 atttaattca actaatataa gctaagttat ctcatccaa **caa**taaaaa  
-336 gatcatttga aaatacctt ttatttagtt tgtggcggtt tcaact**gtca**  
-286 **aaaaaa**gga atttttacga cga**tataaat** ttaaaccagc **aaaaa**ttga

FIGURA 5 (cont.)

## ES 2 319 842 B1

-236 agcagttaag cgaa**ccaact** **catgg**atgt ggatatattt atctttgtcg  
-186 tttatatcgg attcgaatct ctataatgat gaaaaattaa tatcaaactt  
-136 taaataagaa **cgta**tttat agag**ccattt** **tggg**aaacac atatttcag  
-86 tacacgtgat tcgcaaattt **cca**taactc **tatatat**agc cctcctcagt  
-36 ttcatgcatt tgctcacaac ataaccttcc ttgaat

### LEYENDA

- |   |   |   |
|---|---|---|
| ■ | CCAAT                                     | } Secuencias distales generales de Eucariotas |
| ■ | CAAT                                      |   |
| ■ | TATA                                      | Posibles cajas TATA                           |
| ■ | C(A) <sub>6/8</sub> : "GTCAAAA", "ACGTCA" | Elementos presentes en promotores de anteras  |
| ■ | Posibles cajas CArG                       |   |

**FIGURA 5 (cont.)**

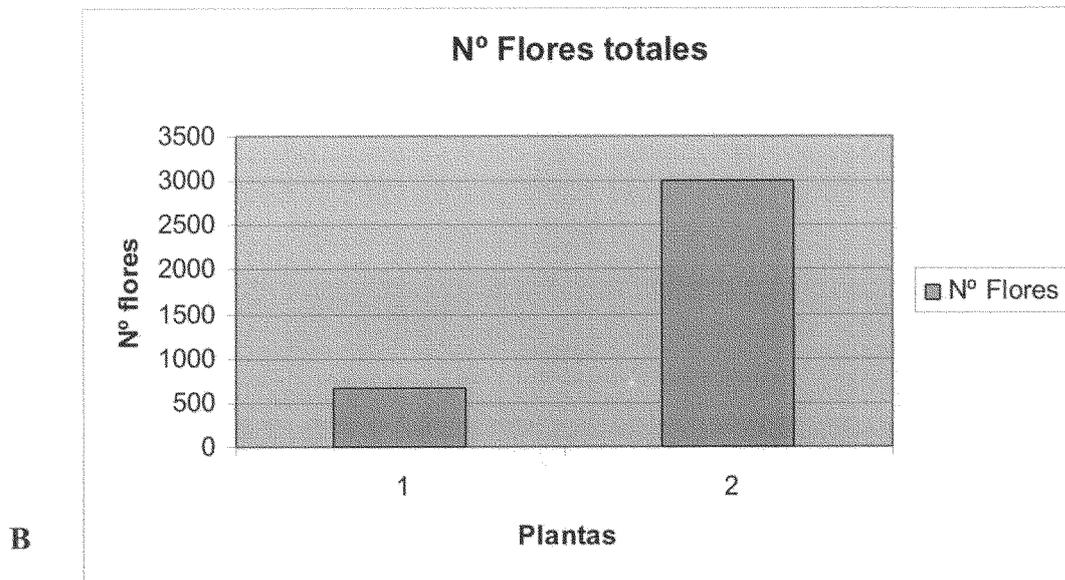
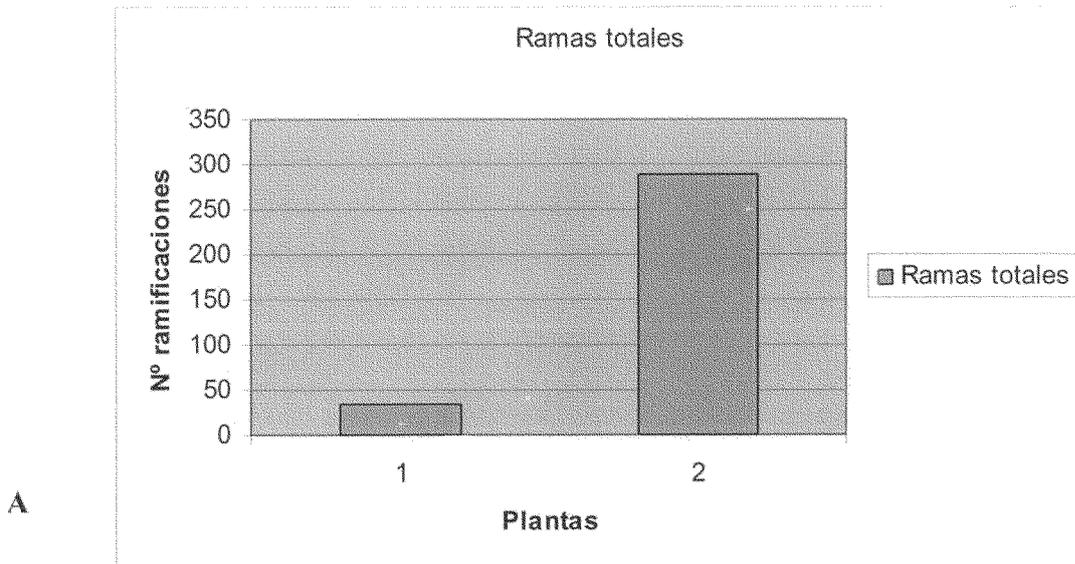


FIGURA 6

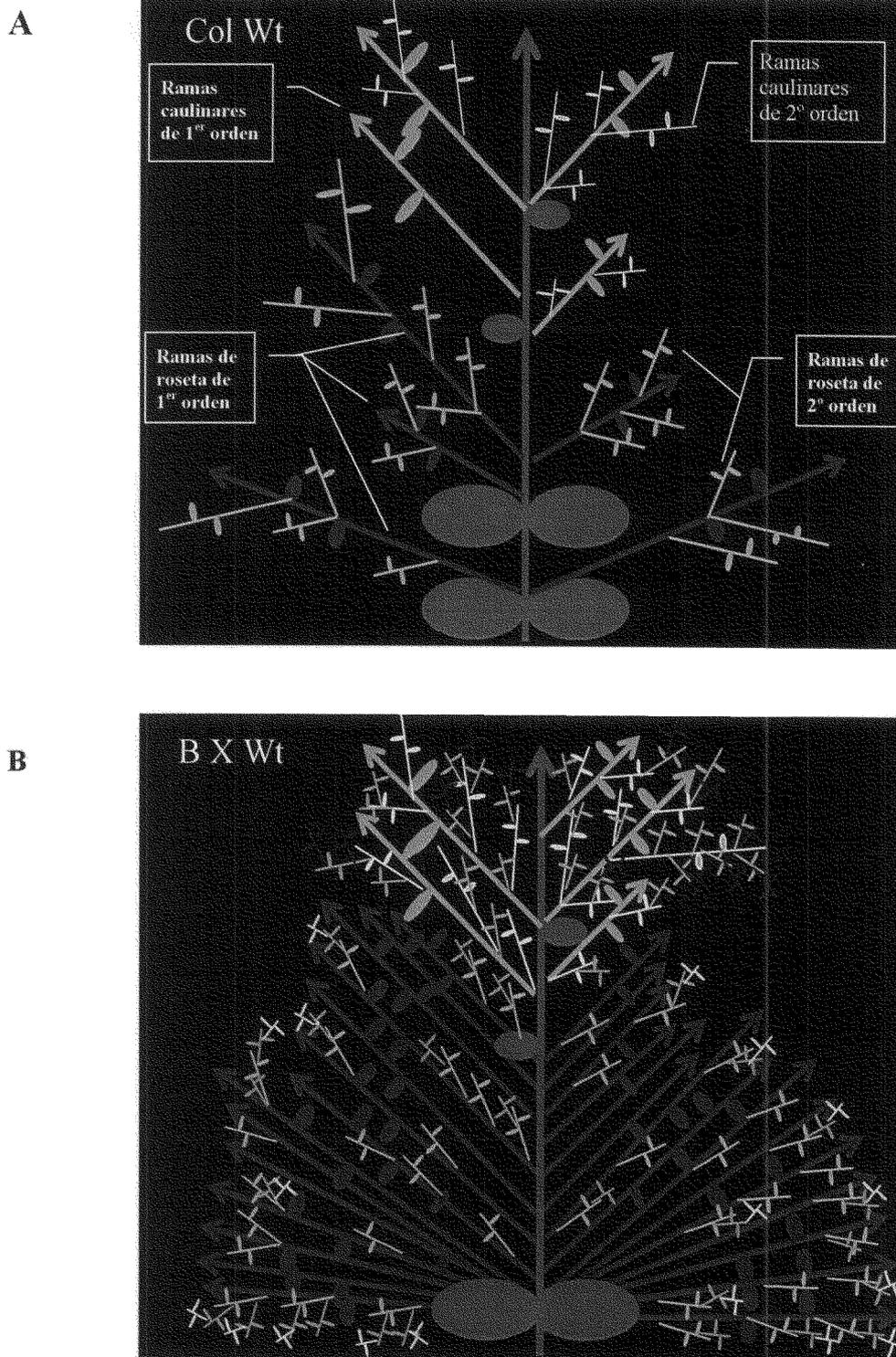
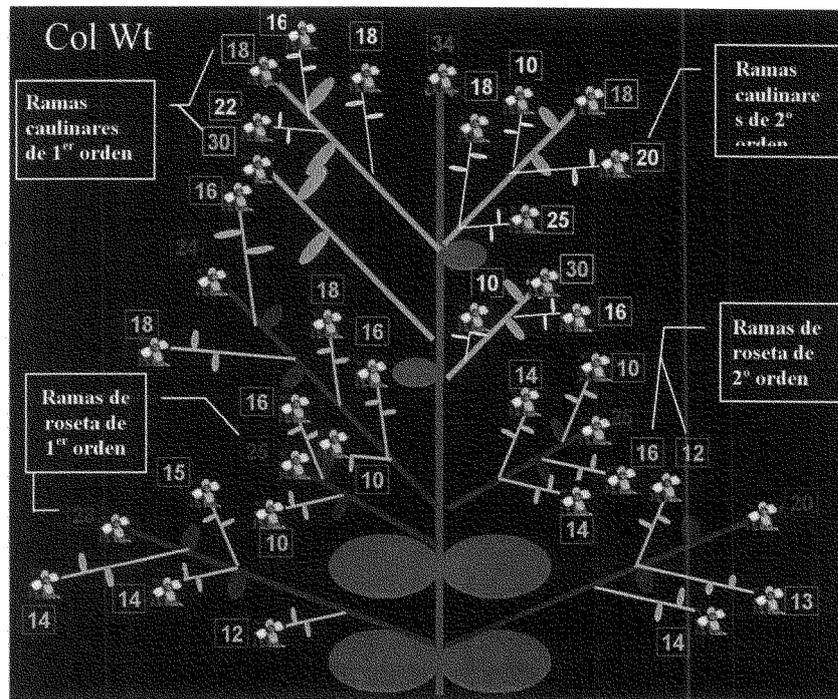


FIGURA 7

A



B

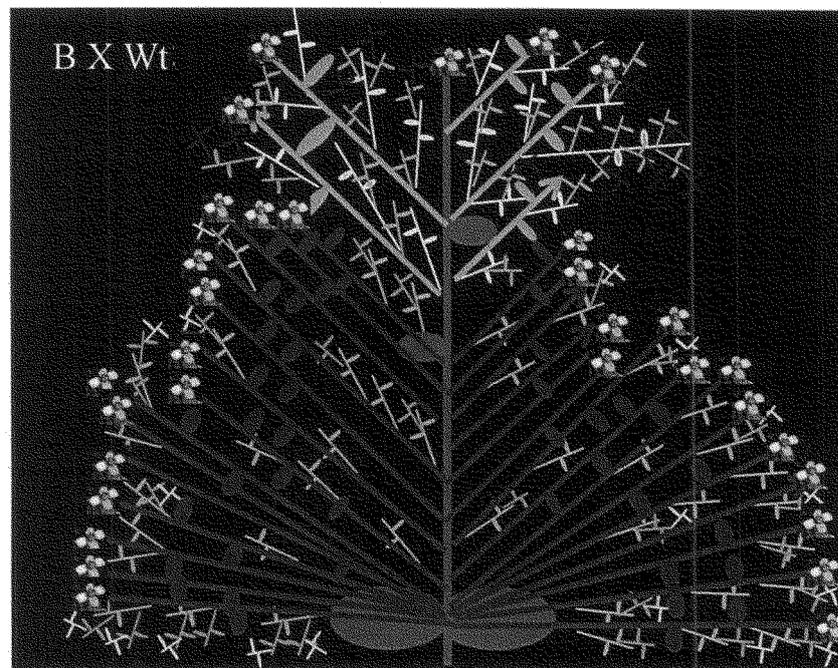


FIGURA 8

# ES 2 319 842 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas Universidad Politécnica de Valencia

5 <120> Procedimiento para modificar la arquitectura de la inflorescencia de las plantas

<130> P1410ES00

10 <140> P200700618

<141> 2007-03-08

<160> 7

15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

20 <211> 2736

<212> ADN

<213> *Pisum sativum* L.

25 <220>

<223> región 5' del gen PsEND1

<400> 1

30

gacttcaacc ttattagtga atggacaata aaggttataa gctcctttac tgtgaaagcc 60

caccagtaac atcaccttgc ttatatcatt cagcttcttt ctagtaacat ttggaacgtg 120

35

tttataacag aaaaaaaccc aaaaactctg aaaagactca cacttttctt atctccagtc 180

cacctctcaa aaggaacaat ttccttcagc ttcttggttg gacacctggt gagcacatat 240

40

gctgcagtg caacagtttc tccccacaaa gtgtaggaa gcttcttctc cttcagcatg 300

ttccttgatca tatcaagcaa agttcggttt tcaacaagac cattatggtg aggagtatat 360

ggatcagtc cttcatgctc aattccatc tctttacaga acttcttgaa ctctgtagag 420

45

ttatactcac ctccaccatc agttctgaga atcttcagaa gtctgaccac tttattttctc 480

agccttgatt atgaatttct taaattcagc aaacacctcg tgtttgaatt ttataaggga 540

50

tacctatgtc atccttgatga actcatccat aatgacata aagtattatt cctcctagtc 600

gaaagggttg taatgggcca cacacataag aatgcactac tcttaaagca tgttttgctc 660

tttgagctac ttttgatgaa aatggcagtc ttgggttgctt ccctttcatg cacacattac 720

55

atgacttttt tggtttctta attgtaggaa ttccacgtac cagtttcttt gaattcaaat 780

tccctaagct cctaaagttc aatgaccaa atcttttggtt ccacaactca ctttccctca 840

60

caacacttgt tgcgctaagg cattcagagt ctgcagtttt aacattcgcc ttgaatgttt 900

tactccttcc atgttctgac tccataatca acttctgata acagtcatac agcttcaaaa 960

gaatgtcatt catggtaact ggaaatccct tttcaattaa ttgacctaca ctcatcagat 1020

65

tgctcttcat gccagaacg taccaagacg ttctgaatta atgcagattt tctattattc 1080

## ES 2 319 842 B1

	ataatcactc taacattccc cattccttta gcatttagtt acttatcacc agcacatcta	1140
	atcttgggtt tcttctaga gtcaaaatca accagccatt tcttatttcc agtatgatgg	1200
5	tttgaacaac cagtgtccat ataccaccag tcttctatag acgcactatc ataactagaa	1260
	gccattaata gcacatgttc atcatgggtc tcagatcctt agaatgttca attgctacaa	1320
	cgatgtaatc aaactgatga gtaagagatc taagtacctt ctcaatgata ctttctcat	1380
10	aaagagtttc tccatgagac ttcattctcat ttgtgatcag aatcactcta gagatgtagt	1440
	cagataactt ctcaattgtc ttcattctcat gattctcata ctgctcacgt agagactgaa	1500
	gtttcacctt ctacactgat gcactactat cgtagcacca caccagtctg tctcacacaa	1560
15	ccttttccgt cattgaaatc acgattttct taaacacgtt cacatccaca cactgatgga	1620
	tgtagaacaa cgcattctga tcttcttcc tcatatcaca ctgagcattt ctttgcgcat	1680
20	ccgttgcatt ttctagaagt gaagcataaa cttcgttgat gagatcaaga acatcttgag	1740
	caccaaataa cacacacatc tgaatcatcc aacgattcca gttgttgcg tcgaacaatg	1800
	gaagcttggg gcacagattc acaacgatat attataattt ttgttttatg aaatttaaga	1860
25	acaaatttcc attattctta aaatgtttac aactgatgt agactgcaa aggaataaag	1920
	atacaatttg ttcacaccac tcaattgctt aaatataagt gagagttaat gagaaatact	1980
	aaaatacctt ctaaaattat gaattaattc taacaatctc taatgttagt ataattcatt	2040
30	aaacactttg atggcaggta taacaagggt gtaagttagt gtatacatat taggctctta	2100
	ttatttttat attatctctg ctttcttct tcatgttctc actaatatga tattatctcc	2160
35	cttccctaaa ttatttatat ttattagaaa aagagtttca ttttttaaaa atatattacc	2220
	gtaatttttc aaaaaataaa atttaaatat attttataaa aaaattattt aataatttat	2280
	ttacattaat gcataaatat aaataaatac tgtcatttaa tatttaacct ttaacaata	2340
40	aattatattt atttaattca actaatataa gctaagttat ctcatccaac caattaaaaa	2400
	gatcatttga aaataccttt ttatttagtt tgtggcgggt tcaactgtca aaaaaagga	2460
45	atttttacga cgatataaat ttaaaccagc aaaaaattga agcagttaag cgaaccaact	2520
	catgggatgt ggatataatt atctttgtcg tttatatcgg attcgaatct ctataatgat	2580
	gaaaaattaa tatcaactt taaataagaa cgtcatttat agagccattt tgggaaacac	2640
50	atatttcatg tacacgtgat tcgcaaattt ccaataactc tatatatagc cctctcagt	2700
	ttcatgcatt tgcacacaac ataaccttcc ttgaat	2736

55 <210> 2  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220> ADN sintético  
 <223> Cebador Ribo 1

65 <400> 2

taggatcccc accatggcac aggttatc

28

## ES 2 319 842 B1

	<210> 3		
	<211> 29		
	<212> AND		
5	<213> Secuencia artificial		
	<220> ADN sintético		
	<223> cebador Inhi2		
10	<400> 3		
	gcgagctcctt aagaaagttg atggtgatg		29
15	<210> 4		
	<211> 22		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220> ADN sintético		
	<223> Cebador T7		
25	<400> 4		
	gtaatacgcac tcactatagg gc		22
30	<210> 5		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220> ADN sintético		
	<223> Cebador SP6		
40	<400> 5		
	gatttaggtg acactataga atac		24
45	<210> 6		
	<211> 2731		
	<212> ADN		
	<213> <i>Pisum sativum</i> L.		
50	<400> 6		
	gacttcaacc ttattagtga atggacaata aaggttataa gctcctttac tgtgaaagcc		60
55	caccagtaac atcaccttgc ttatatcatt cagcttcttt ctagtaacat ttggaacgtg		120
	tttataacag aaaaaaaccc aaaaactctg aaaagactca cacttttctt atctccagtc		180
60	cacctctcaa aaggaacaat ttccttcagc ttcttggttg gacacctggt gagcacatat		240
	gctgcagtggt caacagtttc tccccacaaa gtggttaggaa gcttcttctc cttcagcatg		300
65			

## ES 2 319 842 B1

	ttccttgtea tatcaagcaa agttcggttt tcaacaagac cattatggtg aggagtatat	360
	ggatcagtea ottcatgctc aattccattc tctttacaga acttcttgaa ctctgtagag	420
5	ttatactcac ctccaccatc agttctgaga atcttcagaa gtctgaccac tttattttctc	480
	agccttgatt atgaatttct taaattcagc aaacacctcg tgtttgaatt ttataaggga	540
10	tacccatgtc atccttgtga actcatccat aaatgacata aagtattatt cctcctagtc	600
	gaaaggtttg taatgggcca cacacataag aatgcactac tectaaagca tgttttgctc	660
15	tttgagctac ttttgatgaa aatggcagtc ttggttgctt ccttttcagc cacacattac	720
	atgacttttt tggtttctta attgtaggaa ttccacgtac cagtttcttt gaattcaaat	780
	tccctaagct cctaaagttc aaatgaccaa atcttttggt ccacaactca ctttccttca	840
20	caacacttgt tgcgctaagg cattcagagt ctgcagtttt aacattcgcc ttgaatgttt	900
	tactccttcc atgttctgac tccataatca acttctgata acagtcatac agcttcaaaa	960
25	gaatgtcatt catggtaact ggaaatccct tttcaattaa ttgacctaca ctcatcagat	1020
	tgctcttcat gccagaacg taccaagacg ttctgaatta atgcagattt tctattatc	1080
30	ataatcactc taacattccc cattccttta gcatttagtt acttatcacc agcacatcta	1140
	atcttggttt tcttctaga gtcaaaatca accagccatt tcttatttcc agtatgatgg	1200
	tttgaacaac cagtgccat atatcaccag tcttctatag acgcaactac ataactagaa	1260
35	gccattaata gcacatgttc atcatggtgc tcagatcctt agaatgttca attgctacaa	1320
	cgatgtaatc aaactgatga gtaagagatc taagtacctt ctcaatgata ctttcctcat	1380
40	aaagagtttc tccatgcgac ttcattctcat ttgtgatcag aatcactcta gagatgtagt	1440
	cagataactt ctcatgttcc ttcattctca gattctcata ctgctcacgt agagactgaa	1500
45	gtttcacctt ctacactgat gcatcaactat cgtagcacca caccagtctg tctcacacaa	1560
	ccttttccgt cattgaatca acgattttct taaacacgtt cacatccaca cactgatgga	1620
50	tgtagaacaa cgcattctga tcttcttcc tcatatcaca ctgagcattt ctttgcgcat	1680
	ccgttgcatc ttctagaagt gaagcataaa cttcgttgat gagatcaaga acatcttgag	1740
	caccaaataa cacacacatc tgaatcatcc aacgattcca gttggtgtcg tcgaacaatg	1800
55	gaagcttggc gcacagattc acaacgatat attataattt ttgttttatg aaatttaaga	1860
	acaaatttcc attattctta aaatgtttac aactgatgt agactgcaaa aggaataaag	1920
60	atacaatttg ttcacaccac tcaactgctg aaatataagt gagagttaat gagaaatact	1980
	aaaataccct ctaaaattat gaattaattc taacaatctc taatgttagt ataatccatt	2040
65	aaacactttg atggcaggta taacaagggt gtaagttagt gtatacatat taggctctta	2100
	ttatttttat attatctctg cttttcttct tcatgttctc actaatatga tattatctcc	2160

## ES 2 319 842 B1

	cttccctaaa ttatttatat ttattagaaa aagagtttca ttttttaaaa atatattacc	2220
5	gtaatttttc aaaaaataaa atttaaatat attttataaa aaaattatth aataatttat	2280
	ttacattaat gcataaatat aaataaatac tgtcatttaa tatttaacct tttacaata	2340
	aattatattt atttaattca actaatataa gctaagttat ctcatccaac caattaaaaa	2400
10	gatcatttga aaataccttt ttatttagtt tgtggcgggt tcaactgtca aaaaaagga	2460
	atttttacga cgatataaat ttaaaccagc aaaaaattga agcagttaag cgaaccaact	2520
15	catgggatgt ggatataatt atctttgtcg tttatatcgg attcgaatct ctataatgat	2580
	gaaaaattaa tatcaaactt taaataagaa cgtcatttat agagccattt tgggaaacac	2640
20	atatttcatg tacacgtgat tcgcaaattt ccaataactc tatatatagc cctcctcagt	2700
	ttcatgcatt tgctcacaac ataaccttcc t	2731

25 <210> 7  
 <211> 361  
 <212> ADN  
 30 <213> *Pisum sativum* L.

<400> 7

	gctaagttat ctcatccaac caattaaaaa gatcatttga aaataccttt ttatttagtt	60
	tgtggcgggt tcaactgtca aaaaaagga atttttacga cgatataaat ttaaaccagc	120
40	aaaaaattga agcagttaag cgaaccaact catgggatgt ggatataatt atctttgtcg	180
	tttatatcgg attcgaatct ctataatgat gaaaaattaa tatcaaactt taaataagaa	240
	cgtcatttat agagccattt tgggaaacac atatttcatg tacacgtgat tcgcaaattt	300
45	ccaataactc tatatatagc cctcctcagt ttcatgcatt tgctcacaac ataaccttcc	360
	t	361

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 319 842

② Nº de solicitud: 200700618

③ Fecha de presentación de la solicitud: 08.03.2007

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BELTRAN, J. P. La ingeniería genética de las plantas cultivadas, clave para mejorar la nutrición y la salud humanas. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2005, Vol. 71, Nº 3, páginas 587-608, en especial páginas 596-601. ISSN 1697-428X.	1-8
X	WO 2001073088 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 04.10.2001, todo el documento.	7
A		1-6,8
X	ROQUE, E., GÓMEZ, M. D., ELLUL, P. et al. The PsEND1 promoter: a novel tool to produce genetically engineered male-sterile plants by early anther ablation. Plant Cell Reports. Marzo 2007, Vol. 26, Nº 3, páginas 313-325. Publicado en línea el 03.10.2006. ISSN 1432-203X.	7
A		1-6,8

#### 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

27.04.2009

Examinador

E. Relaño Reyes

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 15/29** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)