

An. R. Acad. Nac. Farm., 2007, 73 (4): 1237-1264

————— *Artículo original* —————

Androesterilidad inducida mediante ingeniería genética en plantas: fundamentos y aplicaciones biotecnológicas

Recibido el 3 de octubre de 2007

JOSÉ-PÍO BELTRÁN*, EDELÍN ROQUE, MÓNICA MEDINA,
FRANCISCO MADUEÑO, MARÍA DOLORES GÓMEZ,
LUIS ANTONIO CAÑAS.

*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV).
Laboratorio de Biología del Desarrollo Floral. Campus de la
Universidad Politécnica de Valencia.*

RESUMEN

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. Nosotros hemos desarrollado herramientas biotecnológicas para la producción de plantas androestériles de interés agronómico (tomate, colza, tabaco) mediante el uso de la región promotora del gen *PsEND1* de guisante para dirigir la expresión de agentes citotóxicos específicamente a los tejidos estructurales de las anteras para producir su ablación genética. En las plantas androestériles obtenidas mediante ingeniería genética, hemos observado que se produce un mayor número de ramas y consecuentemente una mayor producción de flores. Además, la vida útil de estas plantas se prolonga de forma notable. Estas características son de interés para el sector de la floricultura, ya que actualmente se están produciendo híbridos mediante mejora convencional con flores muy vistosas y colores novedosos, pero con escasa producción de flores por

* Información de contacto:

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV). Laboratorio de Biología del Desarrollo Floral. Campus de la Universidad Politécnica de Valencia. Ciudad Politécnica de la Innovación. Avda. Ingeniero Fausto Elio, s/n. 46022-Valencia. España. Teléfono: + 34 96 387 78 70. Fax: +34 96 387 78 59

e-mail: jbeltran@ibmcp.upv.es

planta. Por otra parte, la introducción en la planta modificada genéticamente de un gen que le confiera androesterilidad, es otra característica deseable en el campo de las plantas ornamentales ya que evitaría la transferencia horizontal de transgenes al medio ambiente y a especies sexualmente compatibles.

Palabras clave: vigor híbrido, transferencia horizontal de genes, arquitectura de las plantas, *PsEND1*, barnasa.

ABSTRACT

Male-sterility obtained by genetic engineering: principles and biotechnological applications

The availability of male-sterile plant varieties is relevant for obtaining of hybrid plant lines which are more vigorous than the corresponding parental pure lines because the phenomenon known as heterosis. Moreover, the use of male-sterile plants prevents undesirable horizontal gene transfer. We have developed biotechnological tools to obtain androsteryle lines of plants with agronomic interest such as tomato, tobacco, rape seed and wheat. This is accomplished by the use of the promoter region of the *PsEND1* gene to drive the expression of cytotoxic agents, such as barnase, to the structural tissues of the anthers. The male-sterile transgenic plants obtained live longer and show a higher number of branches and flowers than the corresponding wild type plants. This will allow plant breeders to incorporate those valuable characteristics to increase the number of flowers of plants already displaying new colours, shapes and fragrances. These new ornamental plants are environmental friendly since horizontal gene transfer can not take place.

Key words: Hybrid vigor, horizontal gene transfer, plant architecture, *PsEND1*, barnasa.

INTRODUCCIÓN

Los estambres son los órganos reproductivos masculinos de las plantas con flores (Angiospermas). Se componen de una antera y de un filamento por el que se unen a la base de la flor. El proceso de diferenciación de la antera y liberación del polen está muy conservado entre las Angiospermas. Dicho proceso ocurre en un orden preciso y cronológico que se correlaciona con el tamaño de la yema floral y que está finamente regulado a nivel genético (30, 20, 11).

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. Esta característica sería de gran interés en el caso de plantas modificadas genéticamente ya que evitaría la dispersión de los transgenes entre especies relacionadas. Nosotros hemos desarrollado herramientas biotecnológicas para la producción de plantas androestériles de interés agronómico mediante el uso de la región promotora del gen *PsEND1* de guisante para dirigir la expresión de agentes citotóxicos específicamente a los tejidos estructurales de las anteras (12, 13, 27). En las plantas androestériles obtenidas mediante ingeniería genética, hemos observado que se produce un mayor número de ramas y consecuentemente una mayor producción de flores que en las correspondientes plantas silvestres. Además, la vida útil de estas plantas se prolonga de forma notable (4).

La ablación de anteras producida mediante transformación genética con genes citotóxicos que se expresan únicamente en dichos órganos, utilizando promotores específicos de algún tejido estaminal, ha permitido obtener plantas transgénicas androestériles y plantas transgénicas con androfertilidad restaurada en especies de importancia agronómica como maíz, colza o trigo (34). La ablación genética se basa en la inducción de la muerte celular mediante la expresión de cualquier enzima que sea capaz de destruir la integridad celular como proteasas, lipasas y RNasas. Los mismos resultados se pueden obtener expresando sustancias tóxicas para las células, por ejemplo, péptidos que inactivan los ribosomas como hace la cadena A de la toxina (DT-A) de *Corynebacterium diphtheriae* (6). También es posible la ablación de flores completas en plantas transgénicas en las que el gen que codifica la DT-A se expresa bajo el control del promotor del gen *LEAFY* (25). 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 RNA «antisentido» de un gen que confiere tolerancia a un herbicida (8). El efecto del RNA «en 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. Para obte-

ner una eficiente ablación genética es crucial disponer de un gen citotóxico que actúe sólo allí donde se exprese y de un promotor apropiado que controle la expresión espacio-temporal del gen citotóxico. Los genes que se expresan exclusivamente en los órganos reproductivos de la flor (estambres y carpelos) son particularmente apropiados ya que sus promotores serían, potencialmente, capaces de dirigir la expresión de genes citotóxicos hacia dichos órganos y provocar esterilidad masculina o femenina en la flor. Los promotores que se seleccionen para expresar agentes tóxicos o degenerativos del tejido deben ser promotores suficientemente activos y específicos de las células diana. Si la diana celular es tejido tapetal, el promotor debe ser activo tempranamente para impedir su desarrollo antes de que las microsporas sean independientes del soporte del *tapetum*. Además, el promotor debe actuar antes de la segregación meiótica para impedir la ausencia de actividad degenerativa en parte de las microsporas.

La primera estrategia de ablación diseñada para producir androesterilidad fue propuesta por Mariani *et al.* (22). El promotor del gen *TA29* de tabaco, específico de *tapetum*, se usó para dirigir la expresión de dos RNAsas (RNasa T1 de *Aspergillus oryzae* y barnasa de *Bacillus amyloliquefaciens*) en tabaco y *Brassica napus*. Las anteras transgénicas androestériles que se obtuvieron carecían de *tapetum* y sus sacos polínicos carecían de microsporas o granos de polen. La construcción *TA29-barnasa* se fusionó al gen *bar*, un gen que confiere tolerancia al herbicida glufosinato amónico, para poder seleccionar las plantas androestériles en una población. La aplicación del herbicida a la progenie del cruce elimina las plantas fértiles masculinas e incrementa así la eficiencia con la que las plantas estériles pueden aislarse. Estas plantas transgénicas no serían más apropiadas que los mutantes espontáneos si no existiera la posibilidad de revertir la androesterilidad. Mariani *et al.* (23) resolvieron este problema mediante la producción de plantas transgénicas con una construcción que contenía el gen inhibidor de la ribonucleasa barnasa (*barstar*) bajo el control del promotor *TA29*. Las plantas *TA29-barstar* actúan como una línea restauradora y cuando se cruzan con plantas transformadas con la construcción *TA29-barnasa* se obtienen plantas androfértiles. Para producir semillas híbridas en cantidad suficiente es necesario propagar la línea femenina. Aunque

es posible producir muchas plantas androestériles a través de propagación *in vitro*, también se podría utilizar una estrategia basada en unir el gen ablativo a un gen que confiera resistencia a un herbicida (23). Después de cruzar la línea androestéril con una línea isogénica y fértil, las plantas que no han heredado la esterilidad se pueden eliminar por tratamiento con el herbicida. La restauración de la fertilidad en plantas híbridas puede conseguirse cruzándolas con líneas transgénicas que expresen un inhibidor específico del enzima tóxico causante de la androesterilidad, como es el caso del gen *bars-tar* cuyo producto inhibe la acción de la barnasa (23) o un RNA «en antisentido» del gen letal usado (31).

Por otra parte, la industria de la floricultura se esfuerza por conseguir variedades nuevas de plantas ornamentales con características mejoradas que van desde la resistencia frente a patógenos 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 DNA 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, incluyendo la modificación de la arquitectura de la inflorescencia para producir un mayor número de ramas que a su vez produzcan un mayor número de flores. Por otra parte, la introducción en la planta modificada genéticamente de un gen que le confiera androesterilidad, es una característica deseable en el campo de las plantas ornamentales ya que evitaría la transferencia horizontal de transgenes al medio ambiente y a especies sexualmente compatibles.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cultivo de plantas en cámara e invernadero

Las especies vegetales empleadas en este trabajo fueron: *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia (Nottingham *Arabidopsis* stock centre, UK) y colza (*Brassica napus* L.) cv. Drakkar (Centrum Grüne Gente-

chnik, Germany). Las plantas se cultivaron en fitotrones a 21°C en condiciones de día largo (16h luz, 8h oscuridad), iluminadas con lámparas fluorescentes de luz blanca fría (150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$), en una mezcla (1:1:1) de turba:perlita:vermiculita). Las plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Petite Havana SR1; IBMCP) se cultivaron en una mezcla (1:1) de turba:vermiculita con un fotoperiodo de 16h en el invernadero a 25°C (día) y 18°C (noche). Se les suministró una iluminación suplementaria con lámparas de 400w Phillips HDK/400 HPI [R] [N]. Las plantas de tomate (*Solanum lycopersicon* cv. Micro-Tom; IBMCP) se cultivaron en las mismas condiciones en el invernadero. Las plantas de tabaco y tomate se regaron con una solución nutritiva Hoagland No. 1 (16) suplementada con oligoelementos. Las plantas de *Arabidopsis* y colza se regaron con agua y una vez por semana con la solución nutritiva.

2. Preparación de muestras vegetales para microscopía confocal y electrónica de barrido (SEM).

Las muestras vegetales se introdujeron en p-formaldehído al 4% (p/v) en 1XPBS pH 7,0 inmediatamente después de su recolección para ser fijadas. Posteriormente, fueron sometidas a dos o tres pulsos de vacío de 3 min. 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 1XPBS 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 de si fueron incluidas en parafina (Paraplast Plus, Sigma), o procesadas para ser analizadas por microscopía electrónica de barrido (SEM).

Para su inclusión en parafina, las muestras se introdujeron en soluciones crecientes de Histo-Clear en etanol (25%, 50%, 100% de Histo-Clear) y posteriormente se incluyeron gradualmente en series crecientes de parafina en Histo-Clear a 58°C hasta llegar a parafina absoluta. Tras dos días en parafina absoluta en los cuales se iban haciendo cambios a parafina fresca, las muestras se colocaron en moldes adecuados para seccionarlas. Se mantuvieron a 4°C hasta su

utilización. Las muestras incluidas en parafina se seccionaron en un microtomo rotatorio Microm (secciones de 7-10 μm de grosor). Los cortes obtenidos se depositaron sobre portaobjetos tratados con TESPA (Sigma) como adherente. Las secciones de tejidos incluidos en parafina una vez sobre los portas, se desparafinaron en Histo-Clear durante 10 min. y luego se rehidrataron en soluciones decrecientes de etanol/agua (100%, 70%, 50%), durante 1 min. en cada una y finalmente se lavaron con agua destilada. Posteriormente se realizó la inmunolocalización de la proteína PsEND1 bloqueando las secciones con BSA al 5% en PBS e incubándolas a continuación con un anticuerpo primario anti-PsEND1 diluido al 0.1% durante 2h (3). Luego se realizaron varios lavados con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado a un fluorocromo (Anti-IgG-FITC). Finalmente las preparaciones se montaron permanentemente con un anti-fading. Las observaciones y fotografías se realizaron con un microscopio confocal (Leica, TCS SL).

Para ser utilizadas en SEM, las muestras almacenadas en etanol del 100%, se desecaron con CO_2 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 oropaladio 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 JSM-5410 operando bajo las condiciones de microanálisis de 10 kV y distancia de trabajo de 25 mm.

3. Transformación de bacterias: preparación de células competentes y electroporación

Las cepas que se emplearon en las transformaciones fueron la DH5 α de *Escherichia coli* y las cepas *Agrobacterium tumefaciens* C58 pMP90 (21) y LBA4404 (17). La preparación de células competentes para su transformación mediante electroporación se llevó a cabo según los protocolos descritos en el catálogo Pulse controller: Acce-

sory for bacterial and fungal electro-transformation (BioRad) en el caso de *E. coli*, y según Wen-jun y Forde (33) en el caso de *A. tumefaciens*. Tras descongelar en hielo una alícuota de 40 μ l de células competentes preparadas mediante sucesivos lavados de glicerol, se añadió 1 μ l de vector transformante. La mezcla se introdujo en una cubeta de 0,1 cm de separación entre electrodos (BioRad), previamente enfriada en hielo, y se sometió a un pulso eléctrico con un aparato Gene Pulser™ (BioRad). Las condiciones de electroporación fueron 200 μ s, 25 μ F y 1,8 kV, para *E. coli*, y 400 μ s, 25 μ F y 1,8 kV, para *A. tumefaciens*. Después del pulso eléctrico se añadió 1 ml de medio 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*.

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 μ l (25 mg/ml) de IPTG y 25 μ l (20 mg/ml) de X-Gal al medio de cultivo sólido.

4. Diseño de la construcción pBI-PsEND1::barnasa-barstar.

Para ensayar si la expresión del gen citotóxico barnasa en aquellos tejidos de la antera donde *PsEND1* es activo, era capaz de producir androesterilidad en plantas transgénicas de *Arabidopsis* y tabaco, se realizó la construcción *pBI-PsEND1::barnasa-barstar*. Para ello se partió de la construcción pBI101-F3 (13). 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 cDNA aislado previamente (clon 162) de una genoteca de cDNA de flores de guisante. El fragmento -2.736/-6 de la región promotora del gen *PsEND1* estaba fusionado al gen *uidA* que codifica la enzima β -glucuronidasa (GUS), (13). 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 clonado en el

sitio *Bam*HI del plásmido pBluescript KS (+) (Stratagene), fue amplificado utilizando los cebadores Ribo 1 (5'-TAGGATCCCGACCATGGCACAGGTTATC-3') e Inhi 2 (5'-GCGAGCTCTTAAGAAAGTTGATGGTGATG-3'). Con el primero se mantiene el sitio de corte para la enzima *Bam*HI del clon original a nivel del ATG de la *barnasa*, y con el último se crea un sitio de corte para *Sac*I a nivel del codón de parada del gen *barstar*. El fragmento producto de la reacción de PCR, se ligó al vector pGEM-T Easy (Promega), y se liberó posteriormente con las enzimas *Bam*HI y *Sac*I. Este inserto fue clonado en el sitio que crearon estas mismas enzimas en la construcción *pBI-PsEND1*, creándose así la construcción *pBI-PsEND1::barnasa-barstar*. La *barnasa* es una ribonucleasa muy activa e incluso a bajo niveles de expresión en *E. coli* o *Agrobacterium* puede impedir el normal desarrollo y la supervivencia de las bacterias. Por este motivo se introduce en la construcción el gen *barstar* que produce un inhibidor de la *barnasa* e impide la muerte de las bacterias. El gen *barstar* no se expresa en estas condiciones en la planta (14).

5. Transformación de *Arabidopsis thaliana* y análisis de las plantas transgénicas

Para la producción 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 (2). 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 (T₁), las semillas procedentes de plantas individuales T₁ 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 anteriormente.

Se analizó el fenotipo de la población correspondiente a la primera (T₁) y segunda generación (T₂) de plantas transformadas con la

construcción *pBI-PsEND1::barnasa-barstar*. Las plantas se fotografiaron con una cámara Nikon F-601 M, acoplada a una lupa MZ8 (Leica). Las anteras de las plantas *PsEND1::barnasa* fueron fijadas y observadas por SEM (microscopía electrónica de barrido) y microscopía óptica. Para el análisis fenotípico de dichas plantas *PsEND1::barnasa* de la generación T₂, 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 T₁ 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.

6. Evaluación del número de ramas y flores en plantas *PsEND1::barnasa* de *Arabidopsis thaliana*

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 *PsEND1::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. 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 agujereó el plástico que recubría las bandejas y, terminó eliminándose por completo al cabo de tres días.

7. 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 *et al.*, (19), con las modificaciones propuestas por Fisher y Gultinan (9). 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 MS-SACK (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 utilizó 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 frascos, 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 anteriormente. El análisis fenotípico de la primera generación (T_1) de plantas *PsEND1::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.

8. Transformación de colza (*Brassica napus* L.) y análisis de las plantas transgénicas.

Se utilizaron plantas de colza del cv. Drakkar que se transformaron con la cepa C58C1 ATHV (18) de *Agrobacterium* siguiendo el protocolo de Damgaard *et al.* (5) con algunas modificaciones. Tras un periodo de 2 días de precultivo los explantos de hipocotilo se cortaron en segmentos de 5 mm y se incubaron durante 60 min en medio MS-CIM-G (MS combinado con 20 g l⁻¹ glucosa, 1 mg l⁻¹ 2, 4-D, 0.1 mg l⁻¹ IAA) conteniendo 1 x10⁸ células de *Agrobacterium* por ml⁻¹. Luego, el medio fue reemplazado por medio líquido fresco MS-CIM-

G y el cocultivo se continuó durante 2 días a 22°C en condiciones de luz continua. La selección se realizó sobre medio DKW (Duchefa) conteniendo 20 g l⁻¹ sacarosa, 1 mg l⁻¹ BAP, 0.01 mg l⁻¹ IBA, 0.01 mg l⁻¹ GA₃, 25 mg l⁻¹ kanamicina y 500 mg l⁻¹ carbenicilina. Las plántulas regeneradas se transfirieron luego a medio MS (24) con 250 mg l⁻¹ carbenicilina y 25 mg l⁻¹ kanamicina para regenerar y enraizar. Los transformantes primarios (T₁) fueron transferidos a pequeñas macetas y aclimatados en el invernadero. Tras 2 semanas, las plantas se colocaron en macetas de 1.5 l con sustrato Floraton-3. A las 4 semanas se añadió fertilizante (PlantoSan Compact, Aglukon). El fotoperiodo fue de 16h de luz y 8h de oscuridad. Para condiciones de día largo la luz se suplementó con lámparas fluorescentes (Son-T Agro 400).

9. Transformación de *Solanum lycopersicon* (cv. Micro-Tom) y análisis de las plantas transgénicas.

La transformación genética de plantas de *Solanum lycopersicon* (cv. Micro-Tom) se realizó utilizando el protocolo optimizado descrito por Ellul *et al.* (7) que utiliza como material de partida cotiledones procedentes de plántulas germinadas *in vitro*. Los brotes transgénicos, una vez enraizados, desarrollaron estructuras vegetativas que nos permitieron obtener nuevas plantas mediante propagación clonal. utilizando estas estructuras vegetativas se realizaron los análisis moleculares y el análisis de ploidía de los transformantes primarios.

El nivel de ploidía se analizó mediante citometría de flujo, utilizando para el aislamiento de núcleos hojas procedentes de transformantes primarios (T₁) cultivados en medio de enraizamiento libre de antibiótico. El tejido de aproximadamente 1cm² se colocó en una placa Petri de 50 mm. de diámetro, a la que se añadió 200 µl de tampón de extracción de núcleos (Partec) y se troceó con una cuchilla. Una vez troceado el tejido, se pasó la suspensión resultante a través de una malla de nylon de 50 µl (Nybolt), y se añadieron 800 µl de una solución colorante que contenía 1mg/l de DAPI (4,6-diamino-2-phenyl-indole), consiguiendo así la tinción fluorescente del DNA. El DNA de los núcleos aislados se midió utilizando un citómetro de flujo

Partec PAS-II, provisto de una lámpara de mercurio. El resultado aparece trazado sobre una escala semilogarítmica, en la que el histograma que alcanza desde 2C a 32C se distribuye a lo largo del eje de abscisas. Para calibrarlo se utilizó el pico 2C de núcleos de hojas jóvenes de plántulas de tomate diploides cultivadas *in vitro*.

10. Análisis de los transgenes mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para el análisis por PCR de las líneas transgénicas, se extrajo DNA genómico siguiendo el método de Rogers y Bendich (26). La presencia del transgén de la *barnasa* se detectó mediante PCR utilizando los cebadores: Pro3 (5'-TGCTCACAAACATAACCTTCCTTG-3'; nucleótidos -26 a -4 de la secuencia del promotor *PsEND1*, Gene Bank número de acceso: AY324651) e Inhi3: (5'-CGCAGCCTTCGCTTTCGC-3'; de la secuencia complementaria de gen *barstar* (nucleótidos 374 a 355, Gene Bank número de acceso: X15545). Las secuencias de DNA se analizaron siguiendo el método descrito por Sanger *et al.* (29) en un secuenciador automático ABI PRISM 377 (Perkin Elmer).

RESULTADOS

1. *PsEND1*, un gen que se expresa específicamente en las anteras del guisante.

En nuestro laboratorio, aislamos un clon de cDNA que contenía la secuencia codificante completa de la proteína PsEND1, cuya expresión es específica de anteras. El aislamiento de dicho cDNA fue posible gracias a la secuenciación del extremo N-terminal de la proteína PsEND1 que purificamos mediante cromatografía de afinidad a partir de extractos de antera utilizando un anticuerpo monoclonal obtenido por nosotros (3). Mediante experimentos de hibridación *in situ* e inmunolocalizaciones sobre secciones de flores en desarrollo comprobamos que la expresión de *PsEND1* se circunscribe a la epidermis, capa intermedia, endotecio y tejido conectivo (Figura 1A) desde estadíos tempranos del desarrollo de las anteras hasta la de-

hiscencia (13). *PsEND1* no se expresa en el *tapetum*, ni en el polen ni en el filamento de la antera. La función de *PsEND1* es desconocida si bien presenta homología con los dominios tipo hemopexina de vitronectinas y metaloproteasas de matriz extracelular (Figura 1B). La falta de un método de transformación eficaz aplicable al guisante no nos ha permitido utilizar estrategias de genética reversa que desvelen la función de dicho gen.

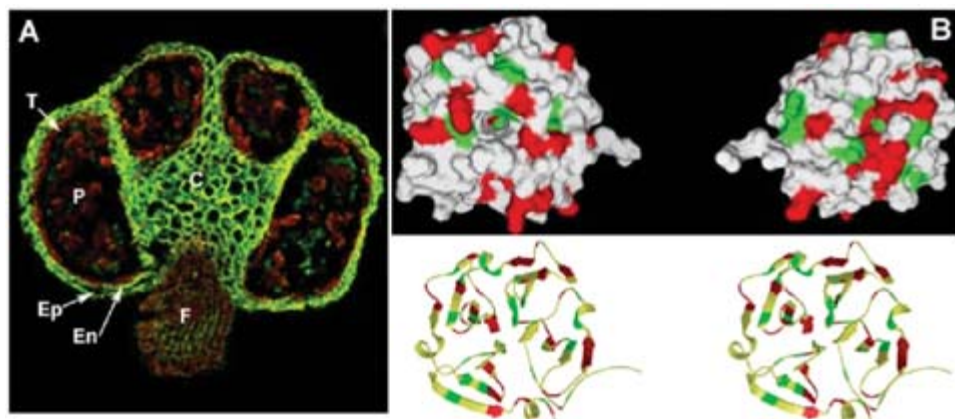


FIGURA 1. A: Inmunolocalización de la proteína *PsEND1* mediante microscopía confocal. Secciones en parafina de estambres de guisante se incubaron con un anticuerpo primario específico para la proteína y posteriormente con un anticuerpo secundario conjugado a un fluorocromo (Anti-IgG-FITC). La proteína se detecta en todos los tejidos que conforman el saco polínico (fluorescencia verde) como la epidermis (Ep), el endotecio (En), la capa intermedia y el tejido conectivo (C). La proteína no se detecta (fluorescencia roja) en el filamento (F), en el tapetum (T), ni tampoco en las células madre del polen (P). **B: Representación de la estructura tridimensional del dominio hemopexina (1GEN) de la Gelatinasa A** mediante un modelo sólido (visión estereoscópica). Los aminoácidos idénticos entre 1GEN y *PsEND1* se muestran en rojo y los que representan cambios conservativos en verde.

El patrón de expresión espacio-temporal de *PsEND1* nos sugirió que su región promotora podría ser de interés para la obtención de plantas transgénicas androestériles ya que podría utilizarse para impedir el desarrollo de las anteras mediante la expresión específica de genes citotóxicos en las mismas desde estadios muy tempranos de su desarrollo. La utilización del cDNA de *PsEND1* en el rastreo de una genoteca genómica de guisante nos condujo al aislamiento de

un fragmento de DNA que contenía su región promotora. Dicha región contiene tres posibles cajas CARG, lo que sugiere que *PsEND1* podría estar regulado por alguno de los genes de la familia MADS-box implicados en la especificación de la identidad del estambre (32). Un análisis del promotor mediante delecciones selectivas del mismo nos indicó que el fragmento correspondiente a las -336 pares de bases más cercanas al inicio del gen es suficiente para mantener su actividad y especificidad de expresión. También hemos comprobado que la región promotora de *PsEND1* dirige de manera específica la expresión del gen de la β -glucuronidasa (*uidA*, GUS) a las anteras de plantas transgénicas de especies diferentes al guisante, como *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* (tabaco), *Brassica napus* (colza) y *Solanum lycopersicom* (tomate). La capacidad de la región promotora de *PsEND1* de dirigir la expresión de genes foráneos en sistemas experimentales heterólogos específicamente a los mismos tejidos que lo hace en guisante, nos ha llevado a proteger su uso mediante patente con objeto de desarrollar herramientas biotecnológicas encaminadas a producir la ablación de anteras (12, 13, 27). Recientemente, hemos comprobado que la región promotora de *PsEND1* es capaz de dirigir la expresión de GUS a polen de trigo en el estadio binucleado y durante el desarrollo del tubo polínico lo que abre la posibilidad de que esta herramienta sea útil también para la producción de líneas androestériles en monocotiledóneas (26).

2. Producción de plantas androestériles en Brásicas y Solanáceas

Para la producción de plantas androestériles mediante ingeniería genética hemos utilizado el sistema *barnasa/barstar* desarrollado por Mariani *et al.* (23) para producir líneas androestériles de dos especies de Brásicas (*Arabidopsis thaliana* y *Brassica napus*) y de dos especies de Solanáceas (*Nicotiana tabacum* y *Solanum lycopersicon*). En todas las plantas ensayadas obtuvimos buenos resultados al conseguir producir líneas androestériles (27), siendo de especial interés agronómico las plantas androestériles de colza y tomate. En el caso de *Arabidopsis thaliana*, las plantas transgénicas generadas mostraron desde el momento en que comenzaron a florecer una serie de características que las diferenciaban de las plantas control:

- Las flores presentes en las plantas control (fenotipo silvestre) poseen anteras normales con polen en su interior (Figura 2A) y el filamento del estambre posee su longitud normal (Figuras 2B y C). Las flores transgénicas no muestran anteras (Figura 2F) 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 (Figuras 2G y H). En el interior de dichas estructuras no se detectaron granos de polen viables.
- Las plantas transgénicas continúan desarrollándose y produciendo flores mientras que las plantas control entran en senescencia y sus frutos se abren para liberar las semillas de su interior. La vida media de estas plantas aumentó unos tres meses con respecto al control.
- Mientras que en las plantas control 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.

Por su parte, las plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* generadas mostraron, al igual que en el caso anterior, las mismas características en cuanto a desarrollo y floración:

- Las flores presentes en las plantas control (fenotipo silvestre) poseen anteras normales con polen en su interior y el filamento del estambre posee su longitud normal (Figuras 2K, L y M). Las flores transgénicas muestran anteras deformes y necróticas con abundantes tricomas recubriendo sus sacos polínicos colapsados, los cuales no muestran polen en su interior (Figuras 2P, Q y R).
- 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 senes-

centes permanecen sobre los tallos que se alargan continuamente al producirse flores en sus meristemas 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 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 flores sin marchitarse durante casi 2 años.

Con objeto de comprobar la reversibilidad del sistema, también se obtuvieron plantas de *Arabidopsis* transformadas con la construcción *PsEND1::basta*r. Estas plantas, al cruzarse con las plantas transgénicas portadoras de la barnasa, produjeron plantas fértiles cuyas flores presentaban estambres normales con polen viable (resultados no mostrados). Esto es debido a que el basta actúa como inhibidor de la barnasa y consigue restablecer el desarrollo normal de las anteras y restaurar la fertilidad (23).

Realizamos también el mismo experimento en una Bráscica de interés agronómico como es la colza (*Brassica napus*), utilizando la misma construcción quimérica (*PsEND1::barnasa*). Los resultados fueron muy similares, produciéndose la esperada androesterilidad de las flores al bloquearse el desarrollo de las anteras. Los estambres transgénicos mostraban filamentos cortos y las anteras estaban colapsadas, no presentando granos de polen viables en el interior de sus sacos polínicos. Los carpelos no polinizados permanecían unidos al pedicelo floral hasta su senescencia (Figuras 2D, E, I y J). Del mismo modo, también realizamos el mismo ensayo en una Solanácea de interés agronómico como el tomate (cv. Micro-Tom) utilizando la misma construcción quimérica. El desarrollo de las plantas transgénicas fue completamente normal pero sus flores presentaban alteraciones en sus estambres (anteras con malformaciones en sus sacos polínicos) que no llegaban a cubrir al carpelo, no formándose por tanto el cono estaminal (Figuras 2N, O, S y T). Como en los otros casos los sacos polínicos colapsados no tenían granos de polen

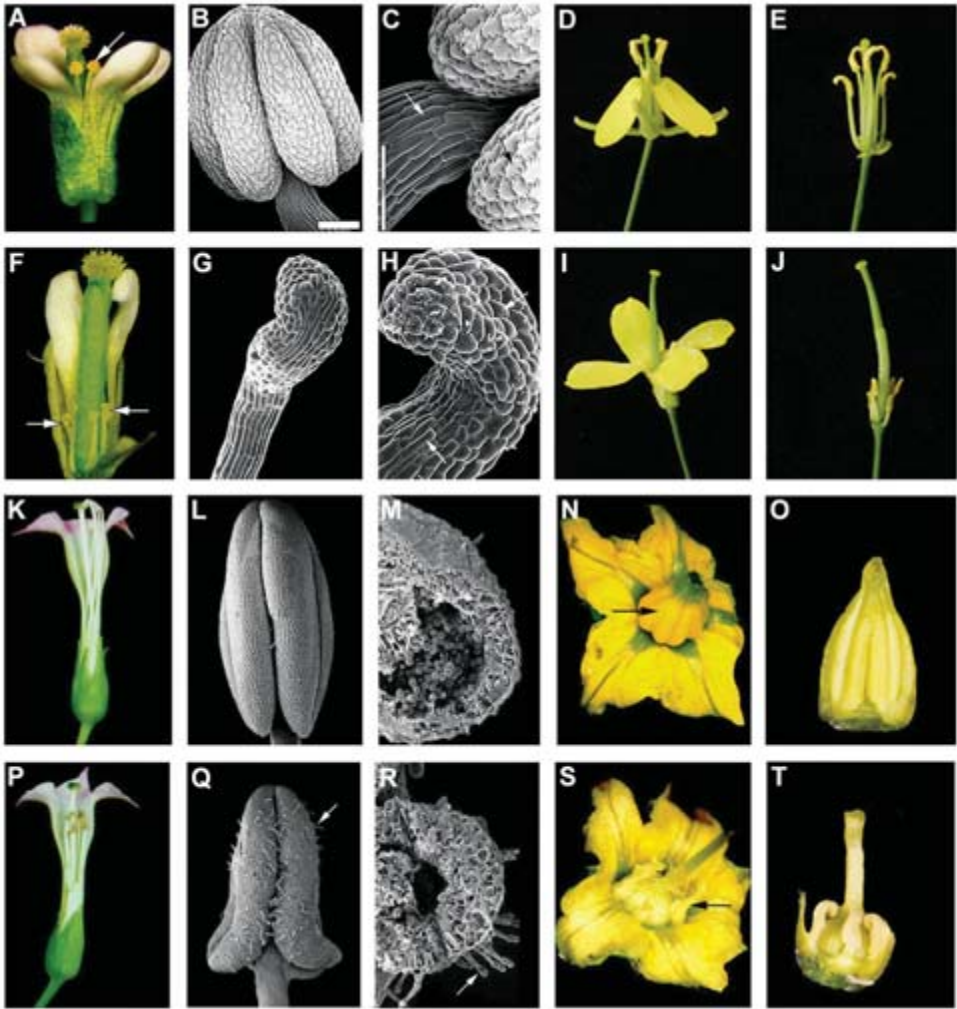


FIGURA 2. **Producción de plantas androestériles mediante ingeniería genética utilizando el gen de la ribonucleasa barnasa bajo el control del promotor PsEND1 de guisante.** **A:** Flor con fenotipo silvestre de *Arabidopsis thaliana* mostrando sus estambres. **B:** Estambre normal (antera + filamento) de *A. thaliana* observada mediante microscopía de barrido (SEM). **C:** Tipos celulares presentes en la epidermis de la antera (festoneados) y del filamento (alargados) de una flor silvestre de *A. thaliana* observados por SEM. **D:** Flor silvestre de colza mostrando todos sus órganos florales. **E:** Flor silvestre de colza sin sépalos ni pétalos para apreciar la morfología de sus estambres. **F:** Flor transgénica de *A. thaliana* transformada con la construcción PsEND1::barnasa mostrando las estructuras estaminoides en forma de gancho que se han formado en lugar de las anteras. **G:** Detalle



viable en su interior. Tampoco se detectaron variaciones en el nivel de ploidía de las líneas transgénicas seleccionadas.

La fertilidad femenina no se vio afectada en ninguna de las plantas transgénicas androestériles, siendo posible su fertilización con polen de una planta silvestre y por tanto el mantenimiento de las líneas transgénicas mediante retrocruzamiento.

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

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. Las plantas silvestres del cultivar Columbia empleado en este estudio producen un total de 36 ramas y que estas 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 una de las estructuras estaminoides observada por SEM. H: Tipos celulares presentes en la epidermis de una de esas estructuras. Predominan los tipos celulares presentes en el filamento. Los tipos celulares festoneados han desaparecido debido a la ablación celular selectiva inducida por el promotor PsEND1. I: Flor transgénica de colza transformada con la construcción PsEND1::barnasa. Los estambres no son visibles a simple vista. J: Flor transgénica de colza sin pétalos ni sépalos para mostrar el colapso sufrido por los estambres durante su desarrollo. K: Flor silvestre de tabaco mostrando sus estambres. L: Estambre normal de tabaco observado mediante SEM. M: Antera normal de tabaco seccionada para mostrar la presencia de polen viable en sus sacos polínicos. N: Flor silvestre de tomate mostrando todos sus órganos florales. O: Detalle del cono estaminal formado por los estambres al disponerse alrededor del carpelo. P: Flor transgénica de tabaco transformada con la construcción PsEND1::barnasa. Se observa la necrosis de las anteras y el acortamiento de sus filamentos. Q: Flor transgénica de tabaco observada mediante SEM. Se aprecia el colapso de sus sacos polínicos y la presencia de numerosos tricomas en su epidermis. R: Sección de una antera transgénica de tabaco en la que se observa la ausencia de granos de polen viable en el interior de sus sacos polínicos. S: Flor transgénica de tomate transformada con la construcción PsEND1::barnasa en la que se aprecia la desaparición del cono estaminal y el colapso de sufrido por las anteras durante su desarrollo. T: Flor transgénica de tomate sin sépalos ni pétalos para observar el colapso de las anteras y la ausencia de cono estaminal rodeando al carpelo.



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 (Figura 4A). Dicho aumento se produce en el número de ramas de todos los órdenes. 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 (Figura 4B). Además, se observa que se producen aumentos en la capacidad de desarrollar flores en las ramas de todos los órdenes.

El número de ramificaciones producido por las plantas con fenotipo androestéril es aproximadamente 8 veces mayor que en las plantas silvestres. 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 (Figura 5A). En lo que respecta al número de flores en las plantas androestériles se observa que el número de flores es, aproximadamente 4,5 veces mayor que en las plantas silvestres (Figura 5B).

FIGURA 3.- Plantas de *Nicotiana tabacum* transgénicas y plantas de *N. tabacum* silvestres. A: planta silvestre (izquierda) frente a dos plantas transgénicas (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 ramas con flores de las plantas silvestres se fecundan y producen frutos (cápsulas) deteniendo su crecimiento (izquierda), mientras que en las ramas de las plantas transgénicas no se aprecia la formación de frutos y continúan produciendo flores, las cuales van entrando en senescencia al no fecundarse.

DISCUSIÓN

La explotación de la heterosis o vigor híbrido, necesita de un mecanismo eficaz para controlar la polinización. La androesterilidad o incapacidad de una planta para producir polen funcional constituye una alternativa importante para controlar la polinización durante la producción de semilla híbrida en especies cultivadas de interés agronómico. La utilización de parentales femeninos androes- tériles durante la producción de semilla híbrida asegura que la semi-

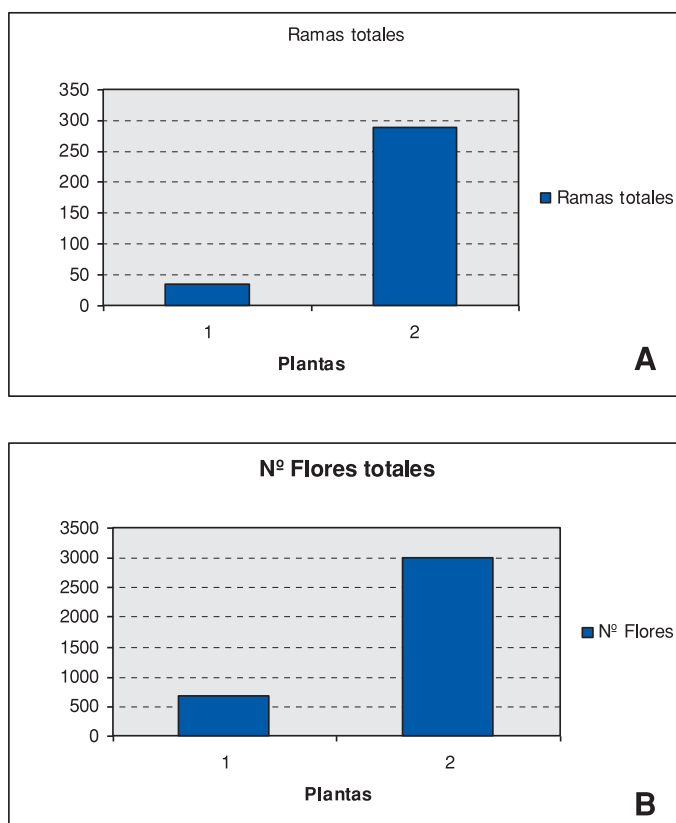


FIGURA 4. *Las gráficas muestran el número de ramas producidas en las plantas silvestres frente a las transgénicas (A) y el número de flores producidas en las plantas silvestres frente a las plantas transgénicas (B). En ambas gráficas el número 1 corresponde a plantas silvestres y el número 2 a plantas transgénicas.*

lla que se cosecha sea efectivamente híbrida y no proceda de la autofecundación o del cruzamiento con plantas de su mismo genotipo. La androesterilidad, es también una característica deseable en plantas capaces de desarrollar frutos en ausencia de fertilización (frutos partenocárpicos). En este tipo de frutos las semillas están ausentes, con lo que se mejora su aceptación por los consumidores (28). Además, la disponibilidad de genotipos androestériles de plantas puede ser relevante para evitar la contaminación por polen en áreas urbanas, disminuir la producción de alérgenos polínicos o evitar la posibilidad de transferencia genética horizontal indeseada, disminuyendo así la alarma social, por ejemplo, en el caso de algunos cultivos transgénicos (10). Por tanto, el desarrollo de técnicas de ingeniería genética para producir plantas androestériles sería rele-

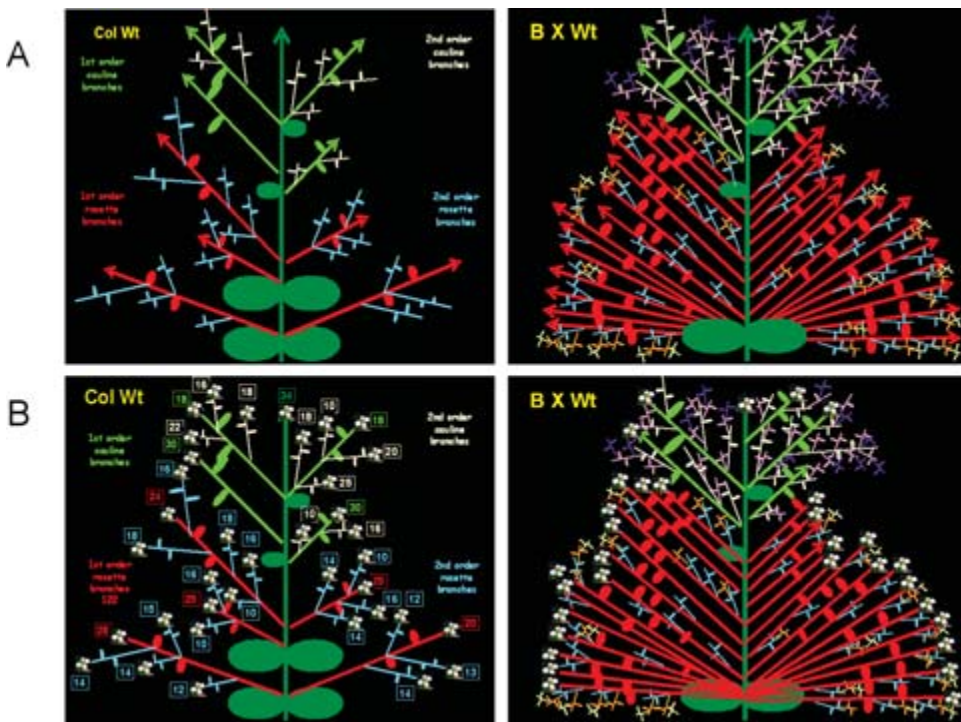


FIGURA 5. *Diagramas representativos del número de ramificaciones producidas en las plantas silvestres y en las plantas transgénicas de A. thaliana (A) y del número de flores producidas en las plantas silvestres y en las plantas transgénicas de A. thaliana (B).*

vante en agroalimentación, medio ambiente y biomedicina. Cuando es posible, la producción de semillas híbridas comerciales se apoya en métodos genéticos para controlar la polinización, utilizándose plantas auto-incompatibles o plantas androestériles, es decir, plantas que no producen polen, no son capaces de liberarlo o desarrollan polen que no es capaz de provocar auto-fertilización.

El sistema desarrollado en nuestro laboratorio, que se basa en la utilización del gen *barnasa* bajo el control del promotor *PsEND1* de guisante con expresión específica en determinados tejidos que conforman la arquitectura de la antera, presenta una serie de ventajas con respecto a otros sistemas similares que se basan en el uso de promotores de expresión específica en el *tapetum*, tejido nutritivo de las células que darán lugar al polen y que se forma más tardíamente en el desarrollo. En primer lugar la expresión del promotor *PsEND1* comienza a producirse en estadios muy tempranos del desarrollo del estambre, concretamente en el primordio estaminal (13). Por tanto la expresión del gen bajo su control (*barnasa*) se realiza también tempranamente produciendo una ablación de los tejidos que conforman los sacos polínicos de la antera impidiendo así la formación de polen viable en los mismos. Además, la especificidad de su expresión exclusivamente en los tejidos del saco polínico (13) y no en otros órganos florales o vegetativos de la planta, produce únicamente la ablación de dichos tejidos respetando la integridad del resto de la planta y por tanto no impidiendo su desarrollo normal. Por último se puede señalar su potencial para investigar funciones celulares en la antera, las relaciones entre diversos linajes celulares, las interacciones entre distintos tipos celulares durante el desarrollo de la antera, etc.

Las plantas androestériles de *Arabidopsis thaliana* y de *Nicotiana tabacum* obtenidas utilizando la tecnología anteriormente descrita, muestran una producción continuada de flores en comparación con plantas silvestres control así como un considerable alargamiento de su vida media. Una posible explicación a este fenómeno sería el hecho de que mientras que las plantas normales producen un determinado número de flores que tras su fecundación producen los correspondientes frutos, en las plantas androestériles al no producirse frutos, la planta continuaría produciendo flores sin cesar, ya que la sacarosa 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 (15). Este fenómeno es de gran interés para las empresas de floricultura (flor cortada o en maceta). La mayoría de las plantas utilizadas por dichas empresas son híbridos que producen flores muy vistosas pero generalmente en muy poca cantidad. La producción, mediante el uso de nuestro sistema, de plantas ornamentales androestériles que produzcan más flores, tendría la ventaja adicional de no producir dispersión horizontal de genes al no producir polen ni por supuesto semillas, con lo que su autorización de uso a nivel de campo no debería entrañar demasiada dificultad (4).

En el caso del sector viverista o el de la floricultura, la construcción *PsEND1::barnasa* podría utilizarse para producir plantas androestériles con mayor número de flores y con una vida media más prolongada. Esto abriría la posibilidad de una serie de aplicaciones de dicha tecnología para producir mayor número de flores en plantas ornamentales de interés para el sector de la flor cortada o el de la planta en maceta. La mayoría de las plantas ornamentales que se comercializan actualmente son híbridos que producen flores muy vistosas, con colores novedosos, pero en poca cantidad (i.e. clavel). Generalmente la ausencia de anteras en este tipo de flores no sería muy importante desde el punto de vista comercial ya que suele ser la forma y el color de los pétalos las características más apreciadas. La producción, mediante el uso de nuestro sistema, de plantas ornamentales androestériles que produzcan más flores tendría la ventaja adicional de no producir dispersión horizontal de genes durante su cultivo en campo o invernadero al no producir polen ni por supuesto semillas. Por tanto, obtener la autorización para cultivar masivamente este tipo de plantas genéticamente modificadas no sería muy dificultoso según la legislación vigente.

AGRADECIMIENTOS

Las investigaciones descritas en este trabajo contaron con financiación del Ministerio de Educación y Ciencia (BIO2003-01171 y PTR95-0979-OP-03-01) y de la Generalitat Valenciana. Mónica Medi-

na disfrutó de una beca predoctoral de la Universidad Politécnica de Valencia.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) BEALS, T.P. AND GOLDBERG, R.B. (1997) A novel cell ablation strategy blocks tobacco anther dehiscence. *Plant Cell*. 9: 1527-1545.
- (2) BECHTOLD, N.; ELLIS, J. AND PELLETIER, G. (1993) *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sci.* 316: 1194-1199.
- (3) CAÑAS, L.A.; ESSID, R.; GÓMEZ, M.D. AND BELTRÁN, J.P. (2002) Monoclonal antibodies as developmental markers to characterize pea floral homeotic transformations. *Sex. Plant Reprod.* 15: 141-152.
- (4) CAÑAS, L. A.; MEDINA, M.; ROQUE, E.; GARCÍA-SOGO, B.; MORENO, V. Y BELTRÁN, J.P. (2007) Procedimiento para modificar la arquitectura de la inflorescencia de las plantas. Oficina Española de Patentes y Marcas P200700618. CSIC-UPV. PCT en trámite.
- (5) DAMGAARD, O.; JENSEN, L.H. AND RASMUSSEN, O. S. (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Brassica napus* winter cultivars. *Transgenic Res.* 6: 279-288.
- (6) DAY, C.D. AND IRISH, V.F. (1997) Cell ablation and the analysis of plan development. *Trends Plant. Sci.* 2: 106-111.
- (7) ELLUL, P.; GARCÍA-SOGO, B.; PINEDA, B.; RÍOS, G.; ROIG, L.A. AND MORENO, V. (2003) The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato cotyledons (*Solanum lycopersicon* L. Mill.) is genotype and procedure dependent. *Theor. Appl. Genet.* 106: 231-238.
- (8) FABIJANSKI, S.F.; ALBANI, D.; ROBERT, L.S. AND ARNISON, P.G. (1992) Characterization of genes expressed during the development of *Brassica napus* pollen. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28: 46-52.
- (9) FISHER, D. K. AND GUILTINAN, J. (1995) Rapid, efficient production of homozygous transgenic tobacco plants with *Agrobacterium tumefaciens*: a seed to seed protocol. *Plant Mol. Biol. Rep.* 13: 278-289.
- (10) GATES, P. (1995) The environmental impact of genetically engineered crops. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 13: 181-195.
- (11) GOLDBERG, R.B.; BEALS, T.P. AND SANDERS, P.M. (1993) Anther development: basic principles and practical applications. *Plant Cell* 5: 1217-1229.
- (12) GÓMEZ, M.D.; CAÑAS, L.A.; MADUEÑO, F. AND BELTRÁN, J.P. (2001) Sequence regulating the specific expression in anthers of a gene and use thereof in the production of androsteryle plants and hybrid seeds. Patente internacional (PCT/ES01/00127). Oficina Española de Patentes y Marcas, P. n.º: P200000814. Patente en explotación por la empresa NBT (NewBioTechnic).
- (13) GÓMEZ, M.D.; BELTRÁN, J.P. AND CAÑAS, L.A. (2004) The pea *END1* promoter drives anther-specific gene expression in different plant species. *Planta*. 219: 967-981.

- (14) HARTLEY, R.W. (1988) *Barnase* and *barstar* expression of its cloned inhibitor permits expression of a cloned ribonuclease. *J. Mol. Biol.* 202: 913-915.
- (15) HENSEL, L.L.; NELSON, M.A.; RICHMOND, T.A. AND BLEECKER, A.B. (1994) The fate of inflorescence meristems is controlled by developing fruits in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 106: 863-876.
- (16) HEWITT, Y.M. (1966) Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Farnham Royal, Bucks. Commonwealth Agricultural Bureaux.
- (17) HOEKEMA, A.; HIRSCH, P.R.; HOOYKAAS, P.J.J. AND SCHILPEROORT, R.A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of *vir* and T region of the *Agrobacterium tumefaciens* tiplasmid. *Nature.* 303: 179-180.
- (18) HOOD, E.E.; HELMER, G.L.; FRALEY, R.T. AND CHILTON, M.D. (1986) The hyper-virulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTi-Bo542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.* 168: 1291-1301.
- (19) HORSCH, R.B.; FRALEY, R.T.; ROGERS, S.G.; SANDERS, P.R.; LLOYD, A. AND HOFFMANN, N. (1984) Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science.* 223: 496-498.
- (20) KOLTUNOW, A.M.; TRUETTNER, J.; COX, K.H.; WALLROTH, M. AND GOLDBERG, R.B. (1990) Different Temporal and Spatial Gene Expression Patterns Occur during Anther Development. *Plant Cell.* 2: 1201-1224.
- (21) KONCZ, C. AND SCHELL, J. (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204: 383-396.
- (22) MARIAN, C.; DE BEUCKELEER, M.; TRUETTNER, J.; LEEMANS, J. AND GOLDBERG, R.B. (1990) Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature.* 347: 737-741.
- (23) MARIANI, C.; GOSSELE, V.; DE BEUCKELEER, M.; DE BLOCK, M.; GOLDBERG, R.B.; DE GREEF, W. AND LEEMANS, J. (1992) A chimaeric ribonuclease inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature.* 357: 384-387.
- (24) MURASHIGE, T. AND SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
- (25) NILSSON, O.; WU, E.; WOLFE, D.S. AND WEIGEL, D. (1998) Genetic ablation of flowers in transgenic *Arabidopsis*. *Plant J.* 15: 799-804.
- (26) PISTÓN, F.; GARCÍA, C.; DE LA VIÑA, G.; BELTRÁN, J.P.; CAÑAS, L.A. AND BARRO, F. (2007) The pea *PsEND1* promoter drives the expresión of GUS in transgenic wheat at the binucleate stage and during pollen tube development. *Molecular Breeding* (in press).
- (27) ROGERS, S.O. AND BENDICH, A.J. (1984) Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 5: 69-76.
- (28) ROQUE, E.; GÓMEZ, M.D.; ELLULL, P.; WALLBRAUN, M.; MADUEÑO, F.; BELTRÁN, J.P. AND CAÑAS, L.A. (2007) The *PsEND1* promoter: a novel tool to produce genetically engineered male-sterile plants by early anther ablation. *Plant. Cell Rep.* 26: 313-325.
- (29) ROTINO, G.L.; PERRI, E.; ZOTTINI, M.; SOMMER, H. AND SPENA, A. (1997) Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nature Biotechnol.* 15: 1398-1401.

- (30) SANGER, F.; NICKLEN, S. AND COULSO, A. R. (1977) DNA sequencing with chain termination inhibitors. *PNAS. USA.* 74: 5463-5467.
- (31) SCOTT, R.J.; SPIELMAN, M. AND DICKINSON, H.G. (2004) Stamen structure and function. *Plant Cell.* 16 (suppl): S46-S60.
- (32) SCHMÜLLING, T.; RÖHRIN, H.; PILZ, S.; WALDEN, R. AND SCHELL, J. (1993) Restoration of fertility by antisense RNA in genetically engineered male sterile tobacco plants. *Mol. Gen. Genet.* 237: 385-394.
- (33) SHORE, P. AND SHARROCKS, A. D. (1995) The MADS-box family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* 229: 1-13.
- (34) WEN-JUN, S. AND FORDE, B. G. (1989) Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. By high voltage electroporation. *Nucleic Acid Res.* 17. 4415.
- (35) WILLIAMS, M.E. (1995) Genetic engineering for pollination control. *Trends Biotechnol.* 13: 344-349.