



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 299 172**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**C12N 15/29** (2006.01)  
**A01H 5/00** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **92903770 .3**  
86 Fecha de presentación : **05.02.1992**  
87 Número de publicación de la solicitud: **0570422**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **24.11.1993**

54 Título: **Promotores específicos de estambres de maíz.**

30 Prioridad: **28.06.1991 EP 91401787**  
**07.02.1991 EP 91400300**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.05.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.05.2008**

73 Titular/es: **Bayer BioScience N.V.**  
**Technologiepark 38**  
**9052 Gent, BE**

72 Inventor/es: **De Beuckeleer, Marc;**  
**Herdies, Lydia;**  
**Gossele, Véronique y**  
**Mariani, Celestina**

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 299 172 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Promotores específicos de estambres de maíz.

5 Esta invención se refiere a promotores aislados de maíz que pueden proporcionar expresión génica predominante o específicamente en las células estaminales de una planta, particularmente una planta monocotiledónea, y proporcionar por ello poca o ninguna expresión génica en otras partes de la planta que no están involucradas en la producción de polen fértil. Los promotores son útiles en la producción de plantas transformadas, en las cuales un gen debe expresarse al menos predominantemente, y de modo preferible específicamente, en las células estaminales, preferiblemente en las células de las anteras. Los promotores son especialmente útiles en la producción de plantas con esterilidad masculina y plantas restablecedoras de la fertilidad masculina como se describe en las solicitudes de Patente Europea ("EPA") 89401194.9 y 90402281.1, respectivamente, de modo particular en la producción de híbridos de plantas monocotiledóneas, tales como maíz, arroz o trigo.

15 **Sumario de la invención**

De acuerdo con esta invención, se proporcionan: promotores específicos de los estambres, preferiblemente específicos de las anteras, un promotor que controla la expresión de la secuencia codificante genómica correspondiente al cDNA de SEQ ID NO. 2 y que está contenido en la secuencia de los nucleótidos 1 a 1179 de SEQ ID NO. 3 (el "promotor CA55" o "PCA55"). Cada uno de tales promotores puede utilizarse en una secuencia de DNA extraña, preferiblemente una secuencia de DNA extraña quimérica, que contiene un gen estructural, preferiblemente un DNA de esterilidad masculina o un DNA restablecedor de la fertilidad masculina, bajo el control transcripcional del promotor y que puede utilizarse para transformar el genoma nuclear de una célula de una planta, particularmente una planta monocotiledónea. Adicionalmente, se proporcionan de acuerdo con esta invención: la planta estéril masculina o la planta restablecedora de la fertilidad masculina que pueden regenerarse a partir de una célula de este tipo transformada con la secuencia de DNA extraña de esta invención; la célula transformada propiamente dicha; un cultivo de una célula transformada de este tipo; semillas de una planta regenerada de este tipo y su progenie; y una planta de fertilidad restablecida y sus semillas resultantes del cruzamiento de dichas plantas con esterilidad masculina y restablecedoras de la fertilidad masculina.

30 **Descripción detallada de la invención**

De acuerdo con esta invención, una planta con esterilidad masculina o una planta restablecedora de la fertilidad masculina puede producirse a partir de una sola célula de una planta por transformación de la célula de la planta de una manera conocida para insertar de manera estable, en su genoma nuclear, la secuencia de DNA extraña de esta invención. La secuencia de DNA extraña comprende al menos un DNA con esterilidad masculina o un DNA restablecedor de la fertilidad masculina que está: bajo el control de, y fusionado en marco en su extremo de aguas arriba (es decir, 5') a, uno de promotores de esta invención específicos de los estambres, preferiblemente específicos de las anteras, y particularmente específicos del tapete, tales como el promotor y opcionalmente la secuencia conductora de SEQ ID NO. 3; y fusionado en su extremo de aguas abajo (es decir 3') a señales adecuadas de terminación (o regulación) de la transcripción, que incluyen una señal de poliadenilación. De este modo, el RNA y/o la proteína o polipéptido, codificados por el DNA de esterilidad masculina o restablecedor de la fertilidad masculina, se produce o se superproduce al menos predominantemente, con preferencia exclusivamente, en las células estaminales de la planta. La secuencia de DNA extraña puede comprender también al menos un DNA marcador que: codifica un RNA y/o proteína o polipéptido que, cuando está presente al menos en un tejido específico o células específicas de la planta, hace que la planta pueda separarse o distinguirse fácilmente de otras plantas que no contienen dicho RNA y/o proteína o polipéptido al menos en el tejido específico o las células específicas; se encuentra bajo el control de, y está fusionado en su extremo 5' a, un segundo promotor que es capaz de dirigir la expresión del DNA marcador al menos en el tejido específico o las células específicas; y está fusionado en su extremo 3' a señales de terminación de la transcripción adecuadas, que incluyen una señal de poliadenilación. El DNA marcador se encuentra preferiblemente en el mismo locus genético que el DNA de esterilidad masculina o restablecedor de la fertilidad masculina. Esta unión entre el DNA de esterilidad masculina o restablecedor de la fertilidad masculina y el DNA marcador garantiza, con un grado de certidumbre elevado, la segregación conjunta de, a la vez, el DNA de esterilidad masculina o restablecedor de la fertilidad masculina y el DNA marcador en la descendencia de la planta regenerada a partir de la célula de la planta transformada. Sin embargo, en algunos casos, dicha segregación conjunta no es deseable y, en tales casos, el DNA marcador debería encontrarse en un locus genético diferente del DNA de esterilidad masculina o restablecedor de la fertilidad masculina.

El DNA de esterilidad masculina de esta invención puede ser cualquier gen o fragmento de gen, cuyo producto de expresión (RNA y/o proteína o polipéptido) altera significativamente el metabolismo, el funcionamiento y/o el desarrollo de las células estaminales, preferiblemente las células de las anteras, e impide por tanto la producción de polen fértil. DNAs de esterilidad masculina preferidos se describen en el documento EPA 89401194.9, por ejemplo aquellos DNAs que codifican: RNAsas tales como RNasa Ti o barnasa; DNAsas tales como endonucleasas (v.g. EcoRI); proteasas tales como papaína; enzimas que catalizan la síntesis de fitohormonas (v.g., isopentenil-transferasa o los productos génicos del gen 1 y el gen 2 del T-DNA de *Agrobacterium*; glucanasas; lipasas; peroxidasa lipídicas; inhibidores de la pared celular de las plantas, o toxinas (v.g. el fragmento A de la toxina de la difteria o la botulina). Otros ejemplos preferidos de DNAs de esterilidad masculina son DNAs antisentido que codifican RNAs complementarios a genes, cuyos productos son esenciales para el desarrollo normal de polen fértil. Ejemplos adicionales preferidos de DNAs de

esterilidad masculina codifican ribozimas capaces de escindir específicamente secuencias diana dadas de genes que codifican productos que son esenciales para la producción de polen fértil. Otros ejemplos adicionales de DNAs de esterilidad masculina codifican productos que pueden hacer que las células estaminales, particularmente las células de las anteras - y no otras partes de la planta - sean propensos a enfermedades específicas (v.g. infección por hongos o virus) o condiciones de estrés (herbicidas).

La construcción de un vector que comprende un DNA de esterilidad masculina, tal como un DNA codificante de barnasa, bajo el control de un promotor específico de anteras del maíz de esta invención, se efectúa del modo más conveniente en un organismo hospedador bacteriano tal como *E. coli*. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza del DNA de esterilidad masculina y la configuración específica del vector, pueden encontrarse problemas debido a la expresión del DNA de esterilidad masculina en, y la disminución concurrente de la viabilidad del organismo hospedador. Tales problemas pueden resolverse de varias maneras. Por ejemplo, el organismo hospedador puede proveerse, en el mismo plásmido o un plásmido diferente del que contiene el DNA de esterilidad masculina o incluso en su DNA cromosómico, de otra secuencia de DNA que evita o inhibe significativamente el efecto de la expresión del DNA de esterilidad masculina en el organismo hospedador. Dicha otra secuencia de DNA puede codificar, por ejemplo: un RNA antisentido a fin de evitar la acumulación y traducción del RNA de esterilidad masculina; o una proteína (v.g., barstar) que inhibe específicamente el producto génico del RNA de esterilidad masculina (v.g., barnasa; Hartley (1988) J. Mol. Biol. 202, 913). Alternativamente, el DNA de esterilidad masculina puede contener elementos, tales como un Intrón vegetal, que dará únicamente como resultado un producto génico activo en un ambiente de células vegetales. Ejemplos de Intrones que pueden utilizarse para este propósito son Intrones de las unidades de transcripción de: el gen *adh-1* del maíz (Luehrsen y Walbot (1991) Mol. Gen. Genet. 225, 81; Mascarenhas *et al.*, (1990) Plant Mol. Biol. 15, 213), el gen *contraído-1* del maíz (Vasil *et al.* (1989), Plant. Physiol. 91, 1575), el gen *cat-1* del haba del ricino (Tanaka *et al.* (1990) Nucleic Acids Research ("NAR") 18, 6767), el gen *act-1* del arroz (McElroy *et al.* (1990) The Plant Cell 2, 163; publicación PCT WO 91/09948) y el gen TA36 (Intrón representado en SEQ ID NO. 4).

El DNA restablecedor de la fertilidad masculina de esta invención puede ser cualquier gen o fragmento de gen, cuyo producto de expresión (RNA y/o proteína o polipéptido) desactiva, neutraliza, inhibe, bloquea, contrarresta, vence o impide de otro modo la actividad específica del producto de un DNA de esterilidad masculina en las células estaminales, particularmente en las células de las anteras. DNAs restablecedores de la fertilidad masculina preferidos se describen en el documento EPA 90402281.1, por ejemplo aquellos DNAs que codifican: barstar, que es el inhibidor de la barnasa; EcoRI metilasa, que previene la actividad de EcoRI; o inhibidores de proteasas (v.g. los inhibidores de papaína). Otros ejemplos de DNAs restablecedores de la fertilidad masculina son DNAs antisentido que codifican RNAs complementarios a los DNAs de esterilidad masculina. Ejemplos adicionales de DNAs restablecedores de la fertilidad masculina codifican ribozimas capaces de escindir específicamente secuencias diana dadas de DNAs de esterilidad masculina.

El DNA marcador de esta invención puede ser cualquier gen o fragmento de gen que codifique un RNA y/o proteína o polipéptido que permite que plantas que expresan el DNA marcador se fácilmente y se separen distinguan de las plantas que no expresan el DNA marcador. Ejemplos del DNA marcador se describen en EPA 89401194.9, tales como los DNAs marcadores que codifican proteínas o polipéptidos que: proporcionan un color distinguible a las células vegetales, tales como el gen A1 que codifica dihidroquercetina-4-reductasa (Meyer *et al.* (1987) Nature 330, 667-678) y el gen de glucuronidasa (Jefferson *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA ("PNAS") 83, 8447); proporcionan una característica morfológica específica a una planta tal como crecimiento enano o una forma diferente de las hojas; confieren a una planta tolerancia al estrés, tal como la proporcionada por el gen que codifica la superóxido-dismutasa como se describe en EPA 88402222.9; confieren resistencia a enfermedades o plagas a una planta, tal como la proporcionada por un gen codificante de una endotoxina de *Bacillus thuringensis* que confiere resistencia a los insectos a una planta, como se describe en EPA 86300291.1; o confieren a una planta una resistencia bacteriana, tal como la proporcionada por el péptido bacteriano descrito en EPA 88401673.4. DNAs marcadores preferidos codifican proteínas o polipéptidos que inhiben o neutralizan la actividad de herbicidas tales como: el gen *sfr* y el gen *sfrv* que codifican enzimas que confieren resistencia a los inhibidores de la glutamina-sintetasa tales como Bialaphos y fosfinotricina como se describe en EPA 87400544.0.

Con objeto de que la proteína o el polipéptido codificado por el DNA marcador funcione como se pretende, a menudo se prefiere que los mismos se produzcan en la célula vegetal como un precursor, en el cual la proteína madura está enlazada en su extremo N-terminal a otro polipéptido (un "péptido de direccionamiento") que translocará la proteína madura a un compartimiento específico tal como los cloroplastos, la mitocondria, o el retículo endoplasmático. Tales péptidos de direccionamiento y las secuencias de DNA que codifican los mismos (las "secuencias de direccionamiento") son bien conocidos. Por ejemplo, si un DNA marcador codifica una proteína que confiere tolerancia o resistencia a un herbicida u otro agente selectivo que actúa sobre el metabolismo de los cloroplastos, tal como el gen *sfr* (o *bar*) o el gen *sfrv* (publicación de patente europea ("EP") 0.242.236), puede ser preferible que dicho gen comprenda también una secuencia de direccionamiento de cloroplastos tal como la que codifica el péptido de tránsito de la subunidad pequeña de la enzima 1,5-ribulosa-bisfosfato-carboxilasa (Krebbers *et al.* (1988) Plant. Mol. Biol. 11, 745; EPA 85402596.2), aunque pueden utilizarse otras secuencias de direccionamiento que codifican otros péptidos de tránsito, tales como las listadas por Von Heijne *et al.* (1991) Plant Mol. Biol. Reporter 9, 104.

Cada uno de los promotores de esta invención específicos de los estambres, preferiblemente específicos de las anteras, tales como el promotor CA55 aguas arriba del nucleótido 1180 en SEQ ID NO. 3, que pueden utilizarse para controlar el DNA de esterilidad masculina o el DNA restablecedor de la fertilidad masculina, pueden identificarse y

aislarse de manera bien conocida como se describe en EPA 89401194.9. A este respecto, los cDNAs de SEQ ID NO. 2 de esta invención pueden utilizarse como sonda para identificar (es decir, para hibridarse a) la región correspondiente del genoma del maíz (es decir, la región que contiene DNA codificante del mRNA específico de estambres, a partir del cual se produjo el cDNA). A continuación, puede identificarse la porción del genoma de la planta que está situada  
5 aguas arriba (es decir, 5') del DNA que codifica dicho mRNA específico de estambres y que contiene el promotor de este DNA. Por ejemplo, puede utilizarse el cDNA de SEQ ID NO. 2 como sonda para identificar y aislar un clon genómico a partir de una genoteca genómica de *Zea mays*, tal como una genoteca genómica de *Zea mays* lambda EMBL3 o EMBL4. De este modo, puede aislarse y secuenciarse un clon de DNA genómico, tal como el clon de SEQ ID NO. 3. SEQ ID NO. 3 contiene una región codificante que es homóloga al cDNA de SEQ ID NO. 2, y aguas arriba  
10 de esta región codificante se encuentra una secuencia promotora, con una secuencia TATA, que dirige la transcripción específica de las anteras de la región codificante.

El segundo promotor, que controla el DNA marcador, puede seleccionarse y aislarse también de manera bien conocida, por ejemplo como se describe en EPA 89401194.9, de tal modo que el DNA marcador se expresa selectivamente  
15 en uno o más tejidos o células específicos o constitutivamente en la planta entera, según se desee, dependiendo de la naturaleza del RNA y/o la proteína o polipéptido codificado por el DNA marcador.

En la secuencia de DNA extraña de esta invención, señales de terminación de la transcripción 3' o el "extremo 3'" pueden seleccionarse de entre aquéllas que son capaces de proporcionar terminación correcta de la transcripción y/o poliadenilación de mRNA en células vegetales. Las señales de terminación de la transcripción pueden ser las naturales del DNA de esterilidad masculina o del DNA restablecedor de la fertilidad masculina a transcribir, o pueden ser extrañas o heterólogas. Ejemplos de señales de terminación de la transcripción 3' heterólogas son las del gen de la octopina-sintasa (Gielen *et al.* (1984) EMBO J. 3, 835-845) y del gen 7 de D-DNA (Velten y Schell (1985) NAR 13, 6981-6998). Cuando la secuencia de DNA extraña de esta invención comprende más de un gen estructural (v.g.  
25 un DNA de esterilidad masculina o un DNA restablecedor de la fertilidad y un DNA marcador), se prefiere que los extremos 3' de los genes estructurales sean diferentes.

En las plantas, especialmente en las plantas monocotiledóneas, particularmente cereales tales como arroz, maíz y trigo, la expresión de acuerdo con esta invención de un DNA marcador, así como un DNA de esterilidad masculina o un DNA restablecedor de la fertilidad, puede intensificarse por la presencia en una o más, preferiblemente una, posición o posiciones apropiada(s) en la unidad de transcripción de cada secuencia de DNA extraña de esta invención, de un Intrón vegetal adecuado (Luerhsen y Walbot (1991) Mol. Gen. Genet. 225, 81; Mascarenhas *et al.* (1990) Plant Mol. Biol. 15, 913; Vasil *et al.* (1989) Plant Physiol. 91, 1575; Tanaka *et al.* (1990) NAR 18, 6767; McElroy *et al.* (1990) The Plant Cell 2, 163; publicación PCT WO 91/09948). Preferiblemente, cada Intrón tiene una secuencia de nucleótidos que: puede ser reconocida por las células de la especie vegetal que se transforma (para requerimientos de reconocimiento de Intrones por plantas, véase Goodall y Filipowicz (1989) Cell 58, 473; Hanley y Schuler (1988) NAR 16, 7159), tiene una longitud mayor que aproximadamente 70-73 pb (Goodall y Filipowicz (1990) Plant Mol. Biol. 14, 727), y está posicionada próxima al extremo 5' del mRNA codificado, particularmente en cualquier secuencia conductora no traducida.  
40

Las células de una planta pueden transformarse con la secuencia de DNA extraña de esta invención de manera convencional. En el caso en que la planta a transformar es propensa a infección por *Agrobacterium*, se prefiere utilizar un vector, que contiene la secuencia de DNA extraña, que es un plásmido Ti desactivado. La transformación puede realizarse utilizando procedimientos descritos, por ejemplo, en EP 0.116.718 y EP 0.270.822. Vectores preferidos de plásmidos Ti contienen la secuencia de DNA extraña entre las secuencias límite o al menos localizadas aguas arriba de la secuencia límite derecha. Por supuesto, pueden utilizarse otros tipos de vectores para transformar la célula vegetal, utilizando procedimientos tales como transferencia directa de genes (como se describe por ejemplo en EP 0.223.247), transformación mediada por polen (como se describe por ejemplo en EP 0.270.356, publicación PCT WO/85/01856 y EP 0275069), transformación de protoplastos *in vitro* (como se describe por ejemplo en la Patente US 4.684.611), transformación mediada por virus de plantas (como se describe por ejemplo en EP 0.067.553 y Patente US 4.407.956) y transformación mediada por liposomas (como se describe por ejemplo en la Patente US 4.536.475).  
50

En el caso en que la planta a transformar es el maíz, pueden utilizarse métodos de transformación desarrollados recientemente tales como los métodos descritos para ciertas líneas de maíz por Fromm *et al.* (1990) Bio/Technology 8, 833 y Gordon-Kamm *et al.* (1990) The Plant Cell 2, 603.  
55

En el caso en que la planta a transformar es el arroz, pueden utilizarse métodos de transformación desarrollados recientemente tales como los métodos descritos para ciertas líneas de arroz por Shimamoto *et al.* (1990) Nature 338, 274, Datta *et al.* (1990) Bio/Technology 8, 736, Christou *et al.* (1991) Bio/Technology 9, 957 y Lee *et al.* (1991) PNAS 88, 6389.  
60

En el caso en que la planta a transformar es el trigo, puede utilizarse un método análogo a los arriba descritos para maíz o arroz. Preferiblemente, para la transformación de una planta monocotiledónea, particularmente un cereal tal como arroz, maíz o trigo, se utiliza un método de transferencia directa de DNA, tal como un método de transformación biolística o electroporación. Cuando se utiliza un método de transferencia directa de este tipo, se prefiere minimizar el DNA que se transfiere de tal modo que se integre esencialmente sólo en el genoma de la planta la secuencia de DNA extraña de esta invención, con su DNA de esterilidad masculina, DNA restablecedor de la fertilidad y/o DNA marcador. A este respecto, cuando se construye una secuencia de DNA extraña de esta invención y se multiplica sobre  
65

## ES 2 299 172 T3

un plásmido en un organismo hospedador bacteriano, se prefiere que, antes de la transformación de una planta con la secuencia de DNA extraña, se separen las secuencias plasmídicas que se requieren para propagación en el organismo hospedador bacteriano, tales como un origen de replicación, un gen de resistencia a antibióticos para selección del organismo hospedador, etc., de las partes del plásmido que contienen la secuencia de DNA extraña.

5 Los ejemplos que siguen describen: el aislamiento y la caracterización de las dos secuencias de cDNA de maíz SEQ ID NO. 1 y NO. 2; *el uso del cDNA de SEQ ID NO. 2* de esta invención para aislamiento de promotores específicos de los estambres de esta invención a partir del genoma del maíz, tales como el promotor CA55 aguas arriba del nucleótido 1180 en SEQ ID NO. 3; la construcción de casetes promotoras para la fusión de los promotores con los DNAs de fertilidad masculina [sic] y restablecedor de la fertilidad masculina; la construcción de vectores de transformación de plantas a partir de las casetes promotoras; así como la transformación de maíz, arroz y tabaco con los vectores de transformación de plantas resultantes.

15 A no ser que se indique otra cosa en los ejemplos, todos los procedimientos para fabricación y manipulación de DNA recombinante se llevaron a cabo por los procedimientos estándar descritos en Maniatis *et al.*, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1982) y Sambrook *et al.*, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989). Cuando se fabricaron construcciones de plásmidos, se comprobaron la orientación y la integridad de los fragmentos clonados por medio de mapeado de restricción y/o secuenciación.

20 Los números de identificación de secuencias a que se hace referencia anteriormente y en los ejemplos se listan a continuación.

### Listado de secuencias

- 25 SEQ ID NO.: 1; secuencia de cDNA del gen CA444.  
SEQ ID NO.: 2: secuencia de cDNA del gen CA455.  
30 SEQ ID NO.: 3: clon de DNA genómico obtenido de una genoteca genómica de *Zea mays* utilizando el cDNA de SEQ ID NO. 2 como sonda.  
SEQ ID NO. 4: Intrón del gen TA36 de *Nicotiana tabacum* unido a enlazadores KpnI.  
35 SEQ ID NO. 5: secuencia del plásmido pVE149.

### Ejemplo 1

#### *Aislamiento y caracterización de cDNAs específicos de las anteras del maíz*

40 Para la clonación de cDNAs correspondientes a genes que se expresan exclusivamente, o al menos predominantemente, en las anteras del maíz, se preparó una genoteca de cDNA a partir de mRNA poliA<sup>+</sup> aislado de las espiguillas de la borla de la línea de maíz disponible públicamente B73 portadora de anteras en la etapa de tétrada. Por medio del kit del Sistema de Síntesis de cDNA Amersham Plus RPN 1956 Y/Z (Amersham International PLC, Buckinghamshire, Inglaterra), se sintetizó cDNA utilizando transcriptasa inversa y un iniciador oligo dT de acuerdo con las instrucciones expuestas en el kit para su utilización.

50 Los cDNAs se clonaron en el vector lambda gt10, utilizando el kit del Sistema de Clonación de cDNA Amersham-lambda gt10-RPN1257, de acuerdo con las instrucciones expuestas en el kit para su utilización. A partir de la genoteca de cDNA así obtenida (30.000 calvas), se realizó un cribado diferencial con una sonda de cDNA marcada de plantas de semillero B73 de maíz y con una sonda de cDNA marcada de las espiguillas enteras de maíz B73. Se seleccionaron 93 clones posibles de cDNA específicos de las anteras y se cribaron de nuevo con sondas de cDNA marcadas de anteras, plantas de semillero y mazorcas de maíz B73. Con los 66 clones restantes de estas selecciones adicionales, se realizó un análisis Southern con sondas diferenciales de cDNA de las anteras en la etapa de tétrada y de borlas, estigmas y mazorcas de la línea de maíz B73. Esto condujo a la selección de 27 clones específicos de las anteras que se subclonaron en pGEM1 (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.). La hibridación cruzada entre estos subclones reveló la presencia de al menos dos clases. Se prepararon sondas de algunos de estos subclones y se comprobaron de nuevo en relación con su especificidad en transferencias Northern con 5 a 10 µg de mRNA poliA<sup>+</sup> aislado de diferentes tejidos de maíz B73 (a saber, anteras, mazorcas, estigmas, hojas, y espiguillas en diversas etapas). A partir de esta selección, se identificaron dos clones específicos de las anteras, denominados "pCA444" y "pCA455". Se secuenciaron estos clones, y sus secuencias se presentan en el listado de secuencias como SEQ ID NO. 1 y SEQ ID NO. 2, respectivamente. Se encontró que pCA455 se hibrida exclusivamente con mRNA de las anteras en diferentes etapas de desarrollo. Se encontró que pCA444 se hibrida con mRNA de las anteras y se hibrida muy débilmente con un mRNA de tamaño similar procedente de embriones.

65 La secuencia de cDNA de pCA444 revela la presencia de dos marcos de lectura abierta ("ORF") de un total de 323 y 376 nucleótidos. La secuencia de cDNA de pCA455 revela la presencia de dos ORFs de un total de 387 y 300 nucleótidos.

## ES 2 299 172 T3

### Ejemplo 2

*Aislamiento del gen específico de anteras correspondiente al clon de cDNA específico de anteras, PCA444, del Ejemplo 1*

5 Para aislar los clones de DNA genómico que llevan las secuencias reguladoras del gen, CA444, correspondiente a pCA444, se utilizan dos enfoques.

10 El primer enfoque utiliza reacciones en cadena de polimerasa ("PCR") inversa (Ochman *et al.* (1989) en "PCR: Application & Protocols", Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. y White, T., compiladores, Academic Press, Nueva York) para la amplificación geométrica de las secuencias de DNA que flanquean, aguas arriba y aguas abajo, una región de núcleo seleccionada de la secuencia del gen CA444 correspondiente a la secuencia de pCA444. Se realizan digestiones de DNA utilizando tampones convencionales y condiciones bien conocidas. Fragmentos de un tamaño adecuado (menores que 3 a 4 kb) para amplificación y circularización correctas se producen utilizando enzimas de restricción que no escinden la región de núcleo seleccionada de la secuencia del gen CA444 y que se identifican preliminarmente por hibridación Southern. La circularización se realiza con DNA ligasa T4 en una concentración diluida de DNA que favorece círculos monómeros (Collins y Weissman (1984) PNAS 81, 6812-6815). Se realizan tres reacciones en cadena de polimerasa en paralelo con tres pares de oligonucleótidos diferentes en condiciones convencionales (Saiki *et al.* (1985) Science 230, 1250-1354) utilizando la DNA-polimerasa Vent<sup>TM</sup> (número de catálogo 254L - Biolabs New England, Beverly, MA 01915, EE.UU.) aislada de *Thermococcus litoralis* (Neuner *et al.* (1990) Arch. Microbiol. 153, 205-207).

25 En una reacción, las regiones flanqueantes de la región de núcleo de CA444, desde el nucleótido 85 al nucleótido 358 de la secuencia de cDNA correspondiente (SEQ ID NO. 1), se amplifican utilizando el par siguiente de 22 y 20 oligonucleótidos que tienen las secuencias respectivas siguientes:

- 1) 5' CCG AGG ACC AGC AGG ACG AGG C 3' (nucleótido 64 a nucleótido 85 de pCA444 (SEQ ID NO. 1))  
y
- 30 2) 5' GGA TGG CAG GAG GGG AGA GG 3' (nucleótido 358 a nucleótido 377 de pCA444 (SEQ ID NO. 1)).

35 En la segunda reacción, las regiones flanqueantes de la región de núcleo de CA444, desde el nucleótido 288 al nucleótido 392 de la secuencia de cDNA correspondiente (SEQ ID NO. 1), se amplifican utilizando el par siguiente de 20 y 23 oligonucleótidos que tienen las secuencias respectivas siguientes:

- 1) 5' GCA GGC TGT TGA TGA TGC CC 3' (nucleótido 269 a nucleótido 288 de pCA444 (SEQ ID NO. 1)) y
- 40 2) 5' CCA TTT CAC AGT GAG AGC AGT CG 3' (nucleótido 392 a nucleótido 414 de pCA444 (SEQ ID NO. 1)).

45 En la tercera reacción, las regiones flanqueantes de la región de núcleo de CA444, desde el nucleótido 43 al nucleótido 74 de la secuencia de cDNA correspondiente (SEQ ID NO.: 1), se amplifican utilizando el par siguiente de 22 y 20 oligonucleótidos que tienen las secuencias respectivas siguientes:

- 1) 5' GGG GCG GTG GCT GCT TCT AGC G 3' (nucleótido 22 a nucleótido 43 de pCA444 (SEQ ID NO. 1))  
y
- 50 2) 5' GCT GGT CCT CGG CGG CGG CA 3' (nucleótido 74 a nucleótido 93 de pCA444 (SEQ ID NO. 1)).

55 El segundo enfoque utiliza una genoteca genómica de *Zea mays* lambda EMBL3 o EMBL4 que se criba con la secuencia entera de cDNA de pCA444 como sonda. Se secuencian clones genómicos correspondientes que se hibridan a pCA444 (Maxam y Gilbert (1977) PNAS 74, 560) y su orientación se comprueba por análisis mediante transferencia Northern con ribosondas de ambos sentidos. La comparación de las secuencias de pCA444 con las secuencias de clones genómicos conduce a la identificación de las regiones homólogas. En el extremo 5' de la región de cada uno de estos clones genómicos homólogos, se determinan el codón ATG y la secuencia de consenso TATA. El hecho de que la secuencia "TATA" forma parte del promotor se confirma por extensión con iniciadores.

### Ejemplo 3

65 *Aislamiento del gen específico de anteras correspondiente al clon de cDNA específico de anteras, pCA455, del Ejemplo 1*

Para aislar los clones genómicos de DNA que llevan las secuencias reguladoras del gen, CA455, correspondiente a pCA455, se utilizan los dos enfoques del Ejemplo 2.

## ES 2 299 172 T3

En el primer enfoque, se utiliza PCR inversa (Ochman *et al.*, 1989) para la amplificación geométrica de las secuencias de DNA que flanquean una región de núcleo seleccionada de la secuencia del gen CA455 correspondiente a la secuencia de pCA455. La digestión y circularización del DNA se llevan a cabo como en el Ejemplo 2. Se realizan dos reacciones en cadena de la polimerasa en paralelo con dos pares de oligonucleótidos diferentes en condiciones convencionales (Saiki *et al.*, 1985) utilizando la DNA-polimerasa Vent<sup>TM</sup> aislada de *T. litoralis* (Neuner *et al.*, 1990).

En una reacción, las regiones flanqueantes de la región de núcleo de CA455, desde el nucleótido 54 al nucleótido 87 de la secuencia de cDNA correspondiente (SEQ ID NO. 2), se amplifican utilizando el par siguiente de 21 y 23 oligonucleótidos que tienen las secuencias respectivas siguientes:

- 1) 5' GCT CGA TGT ATG CAG TGC AGC 3' (nucleótido 34 a nucleótido 54 de pCA455 (SEQ ID NO. 2)) y
- 2) 5' CGT CGC CGT GTC GGT GCT TCT CG 3' (nucleótido 87 a nucleótido 109 de pCA455 (SEQ ID NO. 2)).

En la segunda reacción, se amplifican las regiones flanqueantes de la región de núcleo de CA455, desde el nucleótido 54 al nucleótido 557 de la secuencia de cDNA correspondiente (SEQ ID NO. 2), utilizando el par siguiente de 21 y 24 oligonucleótidos que tienen las secuencias respectivas siguientes:

- 1) 5' GCT CGA TGT ATG CAG TGC AGC 3' (nucleótido 34 a nucleótido 54 de pCA455 (SEQ ID NO. 2)) y
- 2) 5' CCG TTG CGT TGC GTT GCG TAG ACG 3' (nucleótido 557 a nucleótido 580 de pCA455 (SEQ ID NO. 2)).

El segundo enfoque utiliza una genoteca genómica de *Zea mays* lambda EMBL3 o EMBL4 que se escruta con la secuencia de cDNA entera de pCA455 como sonda. Clones genómicos correspondientes que se hibridan a pCA455 se secuencian (Maxam y Gilbert, 1977), y su orientación se comprueba por análisis mediante transferencia Northern con ribosondas de ambos sentidos. La comparación de pCA455 con las secuencias de clon genómico conduce a la identificación de las regiones homólogas. En el extremo 5' de la región de cada uno de estos clones genómicos homólogos, se determinan el codón ATG y la secuencia de consenso TATA. Que la secuencia "TATA" forma parte del promotor se confirma por extensión con iniciadores.

Utilizando este segundo enfoque, se escrutó una genoteca genómica de *Zea mays* lambda EMBL4 existente con la secuencia de cDNA entera de pCA455, como sonda. La genoteca se obtuvo del Dr. H. Saedler del Instituto Max Planck en Colonia, Alemania, con la designación "GH#1417". La genoteca comprendía DNA genómico de *Zea mays* que estaba parcialmente digerido con MboI y cuyos fragmentos de restricción resultantes se clonaron entre los sitios BamHI de los vectores de reemplazamiento EMBL4 del bacteriófago lambda (Frischauff *et al.* (1983) *J. Mol. Biol.* 170, 827; Pouwels *et al.* (1988) *Cloning Vectors - A Laboratory Manual* (actualización suplementaria), Elsevier Science Publishers, Amsterdam). Los fragmentos de restricción de la genoteca pudieron escindirse de los vectores como fragmentos EcoRI.

Se encontró que un fragmento EcoRI de aproximadamente 6 kb de longitud de la genoteca se hibridaba con pCA455 y se designó "VG55". Se encontró que VG55 contiene un sitio BamHI exclusivo, y uno de los fragmentos EcoRI-BamHI de VG55 se hibridaba todavía con pCA455, mientras que el otro no lo hacía. El fragmento EcoRI-BamHI que se hibridaba de modo cruzado con pCA455 se clonó entre los sitios EcoRI y BamHI del vector pGEM1 (Promega), produciendo un plásmido que se designó "pVG55.3". Se secuenció pVG55.3 (Maxam y Gilbert, 1977), y se comprobó su orientación por análisis mediante transferencia Northern con ribosondas de ambos sentidos. La secuencia de pVG55.3, aparte de algunos nucleótidos en su extremo 5' (que incluye su sitio EcoRI), se muestra en SEQ ID NO. 3, apreciándose que tiene un alto grado de homología con pCA455. El codón ATG de la secuencia codificante supuesta de pVG55.3 está localizado en la posición 1180, la secuencia codificante supuesta termina en la posición 1596, y la secuencia "TATA" está localizada en la posición 1072. El hecho de que la secuencia "TATA" forma parte del promotor se confirma por extensión con iniciadores. El sitio singular BamHI, arriba mencionado, está localizado en la posición 2770 en SEQ ID NO. 3.

La secuencia situada aguas arriba de la posición 1180 en SEQ ID NO. 3 puede utilizarse como región promotora para la expresión específica de las anteras de una secuencia codificante de interés. Esta secuencia es el promotor CA55 o PCA55. Preferiblemente, se utiliza la secuencia completa desde la posición 1 a la posición 1179, pero parece ser que la región mínima que puede servir como un promotor específico de anteras se extiende aproximadamente 300 a 500 pb aguas arriba de la posición 1180 en SEQ ID NO. 3. El uso de la secuencia conductora no traducida en la región promotora PCA55, entre el sitio de iniciación de la transcripción (que puede determinarse por medio de extensión con iniciadores) y el comienzo de la traducción ATG, parece ser preferido, pero no esencial para expresión específica de las anteras de un gen estructural heterólogo bajo el control del promotor PCA55, y la secuencia conductora puede reemplazarse aparentemente por la secuencia conductora no traducida de otros genes, tales como genes de plantas.

## Ejemplo 4

*Construcción de casetes promotoras derivadas de los genes específicos de las anteras de los Ejemplos 2 y 3*

5 Las secuencias reguladoras 5', con inclusión del promotor, de cada uno de los genes específicos de anteras de los Ejemplos 2 y 3 se subclonan en el polienlazador de pMa5-8 y pMc5-8 (documento EPA 87402348.4). Esto produce vectores que pueden utilizarse para aislar DNA monocatenario para uso en mutagénesis orientada. Utilizando mutagénesis orientada (EPA 87402348.4), se modifican secuencias circundantes del codón de iniciación de la traducción ATG de las secuencias reguladoras 5' de cada uno de los genes específicos de las anteras para crear un sitio de reconocimiento singular para una enzima de restricción para la cual existe un sitio de reconocimiento correspondiente en el extremo 5' de cada uno de los DNAs de esterilidad masculina y restablecedores de la fertilidad masculina (que deben fusionarse a las secuencias reguladoras 5' en el Ejemplo 5, más adelante). Los plásmidos resultantes contienen cada uno el sitio de restricción de nueva creación. La secuencia de nucleótidos precisa que abarca cada sitio de restricción de nueva creación se determina a fin de confirmar que la misma difiere únicamente de las secuencias reguladoras 5' del gen correspondiente específico de anteras del maíz por la sustitución, creando el nuevo sitio de restricción.

En la utilización de este procedimiento para construcción de casetes promotoras, se introduce un sitio NcoI en el codón de iniciación de la traducción ATG de pVG55.3 del Ejemplo 3 como sigue. Un fragmento de 1800 pb EcoRI-AvaI de pVG55.3 (el sitio AvaI está localizado en la posición 1276 de SEQ ID NO. 3; el sitio EcoRI se deriva de pGEM1 (Promega) y está localizado en el extremo 5' de SEQ ID NO. 3 [no representado]) se clona entre los sitios EcoRI y AvaI de los vectores pMa5-8 y pMc5-8 (Stanssens *et al.* (1989) MAR 17, 4441; EPA 87402348.4), produciendo plásmidos designados "pHa5-VG55.3" y "pMc5-VG55.3", respectivamente. Estos plásmidos se utilizan para mutagénesis orientada por un método de DNA dúplex con lagunas utilizando marcadores seleccionables alternativos como ha sido descrito por Stanssens *et al.* (1989), *supra*. El DNA dúplex con lagunas se construye a partir del pMc5-VG55.3 monocatenario y el fragmento grande EcoRI-AvaI de pMa5-VG55.3. Para la mutagénesis, se hace uso del oligonucleótido que tiene la secuencia siguiente:

CAG GAG CGA GCC ATG GCT GCA G.

Esta mutagénesis introduce en el sitio NcoI en el codón ATG de la secuencia codificante de SEQ ID NO. 3. La casete resultante comprende el promotor y la secuencia conductora de SEQ ID NO. 3 en un fragmento EcoRI-NcoI que debe fusionarse a las secuencias codificantes de los DNAs de esterilidad masculina y restaurador de la fertilidad masculina como se describe en el Ejemplo 5, más adelante. Alternativamente, se introduce el sitio NcoI en el codón de iniciación de la traducción ATG de pVG55.3 durante la amplificación por PCR de un fragmento de DNA, que contiene la región promotora CA55, utilizando los dos oligonucleótidos siguientes como iniciadores:

5'-GAT TCG AAT TCT GGT ATG CAT CAA TAG AGC CG-3'

5'-CAG GAG CGA GCC ATG GCT GCA G-3'.

El fragmento de DNA amplificado se utiliza directamente como casete promotora para la construcción de vectores de transformación de plantas como se describe en el Ejemplo 5.

## Ejemplo 5

*Construcción de vectores de transformación de plantas a partir de las casetes promotoras del Ejemplo 4*

Utilizando los procedimientos descritos en EPA 89401194.9 y 90402281.1, se utilizan las casetes promotoras del Ejemplo 4 para construir vectores de transformación de plantas que comprenden secuencias de DNA extrañas químéricas de esta invención, cada una de las cuales contiene las secuencias reguladoras 5', con inclusión del promotor específico de anteras, de uno de los genes específicos de las anteras aislados en el Ejemplo 2 ó 3. Cada una de estas secuencias reguladoras 5' se encuentra aguas arriba de, está en la misma unidad de transcripción que, y controla o bien un DNA de esterilidad masculina (de EPA 89401194.9) que codifica barnasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (Hartley y Rogerson (1972) Preparative Biochemistry 2 (3), 243-250) o un DNA restablecedor de la fertilidad masculina (de EPA 90402281.1) que codifica barstar (Hartley y Rogerson (1972) *supra*; Hartley y Sweatn (1973) J. Biol. Chem. 248 (16), 5624-5626). Aguas abajo de cada DNA de esterilidad masculina o cada DNA restablecedor de la fertilidad masculina se encuentra el extremo 3' del gen de la nopalina-sintasa (An *et al.* (1985) EMBO J. 4 (2), 277). Cada secuencia de DNA químérica comprende también el promotor 35 S'3 (Hull y Howell (1987) Virology 86, 482-493) cohesionado en marco con el gen *neo* que codifica resistencia a la kanamicina (EPA 84900782.8) y el extremo 3' del gen de la octopina-sintasa (Dhaese *et al.* (1983) EMBO J. 2, 419).

Alternativamente, se construyen los vectores de transformación de plantas pVE149, pVE139 y pVE136, como sigue.

## ES 2 299 172 T3

En un primer paso, el fragmento de DNA EcoRI-HindIII de 1083 pb de pMT416, que contiene las secuencias codificantes de barnasa y barstar (Hartley (1988) J. Mol. Biol. 202, 913) se liga al fragmento grande EcoRI-HindIII del plásmido pMa5-8, produciendo el plásmido pMa5tpbs1. Por medio de mutagénesis orientada (publicación PCT WO 89/03887), se introduce luego un sitio NcoI en el codón de iniciación de la traducción ATG de la secuencia codificante de barnasa. Para este propósito, se construye un DNA dúplex con lagunas a partir del pMa5tpbs1 monocatenario, el fragmento grande EcoRI-HindIII de pMc5-8, y el oligonucleótido siguiente:

5'-GAT AAC CGG TAC CAT GGT TGT CAC AGG GG-3'.

El plásmido resultante se designa como "pVE145A".

En una tanda de mutagénesis subsiguiente, se introduce un sitio MsiI 14 pb aguas abajo del codón de iniciación de la traducción ATG de la secuencia codificante de barnasa utilizando un DNA dúplex con lagunas constituido por DNA monocatenario de pVE145A, el fragmento grande EcoRI-HindIII de pMa5-8, y el oligonucleótido siguiente:

5'-CCC CGT CAA ATG CAT TGA TAA CCG G-3'.

El plásmido resultante se designa como "pVE145".

Los plásmidos pMa5-8 y pMc5-8 han sido depositados en fecha 3 de mayo de 1988 en la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM), Mascheroderweg 1B, D-330 Braunschweig, Alemania bajo los números de acceso DSM 4567 y DSM 4566, respectivamente.

Se corta pVE145 con NsiI, se rellena con Klenow, y se liga al fragmento de DNA de 111 pb representado en SEQ ID NO. 4 que contiene el Intrón TA36 y que ha sido escindido con KpnI y se ha hecho romo en los extremos con Klenow, obteniéndose el plásmido pVE146. El fragmento de SEQ ID NO. 4 se obtiene por amplificación, a partir de DNA genómico de *Nicotiana tabacum* cv. Samsun, por medio de PCR utilizando como iniciadores los dos oligonucleótidos siguientes:

5'-CGA CGG TAC CAC GTA ATT AG-3'

5'-CAT AGG GTA CCT GTA TGT AAT AAA AAC-3'.

El plásmido pVE147 se construye por ligación del fragmento EcoRI-HindIII de 2820 pb de pGEM1 (Promega), el fragmento HindIII-NcoI de 979 pb de pVE146 (que lleva el gen barnasa con Intrón), y el fragmento PCR de 1184 pb del Ejemplo 4 que lleva el promotor específico de anteras CA55 del maíz.

Finalmente, se obtiene pVE149 por ligación de los cuatro fragmentos de DNA siguientes:

- el fragmento de 1715 pb EcoRI (rellenado con Klenow)-XbaI de pVE147, que lleva el gen de barnasa bajo control del promotor CA55,
- un fragmento de 296 pb EcoRI-XbaI de pTTM6 (depositado en fecha 7 de marzo de 1988 en la DSM bajo el número de acceso DSM 4468), que lleva el extremo 3' no traducido del gen de la nopalina-sintasa de T-DNA de *Agrobacterium*,
- un fragmento de 1728 pb BglII (rellenado con Klenow)-HindIII, que lleva el gen *bar* (EP 0.242.236) bajo el control del promotor 35S3 (EP 0.359.617) y con un extremo 3' no traducido del gen de la nopalina-sintasa de T-DNA de *Agrobacterium* (este fragmento corresponde a la secuencia indicada en SEQ ID NO. 5 entre las posiciones 2409 y 4137), y
- el fragmento grande EcoRI-HindIII de pUC19 (New England Biolabs Inc. Beverly, MA, EE.UU.).

La secuencia completa de pVE149 se muestra en SEQ ID NO. 5.

El plásmido pVE136 es idéntico a pVE149 excepto que carece del Intrón TA36 en el gen de barnasa. pVE136 se construye reemplazando, en pVE149, el fragmento de 534 pb NcoI-BamHI, que lleva el gen de barnasa, con el fragmento de 449 pb NcoI-BamHI de pVE145A.

Se construye pVE136 y se mantiene en *E. coli* WK6 que contiene el plásmido pMc5-BS. pMc5-BS contiene el gen barstar bajo el control del promotor tak (De Boer *et al.* (1983) PNAS 80, 21) y se construye por clonación del fragmento EcoRI-HindIII de pMT416 (Hartley (1988) J. Mol. Biol. 202, 913) en pMc5-8. A continuación, la

## ES 2 299 172 T3

secuencia, que comienza con la secuencia señal PhoA y que termina con el último nucleótido antes del codón de iniciación de la traducción de la región codificante de barstar, se deletiona por mutagénesis de salto (“looping-out”) de acuerdo con los procedimientos generales descritos por Sollazi *et al.* (1985) Gene 37, 199. La disponibilidad de un gen de resistencia a la ampicilina en los plásmidos derivados de pUC18 que llevan el gen quimérico barnasa y el gen de resistencia a cloranfenicol en pMc5-BS hace posible que la cepa se mantenga estable en placas provistas de dos antibióticos o con objeto de seleccionar un plásmido cualquiera. Si bien está reprimida normalmente, la expresión de genes por este promotor puede inducirse por adición de un inductor del operón lac utilizado comúnmente, IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido).

El fragmento de 5843 pb NcoI-BamHI de pVE149 parcialmente digerido, que lleva la totalidad del plásmido excepto la secuencia codificante de barnasa, se rellena con Klenow y se liga a un fragmento DraI-HindIII (rellenado con Klenow) de pVE151, que lleva la secuencia codificante de barstar. El plásmido resultante se designa como “pVE139”. pVE151 se obtiene por medio de mutagénesis orientada de pMc5-BS, de tal manera que se introduce un sitio DraI en el codón de iniciación de la traducción ATG de la secuencia codificante de barstar. Para este propósito, se construye un DNA dúplex con lagunas a partir del pMc5-BS monocatenario, el fragmento grande EcoRI-HindIII de pMa5-8, y el oligonucleótido siguiente:

5'-GCT TTT TTA AAT TTA TTT TCT CC-3'.

Vectores de T-DNA para transformaciones de plantas mediadas por *Agrobacterium* se preparan por clonación de los fragmentos EcoRI (rellenado con Klenow)-HindIII apropiados de pVE149 o pVE136 (que contienen el gen 35S3-*bar* y el gen del promotor barstar del promotor específico de anteras) o pVE139 (que contiene los genes quiméricos 35S3-*bar* y el promotor barstar específico de anteras) entre los sitios HindIII y XbaI (rellenado con Klenow) de los vectores T-DNA conocidos pGSC1700 o pGSC1701A. pGSC1700 ha sido depositado en fecha 21 de marzo de 1988 en el DSM bajo el número de acceso DSM 4469, y pGSC1701A ha sido depositado en fecha 22 de octubre de 1987 en el DSM bajo el número de acceso DSM 4286. Los vectores T-DNA que contienen pVE149, pVE139 y pVE136 se utilizan para transformación de tabaco como se describe en el Ejemplo 7.

### Ejemplo 6

#### *Transformación de maíz con los vectores de transformación de plantas del Ejemplo 5*

Utilizando los procedimientos descritos por Fromm *et al.* (1990), *supra*, se transforman cultivos de suspensión embriogénicos de una línea de maíz B73 X A188 con los vectores de transformación de plantas descritos en el Ejemplo 5, que incluyen pVE149, pVE136 y pVE139 - sea directamente o después de linealización adecuada (v.g., después de digestión con EcoRI y/o HindIII). Las plantas transformadas regeneradas a partir de los cultivos de suspensión embriogénicos, cada una de las cuales contiene un promotor específico de anteras del Ejemplo 2 ó 3 que controla un DNA de esterilidad masculina o un DNA restablecedor de la fertilidad masculina, son normales excepto por lo que respecta a sus flores. A este respecto, cada planta que contiene un DNA de esterilidad masculina bajo el control de uno de los promotores específicos de las anteras expresa dicho DNA al menos predominantemente en sus anteras y no produce polen normal alguno, cada planta que contiene un DNA restablecedor de la fertilidad masculina bajo el control de uno de los promotores específicos de las anteras, expresa dicho DNA al menos predominantemente en sus anteras, pero produce polen normal.

### Ejemplo 7

#### *Transformación de tabaco con los vectores de transformación de plantas del Ejemplo 5*

Utilizando los procedimientos descritos en EPA 89401194.9 y 90402281.1, se transforman plantas de tabaco por transferencia mediada por *Agrobacterium* con los vectores de transformación de plantas que contienen las secuencias de DNA quiméricas extrañas del Ejemplo 5. Las plantas de tabaco transformadas, cada una de las cuales contiene un promotor específico de anteras del Ejemplo 2 ó 3 que controla o bien un DNA de esterilidad masculina o un DNA restablecedor de la fertilidad masculina, son normales excepto en lo que respecta a sus flores. A este respecto, cada planta que contiene un DNA de esterilidad masculina bajo el control de uno de los promotores específicos de las anteras expresa dicho DNA al menos predominantemente en sus anteras y no produce polen normal alguno, y cada planta que contiene un DNA restablecedor de la fertilidad masculina bajo el control de uno de los promotores específicos de las anteras expresa dicho DNA al menos predominantemente en sus anteras, pero produce polen normal.

### Ejemplo 8

#### *Transformación de arroz con los vectores de transformación de plantas del Ejemplo 5*

Utilizando los procedimientos descritos por Datta *et al.* (1990) *supra*, se transforman protoplastos de la línea de arroz *Oryza sativa*, variedad Chinsurah Boro II, con los vectores de transformación de plantas descritos en el Ejemplo 5, incluyendo pVE149, pVE136 y pVE139 - sea directamente o después de linealización adecuada (v.g. después de digestión con EcoRI y/o HindIII). Las plantas transformadas regeneradas a partir de los protoplastos, cada una de

## ES 2 299 172 T3

las cuales contiene un promotor específico de anteras del Ejemplo 2 ó 3 que controla o bien un DNA de esterilidad masculina o un DNA restablecedor de la fertilidad masculina, son normales excepto en lo que respecta a sus flores. A este respecto, cada planta que contiene un DNA de esterilidad masculina bajo el control de los promotores específicos de las anteras expresa dicho DNA al menos predominantemente en sus anteras y no produce polen normal alguno, y cada planta que contiene un DNA restablecedor de la fertilidad masculina bajo el control del promotor específico de anteras expresa dicho DNA al menos predominantemente en sus anteras pero produce polen normal. Alternativamente, embriones inmaduros de variedades de arroz Gulfmont, Lemont, IR26, IR36, IR54 o IR72 se bombardean con partículas de oro, que llevan DNA de plásmido apropiado del Ejemplo 5, y se regeneran plantas de acuerdo con los procedimientos descritos por Christou *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9, 957.

Es innecesario decir que el uso de los promotores de maíz específicos de las anteras de esta invención no está limitado a la transformación de cualquier planta específica. Dichos promotores de maíz pueden ser útiles en cualquier cosecha en la que los mismos sean capaces de controlar la expresión génica, y preferiblemente donde dicha expresión ocurre al menos predominantemente, de manera preferible específicamente, en las células estaminales de la cosecha. Asimismo, el uso de tales promotores no se limita al control de los DNAs de esterilidad masculina o DNAs restablecedores de la fertilidad masculina, sino que puede utilizarse para controlar la expresión de cualquier gen selectivamente en las células estaminales.

Adicionalmente, esta invención no está limitada a los promotores específicos de los estambres, preferiblemente específicos de las anteras, y en particular específicos del tapete, descritos en los ejemplos anteriores. De hecho, se cree que las secuencias de DNA de los promotores de los Ejemplos 2 y 3 pueden modificarse por reemplazamiento de algunos de sus nucleótidos con otros nucleótidos, con tal que dichas modificaciones no alteren sustancialmente la aptitud de los complejos de polimerasa, con inclusión de activadores de la transcripción, de las células estaminales, particularmente células de las anteras, para reconocer los promotores, tal como están modificados.

## ES 2 299 172 T3

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Un promotor específico de anteras que comprende una secuencia correspondiente a 300 pb aguas arriba de la posición 1180 en SEQ ID NO. 3.
2. Un promotor específico de anteras que se **caracteriza** porque su secuencia de nucleótidos está contenida en la secuencia de nucleótidos 1 a 1179 de SEQ No. 3.
- 10 3. Una región promotora que se **caracteriza** por tener la secuencia que comienza entre aproximadamente los nucleótidos 680 y 880 y termina en el nucleótido 1179 de SEQ ID NO. 3.
4. La región promotora de la reivindicación 3, que se **caracteriza** por tener la secuencia de nucleótidos entre el nucleótido 1224 y el nucleótido 2408 de SEQ ID NO. 5.
- 15 5. La región promotora de la reivindicación 3 ó 4 en la cual la secuencia conductora no traducida está reemplazada por la secuencia conductora no traducida de otro gen, preferiblemente un gen vegetal.
6. Un DNA adecuado para transformación de una planta en donde dicho DNA comprende un gen estructural heterólogo, bajo el control del promotor de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, o la región promotora de la reivindicación 3 a 5.
- 20 7. El DNA de acuerdo con la reivindicación 6, en el cual dicho gen estructural es un DNA de esterilidad masculina, que codifica preferiblemente una ribonucleasa.
- 25 8. El DNA de acuerdo con la reivindicación 7, en el cual dicho gen estructural codifica barnasa.
9. El DNA de acuerdo con la reivindicación 6, en el cual dicho gen estructural es un DNA restablecedor de la fertilidad masculina.
- 30 10. El DNA de acuerdo con la reivindicación 9, en el cual dicho gen estructural codifica barstar.
11. El DNA de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, que es un plásmido.
- 35 12. El DNA de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, que es DNA nuclear de una célula vegetal.
13. Una célula vegetal que comprende el DNA de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10.
- 40 14. Un cultivo de células vegetales que está constituido esencialmente por las células vegetales de la reivindicación 13.
15. Una planta o una semilla de una planta constituida esencialmente por las células vegetales de la reivindicación 13.
- 45 16. Una planta, o la semilla o progenie de la misma, regenerada a partir de la célula vegetal de la reivindicación 13, que comprende en el DNA nuclear de sus células, el DNA de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10.
17. La planta de acuerdo con la reivindicación 15 ó 16, **caracterizada** porque es una monocotiledónea, preferiblemente un cereal.
- 50 18. La planta de acuerdo con la reivindicación 17, que es una planta de maíz.
19. Un método para aislar un promotor específico de estambres del maíz que comprende realizar una PCR inversa sobre DNA genómico de maíz utilizando un par de oligonucleótidos constituidos por un primer oligonucleótido complementario a una secuencia de 21 a 24 nucleótidos del DNA de SEQ ID NO. 2 o el DNA de SEQ ID NO. 3 entre las posiciones de los nucleótidos 1120 y 1839, y un segundo oligonucleótido correspondiente a una secuencia de 21 a 24 nucleótidos del DNA de SEQ ID NO. 2 o el DNA de SEQ ID NO. 3 entre las posiciones de los nucleótidos 1120 y 1839.
- 55 20. El método de la reivindicación 19, en el cual dicho primer oligonucleótido tiene la secuencia siguiente:  
5'GCT CGA TGT ATG CAG TGC AGC 3'
- y en donde dicho segundo oligonucleótido tiene una secuencia seleccionada del grupo constituido por:  
65 5'CGT CGC CGT GTC GGT GCT TCT CG 3', y  
5'CCG TTG CGT TGC GTT GCG TAG ACG 3'.

# ES 2 299 172 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

### 1. Información General

- 5 i) SOLICITANTE: PLANT GENETIC SYSTEMS N.V.
- ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Promotores específicos de los estambres del maíz
- iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 5
- 10 SEQ. ID. NO: 1: cDNA CA444
- SEQ. ID. NO: 2: cDNA CA455
- SEQ. ID. NO: 3: secuencia genómica de maíz que comprende el promotor CA55
- 15 SEQ. ID. NO: 4: Intrón TA36
- SEQ. ID. NO: 5: plásmido pVE149
- iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- 20 A. DESTINATARIO: Plant Genetic Systems N.V.
- B. CALLE: Plateaustraat 22,
- C. CÓDIGO POSTAL Y CIUDAD: 9000 Gante,
- 25 D. PAÍS: Bélgica
- v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- A. TIPO DE MEDIO: disquete flexible 5,25 pulg., de 2 caras y alta densidad, 1,2 Mb
- 30 B. ORDENADOR: IBM PC/AT
- C. SISTEMA OPERATIVO: DOS versión 3.3
- D. SOPORTE LÓGICO: WordPerfect 5.1
- vi) DATOS DE LA PRESENTE SOLICITUD: No disponibles
- vii) DATOS DE SOLICITUDES ANTERIORES:
- EPA 91400300.9, presentada el 7 de febrero de 1991
- 40 EPA 91401787.6, presentada el 28 de junio de 1991

### 2. Descripción de la Secuencia: SEQ. ID. NO: 1

- 45 TIPO DE SECUENCIA: nucleótido
- LONGITUD DE LA SECUENCIA: 533
- CLASE DE CADENA: bicatenario
- 50 TOPOLOGÍA: lineal
- TIPO DE MOLÉCULA: cDNA a mRNA
- 55 FUENTE ORIGINAL:
- ORGANISMO: maíz
- ÓRGANO: antera
- 60 CARACTERÍSTICAS: desde el nucleótido 2 al nucleótido 376: Marco de Lectura Abierto 1  
desde el nucleótido 3 al nucleótido 326: Marco de Lectura Abierto 2
- PROPIEDADES: cDNA específico de anteras
- 65 DIVERSOS: cDNA designado como CA444

ES 2 299 172 T3

```

GGATCCTCGA GGCAACAATG GCGCTAGAAG CAGCCACCGC CCCCOCGCGA 50
CTCCTCGCCG CGTGCCCTCGT CCTGCTGGTC CTCGGCGGGC GCACCGGCC 100
GTCGTCGGTG CTGCGCGGGC CCGGGGCGCA GGCCGGCGGG CAGTGCCTGC 150
CGCAGCTGAA CCGCCTCCTG GCGTGCCGCG CGTACCTGGT GCCCGGCGCG 200
5 CCGGACCCCA GCGCGGACTG CTGCAGCGCG CTGAGCGCGG TGTGCGACGA 250
GTGCGCCTGC AGCACCATGG GCATCATCAA CAGCCTGCCG GGCCGGTGCC 300
ACCTCGCCCA AGCCAACTGC TCCGCTTCAA GCAGGGACCT GGCACGCGTG 350
CTGCAATGGA TGGCAGGAGG GGAGAGGAAT AAGAAGTGT TCCATTTTCC 400
AGTGAGAGCA GTCGAGCTCC AACGTTGTCG TCGTCGTCGT CTTCTTCTTT 450
10 TGATATTTCAG ACTCTGTCTT GCGGTCTATA TCATCAGCAT AATAATAATA 500
AAATAAGTAA AACCAAAAAA AAAAAAAAC CAT 533

```

3. Descripción de la Secuencia: SEQ. ID. NO: 2

15 TIPO DE SECUENCIA: nucleótido

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 796

20 CLASE DE CADENA: bicatenario

TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: cDNA a mRNA

25 FUENTE ORIGINAL:

ORGANISMO: maíz

30 ÓRGANO: antera

CARACTERÍSTICAS: desde el nucleótido 2 al nucleótido 388: Marco de Lectura Abierto 1  
 desde el nucleótido 70 al nucleótido 369: Marco de Lectura Abierto 2

35 PROPIEDADES: cDNA específico de anteras

DIVERSOS: cDNA designado como CA455

```

40 CCATGGTACC CCGATCCTCG CCAAACGCA GAAGCTGCAC TGCATACATC 50
GAGCTAACTA TCTGCAGCGA TGTCTCGCTC CTGCTGCGTC GCCGTGTCGG 100
TGCTTCTCGC TGTCCGCGCG ACAGCCAGCC CCACCGCGCC GGCATGGCTG 150
CAGGAGGAGG CCATGGCCAC GGGCCCGCTG GTCGCAGAGG GTGCAAGGGT 200
GGCGCCCTCC GCGTCCACCT GGGCTGCGCA CAAGGCGTCG CCGGCGAGGC 250
45 CGAGCGGCGG CATGGCCACG CAGGGCGACG ACCAGAGCTC GTCGGGCGGC 300
AGTGGCAGCA GCGGTGAGCA CGGCAAGGAG GAGGGCGAGA AGCAGGGCAA 350
GAGCTGCCTC ACCAAGGAGG AGTGCCCAA GAAGAAGATG ATCTGCCGCA 400
AGGGCTGCAC GCTCTCGGGC CACAGCAAGT GCGCCGCCAA GTGCACCAAG 450
TCCGTGTGCC CCACCTGCTA GGAGCCGAGG CCGGAGCTTG CCGGCGGCGA 500
50 GACCTCGATC GATCGAGTGC TTCACTTCC TTCTTTGTTA TAGTTCTTGT 550
GTGTGCGCGT TCGGTTGCGT TCGGTAGACG AAGGGAATAA GGAAGGGTAA 600
TTGGATTACC TGTTCCAGAT CTCTGTGTAA GCGTGTGTC GTGACCAAGTC 650
ATTTGATCCA GAGCGAGCGA TGGATAGATC GCGCTCGCAG TTTTAATTGC 700
AATGCTAGTT CAATAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 750
55 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA CCATGGTACC CGGATC 796

```

4. Descripción de la Secuencia: SEQ. ID. NO: 3

60 TIPO DE SECUENCIA: ácido nucleico

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 2784 pares de bases

65 CLASE DE CADENA: bicatenario

TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: DNA genómico

## ES 2 299 172 T3

FUENTE ORIGINAL: maíz

ÓRGANO: antera

5

CARACTERÍSTICAS:

- nucleótido 1 a nucleótido 1179: región que comprende el promotor y la secuencia conductora
- nucleótido 1072: secuencia TATA
- nucleótido 1180 a nucleótido 1596: secuencia codificante supuesta
- nucleótido 1120 a nucleótido 1839: región correspondiente a cDNA de SEQ. ID. NO. 2

10

15

PROPIEDADES: DNA genómico obtenido por sonda de una genoteca genómica de *Zea mays* utilizando el cDNA se SEQ. ID. NO. 2 como sonda. El DNA genómico se designa como pVG 55.3

20

TGGTATGCAT	CAATAGAGCC	GGAAGATGGT	CTGGAGTAAG	GACCTGGCAG	50
TGTGATACGG	GAACCTGACA	TCTGAATAGA	TATTCTCCCT	TGTCCTCTG	100
GTAAAAAAA	CTGTTGTCAC	ATTGCCTTC	GCTGTGACTT	GGATGTATCA	150
TGTATATCTT	TGACCATTGA	TATCTTGGTT	AATCAGACGG	TGCATTACAA	200
TCATGGCCTC	ATTCATATAG	GGTTTAGGGT	TACCACGATT	GGTTTGATA	250
AGTAGTACCC	CTCCGTTTCA	AATTATGTCG	TATTTTGATT	TTTTAGATAC	300
ACTTTTTATA	TAATTTTTTA	TTTTAAATTA	GGTGTTTTAT	ATAATACGTA	350
TCTAAGTGTA	TAATAAATA	TATGTATCTA	AAAGCTGTAA	TTTAGTATAA	400
ATTAGAATGG	TGTATATCTT	CAATGTATGA	CAAATAATTT	GAAATGGAGG	450
AGGGTATGAA	AAGCCAAAAC	CTCCTAGAAT	ATGGAATGGA	GGGAATACAT	500
ACAAATTCTT	TGCTTCAGTT	AAAAGAAACG	AGAAAAGGAG	GGGAATGGGG	550
AATCGTACTT	CAGTTTTTAC	GAGTTTTCAT	CAAACATGTA	TGCACGTCTT	600
CCCTTGGTTG	ATGCATCTTT	TTGGCAAATC	TTCGTTTAAT	TGCGGCTTCT	650
TTTTTATAAC	GTTCGAAGGT	TTTCGTCTGC	AATGCTGAAA	CTCCACTTTC	700
ACCACCTTCG	GTTGCATCTG	CTTGCTTTCA	ATTCACCTCT	AATTAGTCCA	750
AGTGTTPCAT	TGGACGAAGG	TCCAAGTCCT	TCAGATCATC	TCAATTTTCT	800
TTGATCTGAA	ACAACAATTT	AAAACCTGATT	TTGTTACCTT	GACCTGTCCG	850
AGACCTTCGA	ACGAACGGTA	CTGTAAAAT	ACTGTACCTC	AGATTTGTGA	900
TTTCAATTTCG	ATTCGGGTCT	CCTGGCTGGA	TGAAACCAAT	GCGAGAGAAG	950
AAGAAAAAAT	GTTGCATTAC	GCTCACTCGA	TCGGTTACGA	GCACGTAGTT	1000
GGCGCCTGTC	ACCCAACCAA	ACCAGTAGTT	GAGGCACGCC	CTGTTTGCTC	1050
ACGATCACGA	ACGTACAGCA	CTATAAAACA	CGCAGGGACT	GGAAAGCGAG	1100
ATTTACACAGC	TCAAAGCAGC	CAAAACGCAG	AAGCTGCACT	GCATATACAG	1150
AAGATACATC	GAGCTAACTA	GCTGCAGCG	ATG TCT CGC	TCC TGC	1194
			MET Ser Arg	Ser Cys	
			1	5	

45

50

55

60

65

ES 2 299 172 T3

	TGC GTC GCC GTG TCG GTG CTT CTC GCT GTC GCC GCG ACA	1233
	Cys Val Ala Val Ser Val Leu Leu Ala Val Ala Ala Thr	
	10 15	
5	GCC AGC GCC ACC GCG CCG GCA TGG CTG CAC GAG GAG CAG	1272
	Ala Ser Ala Thr Ala Pro Ala Trp Leu His Glu Glu Gln	
	20 25 30	
10	CAC CTC GAG GAG GCC ATG GCC ACG GGC CCG CTG GTC GCA	1311
	His Leu Glu Glu Ala MET Ala Thr Gly Pro Leu Val Ala	
	35 40	
15	GAG GGT GCG AGG GTG GCG CCC TCC GCG TCC ACC TGG GCT	1350
	Glu Gly Ala Arg Val Ala Pro Ser Ala Ser Thr Trp Ala	
	45 50 55	
20	GCC GAC AAG GCG TCG CCG GCG AGG CCG AGC GGC GGC ATG	1389
	Ala Asp Lys Ala Ser Pro Ala Arg Pro Ser Gly Gly MET	
	60 65 70	
25	GCC ACG CAG GGC GAC GAC CAG AGC TCG TCG GGC GGC AGT	1428
	Ala Thr Gln Gly Asp Asp Gln Ser Ser Ser Gly Gly Ser	
	75 80	
30	GGC AGC AGC GGT GAG CAC GGC AAG GCG GAG GGC GAG AAG	1467
	Gly Ser Ser Gly Glu His Gly Lys Ala Glu Gly Glu Lys	
	85 90 95	
35	CAG GGC AAG AGC TGC CTC ACC AAG GAG GAG TGC CAC AAG	1506
	Gln Gly Lys Ser Cys Leu Thr Lys Glu Glu Cys His Lys	
	100 105	
40	AAG AAG ATC ATC TGT GGC AAG GGC TGC ACG CTC TCG GCG	1545
	Lys Lys MET Ile Cys Gly Lys Gly Cys Thr Leu Ser Ala	
	110 115 120	
45	CAC AGC AAG TGC GCC GCC AAG TGC ACC AAG TCC TGT GTC	1584
	His Ser Lys Cys Ala Ala Lys Cys Thr Lys Ser Cys Val	
	125 130 135	
50	CCC ACC TGC TAGGAGCCGA GGCCGGAGCT TGCCGGCGGC GAGACCTCGA	1633
	Pro Thr Cys	
55	TCGATCGAGT GCTTCACTTC ACTTCTTTGT TATAGTTCTT GTGTGTGACC	1683
	GTTGCGTGC GTTGCGTAGA CGAAGGGAAT AAGGAAGGGT AATTGGATTA	1733
	CCTGTTCCAG ATCTCTGTGT AAGCGTGTG TCGTGACAAG TCTTTGATC	1783
	CAGAGCGAGG GATGGATAGA TCGCGCTCGC AGTTTTAAT GCAATGCTAG	1833
	TTCAATATGT TTGCATCATG TTGGCACTA CATAGTCCAG ATTCAAACCG	1883
	AGATCGCTGT TTAGCATGCC AGCACAATA TAACGGTACA ATCATATTAT	1933
	ATTTTATACA AATGCACAAT TTATCTCTAG AGATGTCAAT GGGAAATTC	1983
	TCATCGGGTT ATATCATCTC AGACTCATCC GCATCATATT TGATTCATCC	2033
	TCATACTCAT CCTCATATCT ATCATGAGTG CAAAATCAT TTCATACCCA	2083
60	TCTCTATTTT GGTTTAGGGT CTCCATCCCT AATTAAGGGA TAACTAGTAC	2133
	TAACTACTAG CACAACTAT CTAGATTTCA GATATCACCA CATGACAAA	2183
	CAATCATCCA TGAACATAGA TCCATTCATC CATCCATCAA AAAATAAATC	2233
	GGTATTTTGA GAACGATAGA AGAAATGAAG TCGGCTCACC TTTCTTGGTC	2283
	ACCATTTGAG TTTGTTGGTG CCTGAGAATC CATGGTCGTC ATCGTCGTCC	2333
	TAGGGATCGG CCGTGTCTCT CGTTGTTGGT AAAGTCGCCA GTGTGTAGTG	2383
	CTAGCGCAAC TGTCCAGGCG TGCAACGGTT GGCCGGCTGG AAAGGGCATA	2433
	GCGTATGGCT GGTATTTTTT AGGGTTTTGT TTTTTACTA ATCTGCTAGT	2483
	TGCCTTGCCA TGTGTCTTTA TTGGGCTAGG ATCTAGGGCT TGTACGCTG	2533
	CATGTTGGG CTTGGTGTCC GGTTCAGCCT CAACTCATTC ATACAAATCA	2583
	GATTCATACA AAACAGGTAT ACACGTATGA AATATCCATG GATAATCAGG	2633
	TTGGAATTAT TGTCCCCTAA ACCCATACAC GTTTACCCAA TGGATGGATA	2683
	TTTTGTCTCA TATCCATACA CATGAGACGA TTTTGTCCC ATACCTGTGC	2733
	TCTAATAGGA GAATTTCTCT CGGGATAGCG AGTATCGGAT CCTCTAGAGT	2783
	C	2784

## ES 2 299 172 T3

### 5. Descripción de la Secuencia: SEQ. ID. NO: 4

TIPO DE SECUENCIA: nucleótido

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 111 pb

CLASE DE CADENA: bicatenario

TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: DNA genómico amplificado por medio de PCR

FUENTE ORIGINAL:

ORGANISMO: *Nicotiana tabacum* cv. Samsun

CARACTERÍSTICAS: desde nt 1 a nt 7: secuencia espaciadora  
desde nt 8 a nt 13: sitio KpnI  
desde nt 16 a nt 100: secuencia de Intrón  
desde nt 101 a nt 106: sitio KpnI  
desde nt 107 a nt 111: secuencia espaciadora

PROPIEDADES: Intrón del gen TA36 con enlazadores KpnI en los extremos 5' y 3'

```
CTACGACGGT ACCACGTAAT TAGTTTATAC CTTTAAACTT TAATTTTCAA    50
CCGATTTTGT GTCGTCTGCT TAATCTAACT TATTGTTTTT ATTACATACA    100
GGTACCCTAT G                                                    111
```

### 6. Descripción de la Secuencia: SEQ. ID. NO: 5

TIPO DE SECUENCIA: nucleótido

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 6376 pb

CLASE DE CADENA: bicatenario

TOPOLOGÍA: circular

TIPO DE MOLÉCULA: DNA plasmídico

CARACTERÍSTICAS:

- nt 1 a nt 396: DNA derivado de pUC18

- nt 397 a nt 802: extremo 3' no traducido derivado del gen de nopalina-sintasa de T-DNA de *Agrobacterium*

- nt 803 a nt 1223: secuencia codificante de barnasa con el Intrón TA36

- nt 119 a nt 1203: Intrón TA36

- nt 1224 a nt 2408: región promotora CA55 de maíz

- nt 2409 a nt 3272: promotor 35S3

- nt 3273 a nt 3824: secuencia codificante del gen *bar*

- nt 3825 a nt 4137: extremo 3' no traducido derivado del gen de nopalina-sintasa de T-DNA de *Agrobacterium*

- nt 4138 a nt 6376: DNA derivado de pUC18

PROPIEDADES: DNA plasmídico replicable en *E. coli* designado como pVE14

ES 2 299 172 T3

	TCGCGCGTTT	CGGTGATGAC	GGTGAAAACC	TCTGACACAT	GCAGCTCCCG	50
	GAGACGGTCA	CAGCTTGTCT	GTAAGCGGAT	GCCGGGAGCA	GACAAGCCCC	100
	TCAGGGCGCG	TCAGCGGGTG	TTGGCGGGTG	TCGGGGCTGG	CTTAACTATG	150
5	CGGCATCAGA	GCAGATTGTA	CTGAGAGTGC	ACCATATGCG	GTGTGAAATA	200
	CCGCACAGAT	GCGTAAGGAG	AAAATACCGC	ATCAGGCGCC	ATTCCGCCATT	250
	CAGGCTGCGC	AACTGTTGGG	AAGGGCGATC	GGTGCGGGCC	TCTTCGCTAT	300
	TACGCCAGCT	GGCGAAAGGG	GGATGTGCTG	CAAGGCGATT	AAGTTGGGTA	350
	ACGCCAGGGT	TTTCCCAGTC	ACGACGTTGT	AAAACGACGG	CCAGTGAATT	400
	CGAGCTCGGT	ACCCGGGGAT	CTTCCCAGTC	TAGTAACATA	GATGACACCG	450
10	CGCGCGATAA	TTTATCCTAG	TTTGCGCGCT	ATATTTTGT	TTCTATCGCG	500
	TATTAATGT	ATAATTGCCG	GACTCTAATC	ATAAAAACC	ATCTCATAAA	550
	TAACGTCATG	CATTACATGT	TAATTATTAC	ATGCTTAACG	TAATTCAACA	600
	GAAATTATAT	GATAATCATC	GCAAGACCGG	CAACAGGATT	CAATCTTAAG	650
	AAACTTTATT	GCCAAATGTT	TGAACGATCT	GCTTCGGATC	CTCTAGAGXX	700
15	XXCCGGAAG	TGAAATGAC	CGATCAGAGT	TTGAAGAAAA	ATTTATTACA	750
	CACTTTATGT	AAAGCTGAAA	AAAACGGCCT	CCGCAGGAAG	CCGTTTTTTT	800
	CGTTATCTGA	TTTTTGTA	GGTCTGATAA	TGGTCCGTTG	TTTTGTAAAT	850
	CAGCCAGTCG	CTTGAGTAAA	GAATCCGGTC	TGAATTTCTG	AAGCCTGATG	900
	TATAGTTAAT	ATCCGCTTCA	CGCCATGTTT	GTCCGCTTTT	GCCCCGGGAGT	950
	TTGCCTTCCC	TGTTTGAGAA	GATGTCTCCG	CCGATGCTTT	TCCCCGGGAGC	1000
20	GACGTCTGCA	AGGTTCCCTT	TTGATGCCAC	CCAGCCGAGG	GCTTGTGCTT	1050
	CTGATTTTGT	AATGTAATTA	TCAGGTAGCT	TATGATATGT	CTGAAGATAA	1100
	TCCGCAACCC	CGTCAAAC TG	TATGTAATAA	AAACAATAAG	TTAGATTAAG	1150
	CAGACGACAC	AAAATCGGTT	GAAAATTAAA	GTTTAAAGGT	ATAAACTAAT	1200
	TACGTGTTGA	TAACCGGTAC	CATGGCTGCA	GCTAGTTAGC	TCGATGTATC	1250
25	TTCTGTATAT	GCAGTGCAGC	TTCTGCGTTT	TGGCTGCTTT	GAGCTGTGAA	1300

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 299 172 T3

	ATCTCGCTTT	CCAGTCCCTG	CGTGTPTTAT	AGTGCTGTAC	GTTCTGTATC	1350
	GTGACCAAAC	AGGGCGTGCC	TCAACTACTG	GTTTGGTTGG	GTGACAGGCG	1400
	CCAACTACGT	GCTCGTAACC	GATCGAGTGA	GCGTAATGCA	ACATTTTTTC	1450
5	TTCTTCTCTC	GCATTGGTTT	CATCCAGCCA	GGAGACCCGA	ATCGAATTGA	1500
	AATCACAAT	CTGAGGTACA	GTATTTTTAC	AGTACCGTTC	GTTCTGAAGGT	1550
	CTTCGACAGG	TCAAGGTAAC	AAAATCAGTT	TFAAATGTG	GTTTCAGATC	1600
	AAAGAAAATT	GAGATGATCT	GAAGGACTTG	GACCTTCGTC	CAATGAAACA	1650
	CTTGGACTAA	TTAGAGGTGA	ATTGAAAGCA	AGCAGATGCA	ACCGAAGGTG	1700
	GTGAAAGTGG	AGTTTCAGCA	TTGACGACGA	AAACCTTCGA	ACGGTATAAA	1750
10	AAAGAAGCCG	CAATTAACG	AAGATTTGCC	AAAAAGATGC	ATCAACCAAG	1800
	GGAAAGCGTG	CATACATGTT	TGATGAAAAA	TCGTAAAAAC	TGAAGTACGA	1850
	TTCCGCATTC	CCCTCCTTTT	CTCGTTTCTT	TFAACTGAAG	CAAAGAATT	1900
	GTATGTATT	CCTCCATTCC	ATATTCTAGG	AGGTTTTGGC	TTTTCATACC	1950
	CTCCTCCATT	TCAAATTATT	TGTCATACAT	TGAAGATATA	CACCATCTTA	2000
15	ATTTATACTA	AATTACAGCT	TTTAGATACA	TATATTTTAT	TATACACTTA	2050
	CTCAGACTATT	AATAAAAAA	CCTAATTTAA	AATAAAAAAT	TATAAAAAA	2100
	GTGTATCTAA	AAAATCAAAA	TACGACATAA	TTTGAACCGG	AGGGGTAATA	2150
	CTTATGCAAA	CCAATCGTGG	TAACCCATAA	CCCTATATGA	ATGAGGCCAT	2200
	GATTGTAATG	CACCGTCTGA	TTAACCAAGA	TATCAATGGT	CAAAGATATA	2250
	CATGATACAT	CCAAGTCACA	CCGAAGGCAA	ATGTGACAAC	AGTTTTTTTT	2300
20	ACCAGAGGGA	CAAGGGAGAA	TATCTATTCA	GATGTCAAGT	TCCCGTATCA	2350
	CACTGCCAGG	TCCTTACTCC	AGACCATCTT	CCGGCTCTAT	TGATGCATAC	2400
	CAGGAATTGA	TCTAGAGTCC	ACCTGCAGGC	ATGCAAGCTC	CTACGCAGCA	2450
	GGTCTCATCA	AGACGATCTA	CCCGAGTAAC	AATCTCCAGG	AGATCAAATA	2500
	CCTTCCCAAG	AAGGTTAAAG	ATGCAGTCAA	AAGATTCAGG	ACTAATTGCA	2550
25	TCAAGAACAC	AGAGAAAGAC	ATATTTCTCA	AGATCAGAAG	TACTATTCCA	2600
	GTATGGACGA	TTCAAGGCTT	GCTTCATAAA	CCAAGGCAAG	TAATAGAGAT	2650
	TGGAGTCTCT	AAAAAGGTAG	TTCTACTGA	ATCTAAGGCC	ATGCATGGAG	2700
	TCTAAGATT	AAATCGAGGA	TCTAACAGAA	CTCGCCGTGA	AGACTGGCGA	2750
	ACAGTTCATA	CAGAGTCTTT	TACGACTCAA	TGACAAGAAG	AAAATCTTCG	2800
	TCAACATGGT	GGAGCACGAC	ACTCTGGTCT	ACTCCAAAAA	TGTCAAAGAT	2850
30	XCAGTCTCAG	AAGACCAAG	GGCTATTGAG	ACTTTTCAAC	AAAGGATAAT	2900
	TCGGGAAAC	CTCCTCGGAT	TCCATTGCC	AGCTATCTGT	CACCTCATCG	2950
	AAAGGACAGT	AGAAAAGGAA	GGTGGCTCCT	ACAAATGCCA	TCATTGCGAT	3000
	AAAGGAAAGG	CTATCATTCA	AGATGCCTCT	GCCGACAGTG	GTCCCAAAGA	3050
	TGGACCCCCA	CCCACGAGGA	GCATCGTGGA	AAAAGAAGAC	GTTCCAACCA	3100
35	CGTCTTCAAA	GCAAGTGGAT	TGATGTGACA	TCTCCACTGA	CGTAAGGGAT	3150
	GACGCACAAT	CCCACATATC	TTCCGAAGAC	CCTTCTCTTA	TATAAGGAAG	3200
	TTCAATTCAT	TTGGAGAGGA	CACGCTGAAA	TCACCAGTCT	CTCTCTATAA	3250
	ATCTATCTCT	CTCTCTATAA	CCATGGACCC	AGAACGACGC	CCGGCCGACA	3300
	TCCGCCGTGC	CACCGAGGCG	GACATGCCGG	CGGTCTGCAC	CATCGTCAAC	3350
40	CACTACATCG	AGACAAGCAC	GGTCAACTTC	CGTACCGAGC	CGCAGGAACC	3400
	GCAGGAGTGG	ACGGACGACC	TCGTCCGTCT	GCCGGAGCGC	TATCCCTGGC	3450
	TCGTCCGCCA	GGTGGACGGC	GAGGTCCGCC	GCATCCGCTA	CGCGGGCCCC	3500
	TGGAAGGCAC	GCAACGCCTA	CGACTGGACG	GCCGAGTCGA	CEGTGTACGT	3550
	CTCCCCCGC	CACCAGCGGA	CGGGACTGGG	CTCCACGCTC	TACACCCACC	3600
	TGCTGAAGTC	CCTGGAGGCA	CAGGGCTTCA	AGAGCGTGGT	CGCTGTCAATC	3650
45	GGGCTGCCCA	ACGACCCGAG	CGTGCGCATG	CACGAGGCGC	TCGGATATGC	3700
	CCCCCGCGGC	ATGCTGCCGG	CGGCCGGCTT	CAAGCACGGG	AACTGGCATG	3750
	ACGTGGGTTT	CTGGCAGCTG	GACTTCAGCC	TGCCGGTACC	GCCCCGTCCG	3800
	GTCCGTCCCG	TCACCGAGAT	CTGATCTCAC	GCGTCTAGGA	TCCGAAGCAG	3850
	ATCGTTCAAA	CATTTGGCAA	TAAAGTTTCT	TAAGATTGAA	TCCTGTTGCC	3900

50

55

60

65

ES 2 299 172 T3

	GGTCTTGCGA	TGATTATCAT	ATAATTTCTG	TTGAATFACG	TTAAGCATGT	3950
	AATAATTAAC	ATGTAATGCA	TGACGTTATT	TATGAGATGG	GTTTTTATGA	4000
	TTAGAGTCCC	GCAATTATAC	ATTTAATACG	CGATAGAAAA	CAAAATATAG	4050
5	CGCGCAAAC	AGGATAAATT	ATCGCGCGCG	GTGTQATCTA	TGTTACTAGA	4100
	TCGGGAAGAT	CCTCTAGAGT	CGACCTGCAG	GCATGCAAGC	TTGGCGTAAT	4150
	CATGGTCATA	GCTGTTTCCT	GTGTGAAATT	GTTATCCGCT	CACAATTCCA	4200
	CACAACATAC	GAGCCGGAAG	CATAAAGTGT	AAAGCCTGGG	GTGCCTAATG	4250
	AGTGAGCTAA	CTCACATTAA	TTGCGTTGCG	CTCACTGCCC	GCTTCCAGT	4300
	CGGGAACCT	GTCGTGCCAG	CTGCATTAAT	GAATCGGCCA	ACGCGCGGGG	4350
10	AGAGGCGGTT	TGCGTATTGG	GCGCTCTTCC	GCTTCCTCGC	TCACTGACTC	4400
	GCTGCGCTCG	GTCGTTCCGG	TGCGGCGAGC	GGTATCAGCT	CACTCAAAGG	4450
	CGGTAATACG	GTTATCCACA	GAATCAGGGG	ATAACGCAGG	AAAGAACATG	4500
	TGAGCAAAC	GCCAGCAAAA	GGCCAGGAAC	CGTAAAAAGG	CCGCGTTGCT	4550
	GGCGTTTTTC	CATAGGCTCC	GCCCCCTGA	CGAGCATCAC	AAAAATCGAC	4600
	GCTCAAGTCA	GAGGTGGCGA	AACCCGACAG	GACTATAAAG	ATACCAGGCG	4650
15	TTTCCCCCTG	GAAGCTCCCT	CGTGCCTCT	CCTGTTCCGA	CCCTGCCGCT	4700
	TACCCTGATC	CTGTCGCGCT	TTCTCCCTTC	GGGAAGCGTG	GCGCTTCTC	4750
	AATGCTCACG	CTGTAGGTAT	CTCAGTTCGG	TGTAGGTCGT	TCGCTCCAAG	4800
	CTGGGCTGTG	TGCACGAACC	CCCCGTTCCG	CCCGACCGCT	GCGCCTTATC	4850
	CGGTAACACT	CGTCTTGAGT	CCAACCCGGT	AAGACACGAC	TTATCGCCAC	4900
20	TGGCAGCAGC	CAC TGGTAAC	AGGATTAGCA	GAGCGAGGTA	TGTAGGCGGT	4950
	GCTACAGAGT	TCTTGAAGTG	GTGGCCTAAC	TACGGCTACA	CTAGAAGGAC	5000
	AGTATTTGGT	ATCTGCGCTC	TGCTGAAGCC	AGTTACCTTC	GGAAAAAGAG	5050
	TTGGTAGCTC	TTGATCCGGC	AAACAAACCA	CCGCTGGTAG	CGGTGGTTTT	5100
	TTTGTTTGCA	AGCAGCAGAT	TACGCGCAGA	AAAAAAGGAT	CTCAAGAAGA	5150
25	TCCTTTGATC	TTTCTACGG	GGTCTGACGC	TCAGTGGAAC	GAAAACTCAC	5200
	GTTAAGGGAT	TTTGGTCATG	AGATTATCAA	AAAGGATCTT	CACCTAGATC	5250
	CTTTTAAATT	AAAAATGAAG	TTTTAAATCA	ATCTAAAGTA	TATATGAGTA	5300
	AACTTGGTCT	GACAGTTACC	AATGCTTAAT	CAGTGAGGCA	CCTATCTCAC	5350
	CGATCTGTCT	ATTTCTGTTCA	TCCATAGTTG	CCTGACTCCC	CGTCGTGTAG	5400
	ATAACTACGA	TACGGGAGGG	CTTACCATCT	GGCCCCAGTG	CTGCAATGAT	5450
30	ACCGCGAGAC	CCACGCTCAC	CGGCTCCAGA	TTTATCAGCA	ATAAACCCAGC	5500
	CAGCCGGAAG	GGCCGAGCGC	AGAAGTGGTC	CTGCAACTTT	ATCCGCCCTCC	5550
	ATCCAGTCTA	TFAATTGTTG	CCGGGAAGCT	AGAGTAAGTA	GTTCCGCCAGT	5600
	TAATAGTTTG	CGCAACGTTG	TTGCCATTGC	TACAGGCATC	GTGGTGTAC	5650
	GCTCGTCTGT	TGGTATGGCT	TCATTTCAGCT	CCGGTTCCCA	ACGATCAAGG	5700
35	CGAGTTACAT	GATCCCCCAT	GTTGTGCAAA	AAAGCGGTTA	GCTCCTTCGG	5750
	TCCTCCGATC	GTTGTCAGAA	GTAAGTTGGC	CGCAGTGTTA	TCACTCATGG	5800
	TTATGGCAGC	ACTGCATAAT	TCTCTTACTG	TCATGCCATC	CGTAAGATGC	5850
	TTTTCTGTGA	CTGGTGAGTA	CTCAACCAAG	TCATTCTGAG	AATAGTGTAT	5900
	GCGGCGACCG	AGTTGCTCTT	GCCCCGGCGT	AATACGGGAT	AATACCGCGC	5950
	CACATAGCAG	AACTTTAAAA	GTGCTCATCA	TTGGAAAACG	TTCTTCGGGG	6000
40	CGAAAACCTCT	CAAGGATCTT	ACCGCTGTTG	AGATCCAGTT	CGATGTAACC	6050
	CACCTCGTGCA	CCCAACTGAT	CTTCAGCATC	TTTTACTTTC	ACCAGCGTTT	6100
	CTGGGTGAGC	AAAAACAGGA	AGGCAAAATG	CCGCAAAAAA	GGGAATAAGG	6150
	GCGACACCSGA	AATGTTGAAT	ACTCATACTC	TTCCTTTTTT	AATATTATTG	6200
	AAGCATTAT	CAGGGTTATT	GTCTCATGAG	CGGATACATA	TTTGAATGTA	6250
45	TTTAGAAAAA	TAAACAAATA	GGGGTCCGC	GCACATTTC	CCGAAAAGTG	6300
	CCACCTGACG	TCTAAGAAAC	CATTATTATC	ATGACATTA	CCTATAAAAA	6350
	TAGGCGTATC	ACGAGGCCCT	TTCGTC			6376