



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 286 290**

(51) Int. Cl.:

C12N 5/04 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 1/00 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

A01H 4/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02776339 .0**

(86) Fecha de presentación : **28.10.2002**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1451301**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **01.09.2004**

(54) Título: **Promoción de embriogénesis somática en plantas mediante la expresión del gen *Wuschel*.**

(30) Prioridad: **29.10.2001 US 984274**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2007

(73) Titular/es: **The Rockefeller University
1230 York Avenue
New York, New York 10021, US**

(72) Inventor/es: **Zuo, Jianru;
Niu, Qi-Wen;
Frugis, Giovanna y
Chua, Nam-Hai**

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Promoción de embriogénesis somática en plantas mediante la expresión del gen *Wuschel*.

5 Antecedentes de la invención

La embriogénesis somática es una vía única para la propagación asexual o clonación somática en plantas. El procedimiento de desarrollo de la embriogénesis somática comparte una considerable similitud con el de la embriogénesis cigótica (Zimmerman, (1993); Mordhorst y otros, (1997)) y esto es debido, probablemente, a la conservación en el subconsciente de mecanismos celulares y moleculares entre los dos procedimientos. De acuerdo con ello, la embriogénesis somática proporciona un sistema de modelo atractivo para el estudio de la embriogénesis cigótica, particularmente debido a que los embriones cigóticos están encerrados por tejidos maternos y dificultan el acceso a herramientas bioquímicas y moleculares. Más aún, en aplicaciones biotecnológicas, los cultivos las más importantes económicamente así como las plantas de no cultivo, se regeneran vía embriogénesis somática.

Al contrario de la organogénesis, la cual requiere una alta relación de citocinina a auxina (Skoog y Miller, (1957); Sugiyama, (1999); Sugiyama, (2000)), la embriogénesis somática no requiere de ninguna citocinina externa, sino que más bien depende de altas concentraciones de 2,4-D (Zimmerman, (1993); Mordhorst y otros, (1997); Sugiyama, (2000)), un compuesto químico sintético que se ha usado mucho como un análogo funcional de la auxina. Generalmente, se estima que la embriogénesis somática está mediada por una cascada de señalización iniciada por auxina externa o 2,4-D (Zimmerman, (1993); Mordhorst y otros, (1997); Schmidt y otros, (1997)). Sin embargo, se conoce muy poco sobre la vía de transducción de la señal, particularmente el mecanismo molecular implicado en la transmisión de una célula vegetativa a una célula competente embriogénica.

Durante las dos últimas décadas, se han realizado esfuerzos considerables para identificar genes con patrones de expresión alterados durante la embriogénesis somática (Schmidt y otros, (1997); Lin y otros, (1996); Thomas, (1993)). Sin embargo, la mayoría de estos genes están sobre-regulados únicamente en las fases de desarrollo tardías, lo que sugiere que no juegan un papel directo en la transición vegetativa a embriogénica. Hasta aquí, la única excepción es el gen *quinasa tipo receptor de embriogénesis somática* (SERK) de la zanahoria, cuya expresión parece marcar la transición vegetativa a embriogénica; sin embargo, su función sigue sin estar clara (Schmidt y otros, (1997)). Se ha intentado una vía molecular adicional mediante la manipulación de ciertos genes específicos de embriones. El gen del *cotiledón 1 de hoja de Arabidopsis* (*LEC1*), que codifica una subunidad del complejo del factor de transmisión heterotrímero de HAP (HAP3), ha sido propuesto como un regulador clave para la identidad embrionaria (Lotan y otros, (1998)). Las mutaciones en el locus *LEC1* da como resultado la maduración de embriones defectuosos, así como la conversión de cotiledones dentro de estructuras tipo hoja verdadera (Lotan y otros, (1998); Meinke, (1992); Meinke y otros, (1994)). La sobreexpresión constitutiva de *LEC1* conduce al crecimiento y desarrollo severamente anormal de plantas con formación ocasional de estructuras tipo embrión somáticas (Lotan y otros, (1998)). Sin embargo, el destino del desarrollo de estas estructuras tipo embrión permanece desconocido debido al carácter letal de la sobreexpresión de *LEC1*.

Las publicaciones y otros materiales usados aquí para iluminar los antecedentes de la invención, y en particular, casos para proporcionar detalles adicionales referentes a la práctica, se incorporan aquí como referencia, y por motivos de conveniencia, se han referenciado por autor y fecha en el texto y agrupados respectivamente en la Lista de Referencias adjunta.

45 Sumario de la invención

Un aspecto de la presente invención es un procedimiento para la producción de una planta haploide que comprende:

- 50 a. la transformación de manera estable de una célula de planta con una secuencia de ADN que comprende al menos una secuencia que codifica *Wuschel* bajo el control de un promotor para producir una célula de planta transgénica, en el que el promotor está seleccionado entre el grupo constituido por un promotor específico de tejido haploide, un promotor inducible y un promotor que es a la vez específico de tejido haploide e inducible,
- 55 b. la generación de una planta transgénica a partir de dicha célula de planta transgénica,
- c. la sobreexpresión de la secuencia que codifica *Wuschel* en un tejido haploide de dicha planta transgénica para producir un embrión somático haploide,
- 60 d. el crecimiento de dicho embrión dentro de una planta haploide.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama esquemático de la activación XVE de marcación del vector pER16.

65 Las Figuras 2A-F ilustran el fenotipo mutante de ganancia de función *pga6*. Los explantes de raíces derivados a partir de plántulas *pga6* se cultivaron sobre el SCM no inductivo (SCM menos 17- β -estradiol) durante 20 días (Figura 2A); o sobre el SCM inductivo durante 10 días (Figura 2B), 20 días (Figura 2C), ó 30 días (Figura 2D). La Figura

2E muestra una vista ampliada de la germinación de un embrión somático aislado a partir del explante mostrado en la Figura 2D. La Figura 2F muestra la germinación de una plántula derivada a partir de un embrión somático crecido sobre medio MS (45 días). Escala de la barra, 100 μm para las Figuras 2A y 2E; 1 mm para las figuras 2B, 2C, 2D y 2F.

5

Las Figuras 3A-D son análisis al microscopio electrónico que muestran embriogénesis somáticas en explantes mutantes *pga6* (las condiciones de cultivo fueron idénticas a las mostradas en las Figuras 2A-F). La Figura 3A muestra una fase pre-embrión antes de la primera división celular embrionaria (flechas) y una fase bicelular después de la primera división asimétrica con una célula apical (A) más pequeña y una célula basal (B) más grande. La Figura 3B muestra embriones en las fases globular (G) y corazón (H) prematura. La Figura 3C muestra la germinación de un embrión. C: cotiledón; H: hipocotilo. La Figura 3D muestra un embrión somático anormal con tres cotiledones (C) anclados sobre el hipocotilo (H). Escala de la barra, 10 μm para la Figura 3A; 100 μm para las Figuras 3B-D.

Las Figuras 4A-H ilustran la formación de embrión somático independiente de la fitohormona causada por la mutación de ganancia de función *pga6*. La Figura 4A es una vista general de plántulas del mutante *pga6* germinadas y crecidas sobre medio MS (primera plántula a partir de la izquierda) o el medio MS inductivo (MST: 17- β -estradiol 5 μM) durante 7 días. Las Figuras 4B-D muestran plántulas *pga6* que fueron cultivadas sobre el medio MS inductivo durante 10 días (Figura 4B), 14 días (Figura 4C) ó 30 días (Figura 4D). Las Figuras 4E-F muestran plántulas *pga6* de siete días germinadas y crecidas sobre medio MS que fueron transferidas sobre un medio MS inductivo y cultivadas durante 5 (Figura 4E) ó 10 (Figura 4F) días. La Figura 4G muestra explantes de raíces *pga6* que fueron cultivados sobre medio MS inductivo durante 20 días. La Figura 4H es una vista ampliada de la Figura 4G. Escala de la barra, 1 mm.

Las Figuras 5A-D muestran que el fenotipo *pga6* es debido a la sobreexpresión dependiente del inductor de *WUS*. La Figura 5A es un diagrama esquemático que ilustra el sitio de inserción del ADN-T más arriba del gen *WUS* (no se muestra a escala). Las flechas indican las direcciones de transcripción. La Figura 5B muestra gérmenes *pga6* (T2, homozigotes) los cuales fueron germinados y crecieron sobre medio MS suplementado con diversas concentraciones del inductor tal como se ha indicado. Se muestran plántulas de diez días. La escala de la barra representa 1 mm. La Figura 5C muestra la expresión de *PGA6/WUS* inducida mediante diferentes concentraciones del inductor. Las plántulas *pga6* de diez días se germinaron y crecieron sobre medio MS y se transfirieron a un medio MS que contenía diversas concentraciones de 17- β -estradiol tal como se ha indicado y se cultivaron durante un período adicional de 16 horas antes de la extracción del ARN total. Se usaron 5 μg de ARN total para análisis por transferencia Northern usando un fragmento de ADNc de *WUS* como una sonda. Las posiciones de dos marcadores de peso molecular de ARN se indican a la derecha (GIBCO BRL, número de catálogo, 15620-016). La Figura 5D muestra la tinción con bromuro de etidio del gel como un control para la carga y transferencia de ARN.

Las Figuras 6A-H son fotografías que muestran la sobreexpresión controlada por 35S o XVE de fenocopias de ADNc de *WUS* del fenotipo *pga6*. La Figura 6A muestra callos embriogénicos y la Figura 6B muestra la formación de embriones somáticos a partir de puntas de raíces de plántulas T2 de ADNc de XVE-*WUS* crecidas durante 15 días en medio A suplementado con 17- β -estradiol (10 μM). Las Figuras 6C-H muestran fenotipos de plántulas 35S::*WUS* de T1 de 15 días. La Figura 6D muestra que las puntas de las raíces son alargadas y muestran una estructura tipo embrión. La Figura 6E muestra la punta de raíz adventicia. La Figura 6F muestra que la sobreexpresión *WUS* induce tanto la organogénesis como la embiogénesis a partir de la raíz. La Figura 6G muestra detalles de la formación de estructura de embrión prematuro. La Figura 6H muestra que el meristema apical del brote está dramáticamente alterado y, además de la formación de órganos laterales con formas alteradas, producen brotes adventicios y embriones somáticos. La Figura 6H muestra que el meristema apical del brote entero se expande y los órganos laterales se transforman dentro de tejidos meristemáticos. La escala de la barra es de 1 mm.

Las Figuras 7A-C son transferencias Northern de ARN procedentes de explantes de raíces preparadas a partir de plántulas *pga6* cultivadas sobre el medio de rastreo (SCM) para diferentes tiempos, tal como se indica. El día 28, cuando los embriones somáticos fueron obvios, los cultivos fueron transferidos sobre un SCM recién preparado o sobre medio de control (SCM sin el inductor) e incubados durante un día más (28+1) o dos días más (28+2). Mediante transferencia Northern, se analizaron 5 microgramos de ARN total, preparado a partir de materiales congelados, usando ADNc de *WUS* (Figura 7A) y *LEC1* (Figura 7B) como sondas. La mancha se volvió a hibridar con una sonda de ADNc de actina (Figura 7C) con el fin de asegurar que se habían cargado cantidades iguales de ARN.

Las Figuras 8A-B ilustran la formación de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos aislados de plantas transgénicas *PGA6* crecidas en la presencia (Figura 8A) o ausencia (Figura 8B) de un inductor de *PGA6*.

60 Descripción detallada de la invención

Para diseccionar la vía de señalamiento durante la embriogénesis somática, los presentes autores han usado una vía genética para identificar las mutaciones de ganancia de función que pueden promover la formación de callo embriogénico a partir de explantes de raíces de *Arabidopsis*. Es conocido que la *Arabidopsis thaliana* es una especie difícil para la embriogénesis somática. Hasta ahora, los callos embriogénicos únicamente podían ser inducidos a partir de embriones inmaduros de plantas de tipo salvaje (WT) o a partir de la planta mutante *primordia timing* (*pt*) (Wu y otros, (1992); Mordhorst y otros, (1998); y referencias en ellos citadas). Por ello, los explantes vegetativos de *Arabidopsis* parecen ser materiales seguros para el rastreo de mutaciones genéticas implicadas en la transición vegetativa a embrió-

nica. En la presente invención, los autores han descubierto la identificación del gen *activador del crecimiento de la planta 6* (*PGA6*) mediante un nuevo tamiz genético. La sobreexpresión de *PGA6* promueve la formación de embriones somáticos a partir de diversos tejidos vegetativos así como a partir de embriones cigóticos independientemente de cualquier hormona de planta externa. Estos embriones somáticos, siguiendo un procedimiento de desarrollo notablemente similar al de la embriogénesis cigótica, son capaces de germinar y crecer dentro de plantas fértiles, sanas, lo que sugiere que el *PGA6* está implicado en el mantenimiento de la identidad de la célula embrionica. Se ha encontrado que el *PGA6* es idéntico al gen *Wuschel* (*WUS*), una proteína de homeodominio que había sido ya caracterizada como un regulador clave para la especificación del destino de la célula meristémica (Laux y otros, (1996); véase, igualmente, WO 01/23572 con respecto a homólogos *WUS*). Las secuencias de ácido nucleico y proteínas de *Wuschel* son las mostradas por el Registro de GenBank No. AJ012310. Los resultados de los presentes autores revelan una función adicional de *WUS/PAG6* durante la embriogénesis, e igualmente abren una nueva vía en aplicaciones biotecnológicas.

En este estudio, los presentes autores han identificado un locus genético *PGA6* mediante un nuevo tamiz funcional dirigido a elucidar el mecanismo molecular de la embriogénesis somática. Una mutación de ganancia de función en este locus causa una rápida transición desde las células vegetativas o somáticas a las embrionicas, dando lugar al desarrollo de embriones somáticos a partir de diversos tejidos y órganos. La reprogramación del destino de la célula dependiente de mutación *pga6* puede ocurrir tanto en la presencia como en la ausencia de hormonas de plantas externas, aunque la concentración local de reguladores del crecimiento endógenos podría jugar un papel importante en la transición vegetativa a embrionica. Además, la embriogénesis somática independiente de hormonas en *pga6* se asemeja estrechamente al desarrollo del embrión cigótico. Estas observaciones sugieren que el *PGA6* juega un papel regulador crítico durante la embriogénesis, probablemente implicado en el mantenimiento de la identidad de la célula embrionica. Los análisis moleculares y genéticos indican que *pga6* es un alelo de ganancia de función de la mutación de pérdida de función *wus* anteriormente caracterizado (Mayer y otros, (1998)).

Además de dar lugar a que los tejidos u órganos vegetativos se transformen en embriogénicos, la inducción de la sobreexpresión de *PGA6* en embriones cigóticos da igualmente como resultado la generación embriones somáticos con muy alta frecuencia, en tanto que no se observaron embriones somáticos ni callos embriogénicos en la ausencia del inductor. Wu y otros (1992) han informado anteriormente de la generación de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos de *Arabidopsis* con muy baja eficacia, lo cual implica múltiples y tediosos subcultivos y tratamientos con hormonas. El hallazgo de los presentes autores de que la simple manipulación de un único gen (*WUS*) fue capaz de generar embriones somáticos con muy alta frecuencia es un avance fundamental en la biotecnología de plantas.

Las mutaciones de pérdida de función en *WUS* se ha mostrado que causan un desarrollo inadecuado de los meristemas de los brotes y florales en la *Arabidopsis*, dando como resultado la ausencia de los meristemas de los brotes y florales en todas las fases del desarrollo de embriones y plantas adultas *wus* (Laux y otros, (1996); Mayer y otros, (1998)). Los estudios genéticos revelaron que *WUS* interactúa con *CLAVATA* (*CLV*), y la hélice auto-reguladora *WUS/CLV*, en la cual *CLV* actúa presumiblemente más arriba de *WUS* (Clark, (2001)) parece ser crítica para el mantenimiento de la identidad de las células del tallo (Schoof y otros, (2000); Brand y otros, (2000); Waites y Simon, (2000)). Por otra parte, la expresión ectópica de *WUS* da como resultado meristemas alargados (Schoof y otros, (2000)). En su conjunto, estas observaciones sugieren un papel instructivo de *WUS* para la especificación del destino de la célula de la célula del tallo meristemática. De manera interesante, el gen *WUS* no está expresado en el tallo o células meristemáticas; al contrario, su expresión está restringida a un pequeño grupo de células debajo de las células del tallo durante las fases completas de embriogénesis y post-embriogénesis (Mayer y otros, (1998); Schoof y otros, (2000)). El localizador de las células que expresan *WUS* se le ha denominado como el centro de organización (Mayer y otros, (1998)). El inesperado patrón de expresión conduce a suposiciones de que *WUS* promueve y/o mantiene el destino de las células del tallo mediante un mecanismo de difusión o que actúa de una manera no autónoma de la célula (Mayer y otros, (1998); Waites y Simon, (2000)).

Las observaciones de los presentes autores de que *WUS* es capaz de promover la transición vegetativa a embrionica y, eventualmente, la formación de embriones somáticos descubre una función crítica adicional de esta proteína de homeodominio durante la embriogénesis. Presumiblemente, la expresión altamente restrictiva de *WUS* aporta el sello de garantía al supuesto centro de organización embrionico, el cual, a su vez, puede dar origen a células del tallo durante la embriogénesis y desarrollo posterior. De acuerdo con ello, *WUS* está implicado en la promoción y mantenimiento de la identidad de células embrionicas a partir de las cuales han derivado las células del tallo. Dado que las células que expresan *WUS* no han sido morfológicamente y funcionalmente caracterizadas, sigue siendo interesante determinar si este localizador de células representa realmente un centro de organización funcional similar al organizador de Spemann descubierto hace casi 80 años en embriones de *Xenopus* (Spemann y Mangold, (1924)).

De manera interesante, el transcrito *LEC1* fue escasamente detectable en el centro de organización o en el dominio de expresión *WUS*, aunque se encontró que *LEC1* se expresa durante la embriogénesis así como en semillas (Lotan y otros, (1998)). De acuerdo con estas observaciones, la expresión del embrión somático de *LEC1*, que se asemeja presumiblemente a la de embriones cigóticos, se encontró que era rápidamente reprimida por la actividad *WUS*. Además, la función *LEC1* parece requerir cofactores específicos del embrión o la semilla no identificados, puesto que la sobreexpresión inducible de *LEC1* por el sistema XVE (Zuo y otros, (2000b)) durante las fases de post-germinación no dieron como resultado ningún fenotipo detectable. Por el contrario, *WUS* parece ser un jugador clave en la promoción del potencial embrionico ya que su actividad no parece requerir ningún factor específico de desarrollo bajo las condiciones ensayadas por los presentes autores. Tomadas en su conjunto, estas observaciones sugieren además

que *WUS* juega un papel predominante en la inducción del potencial embrionario, en tanto que *LEC1* está implicado probablemente en la promoción de la diferenciación de células embrionarias en fases de desarrollo posteriores. Un supuesto razonable sería que la actividad *LEC1*, una fuerza impulsora para la diferenciación de células de embriones, debe excluirse con el fin de mantener completamente el potencial embrionario en el supuesto centro de organización.

Recientemente, Stone y otros (2001), han mostrado que *LEC2* codifica un factor de transcripción que contiene un dominio B3 único para otros diversos factores de transcripción de plantas que incluyen ABI3/VP1 y FUS3. La sobreexpresión de *LED2* conduce a la formación de embriones somáticos así como a la formación de callo, estructuras de tipo cotiledón y de tipo hoja, un fenotipo similar a la del mutante *pga6*, lo que sugiere que *LEC2* podría estar funcionalmente próximo a *WUS*. Sería interesante determinar si la actividad de *LEC2* depende igualmente de cofactores específicos de embriones y/o semillas como es el caso de *LEC1*.

Los sistemas para la formación de embriones somáticos dependientes de hormonas han sido bien comprobados en diversos modelos de especies, y rápidamente extendidos a otras especies (Zimmerman, (1993); Mordhorst y otros, (1997)). En todos estos sistemas *in vitro*, las fitohormonas, particularmente auxina o 2,4-D, son esenciales para la inducción de la formación de embriones somáticos. Es bien sabido que la *Arabidopsis* es una especie difícil para la embriogénesis somática, aunque con éxito limitado, mediante el uso de embriones cigóticos inmaduros de tipo salvaje (por ejemplo, Wu y otros, (1992)) o ciertos tejidos vegetativos de las plantas mutantes *pt* (Mordhorst y otros, (1998)). La sobreexpresión del *cotiledón 1 de hoja (Lec1)* causa una severa anomalía en el desarrollo y detiene el crecimiento, un fenotipo similar al del mutante *pga6* (Lotan y otros, (1998)). La formación de embriones somáticos se ha observado ocasionalmente en las plantas de sobreexpresión de *Lec1* (Lotan y otros, (1998)), pero estos embriones nunca germinan o se desarrollan dentro de plantas adultas normales. El hallazgo de que la mutación de ganancia de función *pga6* o la sobreexpresión de *WUS* da como resultado la formación de embriones somáticos independientes de hormonas con una alta frecuencia, tendrá un impacto significativo sobre la biotecnología de plantas, y proporciona un sistema de modelo conveniente y atractivo para muchos aspectos de la investigación biológica de plantas.

En otra realización de la invención, la embriogénesis se indujo en células haploides, tal como células de polen, para producir plantas haploides. Esto puede lograrse mediante la transformación de manera estable de una célula o tejido de planta con un gen *WUS* bajo el control de un promotor específico del tejido que es activo en una célula o tejido haploide, y la expresión del gen *WUS* en ella, o mediante la introducción del gen *WUS* dentro de una célula o tejido de planta bajo el control de un promotor inducible y la aplicación del inductor para producir la expresión del gen *WUS* en ella. En una realización preferida, el gen *WUS* está bajo el control de un promotor que es a la vez específico del tejido haploide e inducible. En una realización preferida, se usa un promotor que es a la vez inducible y específico del tejido, lo que proporciona un mayor control sobre el procedimiento. En una realización la más preferida, se usa un gen *WUS* ligado a un promotor específico de polen inducible para inducir la embriogénesis somática en células de polen.

La expresión del gen en el tejido o célula haploide (por ejemplo, mediante la aplicación del inductor específico para el promotor inducible) da como resultado la formación de embriones somáticos haploides, los cuales pueden crecer dentro de plantas haploides usando técnicas convencionales. Cuando se usa un promotor inducible (tanto sea o no específico del tejido), un procedimiento preferido comprende la exposición de tejido transgénico escindido conteniendo las células haploides (por ejemplo, polen u óvulos) al inductor específico para el promotor inducible durante un tiempo suficiente para inducir la formación de un embrión somático, la separación del inductor, y el crecimiento del embrión somático dentro de una planta haploide transgénica en la ausencia del inductor.

La diploidización de las plantas haploides para formar dihaploides, ya sea de manera espontánea o mediante tratamiento con el producto químico apropiado (por ejemplo colchicina), facilita de manera significativa el procedimiento de obtención de plantas homocigóticas en comparación con un procedimiento de segregación genética convencional. Esta tecnología no solamente será beneficiosa para fines de selección sino además para investigación básica tal como estudios de mutagénesis y otros estudios genéticos, puesto que los dihaploides son realmente homocigotos por debajo del nivel de ADN, que contienen dos copias idénticas de cada gen.

Adicionalmente, los genes *WUS* serán útiles para la inducción de apomixis dentro de plantas. La apomixis y los procedimientos que confieren apomixis dentro de plantas están expuestos en diversas patentes (véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. Nos. 5.710.367; 5.811.636; 6.028.185; 6.229.064; y 6.239.327 así como la WO 00/24914 las cuales se incorporan aquí como referencias). La reproducción en plantas se clasifica normalmente como sexual o asexual. El término *apomixis* se acepta generalmente como la sustitución de la reproducción sexual por diversas formas de reproducción asexual (Rieger y otros, en *Glossary of Genetics and Cytogenetics*, Springer-Verlag, New York, N.Y., (1976)). En general, la iniciación de la proliferación de células en el embrión y endosperma están desconectadas a partir de la fertilización. La apomixis es un procedimiento controlado genéticamente de reproducción en plantas en el que el embrión se forma sin la unión de un huevo y un espermatozoido. Existen tres tipos básicos de reproducción apomítica: 1) el embrión aposporia se desarrolla a partir de un huevo sin reducir cromosómicamente en un saco de embrión derivado a partir de una célula somática en el nucelo, 2) el embrión diplosporo se desarrolla a partir de un huevo sin reducir en un saco de un embrión derivado a partir de la célula madre megaspora, y 3) el embrión embrionario adventicio se desarrolla directamente a partir de una célula somática. En la mayoría de las formas de apomixis, es necesaria la pseudogamia o fertilización de los núcleos polares para producir endosperma para la viabilidad de la semilla. Estos tipos de apomixis tienen potencial económico dado que pueden producir cualquier genotipo, independientemente de cómo se han seleccionado realmente los heterocigotos. Es un procedimiento reproductivo que evita la meiosis y singamia femenina para producir embriones genéticamente idénticos al pariente materno. Con la reproducción apomítica,

la progenia de genotipos especialmente adaptados o híbridos manten-drían su fidelidad genética a lo largo de ciclos de vida repetidos. Además de fijar el vigor del híbrido, la apomixis puede hacer posible la producción comercial de híbridos en cultivos en los cuales no se conoce o han desarrollado sistemas de restauración eficaces de la esterilidad o fertilidad masculina para la producción de híbridos. La apomixis puede hacer que el desarrollo de híbridos sea más eficaz. Igualmente, simplifica la producción de híbridos e incrementa la diversidad genética en especies de plantas con buena esterilidad masculina.

Sería ideal encontrar genes que controlen un nivel obligado o alto de apomixis en las especies cultivadas y que sean capaces de hibridar fácilmente genotipos apomícticos x con compatibilidad cruzada sexual para producir híbridos F₁ de verdadera selección. En realidad, los genes los más deseables que controlan la apomixis se encuentran en las especies salvajes las cuales están relacionadas a distancia con las especies cultivadas. Aunque pueden ser posibles cruces interespecíficos entre las especies cultivadas y salvajes, el emparejamiento de cromosomas entre genomas es usualmente baja o inexistente.

Aunque la apomixis se ha usado de manera eficaz en cítricos para producir rizomas libres de virus y enfermedades (Parlevliet y otros, (1959)) y en hierba de búfalo (Bashaw, (1980)) y en grostis (Pepin y otros, (1971)) para producir cultivares mejorados, no ha sido transferida con éxito a una planta de cultivo cultivada. La transferencia de apomixis a cultivos importantes haría posible el desarrollo de híbridos de verdadera selección y la producción comercial de híbridos sin una necesidad de esterilidad masculina nuclear citoplásmica y de procedimientos de producción con mano de obra intensiva, de alto coste. Un híbrido F₁ obligatoriamente apomíctico seleccionaría los verdaderos a través de la semilla indefinidamente y podría ser considerado un procedimiento vegetativo o clonal de reproducción a través de la semilla. El desarrollo de cultivos cultivados que se reproducen apomícticamente proporcionaría igualmente una contribución importante para la seguridad alimentaria en las naciones en desarrollo (Wilson y otros, (1992)).

La presente invención se detalla adicionalmente en los Ejemplos siguientes, los cuales se ofrecen a modo de ilustración y no están destinados a limitar de ninguna manera la invención. Se han usado técnicas convencionales bien conocidas en la técnica o las técnicas se han descrito específicamente más adelante.

Ejemplo 1

30 *Materiales de plantas, condiciones de crecimiento y transformación de plantas*

Se usaron ecotipos Wassilewskija, Columbia y Landsberg de *A. thaliana*. Las plantas crecieron bajo condiciones de luz blanca continua a 22°C sobre medio A sólido (1 x sales MS (Murashige y Skoog, (1962), sacarosa al 3%, agar al 0,8%) suplementado con antibióticos apropiados y/o el inductor 17- β -estradiol. Salvo que se indique lo contrario, se usó 17- β -estradiol 5 μ M para la inducción. La transformación *in planta* de plantas de *Arabidopsis* (el ecotipo Columbia) se llevó a cabo tal como ha sido descrito por Bechtold y otros (1993). La transformación de explantes de raíces se llevó a cabo de acuerdo con Koncz y otros (1989).

Los análisis mediante microscopio de luz y electrónico se llevaron a cabo tal como ya ha sido descrito (Zuo y otros, (2000b)).

Ejemplo 2

45 *Rastreo de mutantes pga6*

Se usaron células *ABI* de *Agrobacteria* que portan pER16 para transformar explantes de raíces de *Arabidopsis* (el ecotipo Wassilewskija). Los explantes de raíces infectados se cultivaron sobre el medio de rastreo (SCM; 1x sales MS, sacarosa al 1%, 0,5 g/l de MES (ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico), 0,15 mg/l de IAA (ácido indol acético), 17- β -estradiol 5 μ M, 50 mg/l de kanamicina, 100 mg/l de carbenicilina y fitagel al 0,2%, pH 5,7) a 22°C bajo un ciclo de 16 horas de luz blanca/8 horas de oscuridad. Los supuestos mutantes *pga*, los cuales aparecen como callos o aglutinados de células verdes o verde-amarillentas que crecen rápidamente tras el cultivo sobre el SCM durante 10-15 días, se transfirieron sobre un medio de inducción de brotes no inductivo (SIM; para callos verdes; 1 x sales Ms, sacarosa al 1%, 0,5 g/l de MES, 1 mg/l de 2-IP (N⁶, δ^2 -isopenteniladenina), 0,15 mg/l de IAA, 50 mg/l de kanamicina, 100 mg/l de carbenicilina y fitagel al 0,2%, pH 5,7) para recuperar los brotes mutantes. Los callos verde-amarillentos se transfirieron sobre el medio de inducción de callo (CIM; 1 x sales B5 (Sigma), glucosa al 2%, 0,5 g/l de MES, 0,5 mg/l de 2,4-D, 0,05 mg/l de cinetina, 50 mg/l de kanamicina, 100 mg/l de carbenicilina y fitagel al 0,2%, pH 5,7). Después de cultivo sobre el CIM durante 7-10 días, los callos amplificados se transfirieron, a continuación, sobre un SIM para regenerar brotes. Los brotes regenerados, usualmente formados después de cultivo sobre el SIM durante 2-3 semanas, se transfirieron, a continuación, a un medio de inducción de raíz (RIM; idéntico al SIM pero sin 2-IP) para promover la formación de raíz. Puesto que la mayoría de las supuestas plántulas mutantes *pga*, incluyendo *pga6*, fueron capaces de asentar semillas después de transferirlas al suelo, se escindieron una porción de las raíces y se colocaron sobre el CIM para reinducir la formación de callo, seguido de la repetición del procedimiento de rastreo anteriormente descrito para confirmar el fenotipo *pga* dependiente del inductor. El mutante *pga6* se volvió cruzar con plantas de tipo salvaje (Wassilewskija) dos veces para análisis genéticos y fenotípicos adicionales.

Ejemplo 3

Manipulaciones moleculares

5 Las manipulaciones moleculares se llevaron a cabo tal como específicamente están establecidas o mediante los procedimientos expuestos por Sambrook y otros (1989). El vector de expresión pER10 inducible de XVE es idéntico al pER8 (Zuo y otros, (2000a)), excepto que el marcador seleccionable de higromicina de pER8 ha sido reemplazado por un marcador seleccionable de kanamicina. Para construir el vector de mutagénesis pER16, se digirió pER10 con *SpeI* y *Asp7181* seguido de reacción de llenado de enzima Klenow y religamiento. El vector pER16 resultante carece de la secuencia de adición *rbcsS3A* polyA de la caja de expresión $O^{LexA-46}::T^{3A}$ (véase Figura 1 de Zuo y otros, (2000a)).

10 El pER16 se muestra en la Figura 1. Únicamente se muestra la región entre el límite derecho (RB) y el límite izquierdo (LB) (no están a escala). Las dos unidades de transcripción y el promotor $O^{LexA-46}$ están localizados entre RB y LB. En la primera unidad de transcripción, el promotor *G10-90* (Ishige y otros, (1999)) impulsa el gen de fusión XVE terminado por la secuencia de adición *rbcs* E9 polyA. La segunda unidad de transcripción está formada por el promotor del gen *nopalina sintasa* (*NOS*), la secuencia que codifica el gen *neomicina fosfotransferasa II* (*NPTII*) y la secuencia de poliadenilación de *NOS*. El promotor $O^{LexA-46}$ está formado por 8 copias de la secuencia del operador *LexA* fusionada al promotor CaMV35S -46. Tras la integración dentro del genoma de la planta, el promotor $O^{LexA-46}$ puede activar la transcripción de secuencias fusionadas más abajo del promotor en un montaje dependiente del 17- β -estradiol.

Las secuencias genómicas marcadas con pER16 se recuperaron mediante PCR de cola (Liu y otros, (1995)) y los fragmentos de PCR purificados fueron sometidos directamente a análisis de secuenciación de ADN.

25 El ADNc de *WUS* se amplificó a partir de ADNc de flor mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando los cebadores WusUp (5' CTTATTTACCGTTAACTTGTTGAACA 3') (SEC ID NO:1) Y WusLow (5' CACA TAACGAGAGATAACTAGTTAAC 3') (SEC ID NO:2). El fragmento de PCR de 1062 bp de longitud, que alberga la región que codifica la proteína entera más parte del UTR 3', se clonó primeramente dentro del vector pPCR-Script Amp SK(+) (Stratagene) y, a continuación, se cortó con *XhoI* (sitio del vector poliligador) y *SpeI* (sitio en el UTR 3' del ADNc de *WUS*) para posterior clonación dentro de los sitios correspondientes tanto del vector pER10 (inducible por 17- β -estradiol) como del vector pBA002 (constitutivo del promotor 35S) para la expresión $35S::WUS$. La secuencia correcta del ADNc de *WUS* se confirmó mediante el análisis de secuenciación de ADN.

Los análisis por transferencia Northern de ARN y Southern de ADN genómicos se llevaron a cabo tal como han sido descritos previamente (Zuo y otros, (2000a); Zuo y otros (2001)).

Ejemplo 4

Rastreo de los mutantes del activador del crecimiento de plantas

40 Los explantes derivados a partir de tejidos vegetativos de *Arabidopsis* es sabido que son incapaces de formar embriones somáticos o callos embriogénicos promovidos por hormonas de plantas externas. Los presentes autores han supuesto que las hormonas externas solas eran incapaces de activar los reguladores clave de *Arabidopsis* necesarios para la transición vegetativa a embriogénica. Con tratamientos de hormona apropiados, las mutaciones de ganancia de función en estos genes reguladores pueden activar la transición vegetativa a embriónica. Por otra parte, dichas mutaciones de ganancia de función pueden igualmente causar severos defectos durante el posterior crecimiento y desarrollo de la planta. De acuerdo con ello, si la expresión del gen mutado y/o la actividad biológica de productos de genes relacionados no está adecuadamente controlada, sería difícil mantener las mutaciones identificadas. Un ejemplo es la sobreexpresión constitutiva del gen *LEC1* (Lotan y otros, (1998)). Como una consecuencia de ello, los presentes autores llevaron a cabo el rastreo usando un sistema XVE inducible químicamente anteriormente desarrollado, el cual se ha demostrado que está estrictamente controlado y que es altamente responsable del inductor 17- β -estradiol, una hormona mamífera sin aparentes efectos biológicos sobre el crecimiento y desarrollo de plantas (Zuo y otros, (2000a)). De acuerdo con ello, el uso de un promotor inducible permite a los presentes autores recuperar plantas mutantes normales mediante la separación del inductor, incluso en el caso de que la mutación de ganancia de función sea letal.

Los explantes de raíces de *Arabidopsis* se transformaron con *Agrobacteria* (Koncz y otros, (1989)) que porta un vector pER16 de XVE (Figura 1). Los explantes transformados se cultivaron sobre un medio de rastreo (SCM conteniendo auxina, 17- β -estradiol y kanamicina pero sin citocinina). Es de señalar que mutaciones funcionalmente análogas a la *citocinina independiente 1* (*cki1*; Kakimoto, (1996)) deberían recuperarse igualmente bajo las condiciones de rastreo. En el tamíz primero, los presentes autores aislaron 35 supuestos mutantes mediante el interrogatorio de aproximadamente 38.000 episodios de transformación independientes. Tal como se esperaba, la mayoría de estos mutantes (33 de 35) mostraron un fenotipo tipo *cki1*, es decir, regeneración del brote independiente de citocinina. Los dos mutantes restantes dieron lugar a callos embriogénicos verde-amarillentos. De manera colectiva, los presentes autores denominaron a estas dos clases de mutaciones como *pga* para el *activador de crecimiento de la planta*. En la presente invención, se describe una caracterización detallada de uno de estos mutantes al cual se le ha denominado *pga6*.

Ejemplo 5

La mutación de ganancia de función pga6 promueve la transición vegetativa a embrionica

El mutante *pga6* fue inicialmente identificado por su capacidad para formar callos embriogénicos sobre SCM. Los callos embriogénicos se transfirieron sobre un medio de inducción de brotes que contenía auxina y citocinina pero sin el inductor químico 17- β -estradiol. Después de 2-3 semanas, los brotes se regeneraron a partir de los callos aislados. Los explantes derivados a partir de diferentes órganos de los brotes regenerados se cultivaron sobre SCM tal como se ha descrito anteriormente; una porción de los explantes escindidos se cultivó sobre SCM sin el inductor para servir como controles. Después de cultivarlos durante 7-10 días, únicamente se observaron ocasionalmente callos que crecieron lentamente en la ausencia del inductor (Figura 2A). Sin embargo, en la presencia del inductor, los explantes produjeron numerosos callos embriogénicos amarillentos, que crecieron rápidamente (Figura 2B), los cuales posteriormente se desarrollaron en distintos embriones somáticos (Figura 2C). Después de ser transferidos sobre un medio no inductivo, todos estos embriones somáticos fueron capaces de germinar (Figuras 2D y 2E) y desarrollarse en plantas adultas fértiles, la mayoría de las cuales fueron indistinguibles morfológicamente de las plantas de tipo salvaje (Figura 2F).

Para confirmar adicionalmente las observaciones anteriores, las plantas derivadas de embriones somáticos, tal como se muestra en la Figura 2F, se germinaron sobre medio SM en la ausencia del inductor. La formación de embrión somático dependiente del inductor se observó de manera reproducible en explantes *pga6* preparados a partir de diferentes órganos/tejidos de plantas T1 no inducidas previamente. De manera similar a lo observado en el explante T0, la frecuencia más alta de formación de embriones somáticos se observó a partir de explantes de raíces, seguido de peciolo de hoja, tallos y hojas. Los embriones cigóticos aislados tenían una frecuencia similar a la de los explantes de raíces. Los resultados anteriores sugieren que la mutación de ganancia de función *pga6* fue capaz de promover la transición vegetativa a embrionica bajo las condiciones experimentales de la presente invención, y que el gen *PGA6* fue lo más probablemente marcado por el promotor O^{LexA}-46 responsable del inductor.

Además de la formación de embriones somáticos, los cuales se caracterizaron por la presencia de cotiledones que carecen de tricomas sobre las superficies, los presentes autores observaron igualmente aproximadamente un 10% de callos *pga6* de desarrollo dentro de raíces, lo que sugiere que el *PGA6* está igualmente implicado en la organogénesis.

Ejemplo 6

El desarrollo de embriones somáticos pga6 se parece morfológicamente y temporalmente al de los embriones cigóticos

Con el fin de seguir lo más de cerca posible el procedimiento de embriogénesis del mutante *pga6*, los presentes autores desarrollaron un análisis microscópico electrónico de barrido. La embriogénesis somática en los explantes *pga6* tratados con inductor se parece altamente a la embriogénesis cigótica. El procedimiento se inició a partir de una división asimétrica de una única célula, lo cual produjo una célula apical más pequeña y una célula basal más grande (Figura 3A). Posteriormente, las estructuras tipo embrión equivalentes a las de los embriones cigóticos en la fase globular prematura fueron fácilmente reconocibles (Figura 3B). Estos embriones somáticos experimentaron un procedimiento de embriogénesis típico, incluyendo la fase corazón, la fase torpedo, y la fase cotiledón (Figuras 3B y 3C), y eventualmente germinaron dentro de plántulas sanas (Figura 2F). Además del crecimiento y desarrollo relativamente normal de las plantas mutantes derivadas de embriones somáticos, los presentes autores observaron que una pequeña fracción (aproximadamente 10%) de los embriones somáticos generaron plántulas con tres cotiledones (Figura 3D). Presumiblemente, esta anomalía está causada por niveles de expresión diferentes del gen *PGA6* o por efectos abióticos tal como ocasionalmente se observó en plántulas germinadas a partir de semillas de tipo salvaje. No obstante, estos resultados anteriores han demostrado que una mutación de ganancia de función condicional en el locus *pga6* promovió la transición vegetativa a embrionica, lo que condujo a la iniciación de la embriogénesis somática.

Ejemplo 7

Formación de embrión somático independiente de la hormona de la planta

Los datos descritos anteriormente se obtuvieron bajo condiciones de cultivo de tejidos. Con el fin de investigar los efectos de la mutación *pga6* sobre el crecimiento y desarrollo de plantas normales, se germinaron semillas T1 sobre medio MS (Murashige y Skoog, (1962)) con o sin el inductor. No se observaron anomalías detectables en el crecimiento y desarrollo (fenotipo) en plantas *pga6* germinadas y crecidas en la ausencia del inductor. Sobre el medio MS inductivo, se segregó progenie con el fenotipo mutante y de tipo salvaje en la relación de 3:1, característica de una mutación dominante en un único locus. Comparadas con las semillas de tipo salvaje, las semillas mutantes *pga6* germinaron substancialmente más tarde, con un retraso de 3-5 días, lo que sugiere un efecto inhibidor de la mutación sobre el crecimiento y desarrollo de la planta. Por el contrario, aproximadamente un tercio de las plántulas mutantes interrumpieron el posterior crecimiento después de la germinación y eventualmente murieron, en tanto que los dos tercios de plántulas mutantes restantes se transformaron rápidamente en callos verdes tras la germinación. Estos dos fenotipos mutantes distintos, con una relación aproximada de 2:1, fueron presumiblemente debidos a segregaciones (heterocigotos u homocigotos) para el locus de mutación de ganancia de función *pga6*, lo que dio lugar a niveles de expresión de *PGA6* diferentes en plántulas de homocigotos y heterocigotos. Esta opinión fue soportada por análisis genéticos posteriores de la generación T2 derivada a partir de plantas T1 crecidas bajo condiciones no inductivas. Por el contrario, todas las progenies de las familias T2 de supuestos homocigotos (5 de 16) mostraron únicamente el

fenotipo “letal” sobre el medio inductivo, dando lugar las familias de los 11 heterocigotos restantes a una segregación típica de 2:1:1 para callos embriogénicos, fenotipos “letal” y de tipo salvaje. Además, la fuerza del fenotipo mutante dependió de las concentraciones del inductor y los niveles de expresión de *PGA6* inducido *per se* (véanse Figuras 5B-C).

En la ausencia de cualquier hormona de planta externa, se formaron embriones somáticos a partir de callos embriogénicos verdes (Figuras 4B y 4C), los cuales fueron capaces de germinar y crecer normalmente dentro de plantas adultas fértiles (Figura 4D). De manera interesante, se observó una frecuencia considerablemente más alta de formación de callo embriogénico a partir de raíces *pga6* cultivadas sobre el medio MS inductivo (Figuras 4G y 4H), lo que sugiere la presencia de una actividad antagonista contra *PGA6* en plantas intactas, la cual puede promover el crecimiento y desarrollo post-embriogénesis.

La sobreexpresión de *LEC1* conduce al crecimiento y desarrollo de plantas anormales, así como la formación ocasional de estructuras tipo embrión (Lotan y otros, (1998)). Sin embargo, el fenotipo de gancia de función *LEC1*, parece estar estrictamente restringido a fases de desarrollo antes de la germinación. Después de la germinación de las plántulas, la sobreexpresión de *LEC1*, controlada por el sistema de expresión inducible XVE (Zuo y otros, (2000a)), no produjo ninguna anomalía aparente en el crecimiento y desarrollo de plantas, aunque el transgen *LEC1* fue altamente responsable del inductor durante las fases de post-germinación. Por otra parte, la misma línea transgénica mostró un fenotipo fuerte si germinó directamente en la presencia del inductor y el transgen *LEC1* fue altamente responsable del inductor durante las etapas de post-germinación. Estas observaciones sugieren que se requieren cofactores específicos del embrión o de la semilla para la función *LEC1*. Con el fin de examinar si la función *PGA6* es también dependiente de cofactores específicos del embrión o de la semilla, se transfirieron sobre un medio MS inductivo, plántulas mutantes *pga6* en diferentes fases de crecimiento, germinadas y crecidas sobre el medio MS no inductivo. En estas fases de desarrollo, el destino tanto de las células de raíces como de brotes ya había sido altamente especificado en plantas de tipo salvaje. Sin embargo, la mutación *pga6* pareció invertir el programa de desarrollo, dando lugar a que tanto los meristemas de las raíces como de los brotes se transformaran en callos embriogénicos (Figura 4D). De manera similar a lo mostrado anteriormente, estos callos embriogénicos fueron eventualmente capaces de formar embriones somáticos, los cuales fueron capaces de germinar y crecer dentro de plantas adultas morfológicamente normales. Los resultados anteriores sugieren fuertemente que *PGA6* juega un papel clave en la especificación y mantenimiento de la identidad de la célula embriónica, independientemente de cualquier cofactor específico del embrión o la semilla.

Ejemplo 8

PGA6 es idéntico a la proteína de homeodominio WUS

En base a la segregación del marcador seleccionable de kanamicina, el genoma mutante *pga6* parece contener un único locus transgénico. Sin embargo, el análisis molecular indicó la presencia del promotor *O^{LexA}-46* en dos loci independientes. Se encontró que un promotor *O^{LexA}-46* se fusiona al gen *WUS* en el cromosoma II (Mayer y otros, (1998)), aproximadamente 1 kilopar de bases (Kb) más arriba del supuesto codón de iniciación de traducción (Figura 5A). El segundo promotor *O^{LexA}-46* se fusiona inmediatamente más arriba del supuesto codón de iniciación de traducción de un marco de lectura abierto (ORF) en el cromosoma V, que codifica un supuesto factor de transcripción tipo hélice-bucle-hélice-básico (designado como ORF1). Con el fin de verificar la identidad de los genes *PGA6*, se clonaron fragmentos de ADNc que contenían tanto *WUS* como el supuesto ORF1 dentro de un vector XVE, y los constructos resultantes se usaron para transformar plantas de tipo salvaje (Bechtold y otros, (1993)). Los explantes derivados a partir de plantas transgénicas T1 de XVE-ORF1 no mostraron ningún fenotipo aparente dependiente del inductor. Además la expresión *ORF1* no pareció estar sobre-regulada por el inductor químico en plantas *pga6*, presumiblemente debido a la inestabilidad del transcripto *ORF1* que carece de la región no traducida (UTR) 5' completa. Por el contrario, se observaron todos los fenotipos mutantes *pga6* descritos anteriormente en las plantas transgénicas T2 de XVE-*WUS* (Figuras 6A y 6B) de una manera dependiente del inductor (para detalles, véase el Ejemplo 11).

La expresión *WUS* fue estrictamente dependiente de diferentes concentraciones del inductor en plantas mutantes *pga6* (Figura 5B). La Figura 5C muestra la expresión de *PGA6/WUS* inducida por diferentes concentraciones del inductor. Plántulas *pga6* de 10 días germinadas y crecidas sobre el medio MS, se transfirieron a un medio MS que contenía diversas concentraciones de 17- β -estradiol tal como se ha indicado y se cultivaron durante un período adicional de 16 horas antes de la extracción del ARN total. Para el análisis por transferencia Northern se usaron 5 μ m de ARN total usando un fragmento de ADNc de *WUS* como una sonda. De acuerdo con la expresión *WUS* dependiente de la concentración del inductor, las plantas *pag6* mostraron igualmente diversas penetraciones del fenotipo mutante en una forma dependiente de la concentración del inductor (Figura 5B), proporcionando, de esta manera, una serie de alelos mutantes condicionales para estudios funcionales adicionales.

Los presentes autores han usado igualmente un constructo 35S-*WUS* para la transformación de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia así como del Landsberg. La mayoría de los transformantes recuperados de la selección mostraron fuerte alteración en el desarrollo de las plántulas. El hipocotilo estaba hinchado y las puntas de las raíces frecuentemente estaban alargadas produciendo estructuras de tipo brote o tipo embrión, las cuales fueron incapaces de desarrollarse posteriormente (Figuras 6C-G). El desarrollo de la hoja, cuando se observó, estaba también comprometido, lo que indica una fuerte alteración del meristemo apical del brote (SAM) que, aparte de órganos laterales, podría igualmente formar brotes adventicios o estructuras de tipo embrión (Figuras 6G-H). En su conjunto, todos los tejidos

de los transformantes producirían órganos o estructuras de tipo embrión cuyo posterior desarrollo, sin embargo, sería inadecuado. Esta observación apoya la validez de la estrategia de los presentes autores de usar un sistema inducible para aislar genes implicados en el cambio al desarrollo del embrión ya que la sobreexpresión continua de proteínas reguladoras evitaría la recuperación de los mutantes.

En resumen, los resultados anteriores indican que el *WUS* marcado con el promotor O^{LexA} -46 en el genoma mutante representa *PGA6*. En el futuro, los presentes autores se referirán a la proteína/gen *PGA6* como *WUS*, pero se usa *pga6* para la mutación/mutante identificado en este estudio debido a diferentes propiedades entre las mutaciones de pérdida y ganancia de función.

Dado que el promotor O^{LexA} -46 se fusiona aproximadamente 1 Kb más arriba del supuesto codón iniciador de traducción (Figura 5A), el promotor *WUS* permanece presumiblemente funcional en el genoma mutante, dando lugar a un fenotipo de pérdida de función no aparente para la mutación. No obstante, el gen *WUS* fue fuertemente inducible, dando lugar a dos transcritos, de aproximadamente 1,3 y 2,3 Kb (Figura 5C). Presumiblemente, el transcripto más corto se generó a partir del sitio de iniciación de transcripción nativo del gen *WUS*, en cuyo caso la secuencia operadora *LexA* podría servir como un potenciador para el promotor *WUS*. Por otra parte, el transcripto más largo podría representar la transcripción a partir del promotor O^{LexA} -46. Esto sugiere que la secuencia O^{LexA} -46 puede servir como un promotor funcional, así como un potenciador de transcripción para la marcación de la activación.

Ejemplo 9

WUS reprime la expresión de LEC1 durante la embriogénesis

Los datos anteriores indican que *WUS*, además de su función meristema descrita previamente (Laux y otros, (1996); Mayer y otros, (1998)), juega, igualmente, un papel crítico en la promoción o mantenimiento del potencial embrionario. Los presentes autores han investigado la expresión de diversos genes específicos del embrión o de la semilla en callo embriogénico *pga6* y embriones somáticos. Los explantes de raíces derivados a partir de plantas mutantes *pga6* se cultivaron sobre un medio MS suplementado con el inductor. Bajo dichas condiciones, mientras que los callos embriogénicos aparecieron después de 10-15 días, los embriones somáticos y plántulas que germinaron se generaron después de 20 días (véanse Figuras 2A-F, 3A-D y 4A-H). Debido a la naturaleza de la expresión transitoria del sistema inducible XVE (Zuo y otros, (2000a)), la expresión *WUS* declinó gradualmente tras el cultivo continuado sobre el medio inductivo; sin embargo, la expresión puede ser fuertemente re-inducida mediante la adición de inductor recién preparado (Figura 7A).

El gen *LEC1*, normalmente expresado únicamente en embriones y semillas (Lotan y otros, (1998)), estaba altamente expresado en explantes de 20-30 días, una fase cuando se generaron embriones somáticos y plántulas derivadas. La Figura 7B muestra la expresión *LEC1* desde los 14 días hasta los 28 días cuando se produjo la embriogénesis somática dependiente de *pga6*. Sin embargo, la expresión *LEC1* disminuyó dramáticamente tras la reactivación de la expresión *WUS* (Figura 7B). No se detectó alteración de la expresión *LEC1* cuando los explantes/callos se transfirieron sobre el medio de control durante un periodo adicional de dos días, lo que sugiere que la represión de *LEC1* fue una respuesta específica a la expresión *WUS* inducida por 17- β -estradiol.

Estas observaciones sugieren que la expresión *LEC1* en explantes *pga6* no fue una respuesta directa a la sobreexpresión de *WUS*, sino más bien una consecuencia del desarrollo del embrión somático *pga6*. Por otra parte, una vía de desarrollo redefinida mediante la sobreexpresión de *WUS* conduce a la represión de *LEC1*, un gen presumiblemente implicado en la maduración del embrión.

Ejemplo 10

Frecuencia potenciada de la formación de embrión somático mediante la adición de 2,4-D

Aunque los presentes autores fueron capaces de generar embriones somáticos a partir de diversos tejidos/órganos *pga6* en la ausencia de cualquier hormona externa, la frecuencia de la formación de embrión somático parece ser más baja comparada con lo observado en las condiciones de rastreo originales de los presentes autores, bajo las cuales se incluyó un pretratamiento con 2,4-D. Para evaluar los efectos de 2,4-D sobre la embriogénesis somática, se cultivaron explantes de raíz *pga6* sobre medio MS con 0,5 mg/l de 2,4-D durante 5 días antes de ser transferidas a un medio MS con o sin 17- β -estradiol 10 μ M. No se observó formación de embrión somático en el medio sin el inductor, en tanto que se generaron numerosos embriones somáticos después de 2-3 semanas de cultivo en la presencia del inductor. Tal como se ha mostrado anteriormente (véase Ejemplo 7 y Figuras 4A-H) y mediante los resultados descritos en este Ejemplo, la ausencia de pretratamiento de 2,4-D dio como resultado una eficacia sustancialmente disminuida de la formación de embrión somático, lo que indica que el tratamiento con 2,4-D es capaz de incrementar significativamente la eficacia de la formación de embrión somático.

En su conjunto, los resultados anteriores sugieren que el 2,4-D fue capaz de potenciar además componentes no identificados en la red de señalamiento, la cual juega un papel clave en la promoción de la transición vegetativa a embrionaria. Además, estos resultados demuestran adicionalmente la validez de la hipótesis de trabajo de los presentes autores, así como la estrategia de rastreo, es decir, que las hormonas externas solas fueron incapaces de activar los componentes claves para la transición vegetativa a embrionaria en *Arabidopsis*, y que el tratamiento de hormo-

na externa apropiada en combinación con las mutaciones de ganancia de función en los genes reguladores claves es completamente capaz de promover la transición vegetativa a somática o la embriogénesis somática.

Ejemplo 11

Formación de embrión somático de explantes derivados a partir de plantas transgénicas que portan un transgen pER10-WUS

El vector pER10 de XVE es idéntico al pER8 excepto que el marcador de resistencia a la higromicina está reemplazado con un marcador de resistencia a la kanamicina (Zuo y otros, (2000a)). El ADNc de *WUS* de longitud completa se colocó bajo el control del sistema XVE en pER10. Los segmentos de tallo derivados a partir de las plantas transgénicas pER10-*WUS* se pre-cultivaron sobre el medio MS con 0,5 mg/l de 2,4-D durante 5 días y, a continuación, se transfirieron a un medio MS con o sin 17- β -estradiol 10 μ M. No se observó embrión somático en el medio en la ausencia del inductor, en tanto que con el inductor, se generaron muchos embriones somáticos después de 2-3 semanas de cultivo.

De manera similar a la de las plantas mutantes *pga6*, los presentes autores han encontrado que el pre-tratamiento con 2,4-D incrementa substancialmente la frecuencia de formación de embrión somático en plantas transgénicas pER10-*WUS*.

El procedimiento de colocación de *WUS* en pER10 o vectores similares que pueden ser regulados, permite llevar a cabo experimentos iguales o similares en plantas distintas de *Arabidopsis*.

Ejemplo 12

Colocación de WUS bajo el control de un promotor específico de tejido

El promotor G10-90 en el vector XVE puede ser reemplazado con un promotor específico de tejido (por ejemplo, un promotor específico de polen, raíz, tallo u hoja). Existe una diversidad de promotores específicos de tejido bien conocidos para los expertos en la técnica. Dado que la expresión de un transgen está activada por el gen XVE quimérico que está controlado por un promotor específico de tejido en este Ejemplo, el promotor O^{LexA}-46 que controla el transgen *WUS* es, de acuerdo con ello, específico de tejido de una manera dependiente del inductor. Esto significa que *WUS* será inducido únicamente en la presencia de un inductor y únicamente en el tejido específico correspondiente al promotor específico de tejido. Los tejidos o tipos de células apropiados, pueden, por ello, recogerse a partir de plantas transgénicas y usarse para la inducción de embriones somáticos tal como se describe en los Ejemplos 10 y 11.

En particular, cuando se usa polen derivado a partir de plantas transgénicas que portan un vector XVE/O^{LexA}-46-*WUS* del promotor específico de polen, las plantas progenie generadas a partir de embriones somáticos derivados del polen deberían ser haploides en lugar de diploides (véase, por ejemplo, Twell y otros, (1989) y Twell y otros, (1990) para promotores específicos de polen). En esta realización de la invención, una planta transgénica que tiene en su genoma un gen *Wuschel* (*WUS*) bajo el control de un promotor específico de polen, inducible, no expresaría normalmente el gen. El polen procedente de una planta de este tipo puede cultivarse en la presencia del inductor hasta que se produzca la embriogénesis somática, después de lo cual el inductor se separa y se permite que los embriones haploides se desarrollen dentro de clones haploides de acuerdo con técnicas convencionales.

Ejemplo 13

Inducción de formación de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos aislados de plantas transgénicas PGA6

Se aislaron embriones cigotos en la fase corazón tardía procedentes de silicuas jóvenes de plantas *PGA6* y se transfirieron o bien a medio no inductivo (MICK: sales MS, 30 g/l de sacarosa, 0,15 mg/l de IAA, 100 mg/l de carbenicilina, 50 mg/l de kanamicina, y fitagel al 0,25%, pH 5,7) o bien medio inductivo (MICK más 17- β -estradiol 10,0 μ M). Después dos semanas de cultivo, 10 embriones cigóticos formaron callos embriogénicos sobre el medio inductivo, pero únicamente 3 embriones cigóticos empezaron a formar callos embriogénicos sobre el medio MICK no inductivo. Después de 35 días de cultivo sobre el medio inductivo, 10 embriones cigóticos formaron embriones somáticos con un índice de regeneración (el número de embriones somáticos por explante de embrión cigoto) de aproximadamente 70-100 (Figura 8A). Por el contrario, sobre medio MICK sin estradiol, únicamente dos embriones cigóticos regeneraron embriones somáticos y el índice de regeneración de embrión somático fue de aproximadamente 10-20 (Figura 8B).

Ejemplo 14

Generación de una planta apomítica

La apomixis puede inducirse mediante la introducción de *WUS* dentro de una célula de planta de una manera tal que el gen *WUS* esté expresado en los tejidos apropiados (por ejemplo, tejido nucelo). Esto puede llevarse a cabo por medio de, pero sin limitarse a ello, la colocación del gen *WUS* bajo el control de un promotor específico de tejido

(por ejemplo, un promotor específico de nucelo), un promotor inducible, o un promotor que es a la vez inducible y específico de tejido. La inducción de la expresión del gen *WUS*, por ejemplo, en el nucelo, produce apomixis que conduce a una planta apomíctica. A continuación, esta planta puede usarse para establecer una línea de planta de verdadera selección. Adicionalmente, el vector usado para transferir *WUS* dentro de la célula de la planta puede

5 incluir cualquier otro gen homólogo deseado además de *WUS*, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, un gen marcador o un gen para conferir un rasgo deseado en la planta, por ejemplo, un gen que dé como resultado plantas más grandes, crecimiento más rápido, resistencia al estrés, etc. Esto conduciría al desarrollo de una línea apomíctica con el rasgo deseado.

10 En una variación del esquema, pueden construirse fácilmente cajas de expresión de plantas, que incluyen, pero sin limitarse a ellas, cajas de expresión de monocotiledones o dicotiledones, que dirigen la expresión de *WUS* al integumento interior o nucelo. Se hizo una caja de expresión que dirige la expresión de las secuencias de ADN de *WUS* al nucelo usando el promotor *Nuc1* de cebada (Doan y otros, (1996)). La expresión se usó para la transformación de la planta. Igualmente, pueden incluirse en la caja otros genes que confieren rasgos deseables.

15 Es de esperar que las plantas transgénicas que portan la caja de expresión serán, por ello, capaces de producir embriones *de novo* a partir de células nucleares que expresan *WUS*. En el caso del maíz, esto se complementa mediante la polinización de mazorcas con el fin de promover la normal fertilización de la célula central y desarrollo del endosperma. En otra variación de este esquema, las transformaciones *Nuc1:WUS* podrían llevarse a cabo usando una base

20 genética nula (endosperma independiente de la fertilidad) *fie*, la cual promocionaría tanto el desarrollo de embriones *de novo* como el desarrollo de endosperma sin fertilización (Ohad y otros, (1999)). Tras el examen microscópico del desarrollo de embriones resultará obvio que la apomixis se ha producido en la presencia de embriones que brotan fuera del nucelo. En otra variación aún de este esquema, las secuencias de ADN de *WUS* podrían suministrarse, tal como se ha descrito anteriormente, dentro de un genotipo letal de embrión cigótico homocigoto. Únicamente los embriones

25 adventicios producidos a partir de tejido nucelo somático se desarrollarían en la semilla.

Lista de referencias

- 30 **Bashaw**, *Crop Science*, vol. 20, pág. 112, (1980).
- Bechtold**, N., **Ellis**, J. y **Pelletier**, G., *In planta Agr. by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants*, *C. R. Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie*, vol. 316, págs. 1194-1199, (1993).
- 35 **Brand**, U., **Fletcher**, J.C., **Hobe**, M., **Meyerowitz**, E.M., y **Simon**, R., *Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by *CLV3* activity*, *Science*, vol. 289, págs. 617-619, (2000).
- Clark**, S.E., *Cell signalling at the shoot meristem*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 2, págs. 276-284, (2001).
- 40 **Doan**, D.N., **Linnestadt**, C. y **Olsen**, O.A., *Isolation of molecular markers from the barley endosperm coenocyte and the surrounding nucellus cell layers*, *Plant. Mo. Biol.*, vol. 31, págs. 877-886, (1996).
- Ishige**, F., **Takaichi**, M., **Foster**, R., **Chua**, N.-H. y **Oeda**, K., *A G-box motif (GCCACGTGCC) tetramer confers high-level constitutive expression in dicot and monocot plants*, *Plant J.*, vol. 18, págs. 443-448, (1999).
- 45 **Kakimoto**, T., *CKII, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction*, *Science*, vol. 274, págs. 982-985, (1996).
- Koncz**, C., **Martíni**, N., **Mayerhofer**, R., **Koncz-Kalman**, Z., **Korber**, H., **Redei**, G.P. y **Schell**, J., *High-frequency ADN-T-mediated gene tagging in plants*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 86, (no. 21), págs. 8467-8471, (1989).
- 50 **Laux**, T., **Mayer**, K.F., **Berger**, J., y **Jurgens**, G., *The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis**, *Development*, vol. 122, págs. 87-96, (1996).
- 55 **Lin**, X., **Hwang**, G.J., y **Zimmerman**, J.L., *Isolation and characterization of a diverse set of genes from carrot somatic embryos*, *Plant Physiol.*, vol. 112, págs. 1365-1374, (1996).
- Liu**, Y.G., **Mitsukawa**, N., **Oosumi**, T., y **Whittier**, R.F., *Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* ADN-T insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR*, *Plant J.*, vol. 8, págs. 457-463, (1995).
- 60 **Lotan**, T., **Ohto**, M., **Yee**, K.M., **West**, M.A., **Lo**, R., **Kwong**, R.W., **Yamagishi**, K., **Fischer**, R.L., **Goldberg**, R.B., y **Harada**, J.J., **Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells*, *Cell*, vol. 93, págs. 1195-1205, (1998).
- 65 **Mayer**, K.F., **Schoof**, H., **Haecker**, A., **Lenhard**, M., **Jurgens**, G., **Laux**, T., *Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem*, *Cell*, vol. 95, págs. 805-815, (1998).
- Meinke**, D.W., *A homoeotic mutant of *Arabidops**, *Science*, vol. 258, págs. 1647-1650, (1992).

Meinke, D.W., Franzmann, L.H., Nickle, T.C. y Yeung, E.C., *Leafy cotyledon mutants of Arabidopsis*, *Plant Cell*, vol. 6, págs. 1049-1064, (1994).

Mordhorst, A.P., Toonen, M.A.J., y de Vries, S.C., *Plant embryogenesis*, *Crit. Rev. Plant Sci.*, vol. 16, págs. 535-576, (1997).

Mordhorst, A.P., Voerman, K.J., Hartog, M.V., Meijer, E.A., van Went, J., Koor-neef, M., y de Vries, S.C., *Somatic embryogenesis in Arabidopsis thaliana is facilitated by mutations in genes repressing meristematic cell divisions*, *Genetics*, vol. 149, págs. 549-563, (1998).

Murashige, T., y Skoog, F., *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture*, *Physiol. Plant.*, vol. 15, págs. 473-497, (1962).

Ohad, N., Yadegari, R., Margossian, L., Hannon, M., Michaeli, D., Harada, J.J., Goldberg, R.B., y Fischer, R.L., *Mutations in FIE, a WD polycomb group gen, allow endosperm development without fertilization*, *The Plant Cell*, vol. 11, págs. 407-416, (1999).

Parlevliet, JE y otros, *Citrus*, *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, vol. 74, págs. 252-260, (1959).

Pepin y otros, *Crop Science*, vol. 11, págs. 445-448, (1971).

Rieger y otros, en *Glosary of Genetics and Cytogenetics*, Springer-Verlag, New York, N.Y., (1976).

Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Press, (1989).

Schmidt, E.D., Guzzo, F., Toonen, M.A., y de Vries, S.C., *A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos*, *Development*, vol. 124, págs. 2049-2062, (1997).

Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K.F., Jurgens, G., y Laux, T., *The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes*, *Cell*, vol. 100, págs. 635-644, (2000).

Skoog, F., y Millar, C.O., *Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro*, *Symp. Soc. Exp. Biol.*, vol. 11, págs. 118-131, (1957).

Spemann, H. y Mangold, H., *Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organismen*, *Archiv für Mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik*, vol. 100, págs. 599-638, (1924).

Stone, S.L., Kwong, L.W., Yee, K.M., Pelletier, J., Lepiniec, L., Fisher, R.L., Goldberg, R.B., y Harada, J.J., *LEAFY COTYLEDON 2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 98, págs. 11806-11811, (2001).

Sugiyama, M., *Organogenesis in vitro*, *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 2, págs. 61-64, (1999).

Sugiyama, M., *Genetic analysis of plant morphogenesis in vitro*, *Int. Rev. Citol.*, vol. 196, págs. 67-84, (2000).

Thomas, T.L., *Gene expression during plant embryogenesis and germination: an overview*, *Plant Cell*, vol. 5, págs. 1401-1410, (1993).

Twell, D., Wing, R., Yamaguchi, J., y McCormick, S., *Isolation and expression of an anther-specific gene from tomato*, *Mol. Gen. Genet.*, vol. 217, págs. 240-245, (1989).

Twell, D., Yamaguchi, J., y McCormick, S., *Pollen-specific gene expression in transgenic plants: coordinate regulation of two different tomato gene promoters during microsporogenesis*, *Development*, vol. 109, págs. 705-713, (1990).

Waites, R., y Simon, R., *Signaling cell fate in plant meristems: Three clubs on one touse*, *Cell*, vol. 103, págs. 835-838, (2000).

Wilson y otros, *Proceedings of the International Workshop on Apomixis in Rice, Changsha, People's Republic of China*, Jan. 13-Jan. 15, (1992). Human Hybrid Rice Research Center, Chansha, People's Republic of China.

Wu, Y., Haberland, G., Zhou, C., y Koop, H.-U., *Somatic embryogenesis, formation of morphogenetic callus and normal development in zygotic embryos of Arabidopsis thaliana in vitro*, *Protoplasma*, vol. 169, págs. 89-96, (1992).

Zimmerman, J.L., *Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants*, *Plant Cell*, vol. 5, págs. 1411-1423, (1993).

Zuo, J., Niu, Q.-W., y Chua, N.-H., *An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expresión in transgenic plants*, *Plant J.*, vol. 24, págs. 265-273, (2000a).

Zuo, J., Niu, Q.-W., Nishizawa, N., Wu, Y., Kost., B., y Chua, N.-H., *KORRIGAN, an Arabidopsis endo-1,4-b-glucanase, localizes to the cell plate by polarized targetting and is essential for cytokinesis*, *Plant Cell*, vol. 12, (no. 7), págs. 1137-1152, (2000b).

Zuo, J., Niu, Q.-W., Moller, S.G., y Chua, N.-H., *Chemical-regulated, site-specific ADN excisión in transgenic plants*, *Nat. Biotechnol.*, vol. 19, págs. 157-161, (2001).

Patentes y solicitudes de patentes

Solicitud de Patente Publicada WO 00/24914, publicada el 4 de Mayo de 2000.

Solicitud de Patente Publicada WO 01/23575, publicada el 5 de Abril de 2001.

Patente de EE.UU. No. 5.710.367.

Patente de EE.UU. No. 5.811.636.

Patente de EE.UU. No. 6.028.185.

Patente de EE.UU. No. 6.229.064.

Patente de EE.UU. No. 6.239.327.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de una planta haploide que comprende:

a. la transformación de manera estable de una célula de planta con una secuencia de ADN que comprende al menos una secuencia que codifica *Wuschel* bajo el control de un promotor para producir una célula de planta transgénica, en el que el promotor está seleccionado entre el grupo constituido por un promotor específico de tejido haploide, un promotor inducible y un promotor que es a la vez específico de tejido haploide e inducible,

b. la generación de una planta transgénica a partir de dicha célula de planta transgénica,

c. la sobreexpresión de la secuencia que codifica *Wuschel* en un tejido haploide de dicha planta transgénica para producir un embrión somático haploide,

d. el crecimiento de dicho embrión dentro de una planta haploide.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el promotor es un promotor específico de tejido haploide.

3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el promotor es un promotor específico de polen, y el tejido haploide de la planta transgénica es polen.

4. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el promotor es un promotor específico de óvulo, y el tejido haploide de la planta transgénica es tejido de óvulo.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el promotor es un promotor inducible.

6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el promotor es a la vez específico de tejido haploide e inducible.

7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el promotor es específico de polen, y la célula de planta haploide es una célula de polen.

8. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la etapa de sobreexpresión c. se lleva a cabo en tejido haploide escindido cultivado en la presencia del inductor específico para el promotor inducible, durante un tiempo suficiente para inducir la formación del embrión somático haploide, seguido de la separación del inductor, y además en el que la etapa de crecimiento d. se lleva cabo en la ausencia del inductor.

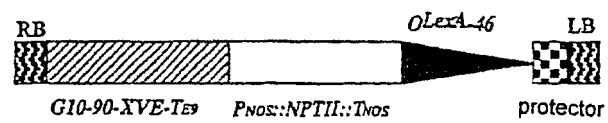


FIGURA 1

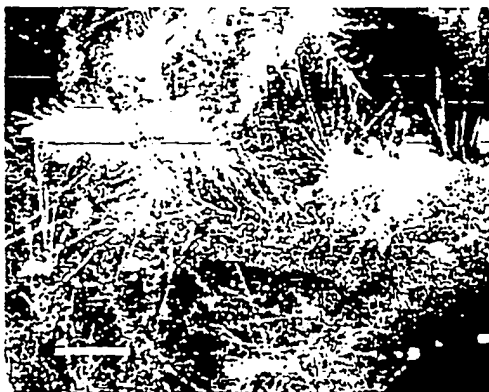


FIGURA 2A

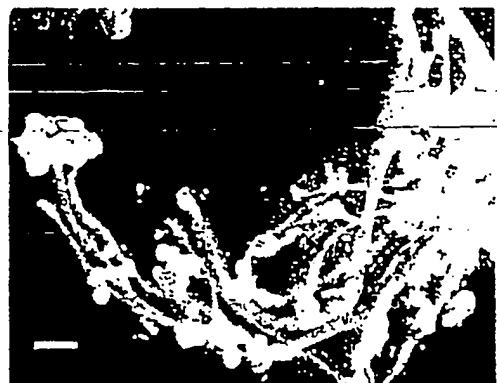


FIGURA 2B



FIGURA 2C



FIGURA 2D

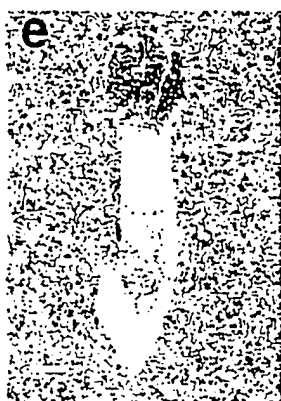


FIGURA 2E



FIGURA 2F

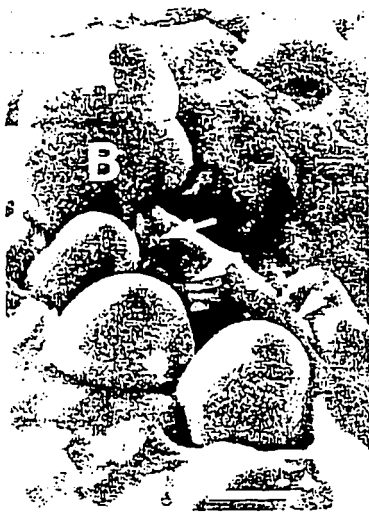


FIGURA 3A

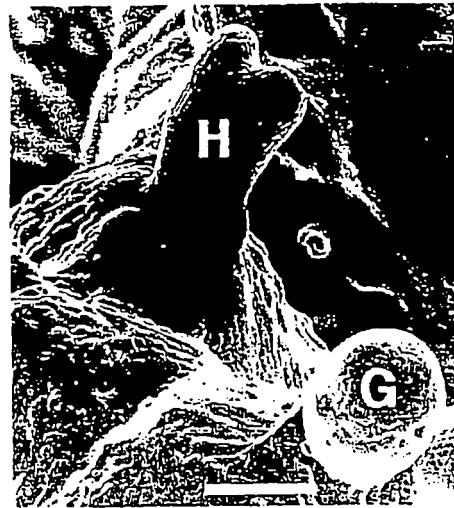


FIGURA 3B



FIGURA 3C

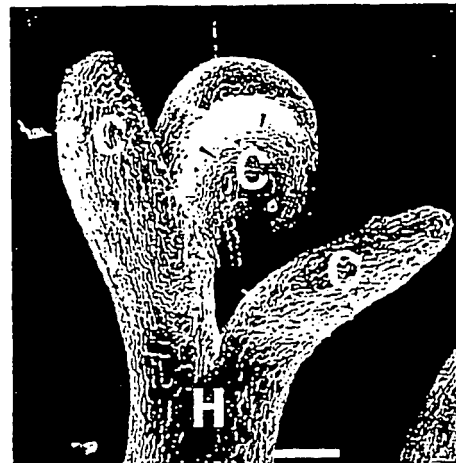


FIGURA 3D

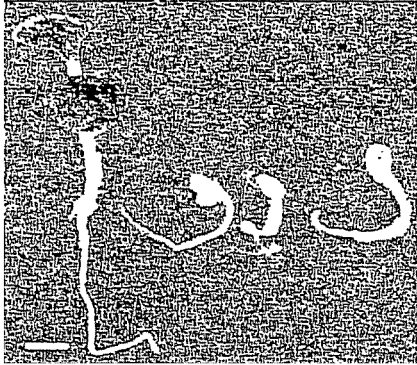


FIGURA 4A



FIGURA 4B

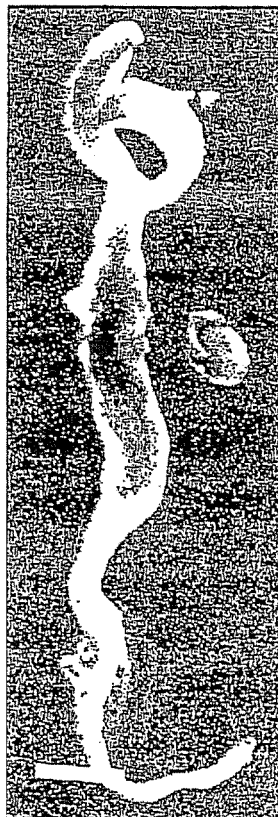


FIGURA 4C



FIGURA 4D

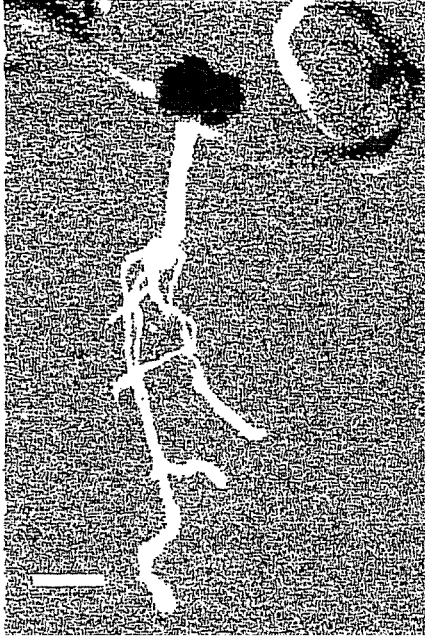


FIGURA 4E



FIGURA 4F



FIGURA 4G



FIGURA 4H

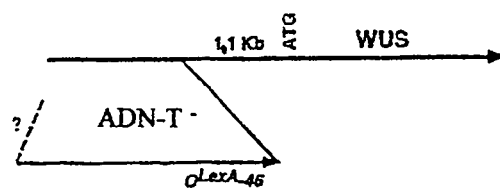


FIGURA 5A

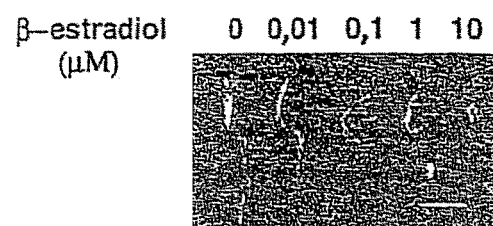


FIGURA 5B

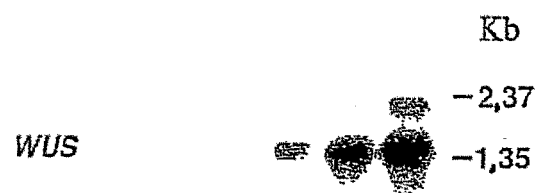


FIGURA 5C

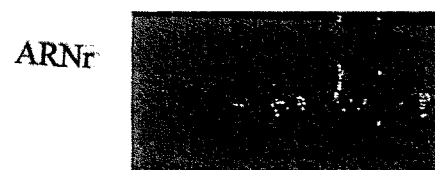


FIGURA 5D



FIGURA 6A



FIGURA 6B



FIGURA 6C

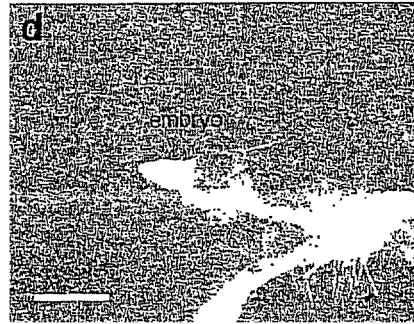


FIGURA 6D

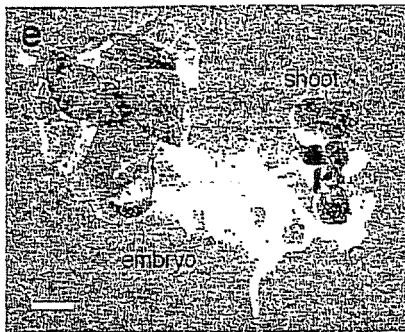


FIGURA 6E

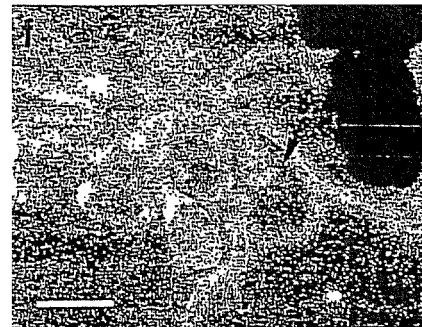


FIGURA 6F

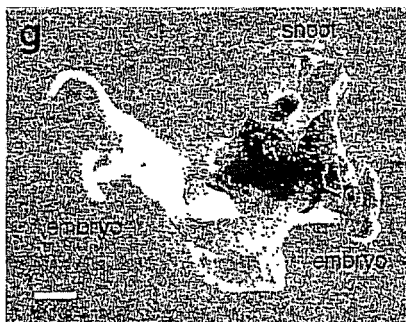


FIGURA 6G

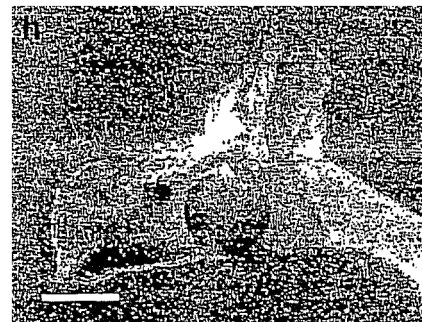


FIGURA 6H

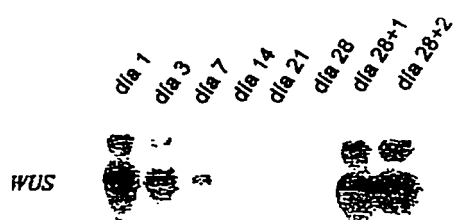


FIGURA 7A

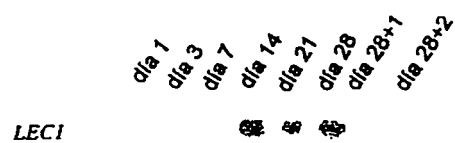


FIGURA 7B

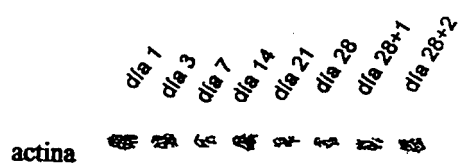


FIGURA 7C



FIGURA 8A

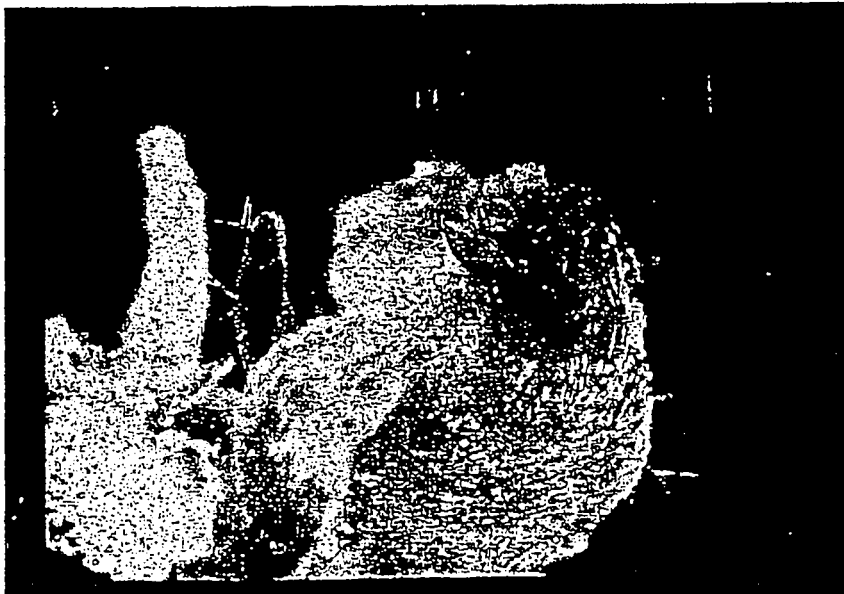


FIGURA 8B

ES 2 286 290 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> The Rockefeller University
5 <120> Promoción de embriogénesis somática en plantas mediante la expresión del gen Wunschel
<130> 2312-114
<140> PCT/US/02/34534
<141> 2002-10-28
10 <150> US 09/984274
<151> 2001-10-29
<160> 2
<170> PatentIn version 3.0
15 <210> 1
<211> 25
<212> ADN
20 <213> Artificial
<220>
<223> cebador de amplificación
25 <400> 1

 cttatttacc gttaacttgt gaaca
30 <210> 2
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial
35 <220>
<223> cebador de amplificación

<400> 2
40
 cacataacga gagataacta gttaac

45

50

55

60

65