



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 308 786**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/56 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **97916529 .7**
96 Fecha de presentación : **10.04.1997**
97 Número de publicación de la solicitud: **0906436**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.1999**

54 Título: **Uso de secuencias de DNA para conseguir esterilidad masculina en plantas transgénicas.**

30 Prioridad: **11.04.1996 GB 9607517**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

73 Titular/es: **Gene Shears Pty. Limited**
CSIRO Plant Industry
Corner Barry Drive and Clunies, Ross Street
Canberra, ACT 2601, AU

72 Inventor/es: **Scott, Roderick, John;**
Wyatt, Paul y
Perez, Pascual

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Uso de secuencias de DNA para conseguir esterilidad masculina en plantas transgénicas.

5 La presente invención se refiere al uso de secuencias de DNA que comprenden la secuencia codificante de una enzima $\beta(1,3)$ glucanasa, ligada operablemente a un promotor que posee un tipo apropiado de expresión temporal y/o tisular, por ejemplo un promotor específico de tapetum, por ejemplo un promotor A3 ó A9, para transformar plantas de tomate o células de plantas de tomate generando plantas de tomate androestériles. Las plantas de tomate y sus semillas también forman parte de la invención.

10 Las plantas híbridas poseen las ventajas de mayor rendimiento y mejor resistencia a las enfermedades que sus plantas parentales, debido a heterosis o vigor del híbrido. La uniformidad del cultivo es otra ventaja de las plantas híbridas cuando las parentales son extensamente homocigóticas; esto conduce a una regulación mejorada del cultivo. La semilla de híbridos es, por tanto, importante desde el punto de vista comercial y se vende a un precio superior al precio normal.

15 Hasta la fecha ha habido varias propuestas referentes a la producción de plantas androestériles. El documento EP-A-0329308 describe varios métodos para producir plantas androestériles que incluyen el uso de secuencias de DNA que codifican RNA "antisentido" que pueden bloquear la expresión de uno o más genes esenciales para la producción de polen, así como el uso de un promotor específico del polen para inducir la expresión de una secuencia de DNA que codifica una molécula citotóxica.

20 El documento EP-A-0344029 describe de modo semejante métodos para producir plantas androestériles, basados en el uso de secuencias de DNA "antisentido", así como el uso de promotores específicos tisulares para regular la expresión de una molécula citotóxica. Son ejemplos de tales moléculas citotóxicas que se indican en el documento EP-A-0344029, RNAsa T1, Barnasa, DNAsas, proteasas, fitohormonas, enzimas implicadas en la síntesis de auxinas, glucanasas, lipasas, peroxidasas lipídicas, inhibidores de las paredes de células vegetales y toxinas bacterianas.

25 Los métodos que se basan en la expresión de una sustancia citotóxica en tejidos particulares dependen, como es lógico, de la disponibilidad de promotores tisulares específicos. El documento WO-A-92/11379 proporciona ciertos promotores específicos de tapetum, designados A3 y A9, que son útiles en "métodos para la producción de plantas androestériles por medio de la expresión específica tisular y temporal de una sustancia citotóxica".

30 Barnasa, en particular, ha sido propuesta como una molécula citotóxica particularmente útil para usar en la producción de plantas androestériles. Sin embargo, la Barnasa no aparece como útil en todas las especies de plantas. En particular se ha encontrado ahora que tiene ciertos efectos secundarios en plantas de tomate que han sido transformadas con una molécula de DNA que comprende una secuencia codificante de Barnasa, bajo el control, de un promotor tisular específico. Por tanto, en la actualidad no existe un método útil para producir plantas de tomate androestériles.

35 Sorprendentemente se ha encontrado que, en el caso de plantas de tomate, el uso de, por ejemplo, un promotor específico de tapetum para inducir la expresión de una secuencia de DNA que codifica una enzima glucanasa, representa un método especialmente eficaz para producir plantas de tomate androestériles, evitándose los problemas de los efectos secundarios experimentados con la Barnasa. Son ejemplos de promotores específicos de tapetum, útiles, los promotores A3 ó A9 que están descritos en el documento WO-A-92/11379.

40 Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona el uso de una secuencia de DNA que comprende la secuencia codificante de una enzima $\beta(1,3)$ glucanasa ligada operablemente a un promotor, u otra secuencia reguladora, que proporciona expresión de la secuencia de DNA con especificidad apropiada tisular y/o temporal, para la preparación de una planta de tomate transgénica androestéril.

45 En el contexto de la presente invención, "especificidad apropiada tisular y/o temporal" significa que el promotor proporciona la expresión de la $\beta(1,3)$ -glucanasa de modo que resulta androesterilidad de la planta de tomate transgénica. Por ejemplo, la secuencia puede ser expresada en tejidos en los que su actividad puede conducir a androesterilidad. El tiempo de expresión puede ser importante también y de aquí la necesidad de un grado de especificidad temporal.

50 Adecuadamente, la secuencia de DNA estará ligada operativamente a un promotor, u otra secuencia reguladora, que proporcione expresión de la secuencia de DNA en el tapetum y/o en células microesporógenas antes de la expresión de callasa. Por tanto, los promotores específicos de tapetum con tipos apropiados de expresión temporal son especialmente útiles, por ejemplo un promotor A3 ó un promotor A9, según se describe en el documento WO-A-92/11379, así como también secuencias que consisten solamente en aquellos elementos reguladores que proceden de tales promotores, que se requieren para iniciar la expresión tisular específica.

55 Adicionalmente, los promotores que poseen la especificidad temporal deseada pero que son expresados más generalmente en todo el tejido vegetal, pueden ser útiles también en la práctica de la presente invención, con tal que sean activos en los tejidos apropiados, y, por tanto, el uso de tales secuencias de promotores está también dentro del alcance de la invención.

En el caso de la $\beta(1,3)$ glucanasa según se ha definido anteriormente, la secuencia codificante de la enzima $\beta(1,3)$ glucanasa será la secuencia codificante natural. Los expertos en la técnica podrán apreciar que, debido a la degeneración del código genético, es posible llevar a cabo cambios conservativos en la secuencia de DNA que no resulten en cambios de la secuencia de aminoácidos de la enzima $\beta(1,3)$ glucanasa. Es bien conocido en la técnica de las proteínas, que pueden llevarse a cabo cambios “conservativos” o sin duda, “semi-conservativos”, en la secuencia de aminoácidos de una proteína que no alteren su actividad fundamental. Por ejemplo, los aminoácidos tales como glicina, valina, leucina e isoleucina, todos los cuales tienen cadenas laterales alifáticas, pueden con frecuencia ser sustituidos unos por otros sin alterar sustancialmente la actividad biológica de la proteína. De modo semejante, aminoácidos tales como fenilalanina, tirosina y triptófano, todos los cuales poseen todos cadenas laterales aromáticas, pueden ser sustituidos unos por otros.

En el contexto de la presente invención, la expresión “promotor, u otra secuencia reguladora” incluye la secuencia completa del promotor, por ejemplo el promotor A3 ó A9, o puede referirse a aquellos elementos o partes de la secuencia del promotor que proporcionan la necesaria especificidad tisular y/o temporal. Por tanto, los expertos en la técnica podrían comprender que una secuencia completa de un promotor podría ser modificada si fuera necesario para retirar elementos no esenciales, no reguladores. Además, sería posible modificar promotores constitutivos mediante la inclusión de secuencias de control, tisular y/o temporal, procedentes de promotores tales como los promotores A3 y A9, para producir secuencias de promotores, compuestas o quiméricas, útiles en la práctica de la invención.

Según se ha mencionado anteriormente, como ejemplos de promotores específicos de tapetum se incluyen los promotores A3 y A9. Además, se entenderá, asimismo, por los expertos en la técnica, que tales promotores A3 ó A9 pueden derivarse no solamente de *Brassicaceae spp.* según se describe en el documento WO-A-92/11379, sino también de otros orígenes, por ejemplo, del Maíz. Por tanto, el uso de promotores “semejantes” a A3 ó A9, derivados de otros orígenes tales, por ejemplo el promotor “semejante” al A9 procedente del Maíz, también forman parte de la presente invención.

En una realización preferida, el promotor es o bien el promotor A9 completo o al menos aquellos elementos reguladores esenciales para iniciar la transcripción. En particular se prefiere el promotor A9 procedente de *Brassicaceae spp.*. Un ejemplo de una enzima glucanasa preferida cuya secuencia codificante de DNA es útil en la presente invención, es la $\beta(1,3)$ PR-Glucanasa. En la figura 5 se muestra una secuencia de DNA que codifica esta enzima.

El DNA para usar según esta invención puede estar en la forma de un vector. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales, virus o fagos. Además, las secuencias de DNA usadas en la invención pueden incluir uno o más marcadores seleccionables para permitir la selección de células transfectadas (o transformadas: los términos se emplean indistintamente en esta memoria descriptiva) con ellos y, preferiblemente, para permitir la selección de células que albergan vectores que incorporan DNA heterólogo. Un ejemplo de un marcador seleccionable tal, es un gen que, cuando se expresa, puede conferir resistencia a herbicidas, por ejemplo, un gen que comunica resistencia contra el herbicida BASTA.

Aun cuando el documento EP-A-0344029 incluía glucanasas como ejemplo de moléculas citotóxicas para usar para conferir androesterilidad, esto se describía solamente como parte de una lista general de posibilidades de, aparentemente, igual mérito, y esta descripción no incluía discusión alguna de los problemas particulares asociados con la producción de una planta de tomate androestéril utilizable.

El documento WO-A-92/11379 describía construcciones de DNA que comprendían el promotor A3 ó el promotor A9 procedentes de *Brassicaceae* y la secuencia codificante de la β -1,3-glucanasa procedente de *N. tabacum*. Sin embargo esta descripción incluía también ejemplos que usaban el promotor A3 ó el promotor A9 para inducir la expresión de Barnasa y, de nuevo, no se describía discusión de las ventajas particulares de usar un sistema de A3/A9-glucanasa en una planta de tomate.

El DNA para usar según la invención puede ser preparado mediante cualquier método conveniente que lleva consigo el acoplamiento, juntos, de sucesivos nucleótidos, y/o el ligamiento de oligo- y/o poli-nucleótidos, incluyendo procesos *in vitro*, pero la tecnología del DNA recombinante constituye el método de elección. En último lugar, el DNA será introducido en las células vegetales mediante cualesquiera medios adecuados.

Preferiblemente, las células vegetales son transformadas con DNA usando un vector plasmídico Ti desactivado y transportado por *Agrobacterium*, mediante procedimientos operatorios conocidos en la técnica, por ejemplo, según se describe en los documentos EP-A-0116718 y EP-A-0270822. Alternativamente, el DNA extraño podría ser introducido directamente en las células vegetales utilizando un aparato de descarga eléctrica. También sería adecuado cualquier otro método que proporcionara la incorporación estable del DNA dentro del DNA nuclear de una célula vegetal de cualquier especie.

Aun cuando la provisión de plantas androestériles es ventajosa, existe también la necesidad de proporcionar medios para la restauración de la fertilidad. Puede desearse asegurar, por ejemplo, que el 100% de las plantas híbridas F1 sean fértiles. Un modo conveniente de conseguirlo es mediante el uso de un gen restaurador o una secuencia restauradora. En el contexto de la presente invención este gen restaurador puede comprender DNA que codifica RNA que está en orientación antisentido con respecto al RNA transcrito desde la secuencia de DNA de la glucanasa. Este

DNA restaurador puede ligarse operablemente a un promotor que manifieste un tipo de expresión apropiado, temporal y tisular, por ejemplo el usado para inducir la expresión de la secuencia de DNA de la glucanasa según se ha descrito anteriormente. Así pues, los promotores, u otras secuencias reguladoras, tal como se describe en esta memoria, son igualmente útiles para proporcionar restauración de la androfertilidad. Por tanto, pueden ligarse operablemente a un promotor específico de tapetum tal como un promotor A3 o un promotor A9, según se ha descrito en esta memoria.

En un segundo aspecto, por consiguiente, la presente invención proporciona una secuencia de DNA que es complementaria, al menos en parte, de una secuencia de DNA que codifica una $\beta(1,3)$ glucanasa como se ha definido anteriormente. De modo adecuado, la secuencia de DNA de este aspecto de la invención está ligada operablemente a un promotor, u otra secuencia reguladora, que proporciona expresión de la secuencia de DNA con especificidad apropiada tisular y/o temporal. En realizaciones preferidas, el promotor, u otra secuencia reguladora, es, como se ha descrito anteriormente, para usar con la secuencia de DNA codificante de la glucanasa.

Adecuadamente, la secuencia de DNA antisentido es complementaria de una parte al menos de la secuencia de DNA que codifica la PR-glucanasa, por ejemplo, es complementaria de una parte al menos de la secuencia que se muestra en la figura 5.

Todavía otro ejemplo de DNA restaurador de la fertilidad codifica una enzima de RNA (conocida como ribozima) capaz de escisión altamente específica de una secuencia diana dada (Haseloff y Gerlach, Nature 334 585-591 (1988)). Al igual que el DNA antisentido, para el DNA de la ribozima (que codifica en este caso una ribozima que es considerada diana del RNA codificado por una secuencia codificante de glucanasa) puede ser posible usar un promotor apropiado, u otra secuencia reguladora según se describe en esta memoria, para inducir el DNA codificante de la ribozima.

Por tanto, según un tercer aspecto de la invención, se proporciona una secuencia de DNA codificante de una ribozima capaz de escisión específica de RNA codificado por una molécula de DNA que codifica una $\beta(1,3)$ glucanasa, según se ha definido anteriormente. Adecuadamente, la secuencia de DNA codificante de ribozima puede estar bajo el control de un promotor, u otra secuencia reguladora, que proporciona expresión de la secuencia de DNA codificante de ribozima con especificidad apropiada tisular y/o temporal, por ejemplo un promotor específico de tapetum tal como un promotor A3 ó un promotor A9, preferiblemente un promotor A9. Una secuencia de DNA codificante de ribozima se muestra en la figura 9.

La presente invención contempla el uso de todas las formas de ribozima. Estas formas incluyen ribozimas tales como las descritas por Haseloff y Gerlach (Nature, 334:585-591 (1988)), ribozimas que forman parte de un mensaje expresado, ribozimas que están incluidas dentro de snRNA o tRNA y ribozimas multiméricas, que a su vez pueden comprender las mismas o diferentes ribozimas individuales.

Ambas secuencias, las secuencias de DNA complementarias, de la invención, así como la secuencia de DNA codificante de ribozima, de la invención, podrían ser útiles para restaurar la androfertilidad de plantas de tomate. Por consiguiente, en un cuarto aspecto, la presente invención proporciona el uso de tales secuencias de DNA de invención para la restauración de la androfertilidad de una planta de tomate.

Así pues, el uso de las secuencias de DNA codificantes de glucanasa, según se ha definido en esta memoria, permite la producción de plantas de tomate transgénicas que son androestériles. Por tanto, en un quinto aspecto, la presente invención proporciona una planta de tomate transgénica que tiene incorporado en algunas de sus células por lo menos, una secuencia de DNA codificante de una $\beta(1,3)$ glucanasa según se define en esta memoria y como se ha descrito anteriormente.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona una planta de tomate transgénica que tiene incorporada en algunas de sus células por lo menos, una secuencia de DNA complementaria o codificante de ribozima, de la invención

En otros aspectos la presente invención proporciona:

- (i) una célula de una planta de tomate que incluye una secuencia de DNA de la invención codificante de una $\beta(1,3)$ glucanasa;
- (ii) una célula de una planta de tomate que incluye una secuencia de DNA complementaria o codificante de ribozima, de la invención;
- (iii) material de propagación que deriva de una planta transgénica de la invención, en que el material de propagación incluye las secuencia de DNA transgénicas anteriormente descritas;
- (iv) semillas que pueden obtenerse desde una planta transgénica de la invención, en las que las semillas incluyen las secuencias de DNA transgénicas anteriormente descritas;

(v) un método para restaurar la androfertilidad de una planta de tomate androestéril, que comprende:

(i) producir una planta de tomate transgénica, androestéril, de la invención; y

(ii) cruzar la planta de tomate transgénica producida en la etapa (i) con una planta de tomate transgénica de la invención que tiene incorporada en algunas de sus células, por lo menos, una secuencia de DNA, complementaria o codificante de ribozima, de la invención.

La invención será descrita ahora con referencia a los ejemplos que siguen, que no deben ser considerados en modo alguno como limitativos de la invención. Los ejemplos hacen referencia a las figuras en las que:

Figura 1: es un diagrama esquemático de los plásmidos pWP173GA y pWP174GA;

Figura 2: muestra el fenotipo de plantas de tomate de A9-PR-Glucanasa (WP173GA): A) tétradas de tipo salvaje teñidas con Azul de Anilina para callosa; B) tétradas de A9-PR-Glucanasa teñidas con Azul de Anilina; las tétradas que rodean a la callosa han sido degradadas por PR-Glucanasa (conocida, en general, como $\beta(1,3)$ Glucanasa); C) polen maduro de tipo salvaje; D) planta de PR-Glucanasa que carece de polen maduro pero que tiene microesporas fusionadas semejantes a tétradas en la dehiscencia de la antera; E) planta de A9-PR-Glucanasa; las dos primeras flores sobre el haz han sido sometidas a polinización cruzada con polen de tipo salvaje; F) puede apreciarse la sección de fruto derivado de polinización cruzada procedente de una semilla híbrida de una planta de A9-PR-Glucanasa; G) fruto partenocárpico sobre una planta de A9-PR-Glucanasa sin someter a polinización cruzada; este fruto no tiene semilla; H) segregante de tipo salvaje procedente de una línea de una planta de A9-PR-Glucanasa; éste pone de manifiesto un conjunto frutal normal;

Figura 3: muestra la morfología floral de plantas de tomate de tipo salvaje y de las plantas androestériles WP173GA y WP174GA; las plantas de A9-Barnasa poseen flores que tienen tamaños reducidos en comparación con las plantas de tipo salvaje y las de A9-PR-Glucanasa;

Figura 4: muestra el análisis molecular de 15 tomates transgénicos portadores de A9-PR-Glucanasa y genes de resistencia a BASTA;

Figura 5: muestra la secuencia de del gen de PR-Glucanasa (conocida, en general, como $\beta(1,3)$ glucanasa). Las regiones subrayadas son complementarias en cuanto a secuencia con los brazos de las ribozimas que se describen en el Ejemplo 6.

Figura 6: es un diagrama esquemático que muestra los fragmentos de PR-Glucanasa (conocida, en general, como $\beta(1,3)$ glucanasa) antisentido (cajas llenas) y sentido parcial (cajas abiertas), clonados detrás del promotor A9; se indica el número y proporción de retransformantes de tabaco que carecían de proteína de PR-Glucanasa detectable, determinado por análisis de transferencia Western;

Figura 7: muestra el análisis de transferencia Western de niveles de proteína de PR-Glucanasa (conocida, en general, como $\beta(1,3)$ glucanasa) en las anteras (procedente de yemas de 8-10 mm de largo) de la progenie de una planta de tabaco androestéril (restaurada), transformada con la construcción A9-PR-Glucanasa antisentido, pJSH1A; el genotipo de las plantas de tabaco está indicado por encima de cada calle; las plantas que contienen el gen de A9-PR-Glucanasa pero no el gen de A9-PR-Glucanasa antisentido, contienen proteína de PR-Glucanasa en las anteras (con flecha); las plantas que contienen ambos genes, de la A9-PR-Glucanasa y A9-PR-Glucanasa antisentido carecen de la proteína de PR-Glucanasa; el anticuerpo es una donación de Pierre De Wit (inducido contra la $\beta(1,3)$ glucanasa ácida del tomate);

Figura 8: muestra diagramas esquemáticos de (A) el plásmido pBIOS144, 35S-Ac. (B) plásmido de A9-PR-Glucanasa antisentido y (C) el plásmido de A9-PR-Glucanasa de sentido parcial, usados para transformar tomate;

Figura 9: muestra la secuencia de DNA de la ribozima multimérica; el resto de adenosina (caja inferior) situado en la posición 15 de la unidad catalítica de la ribozima 4 está ausente en la ribozima multimérica final;

Figura 10: muestra la actividad *in vitro* de la ribozima multimérica a 50°C y a 22°C; los tamaños y orígenes de los diversos productos de escisión están indicados a la izquierda del gel; no pueden observarse productos de escisión que resulten de la escisión de ribozima en el sitio 4;

Figura 11: es un diagrama esquemático de plásmidos de A9-ribozima multimérica usados para transformar tabaco (A) y tomate (B); y

Figura 12: Análisis de transferencia Western de niveles de proteína de PR-Glucanasa en anteras (procedente de yemas de 8-10 mm de longitud) de la progenie de una planta de tabaco androfértil (restaurada) transformada con la construcción A9-ribozima, p3039; las plantas que contienen ambos genes, el de la A9-PR-Glucanasa y el de la A9-ribozima multimérica, carecen de la proteína de PR-Glucanasa (indicado con flecha).

Ejemplo 1

Comparación del fenotipo de plantas de tomate de promotor A9-PR-Glucanasa con plantas de tomate de promotor A9-Barnasa

Cuando son transformados en las plantas de especies de tabaco que sirven de modelo, ambos genes quiméricos, el de promotor A9-Barnasa y el de promotor A9-PR-Glucanasa, pueden causar androesterilidad (Paul *et al.*, *Plant Molecular Biology*, 19:611-622 (1992); Worrall *et al.*, *Plant Cell*, 4:759-771 (1992)). En el caso de A9-Barnasa, la mayor parte de las plantas androestériles eran normales desde el punto de vista fenotípico. Para determinar que gen AMS es superior en las especies de tomate estrechamente afines, ambos genes AMS fueron transferidos en un vector binario que es preferido para la transformación de tabaco. Este vector binario, pGA492 (An, *Plant Physiology*, 81:86-91 (1986)), proporciona un mayor número de transformantes de tomate que el vector pBin19 (Bevan *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 12:8711-8721 (1984)) que fue usado en experimentos previos en el tabaco.

En primer lugar, el fragmento del gen quimérico de A9-PR-Glucanasa *KpnI*, *EcoRV*, del pDW80PR (Worrall *et al.* (1992) referencia anterior) fue clonado entre los sitios *KpnI* y *SmaI* pBluescript KS+ (Stratagene) formando el pWP173. En segundo lugar, el gen de A9-PR-Glucanasa, del pWP173 fue transferido como un fragmento *KpnI*, *SstI* en el pGA492 corte *KpnI*, *SstI*, formando el pWP173GA (Figura 1).

De modo semejante, el fragmento del gen quimérico de A9-Barnasa *KpnI*, *EcoRV*, del pWP127 (Paul *et al.* (1992) (referencia anterior), fue clonado entre los sitios *KpnI* y *SmaI* del pBluescript KS+ formando el pWP174. El gen de A9-Barnasa fue transferido después desde el pWP174 como un fragmento *KpnI*-*SstI* en el pGA492-cortado con *KpnI*, *SstI*, formando el pWP174GA (Figura 1). Ambos plásmidos fueron transferidos después a *Agrobacteria* que se usó luego para transformar tomate y los transformantes primarios fueron clasificados por su androfertilidad.

De 31 plantas de tomate transformadas con el gen de PR-Glucanasa, 26 plantas pusieron de manifiesto androesterilidad completa sin efectos pleiotrópicos observables (Figura 2). Las plantas constituyentes de la progenie de transformantes primarios que contenían una copia única del gen de A9-PR-Glucanasa, fueron analizadas poniendo de manifiesto que eran completamente androestériles, si habían heredado el gen de A9-PR-Glucanasa.

De 29 plantas de tomate transformadas con el gen de A9-Barnasa solamente 11 manifestaron androesterilidad. Sin embargo, el 50% de las plantas androestériles manifestaban también efectos pleiotrópicos adicionales incluyendo crecimiento atrofiado con flores pequeñas y con malformaciones (Figura 3). Estos fenotipos adicionales son debidos, probablemente, a una expresión inapropiada de Barnasa, debida acaso a la influencia de secuencias de DNA de flanco en las plantas. Aun cuando algunas plantas de A9-Barnasa eran androestériles sin fenotipos adicionales obvios, existe la posibilidad de que tales plantas puedan también expresar inapropiadamente Barnasa en determinadas condiciones medioambientales.

Por consiguiente, se prefiere el gen de A9-PR-Glucanasa para la creación de plantas de tomate androestériles.

Ejemplo 2

Ligamiento del gen quimérico de A9-Glucanasa con la resistencia a BASTA y ensayos de campo

En sistemas dominantes de androesterilidad, las plantas AMS son mantenidas mediante polinización con plantas de tipo salvaje. Las semillas producidas en la planta AMS tendrán, por consiguiente, una mezcla 1:1 de plantas AMS y de plantas de tipo salvaje. Para seleccionar plántulas de tomate que contiene el gen de AMS, el gen de A9-PR-Glucanasa es ligado al gen de resistencia a herbicidas fosfinotricina-acetil-transferasa, PAT (Wohlleben *et al.*, *Gene*, 70:25-37 (1988)) que confiere resistencia al herbicida BASTA. Un fragmento *KpnI* de 1,6 kb, que codifica el gen quimérico de PAT-promotor 35S de CaMV procedente de pBASTA (un derivado de pIB16.1 (Broer *et al.*, en *Proceedings of the Braunschweig Symposium on Applied Plant Molecular Biology*, Braunschweig, 21-23 de Noviembre (1989), páginas 240-246), fue clonado en el sitio *KpnI* del pWP173GA formando el pBIOS171 (Figura 4). El pBIOS171 fue transformado en el tomate (Figura 4). De 21 transformantes primarios 16 eran androestériles. En la progenie de plantas que contenían una copia única del gen de BASTA- A9-PR-glucanasa la resistencia a Basta estaba co-segregada con la androesterilidad. Un ensayo de campo de 4 líneas androestériles demostró que se mantenía una androesterilidad completa a lo largo de un período de floración de 90 días (en cuyo punto se dio por terminado el ensayo).

Ejemplo 3

Evaluación de genes de restauración de androfertilidad en el tabaco: genes quiméricos de promotor A9-PR-Glucanasa antisentido y sentido parcial

Con objeto de que el 100% de plantas híbridas F1 fueran androfértiles, las plantas androparentales usadas en el cruce de híbridos deben ser homocigóticas con respecto a un gen, un gen restaurador, que pueda neutralizar el efecto del gen de A9-PR-Glucanasa. Un ejemplo de un gen restaurador tal es un gen de promotor A9-PR-Glucanasa antisentido.

Se prefiere el uso del promotor A9 para inducir la expresión del gen restaurador, aun cuando puede ser igualmente efectivo cualquier promotor que tenga un tipo de expresión adecuado, temporal y/o tisular.

Dado que la transformación de tabaco es más eficiente que la del tomate, fueron evaluados genes restauradores potenciales de PR-Glucanasa por retransformación de líneas de tabaco de A9-PR-Glucanasa androestériles, que han sido descritas por Worrall *et al.* (1992) (referencia anterior). Se construyó un gen de PR-Glucanasa antisentido de longitud total, del modo siguiente:- El gen de PR-Glucanasa procedente de pDW80PR fue vuelto a clonar como un fragmento *Xba*I, *Sst*II en *Xba*I, *Sst*II - corte pBluescript SK- formando el pWP158. El gen de PR-Glucanasa fue recuperado luego desde el pWP158 como un fragmento *Eco*RI, *Sst*II y clonado entre los sitios *Sst*II y *Eco*RI del pWP80 (véase el documento WO-A-92/11379) formando el pWP162. El gen de PR-Glucanasa antisentido inducido por A9 fue recuperado desde el pWP162, como un fragmento *Sst*I, *Eco*RV y clonado entre los sitios *Sst*I y *Sma*I del vector binario pGPTV-Hpt (Becker *et al.*, *Plant Molecular Biology*, 20: 1195-1197 (1992)), formando el pWP162-Hpt. De 51 plantas de tabaco de PR-Glucanasa transformadas con el pWP162-hpt apareció 1 que tenía niveles de callosa aumentados y producción de polen de tipo casi salvaje. Esta planta tenía 8 copias del gen restaurador.

Otras construcciones de PR-Glucanasa antisentido y sentido parcial fueron construidas con el intento de mejorar la frecuencia de restauración y obtener plantas que fueran restauradas a la fertilidad mediante la presencia de una copia única del gen restaurador. Por tanto, se diseñaron los cebadores que siguen diseñados con objeto de obtener por PCR diferentes fragmentos del gen de PR-Glucanasa:

5' TCTAGACCATGGCTGCTATCACACTCCTAGG 3' Extremo N-terminal

(1-31 bp en la Figura 5)

5' GGAACATGCAAGATGGTGGG 3'

PR1 (275-294 bp)

5' CCCTGTGATGGTGGATAAGAGC 3'

PR2 (520-499 bp)

5' GGCAGCATACACAGAATCCAGC 3'

PR3 (749-728 bp)

5' CCGCGGTCACCCAAAGTTGATATTATATTTGA 3' Extremo C-terminal

(1028-997 bp)

Cinco productos de la PCR fueron generados y clonados en el vector pGEM-T (Promega), formando los plásmidos pJSH1 a pJSH5. Los fragmentos de PR-Glucanasa fueron clonados después en la orientación sentido o antisentido detrás del promotor A9, según se describe en la figura 6, transferidos luego en el vector binario pSCV Nos-Hyg (este vector binario es un derivado del pSCV1 (Firek *et al.*, *Plant Molecular biology*, 22:129-142 (1993)) que contiene un promotor nos que induce un gen de resistencia a la higromicina, clonado entre los sitios *Eco*RV y *Eco*RI del pSCV1).

Las construcciones de orientación antisentido y sentido parcial fueron usadas luego para transformar una línea de tabaco de PR-Glucanasa androestéril, y se determinó el nivel de expresión de PR-Glucanasa en las anteras usando un anticuerpo inducido contra un gen de la $\beta(1,3)$ glucanasa ácida del tomate. Los resultados indicados en la figura 6 sugieren que la mayor parte de los genes restauradores son capaces de regular en descenso la expresión de PR-Glucanasa, siendo el más eficaz el pJSH1A-SCV con 15% de las plantas retransformadas careciendo de PR-Glucanasa detectable. Estas plantas restauradas exhibían androfertilidad normal o casi normal. El análisis de la progenie de plantas restauradas que contenían una copia única del gen restaurador mostró que la restauración se había segregado con el gen restaurador (Figura 7) y que el gen de restauración era eficaz para regular en descenso la expresión de PR-Glucanasa cuando era transferido en una línea diferente de A9-PR-Glucanasa, es decir, demuestran que la regulación en descenso por el restaurador era debida solamente al gen restaurador, llevando solamente un segregante el gen restaurador que estaba cruzado en una línea de A9-PR-Glucanasa diferente. De nuevo, el gen restaurador era eficaz para la regulación en descenso de la expresión de PR-Glucanasa.

Ejemplo 4

Restauración de la androfertilidad en plantas de tomate que contienen el gen de A9-PR-Glucanasa usando antisentido dirigido contra PR-Glucanasa

El gen restaurador antisentido de A9 más eficaz, identificado, que procede de pJSH1A, fue transferido en una versión modificada del vector binario pGA492 para usar en la transformación de tomate. Este vector binario, pBIOS222, está diseñado de modo que el gen marcador seleccionable (pnos-*nptII*) puede ser separado después de la transformación. El gen pnos-*nptII* es clonado como un elemento Ds en pGA492 de modo que cuando es cruzado en una planta que expresa transposasa Ac, una proporción de la progenie carece del elemento Ds :: pnos *nptII* pero retienen el gen restaurador. La línea de tomate de Ac transposasa es construida por transformación de tomates con pBIOS144 (Figura 8 A) Éste es un derivado de pBI 35Ac (Finnegan *et al.*, *Plant Molecular Biology*, 22:625-633 (1993)). El gen de A9-PR-Glucanasa antisentido fue escindido desde el pJSH1A como un fragmento *XhoI*, *BglIII* y clonado entre los sitios *XhoI* y *BglIII* de pBIOS22 formando el pBIOS 244 (Figura 8b).

Plantas de tomate fueron transformadas con el pBIOS244 y luego cruzadas con plantas de tomate que expresan transposasa Ac. Estas plantas fueron cruzadas con tipo salvaje. Las plantas de la progenie de este cruce, que contenían el gen de A9-PR-glucanasa antisentido pero que carecían del elemento Ds::*nptII* y transposasa, fueron multiplicadas hasta homocigosis y cruzadas con plantas de tomate de A9-PR-Glucanasa androestériles. La progenie híbrida de este cruce es androfértil al 100%.

Ejemplo 5

Restauración de la androfertilidad a plantas de tomate que contienen el gen de A9-PR-Glucanasa usando sentido parcial dirigido contra PR-Glucanasa

Un gen restaurador eficaz, de sentido parcial, de A9, procedente de pJSH5S fue transferido en el vector binario pBIOS222 para usar en la transformación de tomate. El gen de A9-PR-Glucanasa de sentido parcial, fue escindido desde el pJSH5S como un fragmento *XhoI*, *BglIII* y clonado entre los sitios *XhoI* y *BglIII* de pBIOS222 formando el pBIOS222/5S (Figura 8c).

Plantas de tomate fueron transformadas con el pBIOS222(5S y cruzadas luego con plantas de tomate de BIOS144 que expresan transposasa Ac. Estas plantas fueron cruzadas con tipo salvaje. Las plantas de la progenie de este cruce, que contenían el gen de A9-PR-glucanasa sentido parcial pero que carecían del elemento Ds::*nptII* y transposasa, fueron multiplicados hasta homocigosis y cruzados con plantas de tomate de A9-PR-Glucanasa androestériles. La progenie híbrida de este cruce es androfértil al 100%.

Ejemplo 6

Evaluación de un gen de restauración de androfertilidad en el tabaco; gen quimérico de promotor A9 anti PR-Glucanasa ribozima multimérica

Una ribozima multimérica (Figura 9), que consistía en 4 ribozimas estándar de pez martillo, cada una de las cuales tenía brazos de flaqueo de 10 bases, fue diseñada específicamente para escindir el mRNA de PR-Glucanasa en 4 sitios diana diferentes (Figura 5). El gen de ribozima multimérica fue construido del modo siguiente:

Oligonucleótidos que se solapan fueron sometidos a hibridación de extremos complementarios unos con otros y extendidos mediante Sequenase (United States Biochemical). Las bases contiguas fueron ligadas con T4-DNA ligasa. El producto final fue amplificado luego mediante PCR desde la mezcla de ligación y clonado como un fragmento *EcoRI*, *BamHI* de 198 bp. en pBluescript (SK+) digerido con *EcoRI* y *BamHI*.

El análisis de la secuencia reveló una delección de un resto de adenosina en la posición 15 de la secuencia catalítica de la ribozima 4, evitando la actividad *in vitro* de esta unidad de ribozima (Figura 10). Experimentos de escisión *in vitro* muestran, sin embargo, que las otras tres unidades de ribozima de esta ribozima multimérica pueden cortar el mensaje de la PR-Glucanasa a 22°C (Figura 10).

La ribozima multimérica de 198 bp fue clonada como un fragmento *EcoRI* (hecho romo), *BamHI* entre los sitios *XbaI* (hecho romo), *BamHI* de p1415 (éste es un derivado del pWP91 descrito en el documento WO-A-92/11379), en el que un engarce *HindIII* de 8 bp ha sido insertado en el sitio *EcoRV*). El gen de ribozima multimérica inducido por el promotor A9, que resulta, fue clonado luego como un fragmento *HindIII* en el sitio *HindIII* del vector binario pGA-3-HyB formando el p3039 (Figura 11 a). El pGA-3-HyB contiene un gen de resistencia a higromicina-35SCaMV clonado entre los sitios *SstI* y *EcoRI* del pGA492.

El p3039 fue transformado después en una línea de tabaco androestéril de A9-PR-Glucanasa. La presencia de proteína de PR-Glucanasa en las anteras se determinó mediante análisis de transferencia Western y se verificó la androfertilidad de los transformantes. 5 plantas de 38 transformantes manifestaban androfertilidad mejorada y carecían

ES 2 308 786 T3

de la proteína de PR-Glucanasa. El análisis de la progenie mostró que las plantas que contenían ambos genes, el gen de A9-PR-Glucanasa y el gen de A9-ribozima multimérica, carecían de la proteína de PR-Glucanasa (Figura 12).

5 Ejemplo 7

Restauración de la androfertilidad a plantas de tomate que contienen el gen de A9-PR-Glucanasa usando una ribozima multimérica dirigida contra PR-Glucanasa

10 El gen de A9-ribozima multimérica del p3039 fue escindido como un fragmento *HindIII* y clonado en el sitio *HindIII* del pBIOS222 formando el pBIOS246 (Figura 11b). Plantas de tomate fueron transformadas con el pBIOS246 y cruzadas luego con plantas de tomate que expresan transposasa. Estas plantas fueron cruzadas con tipo salvaje. La progenie de este cruce, que contenía el gen de A9-ribozima multimérica pero que carecía del elemento *Da::nptII* y transposasa Ac, fue multiplicada hasta homocigosis y cruzada con plantas de A9-PR-Glucanasa androestériles. La
15 progenie híbrida de este cruce es androfértil al 100%.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. El uso de una secuencia de DNA que comprende una secuencia codificante que codifica una enzima $\beta(1,3)$ glucanasa ligada operablemente a un promotor, u otra secuencia reguladora, que proporciona expresión de la secuencia de DNA en el tapetum y/o en células microesporógenas antes de la expresión de callasa, para la preparación de una planta de tomate transgénica androestéril.
2. El uso según la reivindicación 1, en el que la secuencia de DNA está ligada operablemente a un promotor específico de tapetum.
3. El uso según la reivindicación 2, en el que el promotor específico de tapetum es un promotor A3 ó A9.
4. El uso según la reivindicación 3, en el que el promotor específico de tapetum es un promotor A9.
5. El uso según la reivindicación 3 ó la reivindicación 4, en el que el promotor A3 ó A9 es el promotor completo.
6. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que el promotor A3 ó A9 está derivado de *Brassicaceae*.
7. El uso según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el promotor, u otra secuencia reguladora, comprende una o más secuencias de control, temporal y/o tisular, derivadas desde un promotor específico de tapetum.
8. El uso según la reivindicación 7, en el que las secuencias de control, temporal y/o tisular, están derivadas desde un promotor A3 ó A9.
9. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la secuencia de DNA que codifica la $\beta(1,3)$ glucanasa es como se muestra en la Figura 5.
10. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha secuencia de DNA es parte de un vector.
11. El uso de una secuencia de DNA que es complementaria o al menos parte, de una secuencia de DNA que codifica una enzima $\beta(1,3)$ glucanasa, para restaurar la androfertilidad de una planta de tomate, en el que dicha planta de tomate comprende la secuencia de DNA que codifica una enzima $\beta(1,3)$ -glucanasa que está ligada operablemente a un promotor, u otra secuencia reguladora, que proporciona expresión de la secuencia de DNA en el tapetum y/o en células microesporógenas antes de la expresión de callasa.
12. El uso según la reivindicación 11, en el que la secuencia complementaria de DNA está ligada operablemente a un promotor, u otra secuencia reguladora, que proporciona expresión de la secuencia de DNA complementaria en el tapetum y/o en células microesporógenas antes de la expresión de callasa.
13. El uso según la reivindicación 12, en el que el promotor es un promotor específico de tapetum.
14. El uso según la reivindicación 13, en el que el promotor específico de tapetum es un promotor A3 ó A9.
15. El uso según la reivindicación 14, en el que el promotor específico de tapetum es un promotor A9.
16. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en el que la secuencia de DNA complementaria es complementaria de al menos una parte de la secuencia indicada en la Figura 5.
17. El uso de una secuencia de DNA que codifica una ribozima capaz de escisión específica de RNA codificado por una secuencia de DNA que codifica una enzima $\beta(1,3)$ glucanasa, para restaurar la androfertilidad en una planta de tomate, en el que dicha planta de tomate comprende la secuencia de DNA que codifica una enzima $\beta(1,3)$ glucanasa que está ligada operablemente a un promotor, u otra secuencia reguladora, que proporciona expresión de la secuencia de DNA en el tapetum y/o en células microesporógenas antes de la expresión de callasa.
18. El uso según la reivindicación 17, en el que la secuencia de DNA que codifica la ribozima, está ligada operablemente a un promotor, u otra secuencia reguladora, que proporciona expresión de la secuencia de DNA que codifica ribozima, en el tapetum y/o en células microesporógenas antes de la expresión de callasa.
19. El uso según la reivindicación 18, modificado por una cualquiera o más de las características de las reivindicaciones 13 a 15.
20. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en el que la secuencia de DNA que codifica la ribozima posee la secuencia indicada en la Figura 9.

ES 2 308 786 T3

21. Una planta de tomate transgénica, androestéril, que tiene incorporada en al menos el tapetum y/o en células microesporógenas, una secuencia de DNA transgénica que comprende una secuencia codificante que codifica una enzima $\beta(1,3)$ glucanasa ligada operablemente a un promotor, u otra secuencia reguladora, que proporciona expresión de la secuencia de DNA en el tapetum y/o en células microesporógenas antes de la expresión de callasa.

22. Una planta de tomate transgénica, androfértil, que tiene incorporada en el menos el tapetum y/o en células microesporógenas:

i. una secuencia de DNA transgénica que comprende una secuencia codificante que codifica una enzima $\beta(1,3)$ glucanasa ligada operablemente a un promotor, u otra secuencia reguladora, que proporciona expresión de la secuencia de DNA en el tapetum y/o en células microesporógenas antes de la expresión de callasa;

y que comprende, además:

ii. una secuencia de DNA transgénica que es complementaria de una parte al menos de la secuencia de DNA definida en (i), ligada operablemente a un promotor, u otra secuencia reguladora, que proporciona expresión de la secuencia de DNA complementaria en el tapetum y/o en células microesporógenas antes de la expresión de callasa; o

iii. una secuencia de DNA que codifica una ribozima capaz de escisión específica de RNA codificado por la secuencia de DNA definida en (i), ligada operablemente a un promotor, u otra secuencia reguladora, que proporciona expresión de la secuencia de DNA que codifica la ribozima, en el tapetum y/o en células microesporógenas antes de la expresión de callasa.

23. Una células de una planta de tomate que incluye una secuencia de DNA transgénica que comprende una secuencia codificante que codifica una enzima $\beta(1,3)$ glucanasa ligada operablemente a un promotor, u otra secuencia reguladora, que proporciona expresión de la secuencia de DNA en el tapetum y/o en células microesporógenas antes de la expresión de callasa.

24. Una células de una planta de tomate que incluye:

i. una secuencia de DNA transgénica que comprende una secuencia codificante que codifica una enzima $\beta(1,3)$ glucanasa ligada operablemente a un promotor, u otra secuencia reguladora, que proporciona expresión de la secuencia de DNA en el tapetum y/o en células microesporógenas antes de la expresión de callasa;

y que comprende, además:

ii. una secuencia de DNA transgénica que es complementaria de una parte al menos de la secuencia de DNA definida en (i), ligada operablemente a un promotor, u otra secuencia reguladora, que proporciona expresión de la secuencia de DNA complementaria, en el tapetum y/o en células microesporógenas antes de la expresión de callasa; o

iii. una secuencia de DNA que codifica una ribozima capaz de escisión específica de RNA codificado por la secuencia de DNA definida en (i), ligada operablemente a un promotor, u otra secuencia reguladora, que proporciona expresión de la secuencia de DNA que codifica la ribozima, en el tapetum y/o en células microesporógenas antes de la expresión de callasa.

25. Material de propagación derivado desde una planta de tomate transgénica, androestéril, según la reivindicación 21, en el que el material de propagación incluye una secuencia de DNA transgénica que comprende una secuencia codificante que codifica una enzima $\beta(1,3)$ glucanasa ligada operablemente a un promotor, u otra secuencia reguladora, que proporciona expresión de la secuencia de DNA en el tapetum y/o en células microesporógenas antes de la expresión de callasa.

26. Material de propagación derivado desde una planta de tomate transgénica, androfértil, según la reivindicación 22, en el que el material de propagación incluye:

i. una secuencia de DNA transgénica que comprende una secuencia codificante que codifica una enzima $\beta(1,3)$ glucanasa ligada operablemente a un promotor, u otra secuencia reguladora, que proporciona expresión de la secuencia de DNA en el tapetum y/o en células microesporógenas antes de la expresión de callasa;

y que comprende, además:

ii. una secuencia de DNA transgénica que es complementaria de una parte al menos de la secuencia de DNA definida en (i), ligada operablemente a un promotor, u otra secuencia reguladora, que proporciona expresión de la secuencia de DNA complementaria en el tapetum y/o en células microesporógenas antes de la expresión de callasa; o

iii. una secuencia de DNA que codifica una ribozima capaz de escisión específica de RNA codificado por la secuencia de DNA definida en (i), ligada operablemente a un promotor, u otra secuencia reguladora, que proporciona expresión de la secuencia de DNA que codifica la ribozima, en el tapetum y/o en células microesporógenas antes de la expresión de callasa.

ES 2 308 786 T3

27. Semillas obtenibles desde una planta de tomate transgénica, androestéril, según la reivindicación 21, en donde las semillas incluyen una secuencia de DNA transgénica que comprende una secuencia codificante que codifica una enzima $\beta(1,3)$ glucanasa ligada operablemente a un promotor, u otra secuencia reguladora, que proporciona expresión de la secuencia de DNA en el tapetum y/o en células microesporógenas antes de la expresión de callasa.

28. Semillas obtenibles desde una planta de tomate transgénica, androfértil, según la reivindicación 22, en donde las semillas incluyen:

i. una secuencia de DNA transgénica que comprende una secuencia codificante que codifica una enzima $\beta(1,3)$ glucanasa ligada operablemente a un promotor, u otra secuencia reguladora, que proporciona expresión de la secuencia de DNA en el tapetum y/o en células microesporógenas antes de la expresión de callasa;

y que comprende, además:

ii. una secuencia de DNA transgénica que es complementaria de una parte al menos de la secuencia de DNA definida en (i), ligada operablemente a un promotor, u otra secuencia reguladora, que proporciona expresión de la secuencia de DNA complementaria, en el tapetum y/o en células microesporógenas antes de la expresión de callasa; o

iii. una secuencia de DNA que codifica una ribozima capaz de escisión específica de RNA codificado por la secuencia de DNA definida en (i), ligada operablemente a un promotor, u otra secuencia reguladora, que proporciona expresión de la secuencia de DNA que codifica la ribozima, en el tapetum y/o en células microesporógenas antes de la expresión de callasa.

29. Un método para restaurar la androfertilidad de una planta de tomate androestéril, que comprende:

(i) producir una planta de tomate transgénica según se define en la reivindicación 22; y

(ii) cruzar la planta de tomate transgénica producida en la etapa (i) con una planta de tomate transgénica según se define en la reivindicación 21.

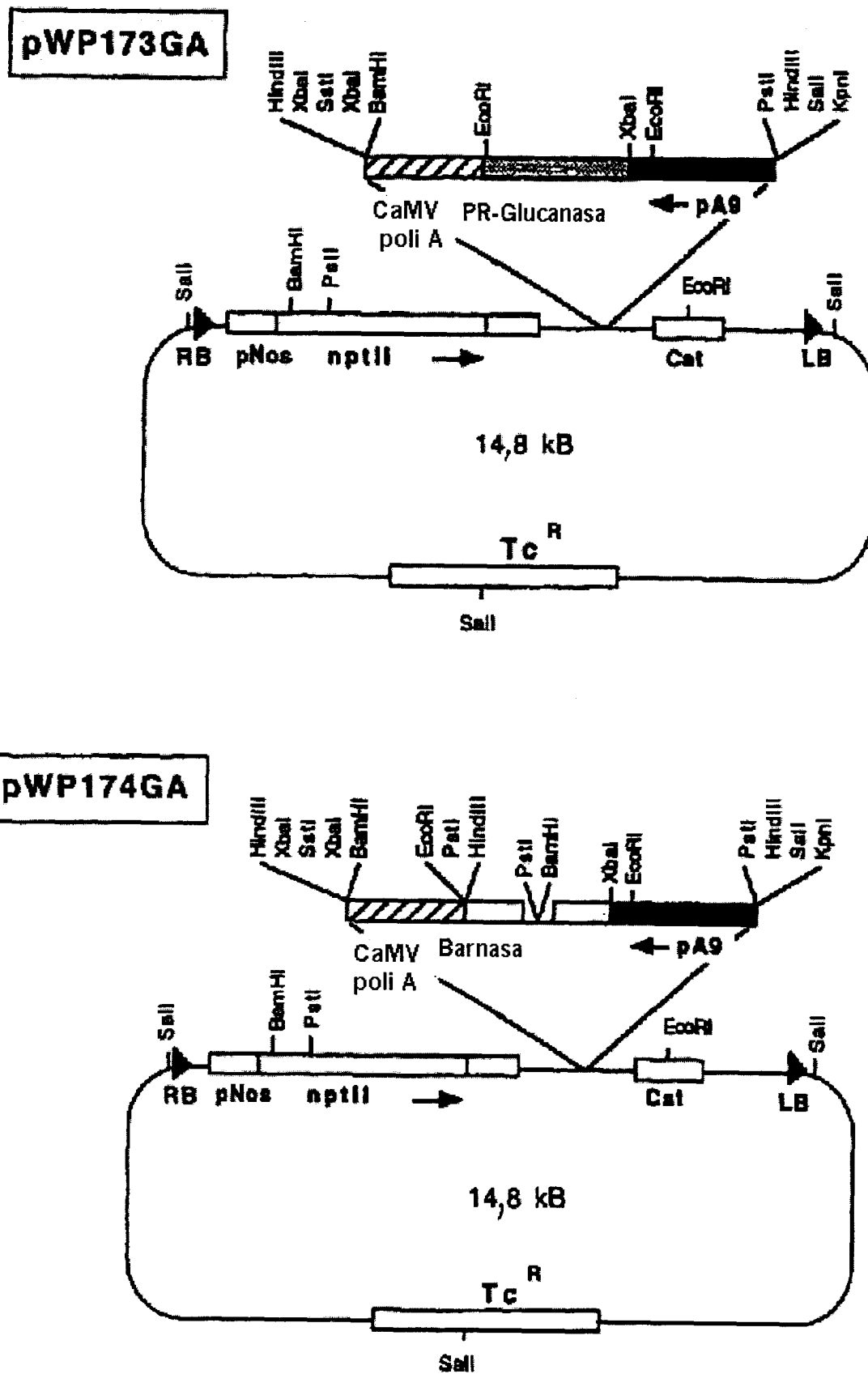


FIG. 1

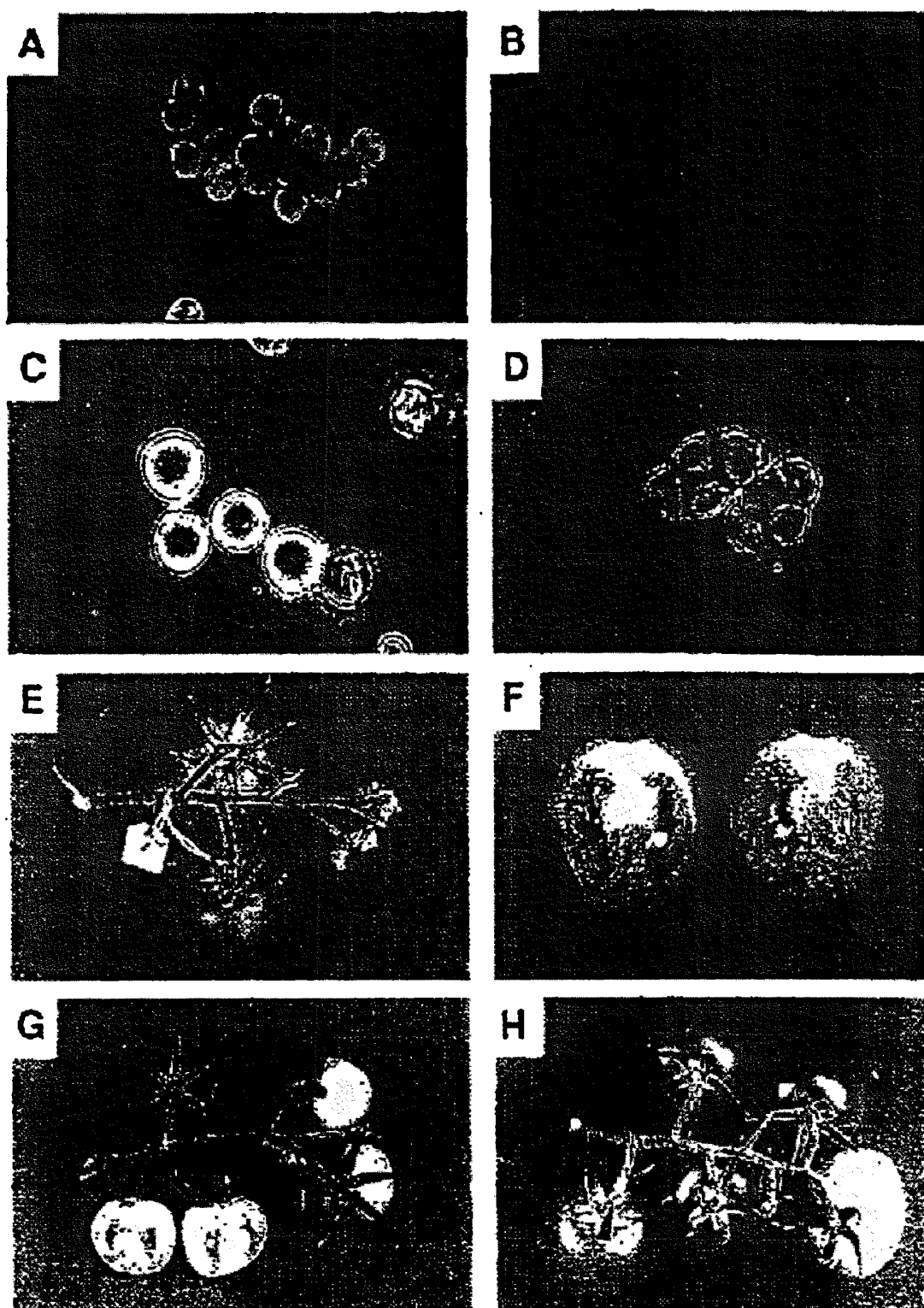


FIG. 2

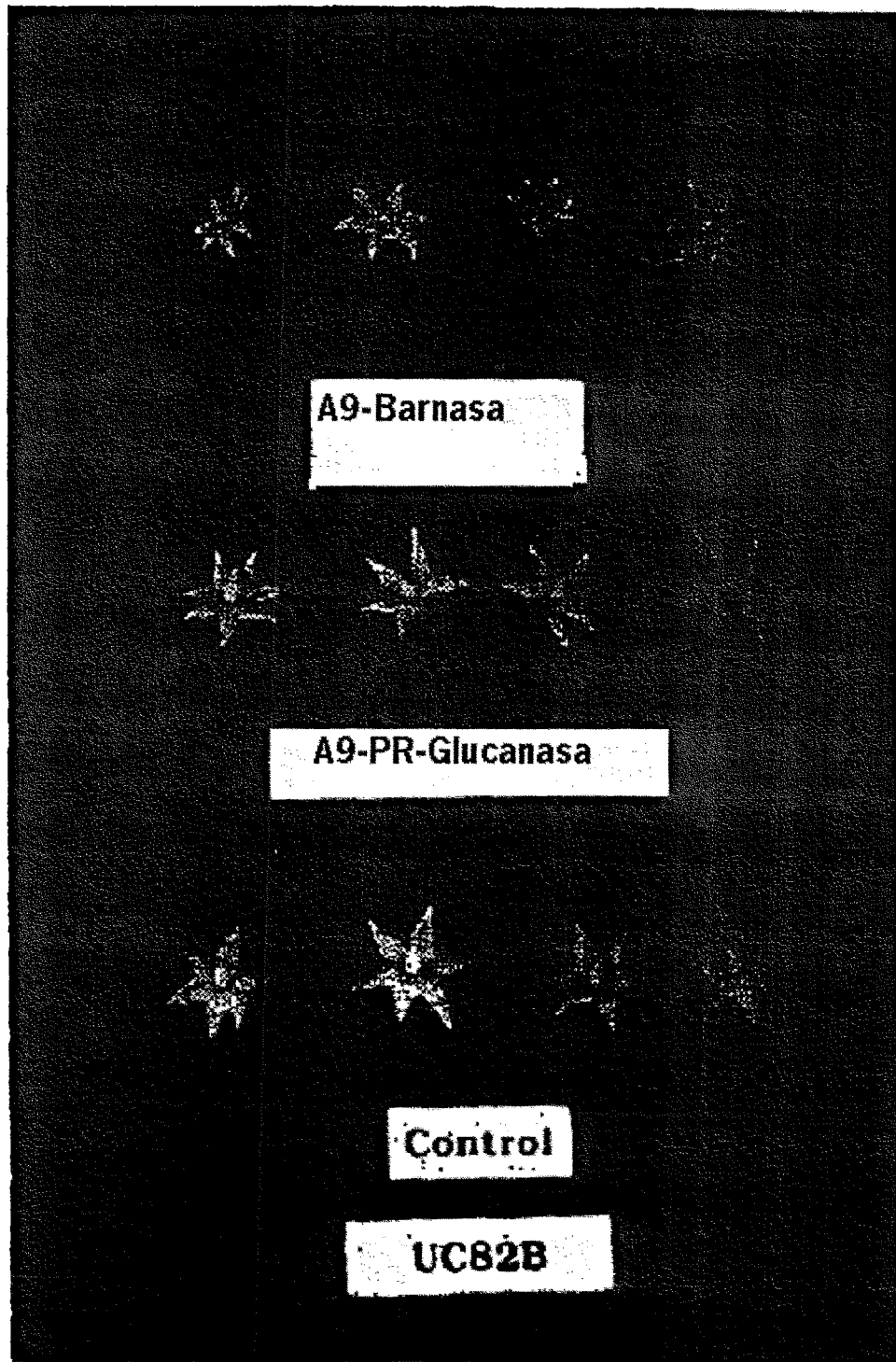


FIG. 3

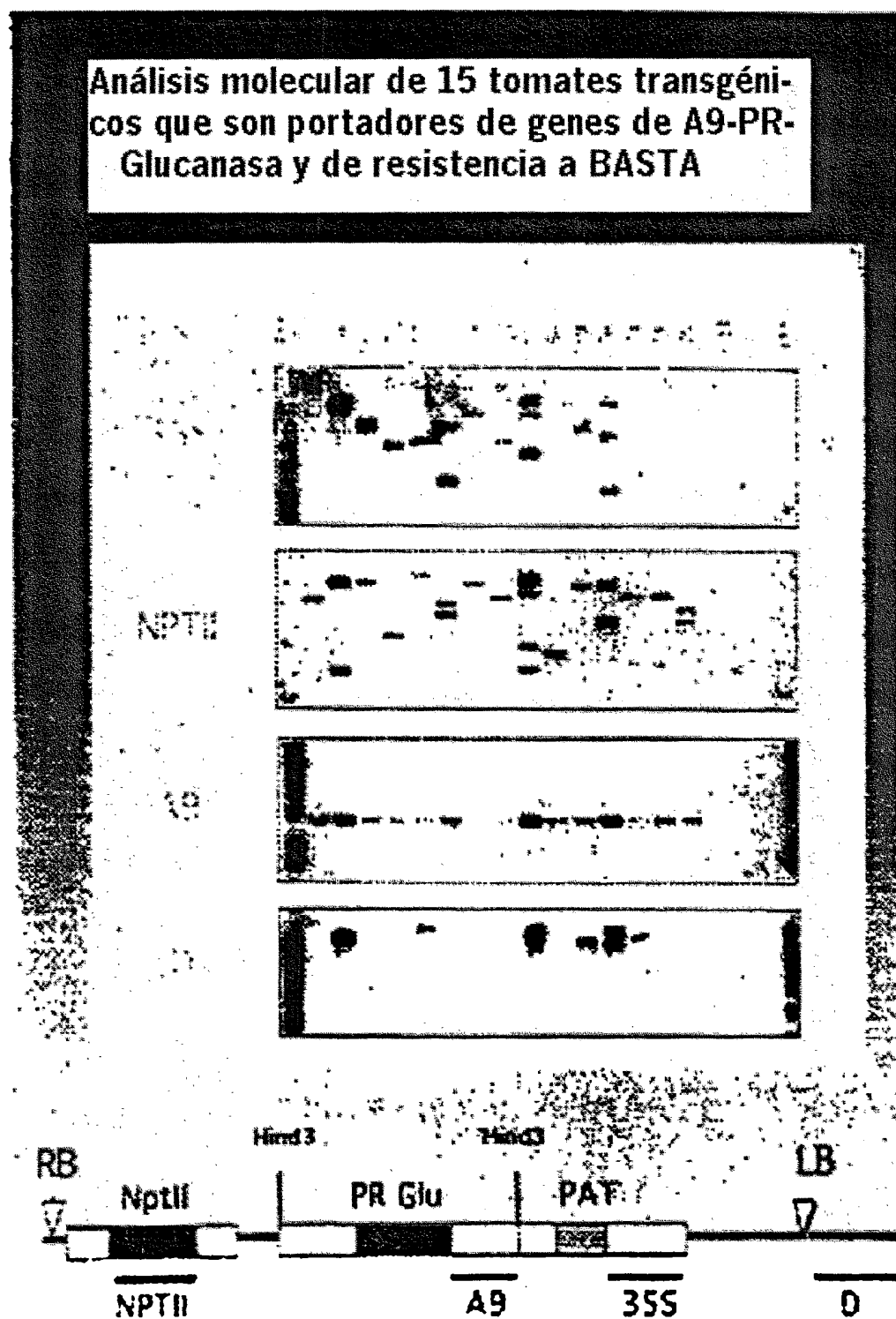


FIG. 4

ES 2 308 786 T3

M A A I T L L G L L L V A S S I D	
TCTAGACCATGGCTGCTATCACACTCCTAGGATTACTACTTGTGGCCAGCAGCATTGACA	60
I A G A Q S I G V C Y G H L G N N L P N	
TACGAGGGGCTCAATCGATAGGTGTTTGCTATGGAATGCTAGGCAACAACCTGCCAAATC	120
H W E V I Q L Y K S R N I G R L R L Y D	
ATTGCGAAGTTATACAGCTCTACAACTCAAGAAACATAGGAAGACTGAGGCTTTATCATC	180
sitio 1	
P N H G A L Q A L K G S N I E V H L G L	
CAATCATGAGCCTTTACAAGCATTAAAAGGCTCAAATATTGAAGTTATGTTAGGAETTC	240
P N S D V K H I A S G M E H A R W W V Q	
CCATTTCAGATGTGANGCACATTGCTTCGGAAATGGAACATGCAAGATGGTGGGTACAGA	300
K N V K D F W P D V K I K Y I A V G N E	
AAATGTTAAGATTCTCTGGCCAGATGTTAAGATTAAATATATTGCTGTTGGCAATGAAA	360
I S P V T G T S Y L T S F L T P A M V N	
TCAGCCCTGTCACTGGCACATCTTACCTAACCTCAATTTCTTACTCTCTGCTATGGTAAATA	420
sitio 2	sitio 3
I Y K A I G E A G L G N N I K V S T S V	
TTTACAAGCAATTGGTGAAGCTGGTTTGGGAAACAACATCAAGGTCTCAACTTCTOTAG	480
D M T L I G S S Y P P S Q G S F R N D A	
ACATGACCTTGATTGGAAGCTCTTATCCACCATCACAGGGTTOGTTTAGGAACGATGCTA	540
R W F V D P I V G F L R D T R A P L L V	
GGTGGTTTGTGATCCCATTGTTGGCTTCTTAAGGCACACACGTGCACCTTTACTCGTTA	600
N I Y P Y P S Y S Q N P G Q I S L P Y S	
ACATTTACCCCTATTTCACTTATTCTGGTAATCCAGGCCAGATTCTCTCCCTATTCTC	660
L F T A P N V V V Q D G S R Q Y R N L F	
TTTTTACAGCACCAAATGTGGTGGTACAAGATGGTTCCCGCCAATATAGGAACCTTATTG	720
D A M L D S V Y A A L E R S G C A S V G	
ATGCAATGCTGGATTCTGTGTATGCTGCCCTGAGGGGATCAGGAGGGGCATCTGTAGGGA	780
I V V S E S G W P S A G A F G A T Y D N	
TTGTTGCTGTCGAGAGTGGCTGGCCATCTGCTGGTGCATTGGAAGCCACATATGACAATG	840
sitio 4	
A A T Y L R N L V Q H A K E G S P R K P	
CAGCAACTTACTTGAGGAACCTTAGTTCAACACGCTAAAGAGGGTAGCCCAAGAAAGCCTG	900
G P I E T Y I F A M F D E N N K N P E L	
GACCTATTGAGACCTATATATTTGCCATGTTTGATGAGAACAACAAGAACCCCTGAACCTG	960
E K H F G L F S P N K Q L K Y N I N F G	
AGAAACATTTGGATTGTTTTCCCGCAACACAGCTCAAATATAATATCAACTTTGGGT	1020

GACCGGG

1028

FIG. 5

Proporción de transformantes antisentido y sentido parcial que carecen de proteína de PR-glucanasa detectable

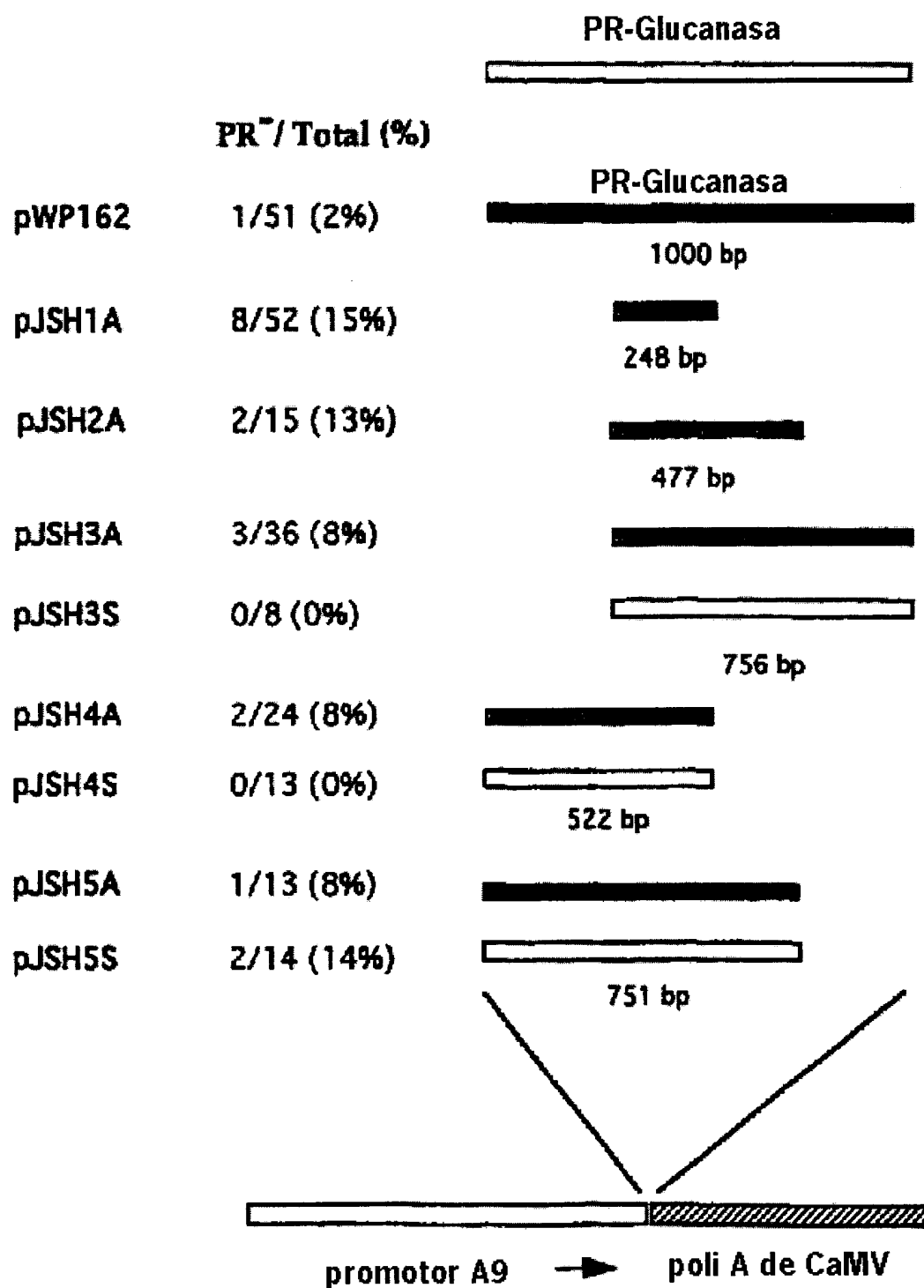


FIG. 6

Segregación de restauración en la
progenie T2 de líneas antisentido

Progenie nº 13 JSH1A A9-Antisentido

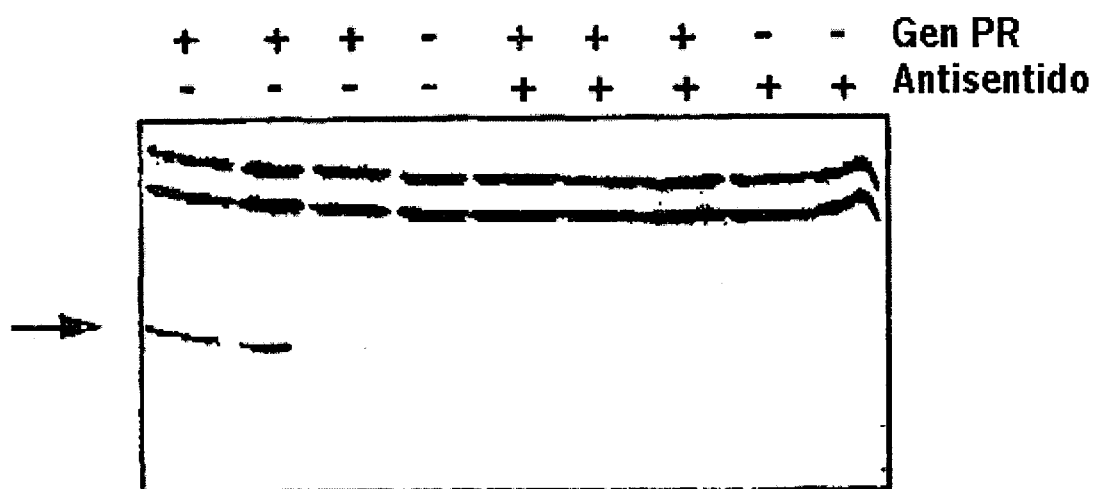
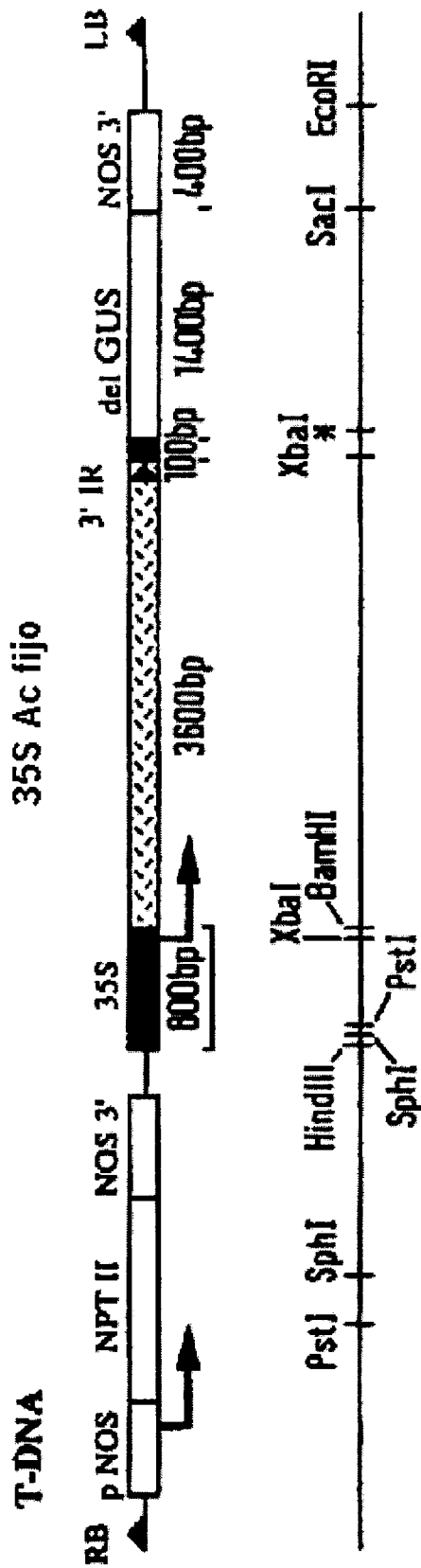


FIG. 7

FIG. 8A
pBIOS 144

Digestión pBI 35S Ac con BamH I y EcoR V
Elución del fragmento de 3,7 Kb
Digestión pBI 121 con BamH I y SnaB I
Clonación del fragmento de 3,7 Kb en
pBI 121



* = SITIO NO ESCINDIBLE QUE RESULTA DE LA
LIGACIÓN DE EcoRV A SnaBI

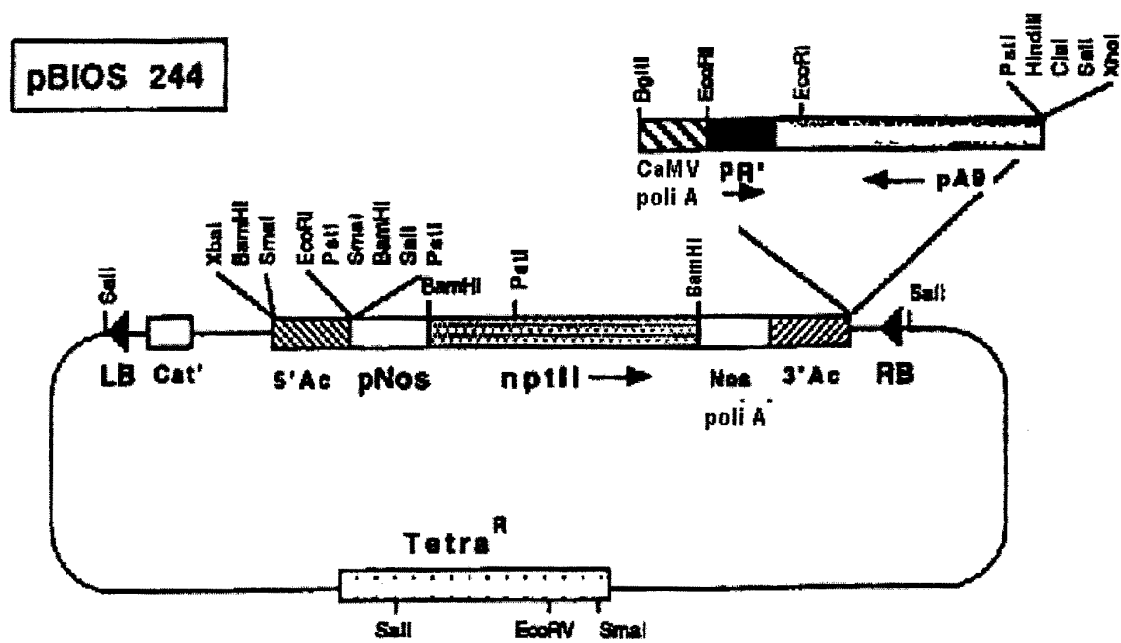


FIG. 8B

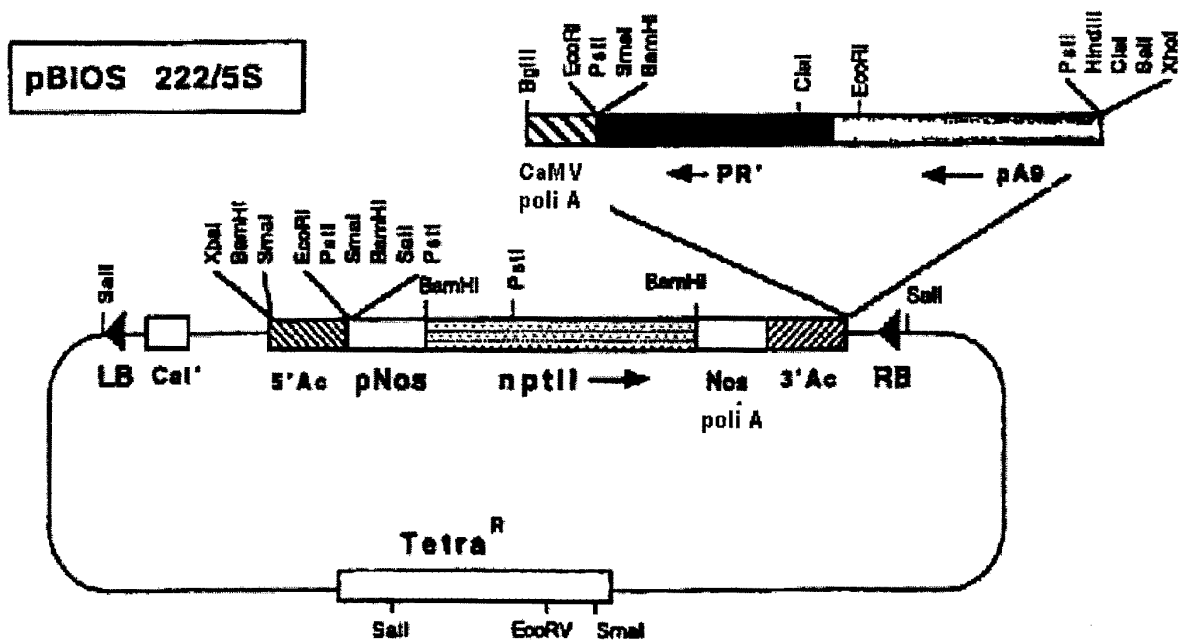


FIG. 8C

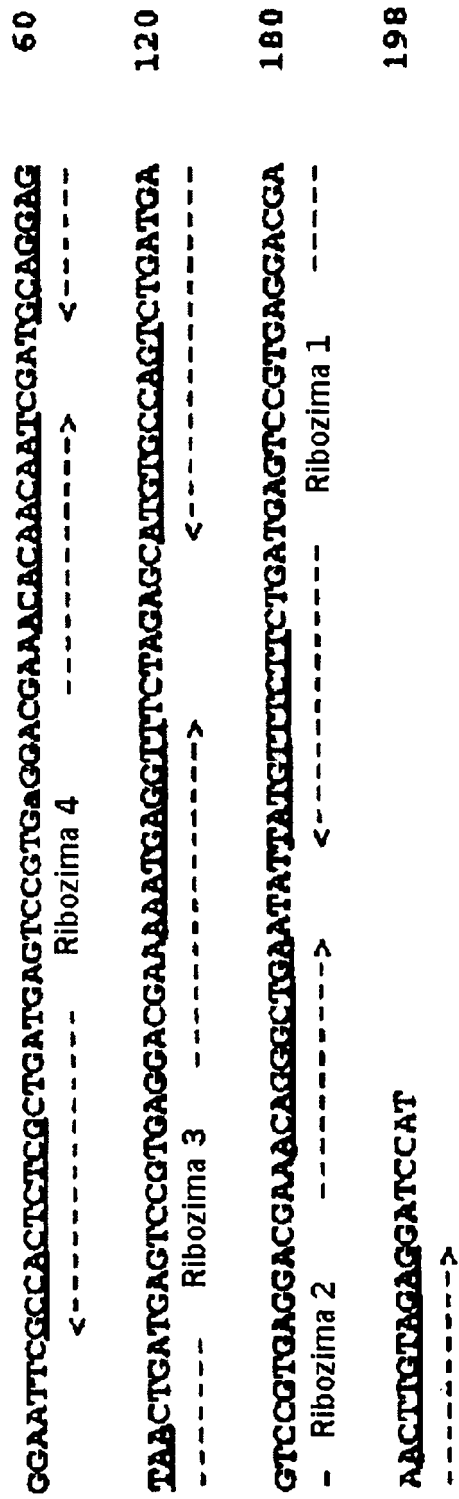


FIG. 9

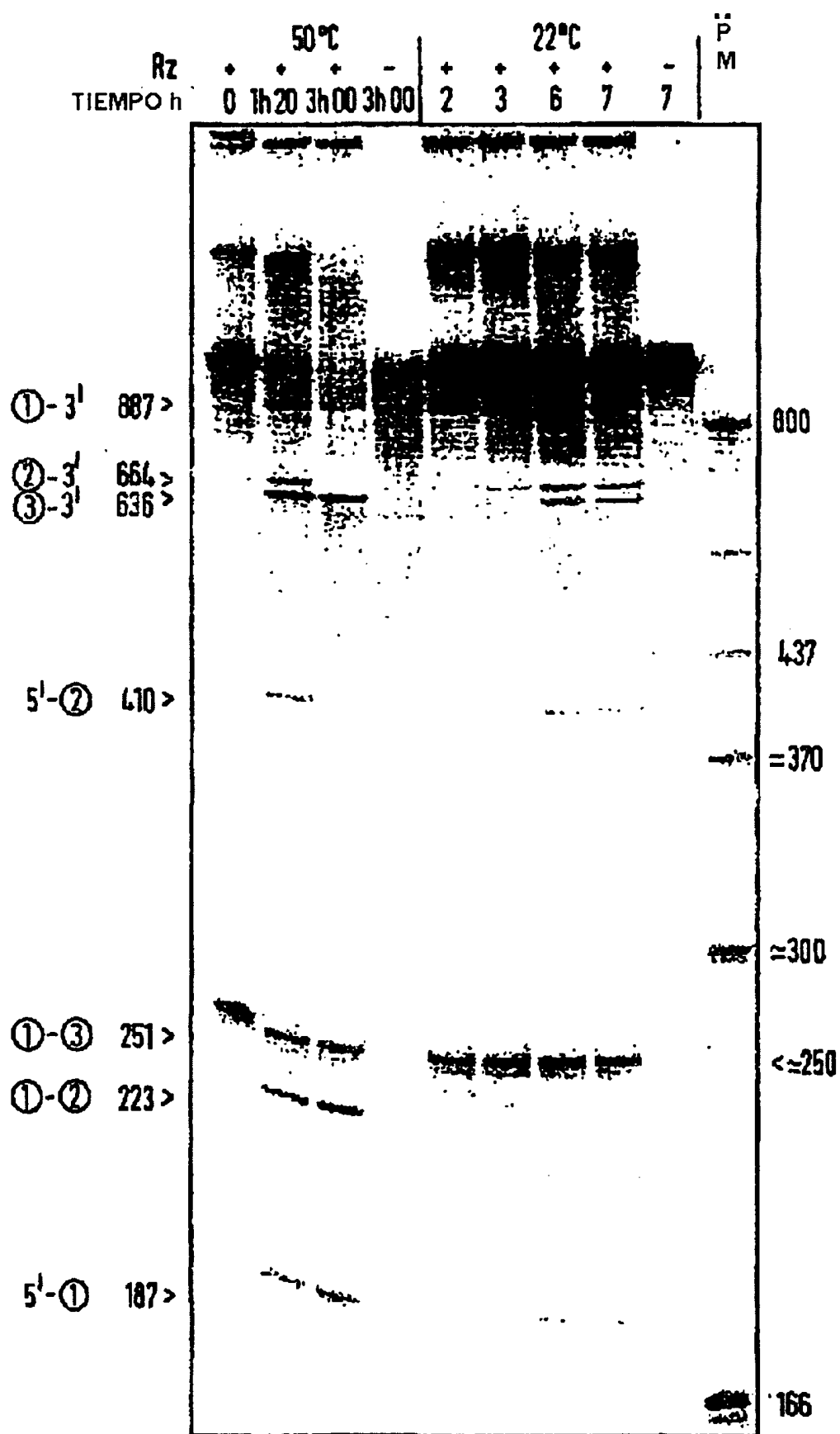


FIG. 10

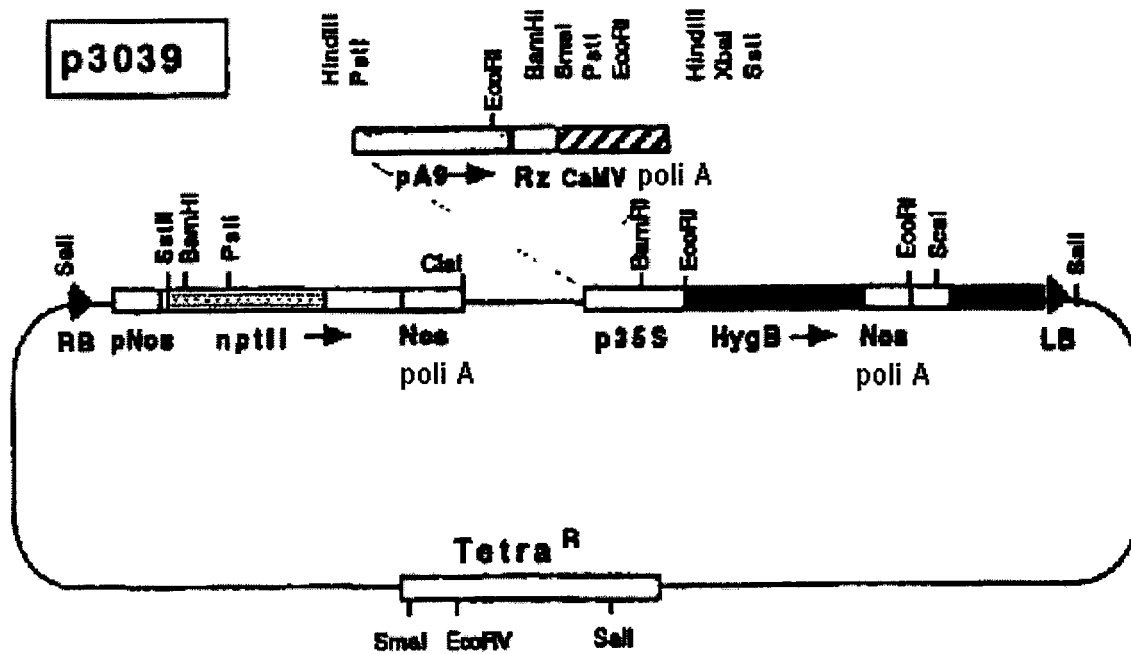


FIG. 11A

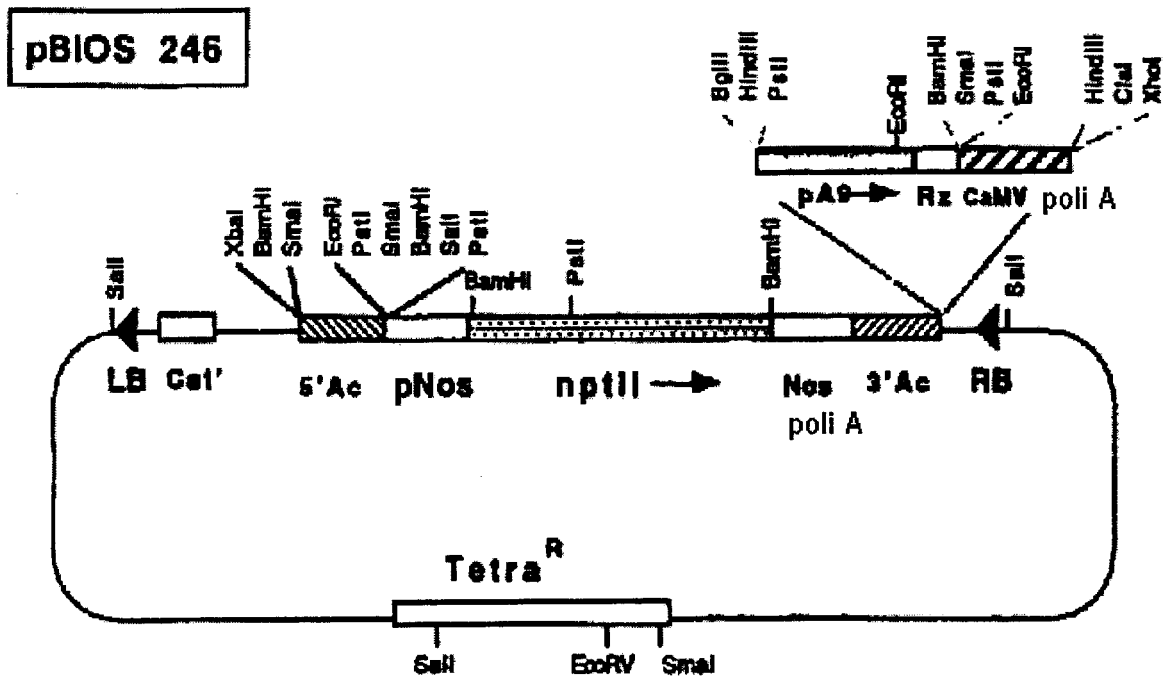


FIG. 11B

Segregación de restauración en la
progenie T2 de líneas de ribozima

Progenie línea F 3039 A9-ribozima

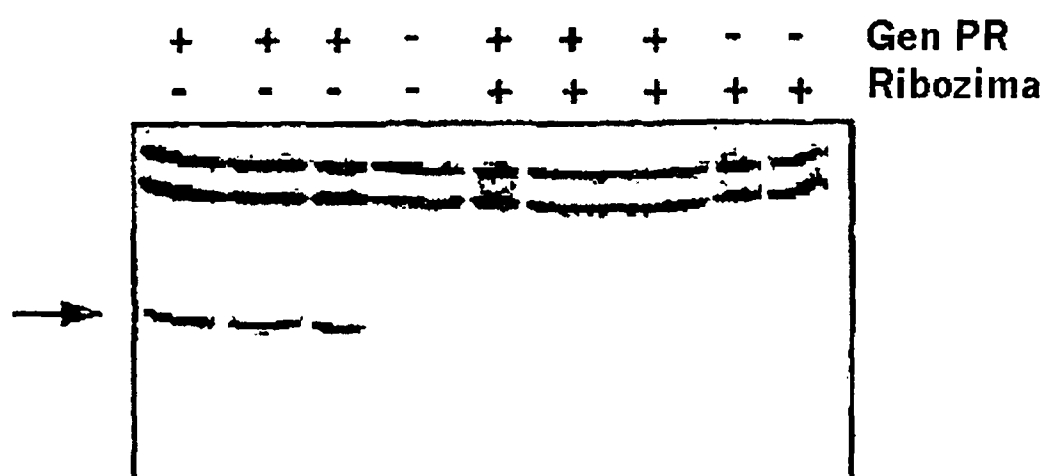


FIG. 12

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL

(ii) SOLICITANTE:

- (A) NOMBRE: Gene Shears Pty Limited
- (B) CALLE: Suite 1. Buiding 5, 105 Delhi Road
- (C) CIUDAD: North Ryde
- (D) ESTADO: NSW 2113
- (E) PAÍS: Australia
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): Ninguno
- (A) NOMBRE: SCOTT, Roderick John
- (B) CALLE: c/o University of Leicester, Biology Dept., University Road
- (C) CIUDAD: Leicester
- (D) ESTADO: Leicester
- (E) PAÍS: Reino Unido
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): LE1 7RH
- (A) NOMBRE: PAUL, Wyatt
- (B) CALLE: Nickerson Biocem Ltd, Cambridge Science Park, Milton Road
- (C) CIUDAD: Cambridge
- (D) ESTADO: Cambridge
- (E) PAÍS: Reino Unido
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): CB4 4GZ
- (A) NOMBRE: PEREZ, Pascual
- (B) CALLE: c/o Biocem, 24 Avenue Des Landais
- (C) CIUDAD: Aubiere
- (D) ESTADO: Aubiere
- (E) PAÍS: Francia
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 63170

(iii) TÍTULO DE LA INVENCION: Uso de Secuencias de DNA

(iv) NÚMERO DE SECUENCIAS: 8

(v) FORMA LEGIBLE POR UN ORDENADOR:

- (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
- (B) ORDENADOR: compatible con PC IBM
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión #1.30 (EPO)

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

NÚMERO DE SOLICITUD: WO PCT/GB 97/00992

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA SECUENCIA CON ID N° 1:

(ii) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 31 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: única

ES 2 308 786 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(iii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SECUENCIA CON ID N° 1

TCTAGACCAT GGCTGCTATC AACTCCTAG G

31

10

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA SECUENCIA ID N° 2:

15

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

20

(C) TIPO DE CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

25

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SECUENCIA CON ID N° 2

GGAACATGCA AGATGGTGGG

20

30

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA SECUENCIA CON ID N° 3:

35

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

40

(C) TIPO DE CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

45

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SECUENCIA CON ID N° 3

CCCTGTGATG GTGGATAAGA GC

22

50

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA SECUENCIA CON ID N° 4:

55

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

60

(C) TIPO DE CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(iv) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

65

ES 2 308 786 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SECUENCIA CON ID N° 4

5 GGCAGCATAC ACAGAATCCA GC 22

10 (2) INFORMACIÓN SOBRE LA SECUENCIA CON ID N° 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 32 pares de bases

15 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SECUENCIA CON ID N° 5

25 CCGCGGTCAC CCAAAGTTGA TATTATATT GA 32

30 (2) INFORMACIÓN SOBRE LA SECUENCIA CON ID N° 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1028 pares de bases

35 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CÓDIGO: CDS

45 (B) LOCALIZACIÓN: 9..1022

50

55

60

65

ES 2 308 786 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SECUENCIA CON ID N° 6

5	TCTAGACC ATG GCT GCT ATC ACA CTC CTA GGA TTA CTA CTT GTT GCC AGC Met Ala Ala Ile Thr Leu Leu Gly Leu Leu Leu Val Ala Ser 1 5 10	50
10	AGC ATT GAC ATA GCA GGG GCT CAA TCG ATA GGT GTT TGC TAT GGA ATG Ser Ile Asp Ile Ala Gly Ala Gln Ser Ile Gly Val Cys Tyr Gly Met 15 20 25 30	98
15	CTA GGC AAC AAC TTG CCA AAT CAT TGG GAA GTT ATA CAG CTC TAC AAG Leu Gly Asn Asn Leu Pro Asn His Trp Glu Val Ile Gln Leu Tyr Lys 35 40 45	146
20	TCA AGA AAC ATA GGA AGA CTG AGG CTT TAT GAT CCA AAT CAT GGA GCT Ser Arg Asn Ile Gly Arg Leu Arg Leu Tyr Asp Pro Asn His Gly Ala 50 55 60	194
25	TTA CAA GCA TTA AAA GGC TCA AAT ATT GAA GTT ATG TTA GGA CTT CCC Leu Gln Ala Leu Lys Gly Ser Asn Ile Glu Val Met Leu Gly Leu Pro 65 70 75	242
30	AAT TCA GAT GTG AAG CAC ATT GCT TCC GGA ATG GAA CAT GCA AGA TGG Asn Ser Asp Val Lys His Ile Ala Ser Gly Met Glu His Ala Arg Trp 80 85 90	290
35	TGG GTA CAG AAA AAT GTT AAA GAT TTC TGG CCA GAT GTT AAG ATT AAG Trp Val Gln Lys Asn Val Lys Asp Phe Trp Pro Asp Val Lys Ile Lys 95 100 105 110	338
40	TAT ATT GCT GTT GGG AAT GAA ATC AGC CCT GTC ACT GGC ACA TCT TAC Tyr Ile Ala Val Gly Asn Glu Ile Ser Pro Val Thr Gly Thr Ser Tyr 115 120 125	386
45	CTA ACC TCA TTT CTT ACT CCT GCT ATG GTA AAT ATT TAC AAA GCA ATT Leu Thr Ser Phe Leu Thr Pro Ala Met Val Asn Ile Tyr Lys Ala Ile 130 135 140	434
50	GGT GAA GCT GGT TTG GGA AAC AAC ATC AAG GTC TCA ACT TCT GTA GAC Gly Glu Ala Gly Leu Gly Asn Asn Ile Lys Val Ser Thr Ser Val Asp 145 150 155	482

ES 2 308 786 T3

5	ATG ACC TTG ATT GGA AGC TCT TAT CCA CCA TCA CAG GGT TCG TTT AGG Met Thr Leu Ile Gly Ser Ser Tyr Pro Pro Ser Gln Gly Ser Phe Arg 160 165 170	530
10	AAC GAT GCT AGG TGG TTT GTT GAT CCC ATT GTT GGC TTC TTA AGG GAC Asn Asp Ala Arg Trp Phe Val Asp Pro Ile Val Gly Phe Leu Arg Asp 175 180 185 190	578
15	ACA CGT GCA CCT TTA CTC GTT AAC ATT TAC CCC TAT TTC AGT TAT TCT Thr Arg Ala Pro Leu Leu Val Asn Ile Tyr Pro Tyr Phe Ser Tyr Ser 195 200 205	626
20	GGT AAT CCA GGC CAG ATT TCT CTC CCC TAT TCT CTT TTT ACA GCA CCA Gly Asn Pro Gly Gln Ile Ser Leu Pro Tyr Ser Leu Phe Thr Ala Pro 210 215 220	674
25	AAT GTG GTG GTA CAA GAT GGT TCC CGC CAA TAT AGG AAC TTA TTT GAT Asn Val Val Val Gln Asp Gly Ser Arg Gln Tyr Arg Asn Leu Phe Asp 225 230 235	722
30	GCA ATG CTG GAT TCT GTG TAT GCT GCC CTC GAG CGA TCA GGA GGG GCA Ala Met Leu Asp Ser Val Tyr Ala Ala Leu Glu Arg Ser Gly Gly Ala 240 245 250	770
35	TCT GTA GGG ATT GTT GTG TCC GAG AGT GGC TGG CCA TCT GCT GGT GCA Ser Val Gly Ile Val Val Ser Glu Ser Gly Trp Pro Ser Ala Gly Ala 255 260 265 270	818
40	TTT GGA GCC ACA TAT GAC AAT GCA GCA ACT TAC TTG AGG AAC TTA GTT Phe Gly Ala Thr Tyr Asp Asn Ala Ala Thr Tyr Leu Arg Asn Leu Val 275 280 285	866
45	CAA CAC GCT AAA GAG GGT AGC CCA AGA AAG CCT GGA CCT ATT GAG ACC Gln His Ala Lys Glu Gly Ser Pro Arg Lys Pro Gly Pro Ile Glu Thr 290 295 300	914
50	TAT ATA TTT GCC ATG TTT GAT GAG AAC AAC AAG AAC CCT GAA CTG GAG Tyr Ile Phe Ala Met Phe Asp Glu Asn Asn Lys Asn Pro Glu Leu Glu 305 310 315	962
55	AAA CAT TTT GGA TTG TTT TCC CCC AAC AAG CAG CTC AAA TAT AAT ATC Lys His Phe Gly Leu Phe Ser Pro Asn Lys Gln Leu Lys Tyr Asn Ile 320 325 330	1010
60	AAC TTT GGG TGA CCGCGG Asn Phe Gly 335	1028

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA SECUENCIA CON ID N° 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 338 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 308 786 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SECUENCIA CON ID N° 7

5	Met	Ala	Ala	Ile	Thr	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ser	Ser	Ile	
	1				5					10					15		
10	Asp	Ile	Ala	Gly	Ala	Gln	Ser	Ile	Gly	Val	Cys	Tyr	Gly	Met	Leu	Gly	
				20					25					30			
15	Asn	Asn	Leu	Pro	Asn	His	Trp	Glu	Val	Ile	Gln	Leu	Tyr	Lys	Ser	Arg	
			35					40					45				
	Asn	Ile	Gly	Arg	Leu	Arg	Leu	Tyr	Asp	Pro	Asn	His	Gly	Ala	Leu	Gln	
		50					55					60					
20	Ala	Leu	Lys	Gly	Ser	Asn	Ile	Glu	Val	Met	Leu	Gly	Leu	Pro	Asn	Ser	
	65					70				75					80		
25	Asp	Val	Lys	His	Ile	Ala	Ser	Gly	Met	Glu	His	Ala	Arg	Trp	Trp	Val	
				85					90					95			
	Gln	Lys	Asn	Val	Lys	Asp	Phe	Trp	Pro	Asp	Val	Lys	Ile	Lys	Tyr	Ile	
			100						105					110			
30	Ala	Val	Gly	Asn	Glu	Ile	Ser	Pro	Val	Thr	Gly	Thr	Ser	Tyr	Leu	Thr	
		115						120					125				
35	Ser	Phe	Leu	Thr	Pro	Ala	Met	Val	Asn	Ile	Tyr	Lys	Ala	Ile	Gly	Glu	
		130					135					140					
40	Ala	Gly	Leu	Gly	Asn	Asn	Ile	Lys	Val	Ser	Thr	Ser	Val	Asp	Met	Thr	
	145					150					155				160		
	Leu	Ile	Gly	Ser	Ser	Tyr	Pro	Pro	Ser	Gln	Gly	Ser	Phe	Arg	Asn	Asp	
				165						170					175		
45	Ala	Arg	Trp	Phe	Val	Asp	Pro	Ile	Val	Gly	Phe	Leu	Arg	Asp	Thr	Arg	
			180						185					190			
50	Ala	Pro	Leu	Leu	Val	Asn	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Phe	Ser	Tyr	Ser	Gly	Asn	
		195					200						205				
	Pro	Gly	Gln	Ile	Ser	Leu	Pro	Tyr	Ser	Leu	Phe	Thr	Ala	Pro	Asn	Val	
		210					215					220					
55	Val	Val	Gln	Asp	Gly	Ser	Arg	Gln	Tyr	Arg	Asn	Leu	Phe	Asp	Ala	Met	
	225					230					235				240		
60	Leu	Asp	Ser	Val	Tyr	Ala	Ala	Leu	Glu	Arg	Ser	Gly	Gly	Ala	Ser	Val	
				245						250					255		
65	Gly	Ile	Val	Val	Ser	Glu	Ser	Gly	Trp	Pro	Ser	Ala	Gly	Ala	Phe	Gly	
			260						265					270			

ES 2 308 786 T3

Ala Thr Tyr Asp Asn Ala Ala Thr Tyr Leu Arg Asn Leu Val Gln His
275 280 285

Ala Lys Glu Gly Ser Pro Arg Lys Pro Gly Pro Ile Glu Thr Tyr Ile
290 295 300

Phe Ala Met Phe Asp Glu Asn Asn Lys Asn Pro Glu Leu Glu Lys His
305 310 315 320

Phe Gly Leu Phe Ser Pro Asn Lys Gln Leu Lys Tyr Asn Ile Asn Phe
325 330 335

Gly

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA SECUENCIA CON ID N° 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 198 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SECUENCIA CON ID N° 8

GGAATTCGCC ACTCTCGCTG ATGAGTCCGT GAGGACGAAA CACAACAATC GATGCAGGAG 60

TAAGTATGA GTCCGTGAGG ACGAAAAATG AGGTTTCTAG AGCATGTGCC AGTCTGATGA 120

GTCCGTGAGG ACGAAACAGG GCTGAATATT ATGTTTCTTC TGATGAGTCC GTGAGGACGA 180

AACTTGTAGA GGATCCAT 198