(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 270 431**

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

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **95940525 .9**
(86) Fecha de presentación : **08.11.1995**
(87) Número de publicación de la solicitud: **0797674**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.1997**

(54) Título: **Elemento regulador específico de microesporas.**

(30) Prioridad: **22.11.1994 US 345756**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

(73) Titular/es:
PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, Inc.
Darwin Building, 7100 N.W. 62nd Avenue
Johnston, Iowa 50131, US

(72) Inventor/es: **Baszczynski, Chris;**
Barbour, Eric;
Miki, Brian y
Hattori, Jiro

(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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Elemento regulador específico de microesporas.

1. **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un nuevo elemento regulador que confiere especificidad de microesporas a la expresión de genes. En particular, esta invención está dirigida a un elemento regulador específico de microesporas del gen *Brassica napus Bnm1*, y a usar dicho elemento regulador para producir plantas transgénicas machos estériles. Esta invención también está dirigida a un método para restablecer la fertilidad de machos en la progenie de plantas machos estériles. Además, la presente invención se refiere al uso del elemento regulador específico de microesporas de la invención para proteger las plantas contra la infección por virus y plagas de insectos.

2. **Fundamento**

El control de la fertilidad del polen es esencial en la producción de cosechas híbridas. Los métodos tradicionales para regular la fertilidad del polen incluyen emasculación manual de plantas que han de usarse como precursor hembra y la aplicación de composiciones químicas. De acuerdo con este último método se producen semillas híbridas mediante la fertilización cruzada de plantas hembras tratadas químicamente con polen de plantas no tratadas. Ambos métodos, sin embargo, requieren un gran trabajo. Además es preferible evitar la introducción de compuestos químicos tóxicos en el medio ambiente.

Otro método para el control de la fertilidad se basa en el uso un(os) gen(es) citoplásmico(s) para la esterilidad de los machos. El problema de esté método es que la expresión de ciertos genes citoplásmicos de esterilidad de machos va acompañada por una mayor susceptibilidad a los hongos patógenos. Por ejemplo, el uso extensivo del citotipo *cmsT* en el maíz condujo a un episodio epifítico de tizón de las hojas en maíz del Sur de EE.UU. en los primeros años de la década de 1970. Aunque han llegado a estar disponibles citotipos adicionales de esterilidad de machos, su uso no ha llegado a extenderse debido a la preocupación sobre posible susceptibilidad a agentes patógenos.

La capacidad de producir líneas híbridas tiene particular importancia económica para cosechas de semillas oleosas. Por ejemplo, las líneas híbridas de *Brassica napus* F_1 producen típicamente rendimientos que son mayores que 20 a 70%, comparados con las líneas establecidas. Thompson, *Adv. Appl. Biol. 7*: 1 (1983); Johnston, *Euphytica 20*: 81 (1971). El método más económico y flexible de controlar la fertilidad en *Brassica* utiliza un sistema de auto-incompatibilidad que está presente de modo natural en las especies de *Brassica*. Gowers, *Euphytica 24*: 537 (1975). Sin embargo, el sistema de auto-incompatibilidad no es fiablemente eficaz en ciertas condiciones ambientales, tales como temperaturas elevadas.

Existe, por tanto, la necesidad de un método para controlar la producción de polen sin la dependencia de la esterilidad de machos que se produce de modo natural o del gen de auto-incompatibilidad o de los métodos tradicionales manuales y químicos.

Sumario de la invención

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar un método para produce plantas machos estériles usando un vector de expresión que interrumpe la función de las microesporas.

Es otro objeto de esta invención proporcionar un elemento regulador del DNA que confiere la expresión de genes específicos de microesporas.

Este y otros objetos se consiguen, de acuerdo con una realización de la presente invención por la creación de un molécula de DNA, preferiblemente una molécula de DNA aislado; en donde la molécula de DNA comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) SEQ ID NO: 8, (b) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 65% de similitud de secuencia con la SEQ ID NO: 8, en donde dicha secuencia de nucleótidos tiene la función de un elemento regulador específico de microesporas, y (c) un fragmento funcional de (a), en donde dicho fragmento tiene la función de un elemento regulador específico de microesporas.

La presente invención también contempla vectores de expresión que comprenden un elemento regulador específico de microesporas. Dichos vectores de expresión pueden comprender además un promotor, en donde la función del promotor está bajo el control de un elemento regulador específico de microesporas. Ejemplos de promotores adecuados incluyen un promotor *Bnm1*, un promotor específico de anteras y el promotor de núcleo CaMV 35S.

La presente invención también está dirigida a un vector de expresión que comprende además un gen extraño que está unido operativamente a un promotor, en donde el producto del gen extraño interrumpe la función de las microesporas.

La presente invención contempla además un método de usar dichos vectores de expresión para producir una planta estéril macho, que comprende la etapa de introducir un vector de expresión en células embriógenas de plantas, en donde en donde el gen extraño se selecciona del grupo que consiste en un gen estructural, un gen antisentido, un gen

de ribozima y un gen de secuencia de guía externa. Por ejemplo, se puede introducir un vector de expresión en células embriogenias de plantas de *Brassica napus*.

Los genes estructurales adecuados codifican una proteína seleccionada del grupo que consiste en toxina de la difteria, proteína antiviral de fitolaca (*Phytolacca americana*) abreviadamente PAF, RNasa-T1 de *Aspergillus oryzae*, barnasa y el producto del gen *rolB*.

Un producto adecuado de un gen antisentido se selecciona del grupo que consiste en RNA antisentido de actina, RNA antisentido de tubulina, RNa antisentido de ubiquitina, RNA antisentido de la enzima que se conjuga con ubiquitina, RNA antisentido de la proteína portadora de ubiquitina, RNa antisentido del factor de prolongación y RNA antisentido de chalcona-sintasa.

Además, los genes de ribozima o los genes de la secuencia de guía externa pueden comprender secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos de actina, secuencias de nucleótidos de tubulina, secuencias de nucleótidos de ubiquitina, secuencias de nucleótidos de la enzima que se conjuga con ubiquitina, secuencias de nucleótidos de la proteína portadora de ubiquitina, secuencias de nucleótidos del factor de prolongación y secuencias de nucleótidos de chalcona-sintasa.

La presente invención también está dirigida a un método de producir una planta macho estéril, que comprende:

(a) construir un vector de expresión que comprende un elemento regulador específico de microesporas, un promotor, y un gen extraño, en donde el elemento regulador específico de microesporas comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: (i) SEQ ID NO: 8, (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 65% de similitud de secuencia con la SEQ ID NO: 8,

en donde dicha secuencia de nucleótidos tiene la función de un elemento específico de microesporas; y

(iii) fragmentos de (i), en donde dicho fragmento tiene la función de un elemento específico de microesporas,

en donde el elemento regulador específico de microesporas en conjunción con el promotor controla la expresión del gen extraño, y en donde el producto del gen extraño interrumpe la función de las microesporas, con lo cual se produce una planta macho estéril.

Dicho método puede comprender además la etapa de (b) introducir el vector de expresión en células embriógenas de plantas.

La presente invención contempla además un método de usar un elemento regulador específico de microesporas para producir una planta híbrida macho fértil, que comprende:

(a) producir una primera planta parental macho estéril que comprende un vector de expresión que comprende un elemento regulador específico de microesporas de la invención, un promotor, y un primer gen extraño, en donde el elemento regulador específico de microesporas en conjunción con el promotor controla la expresión del primer gen extraño, y en donde el producto del primer gen extraño interrumpe la función de las microesporas;

(b) producir una segunda planta precursora que comprende un vector de expresión que comprende el elemento regulador específico de microesporas, un promotor y un segundo gen extraño, en donde el elemento regulador específico de microesporas en conjunción con el promotor controla la expresión del segundo gen extraño; y

(c) someter a fertilización cruzada a la primera planta precursora con la segunda planta precursora para producir una planta híbrida,

en donde las microesporas de la planta híbrida expresan el segundo gen extraño, y en donde el producto del segundo gen extraño impide la interrupción de la función de las microesporas función por el producto del primer gen extraño, produciendo de este modo una planta híbrida macho fértil.

Por ejemplo, el primer gen extraño puede codificar barnasa y el segundo gen extraño puede codificar un inhibidor de barnasa. Alternativamente el producto del primer gen extraño puede ser la toxina de la difteria y el producto del segundo gen extraño puede ser la ribozima de la toxina de la difteria.

La presente invención también está dirigida a un método para restablecer la fertilidad de una planta híbrida macho estéril, que comprende tratar la planta híbrida macho estéril con flavonol-aglicona, en donde la planta híbrida macho estéril comprende un vector de expresión que comprende: (i) un elemento regulador específico de microesporas, (ii) un promotor, y (iii) un gen extraño,

en donde dicho elemento regulador específico de microesporas comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

(a) SEQ ID NO:8;

(b) una secuencia de nucleótidos con al menos 65% de similitud con la SEQ ID NO:8, en donde dicha secuencia de nucleótidos tiene la función de un elemento regulador específico de microesporas; y

(c) un fragmento de (a), en donde dicho fragmento tiene la función de un elemento regulador específico de microesporas, en donde el elemento regulador específico de microesporas en conjunción con el promotor controla la expresión del gen extraño, y en donde el gen extraño expresa RNA antisentido de chalcona-sintasa, produciendo de este modo microesporas deficientes en flavonol. El kaempferol es un ejemplo de una flavonol-aglicona adecuada.

La presente invención se dirige además a un método para producir plantas transgénicas resistentes a enfermedades causadas por virus o insectos, que comprende construir un vector de expresión que comprende un elemento regulador específico de microesporas, un promotor, y un gen extraño, en donde el elemento regulador específico de microesporas comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en (i) SEQ ID NO: 8, (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 65% de similitud de secuencia con la SEQ ID NO: 8, en donde dicha secuencia de nucleótidos tiene la función de un elemento regulador específico de microesporas; y (iii) fragmentos de (i), en donde dicho fragmento tiene la función de un elemento regulador específico de microesporas, en donde elemento regulador específico de microesporas en conjunción con el promotor controla la expresión del gen extraño, y en donde el producto del gen extraño interrumpe la función del virus o codifica una toxina insecticida, con lo cual confiere resistencia a la enfermedad. El producto del gen extraño que interrumpe el virus puede seleccionarse del grupo que consiste en la proteína de cubierta viral, 2',5'-oligoadenilato-sintetasa, RNA antisentido del genoma viral y proteína antiviral de fitolaca, mientras que una toxina insecticida adecuada es una endotoxina de *Bacillus thuringiensis*.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 presenta la secuencia de nucleótidos [SEQ ID NO: 1] de cDNA de *Bnm1* con su correspondiente secuencia de aminoácidos [SEQ ID NO: 2]. El codón de iniciación ATG, el codón de parada TGA y una supuesta señal de poliadenilación están doblemente subrayados.

La Figura 2 presenta la secuencia de nucleótidos [SEQ ID NO: 5] del clon genómico de *Bnm1* incluyendo el promotor, la región codificadora y un solo intrón (en letra cursiva). La región subrayada es idéntica a la secuencia de cDNA de *Bnm1*. El codón de iniciación ATG, el codón de parada TGA y una supuesta señal de poliadenilación están indicados por asteriscos.

La Figura 3 presenta la secuencia de nucleótidos [SEQ ID NO: 8] del fragmento promotor amplificado por PCR usado para clonar el promotor de *Bnm1*. El codón de iniciación ATG está presente dentro del sitio de restricción *Nco*I.

La Figura 4 presenta un mapa del vector DP5476 que contiene el promotor demicroesporas de *Brassica napus* (Msp Prom) que activa la casete gen GUS- terminador PINII insertada en los sitios *Sal*I-*Eco*RI de pBlueScript® II SK+. El vector también contiene el gen de resistencia a la ampicilina (AmpR) como marcador seleccionable para transformaciones de *E. coli*.

La Figura 5 presenta un mapa de DP5477 que contiene el promotor demicroesporas de *Brassica napus* (MSP Prom) que activa la casete gen GUS-terminador PINII insertada en el sitio *Sal*I-*Eco*RI del vector binario DP1741. DP5477 también contiene el promotor CaMV 35S que activa el gen de la neomicina-fosfotransferasa (NPTII) que se usa como marcador de selección. Los bordes izquierdo y derecho de T-DNA están marcados con LB (*left border*) y RB (*right border*), respectivamente.

Descripción detallada

1. *Definiciones*

En la descripción que sigue, se usan ampliamente cierto número de términos y frases definidores. Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar la comprensión de la invención.

Un *gen estructural* es una secuencia de DNA que se transcribe en RNA mensajero (mRNA) que luego se traduce en una secuencia de aminoácidos característica de un polipéptido específico.

Un *promotor* es una secuencia de DNA que dirige la transcripción de un gen estructural. Típicamente un promotor está localizado en la región 5' de un gen, próximo al sitio del comienzo de la transcripción de un gen estructural. Si un promotor es un promotor inducible, entonces la velocidad de transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor. En contraste, la velocidad de transcripción no está regulada por un agente inductor si el promotor es un promotor constitutivo.

Un *promotor de núcleo* contiene secuencias de nucleótidos esenciales para la función del promotor, incluyendo la caja TATA y el comienzo de la transcripción. Por esta definición, un promotor de núcleo puede contener o no actividad detectable en ausencia de secuencias específicas que pueden potencial la actividad o conferir actividad es-

pecífica de tejidos. Por ejemplo, el promotor de núcleo del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 35S consiste en aproximadamente 33 nucleótidos antes del extremo 5' del sitio de iniciación de la transcripción del genoma de 35S.

Un *elemento regulador específico de microesporas* es una secuencia de DNA que dirige un nivel superior de transcripción de un gen asociado en microesporas al de algunos o todos los otros tejidos de una planta. Por ejemplo, el gen *Bnm1*, descrito en la presente memoria, se expresa en microesporas durante las fases binucleadas y trinucleadas del desarrollo. El elemento regulador específico de microesporas del gen *Bnm1* puede dirigir la expresión de un gen extraño en microesporas, pero no en otros tejidos de pared, pistilo o sépalo.

Una *molécula de DNA aislada* es un fragmento de DNA que no está integrado en el DNA genómico de un organismo. Por ejemplo, el elemento regulador específico de microesporas del gen *Bnm1* es un fragmento de DNA que ha sido separado del DNA genómico de *Brassica napus*. Otro ejemplo de una molécula de DNA aislada es una molécula de DNA químicamente sintetizada que no está integrada en el DNA genómico de un organismo.

Un *potenciador* es elemento regulador de DNA que puede aumentar la eficacia de la transcripción, independientemente de la distancia u orientación del potenciador con respecto al sitio del comienzo de la transcripción.

DNA complementario (cDNA) es una de molécula DNA monocatenario que se forma a partir de un molde de mRNA por la enzima transcriptasa inversa. Típicamente, se emplea un cebador complementario a porciones de mRNA para la iniciación de la transcripción inversa. Los expertos en la técnica también usan el término "cDNA" para referirse a una molécula de DNA bicatenario que consiste en dicha molécula de DNA monocatenario y su cadena de DNA complementaria.

El término *expresión* se refiere a la biosíntesis de un producto génico. Por ejemplo, en el caso de un gen estructural, la expresión implica la transcripción del gen estructural en mRNA y la traducción del mRNA en uno o más polipéptidos.

Un *vector de clonación* es una molécula de DNA, tal como un plásmido, cósmido o bacteriófago, que tiene la capacidad de replicarse autónomamente en una célula hospedante. Los vectores de clonación contienen típicamente uno o un pequeño número de sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción en los cuales pueden insertarse las secuencias de DNA extraño de un modo determinable sin pérdida de una función biológica esencial del vector, así como un gen marcador que es adecuado para uso en la identificación y selección de células transformadas con el vector de clonación. Los genes marcadores incluyen típicamente genes que proporcionan resistencia a la tetraciclina o resistencia a ampicilina.

Un *vector de expresión* es una molécula de DNA que comprende un gen que se expresa en una célula hospedante. Típicamente, la expresión del gen está colocada bajo el control de ciertos elementos reguladores, incluyendo promotores constitutivos o inducibles, elementos reguladores específicos de tejidos, y potenciadores. De dicho gen se dice que ha de estar "unido operativamente" a los elementos reguladores.

Un *gen extraño* se refiere en la presente descripción a una secuencia de DNA que está unida operativamente a al menos un elemento regulador heterólogo. Por ejemplo, se considera que cualquier gen distinto del gen estructural *Bnm1* es un gen extraño si la expresión de ese gen está controlada por un elemento regulador específico de microesporas del gen *Bnm1*.

Un *hospedante recombinante* puede ser cualquier célula procariótica o eucariótica que contiene un vector de clonación o de expresión. Esta frase también incluye las células procarióticas o eucarióticas que han sido alteradas por ingeniería genética para contener el(los) gen(es) clonado(s) en el cromosoma o genoma de la célula hospedante.

Una *planta transgénica* es una planta que tiene una o más células de plantaque contienen un vector de expresión.

En eucariotas, la RNA-polimerasa II cataliza transcripción de un gen estructural para producir mRNA. Una molécula de DNA se puede diseñar de modo que contenga molde de RNA-polimerasa II en el cual el RNA transcrito tiene una secuencia que es complementaria a la del mRNA específico. El RNA transcrito se denomina un RNA antisentido y una secuencia de DNA que codifica el *RNA antisentido* se denomina un *gen antisentido*. Las moléculas de RNA antisentido son capaces de unirse moléculas de mRNA, dando como resultado una inhibición de la traducción del mRNA.

Una *ribozima* es una molécula de RNA que contiene un centro catalítico. El término incluye enzimas de RNA, RNA auto-empalmantes, y RNA auto-escindibles. Una secuencia de DNA que codifica una ribozima se denomina un *gen de ribozima*.

Una *secuencia de guía externa* es una molécula de RNA que dirige la ribozima endógena, RNasa P, hasta especies particulares de mRNA intracelular, dando como resultado la escisión del mRNA por la RNasa P. Una secuencia de DNA que codifica una secuencia de guía externa se denomina un *gen de secuencia de guía externa*.

Se considera que dos moléculas de ácido nucleico tienen una *sustancial similitud de secuencia* si sus secuencias de nucleótidos comparten una similitud de al menos 65%. Las determinaciones de similitud de secuencias puede rea-

lizarse, por ejemplo, usando el programa de ordenador FASTA (Genetics Computer Group; Madison, WI). Alternativamente, las determinaciones de similitud de secuencias pueden realizarse usando el programa BLASTP (*Basic Local Alignment Search Tool*) del *Experimental GENIFO(R) BLAST Network Service. Véase Altschul et al., J. Mol. Biol. 215*: 403 (1990). Véanse también Pasternak *et al*., "*Sequence Similarity Searches, Multiple Sequence Alignments, and Molecular Tree Building*," en METHODS IN PLANT MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Glick *et al*. (eds.), pp. 251-267 (CRC Press 1993).

2. *Visión general*

Se conocen en la técnica genes específicos de microesporas. Véanse, por ejemplo, Wing *et al., Plant Molec. Biol. 14*: 17 (1989), Albani *et al., Plant Molec. Biol. 15*: 605 (1990). Guerrero *et al., Mol. Gen. Genet. 224*: 161 (1990). Twell *et al., Development 109:* 705 (1990), van Tunen *et al., The Plant Cell 2*: 393 (1990). Albani *et al., Plant. Molec. Biol: 16*: 501 (1991). Twell *et al., Genes & Development 5:* 496 (1991) y Albani *et al., The Plant Journal 2*: 331(1992). De acuerdo con el esquema de Mascarenhas, *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. 41*: 317 (1990) los genes expresados durante la microesporogénesis pueden caracterizarse como genes "tempranos" o "tardíos". Los transcritos de los genes tempranos son primeramente detectables poco después de la meiosis y se reducen o son indetectables en el polen maduro. En contraste, la expresión de los genes tardíos comienza aproximadamente en el momento de la mitosis de microesporas y continúa a medida que madura el polen. Además, es posible que los genes particulares expresados durante la microesporogénesis no puedan ser clasificados ni como genes tempranos ni como genes tardíos.

De acuerdo con el esquema de clasificación de Mascarenhas, el gen *Bnm1* descrito en la presente memoria es un gen temprano. Por tanto, el elemento regulador del gen *Bnm1* es funcionalmente distinto de los elementos reguladores de los genes tardíos, tales como el gen del maíz *Zm13* (Guerrero *et al., supra*), el gen *NTP303* del tabaco (Weterings *et al., Plant. Mol. Biol. 18:* 1101 (1992)), el gen *LAT51* del tomate (McCormick, *Trends Genet. 7*: 298 (1991)), el gen de la flavona-isomerasa de la chalcona de petunia (promotor chiA P_{A2}; van Tunen *et al., The Plant Cell: 2*:393 (1990)) y el gen *Bcp1* de *Brassica campestris* (Theerakulpisut *et al., The Plant Cell 3*: 1073 (1991)).

También pueden encontrarse diferencias en el grupo de genes tempranos comparando modelos de síntesis de mRNA. Por ejemplo, el gen *LAT52* se expresa en el endospermo, el gen *LAT59* se expresa en el endospermo y las raíces, mientras que el gen *LAT56* se expresa en las raíces. Twell *et al., Mol. Gen. Genet. 217*: 240 (1989); Wing *et al., supra*; McCormick, *The Plant Cell 5*: 1265 (1993). En contraste, el gen *Bnm1* no se expresa ni en las raíces ni en las semillas en desarrollo. Véase el Ejemplo 2. Además, el análisis de Northern indica que el nivel de expresión del gen *Bnm1* es mayor que el nivel de expresión de los genes *Bp4, Bp19* y *Bp10* de *Brassica napus* (1990,1991,1992) *supra*. Véase el Ejemplo 2. Esta observación sugiere que el promotor del gen *Bnm1* es más potente que los promotores de los genes *Bp4, Bp19 y Bp10.*

Además, las variaciones en la función de los elementos reguladores de los genes tempranos pueden revelarse por estudios de transformación. Por ejemplo, el elemento regulador específico del polen del gen SLG_{13} de *Brassica oleracea* induce la expresión del gen en el polen de plantas transgénicas principalmente en la fase binucleada del desarrollo. Thorsness *et al., Develop. Biol. 143*:173 (1991); Dzelzkalns *et al., The Plant Cell 5*:855 (1993). Además, el elemento regulador SLG_{13} no induce la expresión del gen en el tapetum de plantas transgénicas. Thorsness *et al., supra*. En contraste, el elemento regulador del gen *Bnm1* induce la expresión del gen en las microesporas de plantas transgénicas comenzando en la fase mononucleada del desarrollo, así como en las células tapetales. Véase el Ejemplo 5.

Por tanto, el gen *Bnm1* puede distinguirse sobre una base funcional de otros genes tempranos conocidos.

Además de esta distinción funcional, una comparación de secuencias de nucleótidos en varias bases de datos fracasó en revelar una secuencia de nucleótidos que fuera equivalente o similar a la secuencia de nucleótidos *del* elemento regulador específicos de microesporas *Bnm1* mostrado en la Figura 3 [SEQ ID NO: 8]. La ausencia de un apareamiento es consistente con el hecho de que no ha sido posible desarrollar principios generalmente aceptados o criterios estructurales para reconocer secuencias de DNA que confiere especificidad de microesporas. Esto es particularmente cierto para los elementos reguladores de los genes específicos de microesporas de *Brassica*. Consecuentemente, un elemento regulador específico de microesporas de *Brassica* no puede aislarse de una genoteca genómica por escrutinio para una secuencia de consenso que confiere la expresión de genes específicos de microesporas.

Por tanto, el nuevo elemento regulador específico de microesporas de la presente invención se obtuvo aislando moléculas de cDNA que codifican genes específicos de microesporas y luego, usando los cDNA como sondas para identificar genes correspondientes en una genoteca genómica adecuada.

3. *Aislamiento de un elemento regulador de un gen específico de microesporas*

A. *Aislamiento de moléculas de cDNA que codifican genes específicos de microesporas*

La primera etapa en la construcción de una genoteca de cDNA que contiene genes específicos de microesporas es aislar RNA total de las microesporas. Preferiblemente, el RNA se aísla de microesporas mononucleadas tardías/bininucleadas tempranas que han sido cultivadas durante cuatro días para inducir la embriogénesis. Más preferiblemente, dichas microesporas se obtienen a partir de *Brassica napus*.

El RNA total puede prepararse a partir de las microesporas usando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. En general, las técnicas de aislamiento de RNA deben proporcionar un método para romper células vegetales, medios de inhibir la degradación dirigida por RNasa, y un método de separar RNA de DNA, proteínas y contaminantes polisacáridos. Por ejemplo, el RNA total puede aislarse de las microesporas congelando el tejido en nitrógeno líquido, moliendo el tejido congelado con un mortero y su mano para lisar las microesporas, extrayendo el tejido molido con una solución de fenol/cloroformo para separar las proteínas, y separando el RNA de las impurezas restantes por precipitación selectiva con cloruro de litio. Véase, por ejemplo, Ausubel *et al*., (eds.),CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, pp. 4.3.1-4.3.4 (Wiley Interscience 1990) [en lo sucesivo "Ausubel"]. Véase también Sharrock *et al., Genes and Development 3*: 1745 (1989).

Alternativamente, el RNA total puede aislarse de las microesporas extrayendo el tejido molido con isotiocianato de guanidinio, extrayendo con disolventes orgánicos, y separando el RNA de los contaminantes usando centrifugación diferencial. Véase, por ejemplo, Strommer *et al*., "*Isolation and characterization of Plant mRNA*" en METHODS IN PLANT MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Glick *et al*., (eds.),pp. 49-65 (CRC Press 1993).

Con el fin de construir una genoteca de cDNA, debe aislarse RNA de poli(A)$^+$ de una preparación de RNA total. El RNA de poli(A)$^+$ puede aislarse del RNA total usando la técnica estándar de cromatografía sobre oligo(dT)-celulosa. Véase, por ejemplo, Strommer *et al*., *supra*.

Las moléculas de cDNA bicatenario se sintetizan a partir de RNA de poli (A)$^+$ usando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Ausubel en las páginas 5.5.2-5.6.8. Además pueden usarse kits comercialmente disponibles para sintetizar moléculas de cDNA bicatenario. Por ejemplo, dichos kits están disponibles en GIBCO/BRL (Gaithersburg, MD), Clontech Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Promega Corporación (Madison, WI) y Stratagene® Cloning Systems (La Jolla, CA).

Para la construcción de una genoteca de cDNA de microesporas son adecuados diversos vectores de clonación. Por ejemplo, una genoteca de cDNA puede prepararse en un vector derivado de bacteriófagos, tal como un vector λgt10. Huynh *et al*., "*Constructing and Screening cDNA Libraries in λgt10 y λgt11*" en *DNA Cloning: A Practical Approach*, Vol. I, Glover (ed.), pp. 49-78 (IRL Press, 1985).

Alternativamente, las moléculas de cDNA bicatenario pueden insertarse en un vector plasmídico, tal como un vector pBluescript® (Stratagene® Cloning Systems; La Jolla, CA), un vector LambdaGEM®-4 (Promega Corp.) u otros vectores comercialmente disponibles. Los vectores de clonación adecuados pueden obtenerse de American Type Culture Collección (Rockville, MD). Con el fin de amplificar las moléculas de cDNA clonadas, la genoteca de cDNA se inserta en un hospedante procariota, usando técnicas estándares. Por ejemplo, la genoteca de cDNA de microesporas puede introducirse en células de *E. coli* DH5 competentes, que pueden obtenerse en GIBCO/BRL (Gaithersburg, MD).

Puede usarse escrutinio diferencial para aislar clones de cDNA que codifican genes específicos de microesporas a partir de la genoteca cDNA. Por ejemplo, pueden sintetizarse sondas de cDNA monocatenario en presencia de nucleótidos radioactivos usando aislados de RNA de poli(A)$^+$ de microesporas que han sido tratadas para inducir embriogénesis ("Mi-RNA") o de microesporas que han sido tratadas para eliminar la respuesta embriógena ("Mx-RNA"). Los clones de cDNA que se hibridan con sondas de cDNA sintetizadas a partir de Mi-RNA, pero no con sondas Mx-cDNA se aíslan para análisis posterior. El método de escrutinio diferencial es bien conocido por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sargent, "*Isolation of Differentially Expressed Genes*" en GUIDE TO MOLECULAR CLONING TECHNIQUES, Berger *et al*., (eds.), pp. 423-432 (Academic Press, 1987); Tedder *et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85*: 208 (1900). El Ejemplo 1 ilustra el uso de esta técnica.

El método básico para obtener clones de cDNA específicos de microesporas puede modificarse construyendo una genoteca sustraída de cDNA que está enriquecida en clones de cDNA específicos de microesporas. Hedrick *et al., Nature 308:* 149 (1984). Por ejemplo, puede prepararse un cDNA bicatenario con extremos de EcoRI a partir de Mi-RNA y mezclarse con un exceso de 50 veces de pequeños fragmentos de cDNA de extremos romos, preparados a partir de Mx-RNA. La mezcla de los cDNA se calienta para fundir el cDNA bicatenario, los cDNA monocatenarios se dejan hibridar y las moléculas de cDNA bicatenario se insertan en el sitio *Eco*RI de un vector de clonación. En estas condiciones, las únicas moléculas de Mi-cDNA que probablemente regeneren los fragmentos bicatenarios de un sitio *Eco*RI en cada extremo son los cDNA que carecen de los fragmentos complementarios en el Mx-cDNA. Ausubel en las páginas 5.8.9.-5.8.15.

Los clones de cDNA pueden analizarse usando una variedad de técnicas, tales como análisis Northern, análisis Southern, cartografía de restricción y análisis de secuencias, como se ilustra en los Ejemplos 1-3.

B. *Aislamiento de genes específicos de microesporas a partir de una genoteca genómica*

La metodología descrita anteriormente puede usarse para aislar clones de cDNA que codifican proteínas que se expresan en tejido de microesporas. Un clon de cDNA específico de microesporas, tal como el clon cDNA de *Bnm1*, puede usarse para interrumpir la función de las microesporas en construcciones antisentido, siguiendo los métodos generales descritos más adelante. Además, tales clones de cDNA pueden usarse como sondas para aislar los genes correspondientes de una genoteca genómica.

Una genoteca genómica de DNA de plantas puede prepararse por medios bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Slightom *et al*., "*Construction of X Clone Banks*" en METHODS IN PLANT MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Glick *et al*. (eds.), pp. 121-146 (CRC Press, 1993). Una fuente preferida de de DNA genómico de plantas es DNA de *Brassica napus*. El DNA genómico puede aislarse de tejido de *Brassica napus*, por ejemplo, lisando tejido de la planta con el detergente Sarkosyl, digiriendo el lisado con proteinasa K, aclarando los residuos insolubles del lisado por centrifugación, precipitando el ácido nucleico del lisado usando isopropanol, y purificando el DNA resuspendido en un gradiente de densidad de cloruro de cesio. Ausubel en las páginas 2.3.1-2.3.3.

Los fragmentos de DNA que son adecuados para la producción de una genoteca genómica pueden obtenerse por cizallamiento al azar de DNA genómico o por la digestión parcial del DNA genómico con endonucleasas de restricción. Véase, por ejemplo, Ausubel en las páginas 5.3.2-5.4.4, y Slightom *et al*., *supra*.

Los fragmentos de DNA genómico pueden insertarse en un vector, tal como un vector cósmido o bacteriófago, de acuerdo con técnicas convencionales, tales como el uso de digestión por enzimas de restricción para proporcionar los extremos adecuados, el uso de un tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión indeseable de las moléculas de DNA, y ligación con ligasas apropiadas. Las técnicas para dicha manipulación están descritas por Slightom *et al., supra*, y son bien conocidas en la técnica. Véase también Ausubel en las páginas 3.0.5-3.17.5.

Alternativamente, puede obtenerse una genoteca genómica de plantas a partir de una fuente comercial, tal como Clontech Laboratories, Inc, (Palo Alto, CA) o Stratagene® Cloning Systems (La Jolla, CA).

Una genoteca que contiene clones genómicos se escruta con uno o más clones de cDNA específico de microesporas usando técnicas estándares. Por ejemplo, Ausubel en las páginas 6.0.3-6.6.1; Slightom *et al., supra*; Raleigh *et al., Genetics 122*: 279 (1989). El Ejemplo 4 presenta el método que se usó para escrutar una genoteca genómica de *Brassica napus*.

C. *Identificación de un elemento regulador específico de microesporas*

Los clones genómicos pueden analizarse usando una variedad de técnicas, tales como análisis de restricción, análisis Southern, análisis por extensión de cebador, y análisis de secuencias de DNA. El análisis por extensión de cebador o análisis con protección de la nucleasa SI, por ejemplo, puede usarse para localizar el supuesto sitio de transcripción del gen clonado. Ausubel en las páginas 4.8.1-4.8.5; Walmsley *et al*., "*Quantitative and Qualitative Analysis of Exogenous Gene Expression by the S1 Nuclease Protection Assay*" en METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOL. 7: GENE TRANSFER AND EXPRESSION PROTOCOLS, Murray (ed.), pp. 271-281 (Humana Press Inc. 1991). El Ejemplo 4 ilustra el uso de análisis Southern, cartografía por restricción y análisis de secuencias para caracterizar el gen *Bnm1*.

El análisis estructural *per se* no puede conducir a la identificación de un elemento regulador específico de microesporas asociado con el gen *Bnm1* clonado debido a que no se ha desarrollado un modelo para secuencias reguladoras específicas de microesporas de *Brassica napus*. Por tanto, el elemento regulador debe identificarse usando análisis funcional.

El método general de dicho análisis funcional implica subclonar fragmentos del clon genómico en un vector de expresión que contiene un gen informador, introducir el vector de expresión en diversos tejidos de plantas, y analizar el tejido para detectar la expresión transitoria del gen informador. La presencia de un elemento regulador específico de microesporas en el subclon genómico se verifica por la observación de la expresión del gen informador en el tejido de microesporas y la ausencia de expresión del gen informador en tejido que no es microesporas, tal como tejidos de pistilos o de sépalos.

Los métodos para generar fragmentos de un clon genómico son bien conocidos. Preferiblemente, se usa digestión enzimática para formar deleciones anidadas de fragmentos de DNA genómico. Véase, por ejemplo, Ausubel en las páginas 7.2.1-7.2.20; An *et al*., "*Techniques for Isolating and Characterizing Transcription Promotors, Enhancers, and Terminators*" en METHODS IN PLANT MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Glick *et al*., (eds.), pp. 155-166 (CRC Press 1993).

Como Ejemplo, puede ensayarse la posibilidad de que el elemento regulador resida "aguas arriba" o hacia el extremo 5', del sitio de comienzo de la transcripción subclonando un fragmento de DNA que contiene la región "aguas arriba", digiriendo el fragmento de DNA bien en la dirección 5' a 3' o bien en la dirección 3' a 5' para producir deleciones anidadas, y subclonar los pequeños fragmentos en vectores de expresión para la expresión transitoria.

La selección de un vector de expresión apropiado dependerá del método de introducir el vector de expresión en células hospedantes. Típicamente, un vector de expresión contiene: (1) elementos de DNA procariótico que codifican un origen de replicación bacteriano y un marcador de resistencia a antibióticos para proporcionar el crecimiento y selección del vector de expresión en la célula hospedante; (2)elementos de DNA eucariótico que controlan la iniciación de la transcripción, tal como un promotor; (3) elementos de DNA que controlan el procesamiento de los transcritos, tales como una secuencia de terminación de la transcripción/poliadenilación; y (4) un gen informador que está unido operativamente a los elementos de DNA que controlan la iniciación de la transcripción. Genes informadores útiles incluyen β-glucurodinasa, β-galactosidasa, cloranfenicol-acetil-transferasa, luciferasa y similares. Preferiblemente, el

gen informador es cualquier gen de β-glucuronidase (GUS) o el gen de luciferasa. Pueden encontrarse descripciones generales de vectores de expresión en plantas y genes informadores en Gruber *et al*., "*Vectors for Plant Transformation*" en METHODS IN PLANT MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Glick *et al*. (eds.), pp. 89-119 (CRC Press 1993). Además, los vectores de expresión de GUS y las casetes de gen GUS están disponibles en Clontech Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), mientras que los vectores de expresión de luciferasa y casetes de genes de luciferasa están disponibles en Promega Corporation (Madison, WI).

Los vectores de expresión que contienen fragmentos genómicos de ensayo pueden introducirse en protoplastos, o en tejidos intactos o células aisladas. Preferiblemente, los vectores de expresión se introducen en tejidos intactos. Se proporcionan métodos generales de cultivar tejidos de plantas, por ejemplo, en Miki *et al*., "*Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants,*" en METHODS IN PLANT MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Glick et (eds.), pp. 67-88 (CRC Press, 1993).

Los métodos de introducir vectores de expresión en tejido de planta incluyen la infección directa o el co-cultivo de tejido de planta con *Agrobacterium tumefaciens*. Horsch *et al., Science 227*:1229 (1985). Se proporcionan descripciones de sistemas vectores de *Agrobacterium* y métodos para transferencia de genes mediada por *Agrobacterium* en Gruber *et al., supra*, Miki *et al., supra*, y Moloney *et al., Plant Cell Reports 8*: 238 (1808).

Alternativamente, los vectores de expresión se introducen en tejidos de plantas usando un método directo de transferencia de genes, tales como suministro mediado por microproyectiles, inyección de DNA, electroporación, y similares. Véase, por ejemplo, Gruber *et al*., *supra*; Miki *et al., supra*; Klein *et al., Biotechnology 10*:268 (1992). Por ejemplo, los vectores de expresión pueden introducirse en tejidos de plantas usando suministro mediado por microcroproyectiles con un dispositivo biolístico.

Se han usado de estudios de transformación para identificar secuencias de DNA que regulan la expresión de genes de un modo específico de microesporas. Se encontró, en particular, un elemento regulador específico de microesporas que residía dentro de un fragmento de DNA de 820 pares de bases que está localizado inmediatamente aguas arriba del sitio de comienzo de la traducción de *Bnm1*. La secuencia de nucleótidos de un elemento regulador específico de microesporas se proporciona en la Figura 3 [SEQ ID NO: 8]. Por tanto, la presente invención comprende una molécula de DNA que tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 8 y que tiene la función de un promotor específico de microesporas.

Pueden producirse variantes del elemento regulador específico de microesporas delecionando, añadiendo y/o sustituyendo nucleótidos para los nucleótidos descritos en la SEQ ID NO: 8. Dichas variantes pueden obtenerse, por ejemplo, por mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, mutagénesis de exploración con enlazador, mutagénesis que usa la reacción en cadena de polimerasa, y similares. Ausubel en las páginas 8.0.3-8.5.9. Véase también generalmente, McPherson (ed.), DIRECTED MUTAGENESIS: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press (1991). Por tanto, la presente invención también abarca moléculas de DNA que comprenden secuencias de nucleótidos que tienen al menos 65% de similitud de secuencia con la SEQ ID NO:8. y funcionan como promotor específico de microesporas.

Además, el análisis por deleción puede realizarse nuevamente para localizar uno o más elementos reguladores específicos de microesporas dentro del elemento regulador específico de microesporas de 820 pares de bases. Por tanto, la presente invención también abarca "fragmentos funcionales" de SEQ ID NO: 8 que tienen la función de un elemento regulador específico de microesporas.

4. *Uso de un elemento regulador específico de microesporas para controlar la producción de polen*

A. *Producción de plantas machos estériles*

Un objeto de la presente invención es proporcionar medios para controlar la producción de polen usando elemento regulador específico de microesporas. En particular, la presente invención abarca la producción de plantas machos estériles usando secuencias reguladoras de *Bnm1* para estimular la expresión de un gen extraño en microesporas. El elemento regulador específico de microesporas de *Bnm1* induce la expresión de genes desde inmediatamente antes de la fase binucleada hasta la fase trinucleada del desarrollo de microesporas. Puesto que la expresión está confinada a un tejido y fases limitadas, el uso del elemento regulador de *Bnm1* para inducir esterilidad de machos obvia los problemas de regulación referentes a la acumulación de un producto de un gen extraño en otros diversos tejidos, incluyendo las porciones comestibles de las plantas.

Un método general para inducir esterilidad de machos es construir un vector de expresión en el cual el elemento regulador específico de microesporas está unido operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína capaz de interrumpir la función de las microesporas. Las proteínas capaces de interrumpir la función de las microesporas incluyen proteínas que inhiben la síntesis de macromoléculas que son esenciales para la función celular, enzimas que degradan macromoléculas que son esenciales para la función celular, proteínas que alteran la biosíntesis o el metabolismo de hormonas de plantas, y proteínas que inhiben una función específica de microesporas.

Por ejemplo, puede construirse un vector de expresión en el cual el elemento regulador específico de microesporas está unido operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica un sistema inhibidor de la síntesis de proteínas. La toxina de la difteria, por ejemplo, es un inhibidor bien conocido de la síntesis de proteínas en eucariotas. Las molé-

culas de DNA que codifican el gen de la toxina de la difteria pueden obtenerse en American Type Culture Collección (Rockville, MD), ATCC Nº 39359 o ATCC Nº 67011. Como se ha analiza más adelante, la proteína antiviral de fitolaca es otro inhibidor adecuado de la síntesis de proteínas.

Alternativamente, la interrupción de la función de las microesporas puede conseguirse usando secuencias de DNA que codifican enzimas capaces de degradar un macromolécula biológicamente importante. Por ejemplo, Mariani *et al., Nature 347*:737 (1990), han demostrado que la expresión en el tapetum de RNasa-T1 de *Aspergillus oryzae* o de una RNasa de *Bacillus amyloliquefaciens*, denominada "barnasa" indujo la destrucción de las células tapetales, dando como resultado infertilidad de machos. Por tanto, la función de las microesporas puede interrumpirse usando un vector de expresión que contiene un elemento regulador específico de microesporas que está operativamente unido a un gen de barnasa. Otras enzimas adecuadas incluyen DNasas, proteasas y lipasas.

Los genes que codifican las enzimas interruptoras de la función de las microesporas pueden obtenerse por síntesis química usando secuencias de nucleótidos publicadas. Los genes de RNasa-T1 y barnasa pueden obtenerse por ejemplo, sintetizando los genes con oligonucleótidos largos mutuamente cebantes. Véase, por ejemplo, Ausubel en las páginas 8.2.8 a 8.2.13. Véase también Wosnick *et al., Gene 60*:115 (1987). Además, técnicas habituales que usan la reacción en cadena de la polimerasa proporcionan la capacidad de sintetizar genes tan grandes como de una longitud de 1,8 kilobases. Adang *et al., Plant Molec. Biol. 21*:1131 (1993); Bambot *et al., PCR Methods and Applications 2*:266 (1993). Ouaas *et al., Eur. J. Biochem. 273*:617 (1988), describen la síntesis química de la RNasa-T1, mientras que la secuencia de nucleótidos del gen de la barnasa está descrita en Hartley, *J. Molec. Biol. 202*:913 (1988).

En un método alternativo, la función del polen se interrumpe alterando el metabolismo de hormonas de plantas, tales como auxinas y gibberelinas. Por ejemplo, el gen *roIB* de *Agrobacterium rhizogenes* codifica una enzima que interfiere con el metabolismo de la auxina catalizando la liberación de indoles libres de indoxil-β-glucósidos. Estruch *et al., EMBO J. 11*:3125 (1991). Spena *et al.,Theor. App. Genet. 84*:520 (1992) han demostrado que la expresión específica de anteras del gen *rolB* en tabaco da como resultado plantas que tienen mayores niveles de ácido indol-3-acético, menor actividad de gibberelina, y anteras arrugadas en las cuales está fuertemente disminuida la producción de polen. Puesto que se espera que la expresión del gen *rolB* en microesporas aumente los niveles de ácido indol-3-acético en tejidos de anteras, el gen *rolB* es otro ejemplo de un gen que es útil para controlar la producción de polen. Slightom *et al., J. Biol. Chem. 261*:108 (1985), describe la secuencia de nucleótidos del gen *rolB*.

Con el fin de expresar una proteína que interrumpe la función de las microesporas se construye un vector de expresión en el cual una secuencia de DNA que codifica la proteína está unida operativamente a una secuencia de DNA que regula la transcripción del gen de una manera específica de microesporas. Los requisitos generales de un vector de expresión se describen anteriormente en el contexto de un sistema de expresión transitoria. Aquí, sin embargo, el objetivo es introducir el vector de expresión en el tejido embriógeno de plantas de tal modo que se expresará una proteína extraña en una fase tardía del desarrollo de las microesporas de la planta adulta. La estabilidad mitótica puede conseguirse usando vectores virales de plantas que proporcionan replicación epicromosómica.

Un método alternativo y preferido de obtener estabilidad mitótica es proporcionado por la integración de secuencias del vector de expresión en el cromosoma hospedante. Dicho estabilidad mitótica puede ser proporcionada por la técnica de transformación mediada por *Agrobacterium* ilustrada en el Ejemplo 5, más adelante.

La transcripción del gen extraño puede controlarse por un promotor de un gen específico de microesporas o por un promotor viral, tal como el promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), un promotor del virus del mosaico del virus del mosaico de escrofularia y similares. Gruber *et al., supra*. Preferiblemente, el promotor es un promotor de un gen específico de microesporas o el promotor de núcleo CaMV 35S. Más preferiblemente, el promotor es un promotor de un gen específico de microesporas y en particular, el promotor del gen *Bnm1*.

Alternativamente, la transcripción del gen extraño puede ser controlada por un promotor de un gen específico de anteras. De este modo, los genes extraños capaces de interrumpir la función celular pueden expresarse en microesporas y otras células de anteras. Los promotores y genes específicos de anteras son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, McCormick *et al*., "*Anther-Specific Genes: Molecular Characterization and Promotor Analysis in Transgenic Plants*" en PLANT REPRODUCTION: FROM FLORAL INDUCTION TO POLLINATION, Lord *et al*., (eds.), pp. 128-135 (1989); Scott *et al*., Publicación de solicitud de patente internaciona Nº WO 92/11379 (1982); van der Meer *et al., The Plant Cell 4*: 253 (1992). Los métodos antes descritos pueden usarse para sintetizar químicamente un promotor específico de anteras que tiene una secuencia publicada de nucleótidos.

Para seleccionar células transformadas, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable, tal como un gen de resistencia a herbicidas o un gen de resistencia a antibióticos. Por ejemplo, dichos genes pueden conferir resistencia a fosfinotricina, glifosato, sulfonilureas, atrazina, imidazolinona o antibióticos de aminoglicósidos, tales como neomicina, kanamicina y G428 (genticina). Preferiblemente, el gen marcador seleccionable es el gen de neomicina-fosfotransferasa (gen *npt*II).

El vector de expresión puede contener secuencias de cDNA que codifican una proteína extraña bajo el control de un elemento regulador específico de microesporas, así como un gen marcador seleccionable bajo el control de un promotor constitutivo. Alternativamente, el marcador seleccionable puede suministrarse a células hospedantes en un vector de expresión de selección separado por co-transformación con ambos vectores.

En un método alternativo, la esterilidad de machos puede inducirse mediante el uso de un vector de expresión en el cual el elemento regulador específico de microesporas está unido operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica un RNA antisentido. La unión de moléculas de RNA antisentido a moléculas de mRNA diana da como resultado en hibridación con detención de la traducción. Paterson, *et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 74*: 4370 (1987). Por tanto, una molécula de RNA antisentido adecuada podría tener una secuencia que es complementaria a la de una especie de mRNA que codifica una proteína que es necesaria para la función celular.

Por ejemplo, las moléculas de RNA antisentido pueden usarse para inhibir la traducción de los mRNA que codifican actina, tubulina, ubiquitina, enzima que se conjuga con ubiquitina, proteína transportadora de ubiquitina o factores de prolongación. Las moléculas de DNA que codifican dichos genes pueden usarse usando técnicas estándares. Por ejemplo, los genes de actina de plantas se describen en Shah *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79*: 1022 (1992) y en Baird *et al., EMBO J. 6*:3223 (1987). Los genes de tubulina de plantas se describen en Raha *et al., Plant Mol. Biol. 9*: 505(1987). Ludwig *et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 84:* 5833 (1987), y Yamada *et al., Plant Physiol. 103*: 1467 (1993). Los genes de ubiquitina de plantas han sido aislados por Gausing *et al., Eur. Biochem. 158*: 57 (1986) por Xia *et al., Plant Physiol. 104*: 805 (1994). Pramanik *et al., Plant Physiol. 102:* 1049 (1993), informan de la clonación de de la proteína portadora de ubiquitina de alfalfa, mientras que Picton *et al., Plant Physiol 103*: 1471 (1993), aislaron una enzima que se conjuga con ubiquitina de tomate. La clonación del factor de prolongación de cebada ha sido descrita por Sutton *et al., Plant Physiol. 104*: 807 (1994). Además, las moléculas de DNA que codifican genes útiles pueden utilizarse usando secuencias publicadas de nucleótidos, como se ha indicado anteriormente.

Además, las moléculas de RNA antisentido pueden ser dirigidas a los mRNA que codifican proteínas esenciales para el desarrollo de polen. Por ejemplo, la chalcona-sintasa (CHS) cataliza la etapa inicial en la biosíntesis de flavonoides, y una falta de actividad de CHS ha sido correlacionada con una función anormal del polen y/o del desarrollo. Coe *et al., J. Hered. 72*: 318 (1981); Taylor *et al., J. Hered. 83*:11 (1992); van der Meer *et al., The Plant Cell 4*: 253 (1992). Significativamente, el polen deficiente en flavonoides no funciona en los auto-cruzamientos. Taylor *et al., supra*. Por tanto, la esterilidad de machos puede ser inducida por la inhibición de la biosíntesis de flavonoides usando un vector de expresión que produzca RNA antisentido para la región 3' no traducida del gen A de la chalcona-sintasa. Van der Meer *et al., supra*. La clonación y caracterización del gen A de la chalcona-sintasa está descrita por Koes *et al., Gene 81*: 245 (1989) y por Koes *et al., Plant Molec. Biol. 12*: 213 (1989).

Alternativamente puede construirse un vector de expresión en el cual el elemento regulador específico de microesporas está unido operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una ribozima. Las ribozimas pueden diseñarse para expresar actividad de endonucleasa que está dirigida a una cierta secuencia diana en una molécula de mRNA. Por ejemplo, Steinecke *et al., EMBO J. 11*:1525 (1992), consiguieron hasta 100% de inhibición de la expresión del gen de la neomicina-fosfotransferasa gene por ribozimas en protoplastos de tabaco. Más recientemente, Perriman *et al., Antisense Research and Development 3*: 253 (1993), inhibieron la actividad de la cloramfenicol-acetil-transferasa en protoplastos de tabaco usando un vector que expresaba una ribozima del tipo cabeza de martillo modificada. En el contexto de la presente invención, las moléculas de DNA diana apropiadas para ribozimas incluyen especies de mRNA que codifican proteínas esenciales para la función de las microesporas, como se ha descrito antes.

En un método alternativo pueden construirse vectores de expresión en los cuales un elemento regulador específico de microesporas dirige la producción de moléculas de transcritos de RNA capaces de promover la escisión mediada por RNasa P de moléculas de mRNA diana. De acuerdo con este método, puede construirse una secuencia de guía externa para dirigir la ribozima endógena, RNasa P, a una especie particular de mRNA intracelular, que subsiguientemente es escindido por la ribozima celular. Altman *et al*., patente de EE.UU. nº 5.168.053. Yuan *et al., Science 263*, 1269 (1994). Preferiblemente, la secuencia de guía externa comprende una secuencia de diez a quince nucleótidos complementaria de una especie de mRNA que codifica una proteína esencial para la función de las microesporas, y una secuencia de nucleótidos 3'-NCCA, en donde N es preferiblemente una purina. *Id*. Los transcritos de la secuencia de guía externa se unen a las especies de mRNA diana por la formación de pares de bases entre el mRNA y las secuencias de guía externa complementarias, promoviendo así la escisión de mRNA por la RNasa P en el nucleótido localizado en el extremo 5' de la región de bases apareadas. *Id*.

Alternativamente, los genes antisentido, los genes de ribozima, y los genes de secuencias de guía externa pueden ser regulados por una combinación de un elemento regulador específico de microesporas y un promotor de un gen específico de anteras. Todas las microesporas de la planta transgénica no pueden expresar el gen extraño que interrumpe la función celular. Sin embargo, el Ejemplo 5 presenta evidencia de que el elemento regulador específico de microesporas del gen *Bnm1* también induce la expresión de un gen extraño en células tapetales, que son esenciales para el desarrollo de las microesporas. Por tanto, las secuencias reguladoras del gen *Bnm1* son particularmente adecuadas para asegurar esterilidad completa de machos.

No obstante, pueden idearse mecanismos adicionales para interrumpir la función de las microesporas que no expresan en el gen extraño. Por ejemplo, el gen extraño puede codificar una proteína que estimula la producción de una molécula difusible capaz de interrumpir la función de las microesporas viables. Un aumento en los niveles de ácido indol-3-acético por expresión del gen *roIB* o la producción de toxina de la difteria podría conseguir este objetivo. Además, el elemento regulador específico de microesporas del gen *Bnm1* puede estar unido operativamente a secuencias de DNA que codifican otras macromoléculas funcionalmente estables que pueden degradar microesporas, polen o sus componentes estructurales (por ejemplo, las paredes celulares). De este modo, las macromoléculas producidas en una

microespora se introducen en el lóculo (pequeña cavidad) circundante después de la degradación las microesporas, y actúan en otras microesporas o polen.

Este método es particularmente atractivo en el caso de heterozigotos en los que solamente el 50% de de los granos de polen en desarrollo expresan el gen interruptor. De nuevo, la función de las microesporas o granos de polen que no contienen el gen extraño podría ser interrumpida por la acción de macromoléculas liberadas desde microesporas o granos de polen que expresan el gen extraño. Puesto que el elemento regulador del gen *Bnm1* estimula la expresión del gen de un modo dependiente de tejidos, se pueden desarrollar normalmente los tejidos restantes de la planta estéril.

Finalmente, puede construirse un vector de expresión en el cual la expresión del gen extraño está controlada por un elemento regulador del gen *Bnm1* y un promotor específico de anteras, como se ha indicado anteriormente.

B. *Restablecimiento de la fertilidad en machos en los híbridos F1*

Los métodos antes descritos pueden usarse para producir plantas transgénicas machos estériles para la producción de híbridos F1 en cruzamientos dirigidos a gran escala entre líneas endógamas. Si todas las células gametos machos de las plantas transgénicas machos estériles no contienen el gen extraño que interrumpe la función de las microesporas, entonces una proporción de los híbridos F1 tendrá un fenotipo macho-fértil. Por otro lado, los híbridos F1 tendrán fenotipo de machos estériles si el gen extraño está presente en todas las células gametos machos de las plantas transgénicas machos estériles debido a que sería dominante la esterilidad inducida por el gen extraño. Además, los híbridos F1 tendrán fenotipos de machos estériles si la expresión del gen extraño da como resultado la interrupción de las células vecinas. Por tanto, es deseable usar un sistema de restablecimiento de la fertilidad de machos para proporcionar la producción de híbridos F1 machos fértiles. Dicho sistema de restablecimiento de la fertilidad tiene un valor particular cuando se siembra el producto cosechado.

Un método para el restablecimiento de la fertilidad sería cruzar plantas transgénicas machos estériles con plantas transgénicas machos fértiles que contienen un gen de restablecimiento de la fertilidad bajo el control de un elemento regulador específico de microesporas de la invención. Por ejemplo, el gen de restablecimiento de la fertilidad puede codificar una proteína especificamente dianizada para el producto del gen interruptor celular. Como una ilustración, Mariani *et al., Nature 357*: 384 (1992), cruzaron plantas machos-fértiles que expresaban un inhibidor de barnasa en células de anteras, denominado "*barstar*", con plantas machos estériles que expresaban barnasa en las células de anteras. Hartley, *J. Mol.. Biol. 202*: 913 (1988), describe la secuencia de nucleótidos de *barstar*.

Alternativamente, el gen de restablecimiento de la fertilidad puede usarse para producir moléculas de RNA que están dianizadas para los mRNA que codifican la proteína interruptora celular. Por ejemplo, el restablecimiento de la fertilidad de machos puede conseguirse expresando ribozimas de la toxina de la difteria o RNA antisentido en plantas machos-fértiles para neutralizar los efectos de la toxina de la difteria en plantas machos-estériles. Por tanto, la fertilidad de machos puede restablecerse en los híbridos F1 produciendo una planta transgénica macho-fértil que sintetiza una especie particular de molécula de RNA o polipéptido para contrarrestar los efectos del gen extraño particular expresado en las plantas transgénicas machos estériles.

En un método alternativo, la fertilidad de machos puede restablecerse por aplicación de un compuesto químico. Como se ha analizado antes, la esterilidad de machos puede inducirse bloqueando la expresión de chalcona-sintasa para inhibir la biosíntesis de flavonoides. La aplicación de flavonol-agliconas puede usarse para complementar el defecto bioquímico y restablecer la función del polen. Mont *et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89*: 1713 (1992); Vogt *et al., The Plant Cell 6*: 11(1994). Las flavonol-agliconas preferidas, tal como kaempferol, tiene un enlace insaturado entre los carbonos de las posiciones dos y tres en el anillo de C del esqueleto de flavonoides, así como un grupo hidroxilo no sustituido en la posición tres del anillo C. Vogt *et al., supra*.

5. *Uso de un elemento regulador específico de microesporas para inhibir enfermedades de plantas*

Otro objeto de la presente invención es proporcionar medios para controlar enfermedades causadas por plagas. En particular, la presente invención abarca la producción de plantas transgénicas que comprende, vectores de expresión en los cuales las secuencias reguladoras del gen *Bnm1* estimulan la expresión de macromoléculas útiles para defensa contra virus e insectos.

Aproximadamente 20% de los virus de plantas se transmiten de generación en generación en las semillas. Matthews, PLANT VIROLOGY, 3rd Edition, (Academic Press, Inc. 1991); Mink, *Ann. Rev. Phytopathol. 31*: 375 (1993). La transmisión por las semillas se consigue ya sea por invasión directa del embrión o ya sea por una invasión indirecta del embrión mediante los gametos infectados. De acuerdo con Mink, *supra*, hay al menos nueve virus que parecen extenderse planta a planta a través del polen, y al menos cuatro viroides que se transmiten a través del polen a las semillas y plantas hembras. Por tanto, el elemento regulador especifico de microesporas del gen *Bnm1* se puede usarpara inhibir la transmisión de estos virus y viroides.

En un método para conferir protección contra infecciones virales se usa un elemento regulador del gen *Bnm1* para estimular la expresión de una proteína viral de cubierta. La acumulación de proteínas virales de cubierta en células de plantas transformadas proporciona resistencia a la infección viral y/o al desarrollo de enfermedades por el virus del cual se derivó el gen de la proteína de cubierta, así como por virus relacionados. Véase Beachy *et al.,*

Ann. Rev. Phytopathol. 28:451 (1990); Beachy, "*Virus Resistance Through Expression of Coat Protein Genes,*" en BIOTECHNOLOGY IN PLANT DISEASE CONTROL, 3rd Edition, Chet (Ed.), pp. 89-104 (Wiley-Liss, Inc. 1993). Por ejemplo, la resistencia mediada por proteínas de cubierta ha sido conferida por plantas transformadas contra el virus del mosaico de la alfalfa, virus del mosaico del tabaco, virus de bandas del tabaco, virus X de la patata, virus Y de la patata, virus *etch* del tabaco, virus *rattle* del tabaco, y virus del mosaico del tabaco. *Id*.

Alternativamente, la protección contra enfermedades virales puede conseguirse usando un vector que comprende 2',5'-oligoadenilato-sintetasa de mamíferos unido operativamente a un elemento regulador específico de microesporas. Truve *et al., Biol, Technology 11*: 1048 (1993), describe la clonación y secuencia de nucleótidos de un cDNA que codifica 2',5'-oligoadenilato-sintetasa de ratas, un componente de la respuesta antiviral inducida por interferón en mamíferos. Truve *et al*., también describen que las plantas transgénicas que expresan 2',5'-oligoadenilato-sintetasa están protegidas contra la infección viral en las condiciones de campo.

En un tercer método para proporcionar protección contra la infección viral se usa un elemento regulador específico de microesporas de la presente invención para dirigir la expresión del RNA antisentido del genoma viral. Por ejemplo, el RNA antisentido puede usarse para conferir resistencia al virus del mosaico del pepino, como se describe por Rezaian *et al., Plant Molec. Biol. 11:* 463 (1988). Alternativamente, el RNA antisentido puede usarse para conferir resistencia contra el virus del mosaico de tomate, como se describe por Day *et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. 88*: 6721 (1991).

En un cuarto método para proporcionar protección contra infecciones virales, se usa un elemento regulador específico de microesporas para dirigir expresión de proteína antiviral de fitolaca (PAF), una proteína inhibidora del ribosoma encontrada en las paredes celulares de *Phytolacca americana*. Lodge *et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90*:7089 (1993), mostraron que las plantas transgénicas que expresan PAF son resistentes a un amplio espectro de virus de plantas. Lodge *et al*. también describen un método para aislar cDNA de PAF.

La presente invención también contempla el uso de un elemento reguladordel gen *Bnm1* para proporcionar protección contra plagas de insectos, tales como thrips (pequeño insecto chupador) y los artrópodos que se alimentan de polen del orden *Thysanoptera*. De acuerdo con este método se usa un elemento regulador del gen *Bnm1* para estimular la expresión de genes de toxinas insecticidas. Por ejemplo, la bacteria gram-positiva *Bacillus thuringiensis* produce polipéptidos que son tóxicos para una variedad de plagas de insectos, pero no tienen actividad contra vertebrados e insectos beneficiosos. Thompson, "*Biological Control of Plant Pests and Pathogens: Alternative Approaches*" en BIOTECHNOLOGY IN PLANT DISEASE CONTROL, Chet (ed.), pp. 275-290 (Wiley-Liss, Inc. 1993). Las toxinas adecuadas de *Bacillus thuringiensis* incluyen cry/A δ-endotoxinas que son altamente tóxicas para insectos lepidópteros y *cryIIIA* δ-endotoxinas que son altamente tóxicas para insectos coleópteros.

Geiser *et al., Gene 48*: 109 (1986), describe la clonación y secuencia de nucleótidos de un gen de la *cry/A (b)* δ-endotoxina. La transformación de plantas con vectores que comprende un gen de la *cry/A(b)* δ-endotoxin ha sido descrita por Williams *et al., Biol. Technology 10*: 540 (1992), Koziel *et al., Biol. Technology 11*: 194 (1993), y Fujimoto *et al., Biol. Technology 11*: 1151 (1993). Lereclus *et al., Bio/Technology 10*: 418 (1992), describen la construcción de un plásmido que comprende genes estructurales que codifican cry/11A y *cry/Ac*. Además, Adang *et al., Plant Molec. Biol. 21*: 1131 (1993), describen la secuencia de nucleótidos de un gen cryIIIA sintético que se diseñó para la expresión óptima en células de plantas. Además, las moléculas de DNA que codifican genes de δ-endotoxinas pueden adquirirse a American Type Culture Collección (Rockville, MD), con los números de acceso ATCC. 40098, 67136, 31995 y 31998.

Como una ilustración, el perforador del maíz europeo, *Ostrinia nubilalis*, es una plaga principal del maíz en América del Norte y Europa. Después de incubar, las larvas del perforador del maíz de la mayor parte de la segunda prole de neonatos alimentadas sobre el polen se acumula en las axilas de las hojas y en la vaina y los tejidos del cuello. Una vez que las larvas empiezan a alimentarse dentro del cuello, están protegidas de los efectos de los plaguicidas químicos. Koziel *et al., supra*, demostraron que las plantas de maíz transgénicas que expresan el gen cry/A *(b)* fueron resistentes a infestaciones repetidas e intensas del perforador del maíz.

La lista siguiente proporciona otras toxinas insecticidas conocidas que son adecuadas para la expresión específica de microesporas.

(1) Una proteína fijadora de vitamina, tal como avidina. Véase la solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 07/911864, que enseña el uso de avidina y homólogos de avidina como larvicidas contra plagas de insectos.

(2) Un inhibidor enzimático, por ejemplo, un inhibidor de proteasa o un inhibidor de amilasa. Véase, por ejemplo, Abe *et al., J. Biol. Chem. 262*: 16793 (1987) (secuencia de nucleótidos del inhibidor de cisteína-proteinasa del arroz), Huub *et al., Plant Molec. Biol. 21*: 985 (1993) (secuencia de nucleótidos de cDNA que codifica el inhibidor I de la proteinasa del tabaco), y Sumitani *et al., Biosci. Biotech. Biochem. 57*:1243 (1993) (secuencia de nucleótidos del inhibidor de α-amilasa de *Streptomyces nitrosporeus*).

(3) Una hormona o feromona específica de insectos, tal como un ecdyesteroide y hormona juvenil, una de sus variantes, una base mimética basada sobre ella o uno de sus antagonistas o agonistas. Véase, por ejemplo, la descripción de Hammock *et al., Nature 344*: 458 (1990) de la expresión de baculovirus de la hormona esterasa juvenil clonada, un inactivador de la hormona juvenil.

(4) Un péptido o neuropéptido específico de insectos que, por expresión, interrumpe la fisiología de la plaga afectada. Por ejemplo, véanse las descripciones de Regan, *J. Biol. Chem. 269*: 9 (1994) (la clonación de la expresión proporciona DNA que codifica el receptor de la hormona diurética de insectos), y Pratt *et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 163*: 1243 (1989) (se identifica una alostatina en *Diploptera puntata*). Véase también la patente de EE.UU. Nº 5.266.317 de Tomalski *et al*., que describe genes que codifican neurotoxinas paralizantes específicas de insectos.

(5) Un veneno específico de insectos producido en la naturaleza por una serpiente, una avispa, etc. Por ejemplo, véase Pang *et al., Gene 116*: 165 (1992), para la descripción de expresión heteróloga en plantas de un gen que codifica un péptido de escorpión tóxico para los insectos.

(6) Una enzima responsable de una hiperacumulación de un monoterpeno, un sesquiterpeno, un esteroide, ácido hidroxámico, un derivado fenilpropanoide u otra molécula no proteína con actividad insecticida.

(7) Una enzima implicada en la modificación, incluyendo la modificación post-traduccional de una molécula biológicamente activa; por ejemplo, una enzima glicolítica, una enzima proteolítica, una enzima lipolítica, una nucleasa, una ciclasa, una transaminasa, una esterasa, una hidrolasa, unafosfatasa, una quinasa, una fosforilasa, una elastasa, una quitinasa y una gluglucanasa, tanto natural como sintética. Véase la solicitud de patente PCT WO 93/02197 a nombre de Scott *et al*., que describe la secuencia de nucleótidos de un gen de calasa. Las moléculas de DNA que contienen secuencias que codifican quitinasa se pueden obtener, por ejemplo, en ATCC Números de acceso 39637 y 67152. Véase también Kramer *et al., Insect Biochem. Molec. Biol. 23*: 691 (1993), que enseña la secuencia de nucleótidos de un cDNA que codifica quitinasa de la lombriz del tabaco, y Kawalleck *et al., Plant Molec. Biol. 21*: 673 (1993), que proporcionan la secuencia de nucleótidos del gen de la ubi4-2 poliubiquitina del perejil.

(8) Una molécula que estimule la transducción de señales, por ejemplo, véase la descripción de Botella *et al., Plant Molec. Biol. 24*: 757 (1894) de la secuencia de nucleótidos para clones de cDNA de calmodulina de habichuela, y Griess *et al., Plant Physiol. 104*: 1467 (1994), que proporciona la secuencia de nucleótidos de un clon de cDNA de calmodulina de maíz.

(9) Un anticuerpo específico de insectos o una inmunotoxina derivada del mismo. Por tanto, un anticuerpo dianizado para una función metabólica crítica en el intestino de insectos inactivaría una enzima afectada, matando al insecto. Compárese con Taylor *et al*., Abstract Nº 497, SEVENTH INT'L SYMPOSIUM ON MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS (1994) (inactivación enzimática en tabaco transgénico mediante la producción de fragmentos de anticuerpos monocatenarios).

La presente invención, descrita así de un modo general, se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Ejemplo 1

Construcción y escrutinio de una genoteca de cDNA de microesporas de Brassica napus

Se cultivaron microesporas de *Brassica napus* cv Topas, mononucleadas tardías/binucleadas tempranas, durante cuatro días a 32,5ºC para inducir embriogénesis. Se aisló RNA de Poli(A)$^+$ de las microesporas usando un método con isotiocianato de guanidinio como se describe en Ouellet *et al., Plant Journal 2*: 321 (1992). Se sintetizó cDNA bicatenario a partir de RNA de poli(A) usando el sistema de síntesis de cDNA Riboclone® (Promega Corp.; Madison, WI) y se clonó en el vector de clonación LambdaGEM®-4 (Promega Corp.).

La genoteca de cDNA se escrutó diferencialmente para clones específicos de microesporas sondando tomas por duplicado con RNA de microesporas marcado con ^{32}P usado para la construcción de la genoteca (Mi-RNA) o con RNA marcado ^{32}P de microesporas sometidas a 25ºC durante 24 horas y luego a 32ºC durante tres días para eliminar la respuesta embriógena (Mx-RNA). Se purificaron y luego se caracterizaron tres clones de cDNA (Mi-cDNA 3, 4 y 5) que se hibridaron con Mi-RNA, pero no con Mx-RNA.

Una transferencia Southern de cada clon de cDNA aislado se hibridó con sondas de cDNA marcadas con ^{32}P que representan la genoteca de DNA total de microesporas. Los brazos de DNA del promotor napin y del vector lambda se incluyeron en la transferencia como controles negativos. Tanto Mi-cDNA 3 como Mi-cDNA 4 se hibridaron con la sonda de cDNA total y se encontró que contenían insertos de aproximadamente 800 pares de bases. El análisis de la secuencia de nucleótidos reveló que Mi-cDNA 3 y Mi-cDNA 4 eran idénticos, y probablemente contenían insertos de cDNA de longitud completa debido a que ambos cDNA terminaban en el mismo nucleótido. El clon de cDNA específico de microesporas se designó *Bnm1*. En la Figura 1 se muestra la secuencia de nucleótidos del cDNA de *Bnm1* [SEQ ID NO: 1] con su correspondiente secuencia de aminoácidos [SEQ ID NO: 2].

Ejemplo 2

Análisis Northern con sonda de cDNA de Bnm1

Se realizaron análisis Northern para caracterizar el modelo de expresión del gen *Bnm1*. Estos estudios revelaron que el cDNA de *Bnm1* se hibridaba con RNA de brotes enteros, flores y anteras, pero no se hibridaba con RNA aislado de raíces, tallos, hojas, pistilos y semillas en desarrollo. La expresión de RNA de *Bnm1* fue muy fuerte en microesporas trinucleadas y binucleadas pero estaba esencialmente ausente en las fases mononucleadas y de tetradas del desarrollo de microesporas. Los resultados de los análisis Northern también indican que el RNA de *Bnm1* se expresa en una mayor extensión en todo el desarrollo de las microesporas, en comparación con los clones específicos de microesporas *Bp4, Bp10* y *Bp19* de *Brassica*. Albani *et al., Plant Molecular Biology 15*: 605 (1990); Albani *et al., Plant Molecular Biology 16*: 501 (1991); Albani *et al., The Plant Journal 2*: 331 (1992).

Para caracterizas más el clon *Bnm1*, se cultivaron microesporas mononucleadas a 32,5ºC durante cuatro días para inducir la embriogénesis o bien se cultivaron a 24ºC durante cuatro días para permitir el desarrollo del polen. Los embriones de microesporas se aislaron en las fases o estados de desarrollo globular, torpedo, corazón y cotiledonal. Los análisis Northern de las muestras de RNA revelaron bajos niveles de expresión del gen *Bnm1* en microesporas inducidas a embriogénesis con niveles marcadamente mayores de expresión en microesporas inducidas por polen. Las muestras de RNA de las fases o estados de desarrollo globular, torpedo, corazón y cotiledonal no se hibridaban con la sonda de *Bnm1*.

Ejemplo 3

Análisis Southern con sonda de cDNA de Bnm1

Las hibridaciones para el análisis Southern y el escrutinio genómico, analizadas más adelante, se realizaron a 42ºC usando la siguiente mezcla de hibridación: formamida al 50%, solución de Denhardt 10x: (100x: 10 gramos de polivinilpirrolidona, 10 gramos de seroalbúmina y 10 gramos de Ficoll 400 en 500 mililitros de agua estéril), tampón 5x SSC (20x: cloruro de sodio 3M y citrato de $Na_3..2H_2O$ 0,3M, pH 7,0), fosfato sódico 50 mM (pH 7,0), dodecil-sulfato sódico al 1%, y 5 mg/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado. Las transferencias se lavaron usando requisitos muy estrictos (0,1x SSC, 65ºC) y luego se incubaron con una película de rayos X para diverso periodos de tiempo con el fin de obtener la exposición óptima.

En una serie de experimentos se sondó *Bnm1* contra una transferenciaSouthern de muestras de DNA obtenidas de *B. campestris cv Candle, B. napus cv Topas, B. oleracea alboglabra*, picea negro, *Arabidopsis thaliana*, girasol, tabaco, cebada y maíz. Los resultados que indican que el gen *Bnm1* está presente en picea negro, cebada, y las crucíferas, pero no en girasol, tabaco o maíz.

Ejemplo 4

Aislamiento del clon Bnm1 genómico

Se construyó una genoteca genómica de *Brassica napus* digeriendo parcialmente DNA genómico de *B. napus* cv Westar con *Sau*3Ae insertándolos fragmentos de DNA (tamaño medio del inserto aproximadamente 8 kilobases) en el sitio SAII parcialmente hueco-lleno del plásmido TZ18R. Mead *et al., Protein Eng. 1*: 67 (1986); Nantel *et al., Plant Molecular Biology 16*: 955 (1991). Siguiendo el método de Nantel *et al., supra*, la genoteca se recogió en 42 fracciones, una parte alícuota de cada fracción se digerió con *Eco*RI, y los productos de digestión con *Eco*RI se examinaron por análisis Southern para identificar que fracción(es) contenía(n) clones genómicos correspondiente a cDNa de *Bnm1*.

Se escrutaron aproximadamente 10.000 colonias de cada fracción que se hibrida positivamente con filtros Hybond-N (Amersham Corp.; Arlington Heights, IL) usando una sonda de cDNA marcado con cebador al azar de ^{32}P-dCTP. Las colonias hibridantes se cultivaron por duplicado sobre placas de ensayo de rejilla de colonias para escrutinio secundario. Los positivos potenciales se tomaron a través de un escrutinio terciario final para aislar colonias positivas individuales. Después de la tercera ronda de escrutinio se identificaron cinco clones que mostraban señales positivas fuertes.

Se generaron mapas de restricción para cinco clones genómicos positivos usando como sonda el cDNA del gen *Bnm1* completo. Los resultados de estos estudios sugieren que tres de los cinco clones representaban el mismo fragmento genómico. Uno de estos tres clones más los dos clones restantes (*Bnm1*-5, 8 y 31) se caracterizaron adicionalmente. La cartografía por restricción y el análisis Southern eliminó *Bnm1*-5 como clon genómico útil.

Se determinaron las longitudes de la región aguas arriba (hacia el extremo 5') en *Bnm1*-8 y *Bnm1*-31 sintetizando los siguientes oligonucleótidos para amplificar el extremo 5' del gen *Bnm1* cuando se usa en combinación con cualquiera de los cebadores de secuenciación universales o inversos:

MSP-1 [SEQ ID NO: 3]:



MSP-2 [SEQ ID NO: 4]:



MSP-1 y MSP-2 se diseñaron para generar fragmentos que difieren en tamaño en aproximadamente 230 pares de bases. Los cebadores se asociaron a 65ºC en tampón 1x de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Perkin Elmer Corp.; Norwalk, CT) que contenía $MgCl_2$ 2,5 mM.

Se amplificaron dos bandas, 2,7 kilobases y 3,2 kilobases, a partir de *Bnm1*-8 usando los cebadores MSP-1 y MSP-2, respectivamente en combinación, con el cebador de secuenciación inversa. La diferencia inesperada de 500 pares de bases en el tamaño se pensó que era debida a la presencia de un intrón. Se secuenció la región codificadora del clon genómico clone y se confirmó la presencia de un solo intrón de 361 pares de bases. La Figura 2 muestra la secuencia de nucleótidos [SEQ ID NO: 5] del clon genómico *Bnm1* con regiones aguas arriba y codificadora.

Para determinar la secuencia de nucleótidos de los fragmentos de la PCR, cada fragmento se digerió con *Eco*RI y un fragmento de 1,3 kilobases se subclonó enel sitio *Eco*RI-*Hinc*II de pTZ18R. Las moléculas de DNA ligadas se introdujeron en la cepa de *E. coli* DH5αMCR-. Los fragmentos de PCR subclonados se secuenciaron usando un kit Sequenase (United States Biochemical Corp.; Cleveland, OH) que usa el protocolo de terminación de cadena mediado por didesoxi de Sanger *et al. J. Mol. Biol. 94*: 441 (1975).

Se encontró que los fragmentos de PCR contenían solo 535 pares de bases de la secuencia 5' aguas arriba no traducida. Luego se subclonó un fragmento *Pvu*II-*Bam*HI de 2,95 kilobases del clon genómico *Bnm1* original para obtener secuencias adicionales aguas arriba. Se usó recorrido del cebador para secuenciar un total de 820 bases de la supuesta región promotora.

Ejemplo 5

Transformación y análisis de transgénicos de canola

Para examinar la función del promotor del gen *Bnm1*, se diseñó el siguiente conjunto de cebadores de PCR para añadir un sitio *Sal*I en el extremo 5' del promotor introducir un sitio *Nco*I en el codón ATG:

MSP-8 [SEQ ID NO: 6]:



MSP-7 [SEQ ID NO: 7]:



El cebador MSP-6 consiste en 23 nucleótidos de la región 5' aguas arriba partiendo del nucleótido -820 y también incluye un sitio *Sal*I aguas arriba para facilitar la clonación. El cebador MSP-7 consiste en 23 nucleótidos que flanquean el codón de iniciación ATG y se diseñó para crear por ingeniería genética un sitio *Nco*I en el codón de iniciación del gen *Bnm1*. MSP-7 también incluye un sitio *Xba*I para facilitar la clonación.

Usando estos cebadores se amplificó, clonó y secuenció un fragmento de 844 pares de bases. El fragmento de DNA incluía 820 pares de bases de la región promotora situada directamente aguas arriba del sitio de iniciación ATG del gen *Bnm1*. La secuencia de nucleótidos [SEQ ID NO: 8] del fragmento de 844 pares de bases se muestra en la Figura 3.

El fragmento promotor se digerió con *Nco*I-*Sal*I, se ligó a un fragmento *Nco*I-*Eco*RI que contenía un gen informador GUS y la región 3' no traducida (terminador) de un gen inhibidor de proteinaza de patata (PINII), y se clonó en sitios *Sal*I-*Eco*RI de ambos pBluescript® II SK+ (Stratagene Cloning Systems; La Jolla, *CA*)yDP1741 para producir los vectoresDP5476 (Figura 4) y DP5477 (Figura 5), respectivamente. DP1741 difiere de pBI101.1 (Jefferson, *Plant Molecular Biology Reporter 5*: 387 (1987) por contener las secuencias reguladoras de CaMV 35S, en lugar de las secuencias reguladoras 5' y 3' de la nopalina-sintasa, para regular la expresión del marcador seleccionable NPTII.

La construcción binaria DP5477 se transformó en *B. napus cv Westar* mediante co-cultivo mediado por *Agrobacterium* de peciolos cotiledóneos usando la metodología general de Moloney *et al., Plant Cell Reports 8*: 238 (1889). Se encontró que las microesporas aisladas de tres de cada cuatro transgénicos de canola analizadas para actividad de GUS estaban intensamente teñidas, mientras que la cuarta exhibía una ligera tinción azul. La expresión de GUS parece estar localizada principalmente en las microesporas puesto que no se tiñeron otros tejidos incluyendo paredes de las anteras, pistilos y sépalos. Sin embargo, la matriz dentro de los lóculos estaba teñida de azul indicando que en ellos puede haber algo de expresión tapetal. La mayoría de la expresión de GUS parece estar asociada con microesporas mononucleadas y binucleadas, y es probable que la expresión sea post-meiótica, debido a que no estaban manchadas el 25 al 50% de las microesporas.

Aunque la descripción anterior se refiere a realizaciones preferidas particulares, ha de entenderse que la presente invención no está limitada a las mismas. A los expertos con conocimiento ordinario de la técnica se les ocurrirá que pueden hacerse diversas modificaciones de las realizaciones descritas.

Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en esta memoria son indicactivas del nivel de conocimiento de los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de DNA que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

(a) SEQ ID NO:8;

(b) una secuencia de nucleótidos con al menos 65% de similitud con la SEQ ID NO:8, en donde dicha secuencia de nucleótidos tiene la función de un elemento regulador específico de microesporas; y

(c) un fragmento de la secuencia de nucleótidos de (a), en donde dicho fragmento tiene la función de un elemento regulador específico de microesporas.

2. La molécula de DNA de la reivindicación 1, en donde dicha molécula de DNA consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:8.

3. Un vector de expresión que comprende un elemento regulador específico de microesporas de la reivindicación 1 ó 2.

4. El vector de expresión de la reivindicación 3, que comprende además un promotor, en donde la función de dicho promotor está bajo el control de dicho elemento regulador específico de microesporas.

5. El vector de expresión de la reivindicación 4, en donde dicho promotor se selecciona del grupo que consiste en el promotor del gen *Bnm1*, un promotor específico de anteras y el promotor de núcleo CaMV 35S.

6. El vector de expresión de la reivindicación 4 ó 5, que comprende además un gen extraño, en donde dicho gen extraño está unido operativamente a dicho promotor.

7. El vector de expresión de la reivindicación 6, en donde el producto de dicho gen extraño interrumpe la función de las microesporas.

8. Un método de producir una planta macho estéril, que comprende la etapa de introducir el vector de expresión de la reivindicación 7 en células embriónicas de planta, en donde dicho gen extraño se selecciona del grupo que consiste en un gen estructural, un gen antisentido, un gen de ribozima y un gen de una secuencia de guía externa.

9. El método de la reivindicación 8, en donde dicho gen estructural codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en toxina de la difteria, proteína antiviral de fitolaca, RNasa-T1 de *Aspergillus oryzae*, barnasa y el producto del gen *rolB*.

10. El método de la reivindicación 8, en donde el producto de dicho gen antisentido se selecciona del grupo que consiste en: RNA antisentido de actina, RNA antisentido de tubulina, RNA antisentido de ubiquitina, RNA antisentido de la enzima que se conjuga con ubiquitina, RNA antisentido de la proteína portadora de ubiquitina, RNA antisentido de factor de prolongación y RAN antisentido de chalcona-sintasa.

11. El método de la reivindicación 8, en donde dicho gen de ribozima comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: secuencias de nucleótidos de actina, secuencias de nucleótidos de tubulina, secuencias de nucleótidos de ubiquitina, secuencias de nucleótidos de una enzima que se conjuga con ubiquitina, secuencias de nucleótidos de la proteína portadora de ubiquitina; secuencias de nucleótidos del factor de prolongación y secuencias de nucleótidos de chalcona-sintasa.

12. El método de la reivindicación 8, en donde dicho gen con secuencia de guía externa comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos de actina, secuencias de nucleótidos de tubulina, secuencias de nucleótidos de ubiquitina, secuencia de nucleótidos de una enzima que se conjuga con ubiquitina, secuencia de nucleótidos de la proteína portadora de ubiquitina, secuencia de nucleótidos de factor de prolongación y secuencia de nucleótidos de chalcona-sintasa.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en donde dichas células embriógenas de planta son células de *Brassica napus*.

14. Una planta transgénica que comprende el vector de expresión de la reivindicación 7.

15. Un método de producir un planta estéril macho, que comprende:

(a) construir un vector de expresión que comprende un elemento regulador específico de microesporas, un promotor, y un gen extraño, en donde dicho elemento regulador específico de microesporas comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

(i) SEQ ID NO: 8,

(ii) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 65% de similitud de secuencia con la SEQ ID NO: 8, en donde dicha secuencia de nucleótidos tiene la función de un elemento regulador específico de microesporas; y

(iii) un fragmento de (i), en donde dicho fragmento tiene la función de un elemento regulador específico de microesporas,

en donde dicho elemento regulador específico de microesporas en conjunción con dicho promotor controla la expresión de dicho gen extraño, y en donde el producto de dicho gen extraño interrumpe la función de las microesporas, con lo cual se produce una planta macho estéril.

16. El método de la reivindicación 15, que comprende además la etapa de:

(b) introducir dicho vector de expresión en células embriógenas de plantas.

17. Un método de usar un elemento regulador específico de microesporas para producir una planta fértil macho híbrida, que comprende:

(a) producir una primera planta parental macho estéril que comprende un vector de expresión que comprende un elemento regulador específico de microesporas de la reivindicación 1 ó 2, un promotor, y un primer gen extraño, en donde dicho elemento regulador específico de microesporas en conjunción con dicho promotor controla la expresión de dicho primer gen extraño, y en donde el producto de dicho primer gen extraño interrumpe la función de las microesporas;

(b) producir una segunda planta precursora que comprende un vector de expresión que comprende dicho elemento regulador específico de microesporas, un promotor y un segundo gen extraño, en donde dicho elemento regulador específico de microesporas en conjunción con dicho promotor controla la expresión de dicho segundo gen extraño; y

(c) someter a fertilización cruzada a dicha primera planta precursora con dicha segunda planta precursora para producir una planta híbrida,

en donde las microesporas de dicha planta híbrida expresan dicho segundo gen extraño, y en donde el producto de dicho segundo gen extraño impide la interrupción de la función de las microesporas por el producto de dicho primer gen extraño, produciendo de este modo una planta híbrida macho fértil.

18. El método de la reivindicación 17, en donde dicho primer gen extraño codifica barnasa y dicho segundo gen extraño codifica un inhibidor de barnasa.

19. El método de la reivindicación 17, en donde dicho producto de dicho primer gen extraño es toxina de la difteria y dicho producto de dicho segundo gen extraño es una ribozima de la toxina de la difteria.

20. Un método para restablecer la fertilidad de una planta macho estéril híbrida, que comprende tratar la planta macho estéril híbrida con flavonol-aglicona, en donde dicha planta macho estéril híbrida comprende un vector de expresión que comprende: un elemento regulador específico de microesporas, un promotor, y un gen extraño, en donde dicho elemento regulador específico de microesporas comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

(a) SEQ ID NO:8;

(b) una secuencia de nucleótidos con al menos 65% de similitud con la SEQ ID NO:8, en donde dicha secuencia de nucleótidos tiene la función de un elemento regulador específico de microesporas; y

(c) un fragmento de (a), en donde dicho fragmento tiene la función de un elemento regulador específico de microesporas,

en donde dicho elemento regulador específico de microesporas en conjunción con dicho promotor controla la expresión de dicho gen extraño, y en donde dicho gen extraño expresa RNA antisentido de chalcona-sintasa, produciendo de este modo microesporas deficientes en flavonol.

21. El método de la reivindicación 20, en donde dicha flavonol-aglicona es kaempferol.

22. Un método para producir plantas transgénicas resistentes a enfermedades causadas por virus o insectos, que comprende:

(a) construir un vector de expresión que comprende un elemento regulador específico de microesporas, un promotor, y un gen extraño, en donde dicho elemento regulador específico de microesporas comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

(i) SEQ ID NO: 8,

(ii) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 65% de similitud de secuencia con la SEQ ID NO: 8, en donde dicha secuencia de nucleótidos tiene la función de un elemento regulador específico de microesporas; y

(iii) un fragmento de (i), en donde dicho fragmento tiene la función de un elemento regulador específico de microesporas,

en donde dicho elemento regulador específico de microesporas en conjunción con dicho promotor controla la expresión de dicho gen extraño, y en donde el producto de dicho gen extraño interrumpe la función de dicho virus o codifica una toxina insecticida, con lo cual confiere resistencia a enfermedades.

23. El método de la reivindicación 22, que comprende además la etapa de:

(b) introducir dicho vector de expresión en células embriógenas de plantas .

24. El método de la reivindicación 22 ó 23, en donde dicho producto de gen extraño interruptor de virus se selecciona del grupo que consiste en proteína de cubierta viral, 2',5'-oligoadenilato-sintetasa, RNA antisentido de genoma viral y proteína antiviral de fitolaca.

25. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, en donde dicha toxina insecticida es una endotoxina de *Bacillus thuringiensis*.

FIG. 1

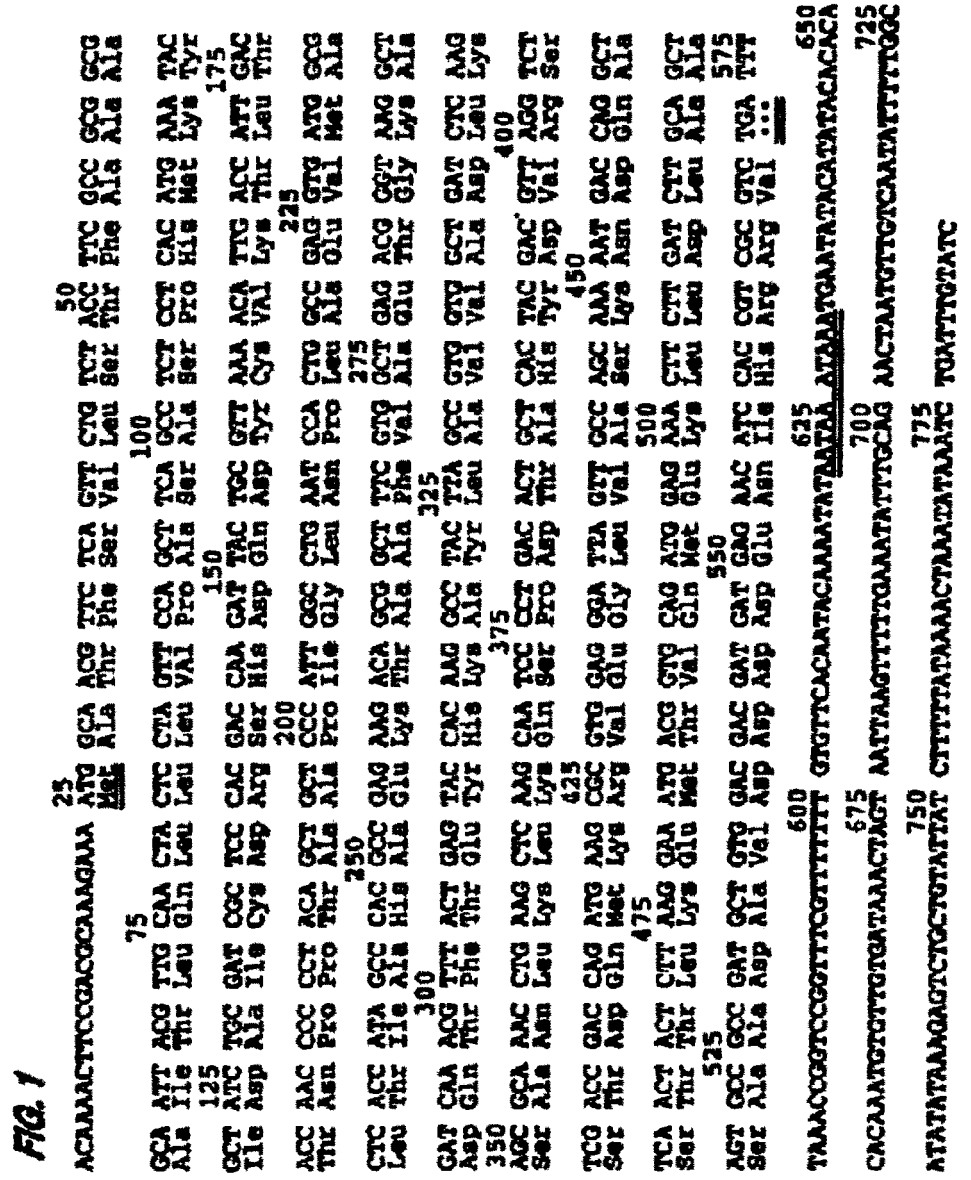


FIG. 2

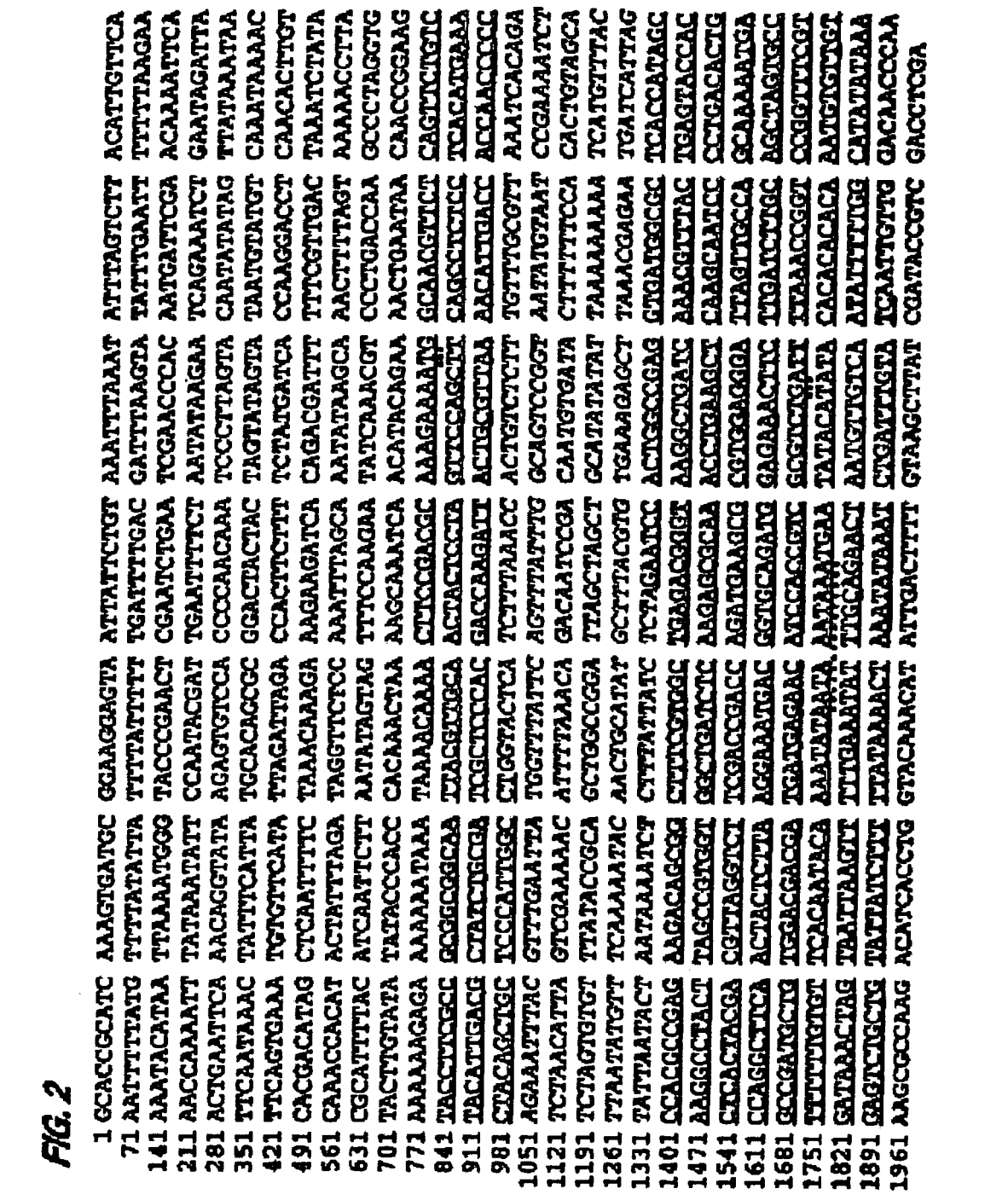


FIG. 3

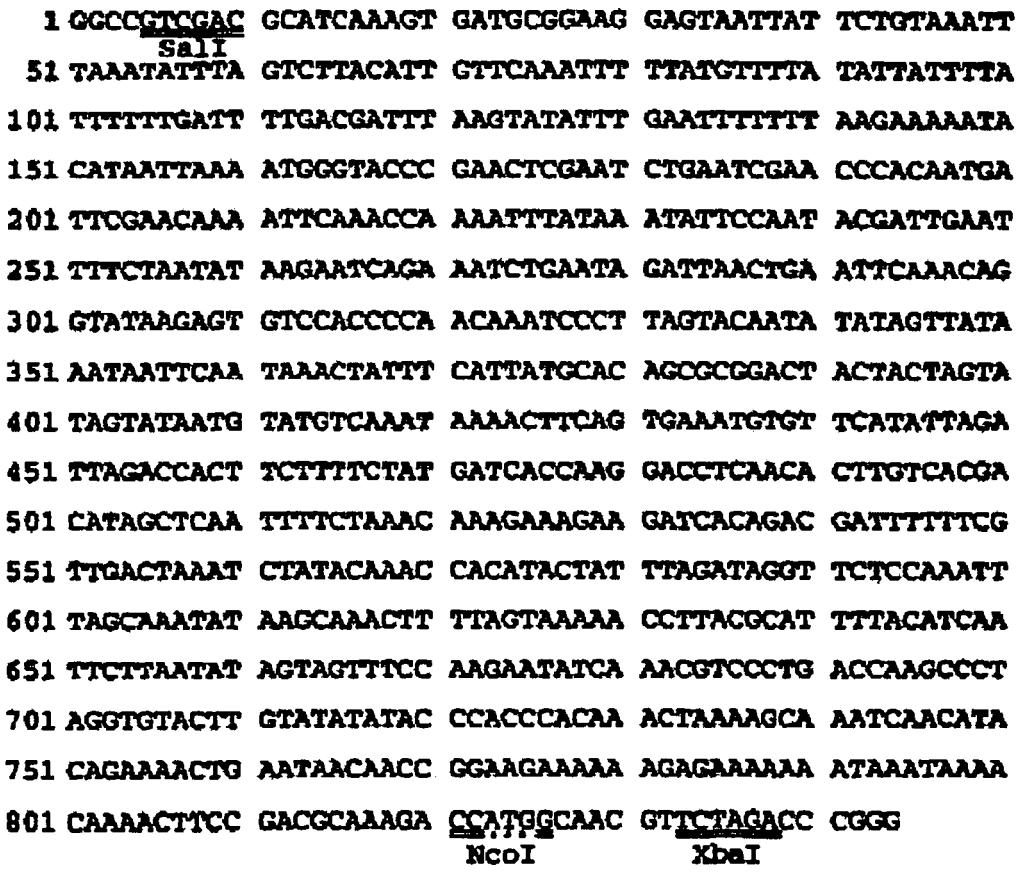
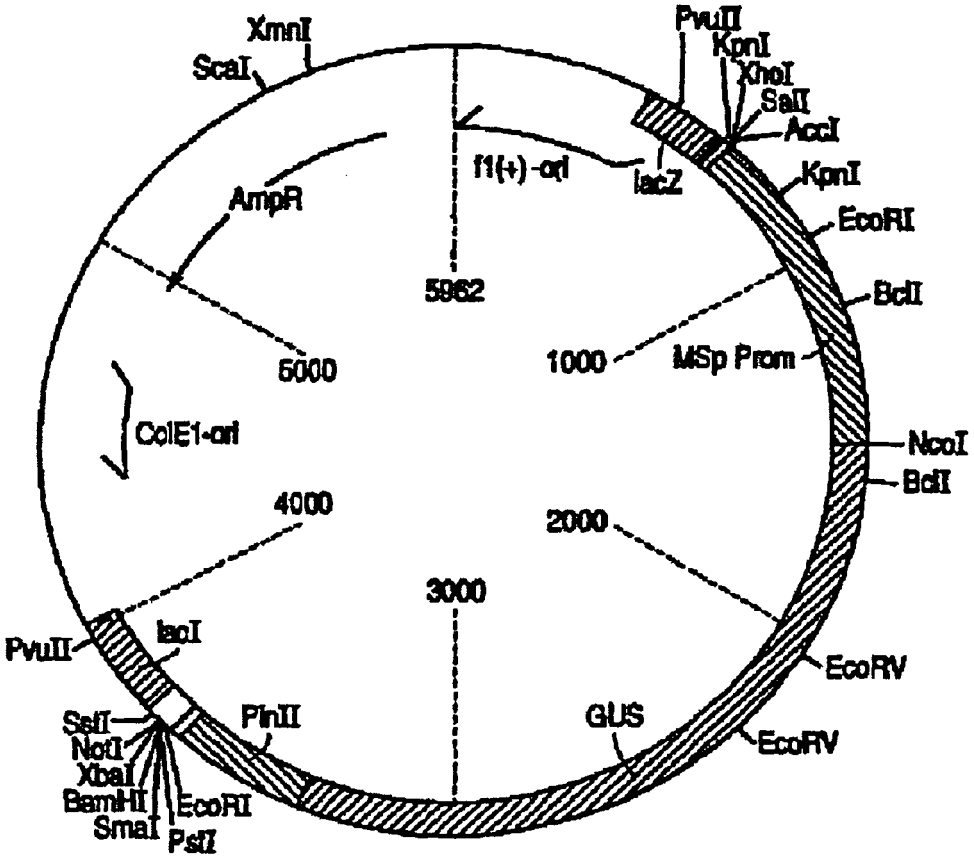

1 GGCCGTCGAC GCATCAAAGT GATGCGGAAG GAGTAATTAT TCTGTAAATT
SalI
51 TAAATATTTA GTCTTACATT GTTCAAATTT TTATGTTTTA TATTATTTTA
101 TTTTTTGATT TTGACGATTT AAGTATATTT GAATTTTTTT AAGAAAAATA
151 CATAATTAAA ATGGGTACCC GAACTCGAAT CTGAATCGAA CCCACAATGA
201 TTCGAACAAA ATTCAAACCA AAATTTATAA ATATTCCAAT ACGATTGAAT
251 TTTCTAATAT AAGAATCAGA AATCTGAATA GATTAACTGA ATTCAAACAG
301 GTATAAGAGT GTCCACCCCA ACAAATCCCT TAGTACAATA TATAGTTATA
351 AATAATTCAA TAAACTATTT CATTATGCAC AGCGCGGACT ACTACTAGTA
401 TAGTATAATG TATGTCAAAT AAAACTTCAG TGAAATGTGT TCATATTAGA
451 TTAGACCACT TCTTTTCTAT GATCACCAAG GACCTCAACA CTTGTCACGA
501 CATAGCTCAA TTTTCTAAAC AAAGAAAGAA GATCACAGAC GATTTTTTCG
551 TTGACTAAAT CTATACAAAC CACATACTAT TTAGATAGGT TCTCCAAATT
601 TAGCAAATAT AAGCAAACTT TTAGTAAAAA CCTTACGCAT TTTACATCAA
651 TTCTTAATAT AGTAGTTTCC AAGAATATCA AACGTCCCTG ACCAAGCCCT
701 AGGTGTACTT GTATATATAC CCACCCACAA ACTAAAAGCA AATCAACATA
751 CAGAAAACTG AATAACAACC GGAAGAAAAA AGAGAAAAAA ATAAATAAAA
801 CAAAACTTCC GACGCAAAGA CCATGGCAAC GTTCTAGACC CGGG
NcoI
XbaI

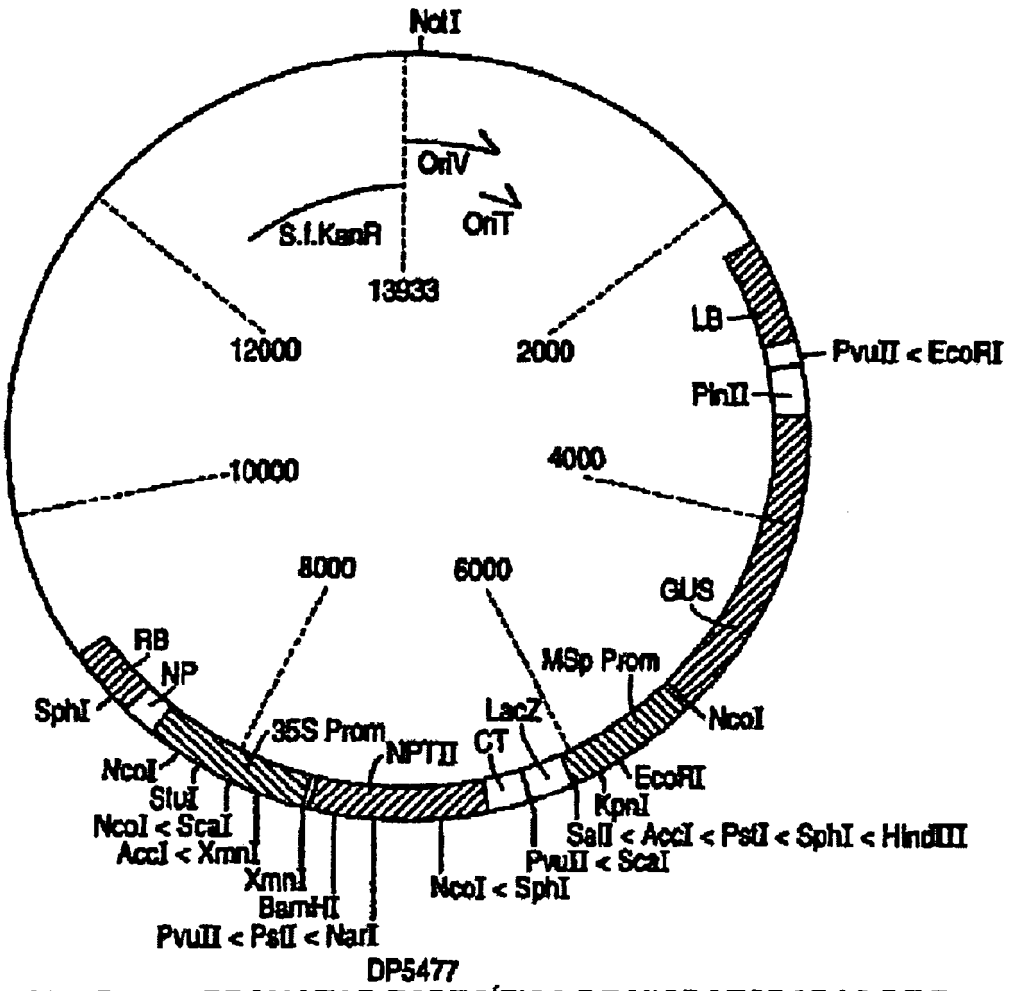
FIG. 4



DP5476

MSP Prom = PROMOTOR ESPECÍFICO DE MICROSPORAS DE B.NAPUS

FIG. 5



Msp Prom = PROMOTOR ESPECÍFICO DE MICROESPORAS DE B. NAPUS

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

(A) NOMBRE: Pioneer Hi-Bred International, Inc.

(B) CALLE: 700 Capital Square, 400 Locust Street

(C) CIUDAD: Des Moines

(D) ESTADO O PROVINCIA: Iowa

(E) PAÍS: Estados Unidos de América

(F) CÓDIGO POSTAL: 50390

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: ELEMENTO REGULADOR ESPECÍFICO DE MICROESPORAS

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 8

(iv) DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA:

(A) DESTINATARIO: Foley & Lardner

(B) CALLE: 3000 K Street, N.W., Suite 500

(C) CIUDAD: Washington

(D) ESTADO: D.C.

(E) PAÍS: Estados Unidos de América

(F) ZIP: 20007-5109

(v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: disquete

(B) ORDENADOR: IBM PC compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) PROGRMA: Patent In Release nº 1.0, Versión nº 1.30

(vi) DATOS USUALES DE LA SOLICITUD ACTUAL

(A) NÚMERO DE LA SOLICITUD: PENDIENTE DE ASIGNAR

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN:

(vii) DATOS DE LA SOLICITUD PREVIA:

(A) NÚMERO DE LA SOLICITUD : US 08/345,756

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 22-NOV-1994

(viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:

(A) NOMBRE: BENT, STEPHEN A.

(B) NÚMERO DE REGISTRO: 29,768

(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 33229/372/PIHI

(ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES:

(A) TELÉFONO: (202)672-5300

(B) TELEFAX: (202)672-5399

(C) TELEX: 904136

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 786 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(ix) CARACTERISTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 24..569

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:1:

```
ACAAAACTTC CGACGCAAAG AAA ATG GCA ACG TTC TCA GTT CTG TCT ACC          50
                          Met Ala Thr Phe Ser Val Leu Ser Thr
                            1               5

TTC GCC GCG GCG GCA ATT ACG TTG CAA CTA CTC CTA GTT CCA GCT TCA          98
Phe Ala Ala Ala Ala Ile Thr Leu Gln Leu Leu Leu Val Pro Ala Ser
 10                  15                  20                  25

GCC TCT CCT CAC ATG AAA TAC ATT GAC GCT ATC TGC GAT CGC TCC CAC         146
Ala Ser Pro His Met Lys Tyr Ile Asp Ala Ile Cys Asp Arg Ser His
                30                  35                  40

GAC CAA GAT TAC TGC GTT AAA ACA TTG ACC ACC AAC CCC CCT ACA GCT         194
Asp Gln Asp Tyr Cys Val Lys Thr Leu Thr Thr Asn Pro Pro Thr Ala
            45                  50                  55

GCT CCC ATT GGC CTG AAT CCA CTG GCC GAG GTG ATG GCG CTC ACC ATA         242
Ala Pro Ile Gly Leu Asn Pro Leu Ala Glu Val Met Ala Leu Thr Ile
        60                  65                  70

GCC CAC GCC GAG AAG ACA GCG GCT TTC GTG GCT GAG ACG GGT AAG GCT         290
Ala His Ala Glu Lys Thr Ala Ala Phe Val Ala Glu Thr Gly Lys Ala
    75                  80                  85

GAT CAA ACG TTT ACT GAG TAC CAC AAG GCC TAC TTA GCC GTG GTG GCT         338
Asp Gln Thr Phe Thr Glu Tyr His Lys Ala Tyr Leu Ala Val Val Ala
 90                  95                  100                 105

GAT CTC AAG AGC GCA AAC CTG AAG CTC AAG CAA TCC CCT GAC ACT GCT         386
Asp Leu Lys Ser Ala Asn Leu Lys Leu Lys Gln Ser Pro Asp Thr Ala
                110                 115                 120

CAC TAC GAC GTT AGG TCT TCG ACC GAC CAG ATG AAG CGC GTG GAG GGA         434
His Tyr Asp Val Arg Ser Ser Thr Asp Gln Met Lys Arg Val Glu Gly
            125                 130                 135

TTA GTT GCC AGC AAA AAT GAC CAG GCT TCA ACT ACT CTT AAG GAA ATG         482
Leu Val Ala Ser Lys Asn Asp Gln Ala Ser Thr Thr Leu Lys Glu Met
        140                 145                 150

ACG GTG CAG ATG GAG AAA CTT CTT GAT CTT GCA GCT AGT GCC GCC GAT         530
Thr Val Gln Met Glu Lys Leu Leu Asp Leu Ala Ala Ser Ala Ala Asp
    155                 160                 165

GCT GTG GAC GAC GAT GAT GAG AAC ATC CAC CGT CGC GTC TGATTTTAAA          579
Ala Val Asp Asp Asp Asp Glu Asn Ile His Arg Arg Val
170                 175                 180

CCGGTCCGGT TTCGTTTTTT TGTGTTCACA ATACAAAATA TAATAAATAA ATGAATATAC      639

ATATACACAC ACACAAATGT GTTGTGATAA ACTAGTAATT AAGTTTTTGA AATATTTGCA      699

GAACTAATGT TGTCAATATT TTTGGCATAT ATAAAGAGTC TGCTGTATTA TCTTTTTATA      759

AAACTAAATA TAAATCTGAT TTGTATC                                          786
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 182 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:2:

Met Ala Thr Phe Ser Val Leu Ser Thr Phe Ala Ala Ala Ala Ile Thr
1 5 10 15

Leu Gln Leu Leu Leu Val Pro Ala Ser Ala Ser Pro His Met Lys Tyr
20 25 30

Ile Asp Ala Ile Cys Asp Arg Ser His Asp Gln Asp Tyr Cys Val Lys
35 40 45

Thr Leu Thr Thr Asn Pro Pro Thr Ala Ala Pro Ile Gly Leu Asn Pro
50 55 60

Leu Ala Glu Val Met Ala Leu Thr Ile Ala His Ala Glu Lys Thr Ala
65 70 75 80

Ala Phe Val Ala Glu Thr Gly Lys Ala Asp Gln Thr Phe Thr Glu Tyr
85 90 95

His Lys Ala Tyr Leu Ala Val Val Ala Asp Leu Lys Ser Ala Asn Leu
100 105 110

Lys Leu Lys Gln Ser Pro Asp Thr Ala His Tyr Asp Val Arg Ser Ser
115 120 125

Thr Asp Gln Met Lys Arg Val Glu Gly Leu Val Ala Ser Lys Asn Asp
130 135 140

Gln Ala Ser Thr Thr Leu Lys Glu Met Thr Val Gln Met Glu Lys Leu
145 150 155 160

Leu Asp Leu Ala Ala Ser Ala Ala Asp Ala Val Asp Asp Asp Asp Glu
165 170 175

Asn Ile His Arg Arg Val
180

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:3

GGCCGAATTC GCCGCCGCGG CGAAGGTAGA 30

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:4

GGCCGAATTC CTGCCTTACC CGTCTCAGCC ACG 33

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 2039 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:5

GCCAGGGTTC CGCACCGCAT CAAAGTGATG CGGAAGCAGT AATTATTCTG TAAATTTAAA 60

TATTTAGTCT TACATTGTTC AAATTTTTAT GTTTTATATT ATTTTATTTT TTGATTTTGA 120

CGATTTAAGT ATATTTGAAT TTTTTTAAGA AAAATACATA ATTAAAATGG GTACCCGAAC 180

TCGAATCTGA ATCGAACCCA CAATGATTCG AACAAAATTC AAACCAAAAT TTATAAATAT 240

TCCAATACGA TTGAATTTTC TAATATAAGA ATCAGAAATC TGAATAGATT AACTGAATTC 300

AAACAGGTAT AAGAGTGTCC ACCCCAACAA ATCCCTTAGT ACAATATATA GTTATAAATA 360

ATTCAATAAA CTATTTCATT ATGCACAGCG CGGACTACTA CTAGTATAGT ATAATGTATG 420

TCAAATAAAA CTTCAGTGAA ATGTGTTCAT ATTAGATTAG ACCACTTCTT TTCTATGATC 480

ACCAAGGACC TCAACACTTG TCACGACATA GCTCAATTTT CTAAACAAAG AAAGAAGATC 540

ACAGACGATT TTTTCGTTGA CTAAATCTAT ACAAACCACA TACTATTTAG ATAGGTTCTC 600

CAAATTTAGC AAATATAAGC AAACTTTTAG TAAAAACCTT ACGCATTTTA CATCAATTCT 660

TAATATAGTA GTTTCCAAGA ATATCAAACG TCCCTGACCA AGCCCTAGGT GTACTTGTAT 720

ATATACCCAC CCACAAACTA AAAGCAAATC AACATACAGA AAACTGAATA ACAACCGGAA 780

GAAAAAAGAG AAAAAAATAA ATAAAACAAA ACTTCCGACG CAAAGAAAAT GGCAACGTTC 840

TCAGTTCTGT CTACCTTCGC CGCGGCGGCA ATTACGTTGC AACTACTCCT AGTTCCAGCT 900

TCAGCCTCTC CTCACATGAA ATACATTGAC GCTATCTGCG ATCGCTCCCA CGACCAAGAT 960

TACTGCGTTA AAACATTGAC CACCAACCCC CCTACAGCTG CTCCCATTGG CCTGGTACTC 1020

ATCTTTAAAC CACTGTCTCT TTGTTTGCGT TAAATCACAG AAGAAATTTA CGTTTGAATT 1080

ATGGTTTATT CAGTTTATTT GGCAGTCCGG TAATATGTAA TCCGAAAATC TTCTAACATT 1140

AGTCGAAAAA CATTTTAAAC AGACAATCCG ACAATGTGAT ACTTTTTTCC ACACTGTAGC 1200

ATCTAGTGTG TTTATACCGC AGCTGGCCGG ATTAGCTAGC TGCATATATA TTAAAAAAAA 1260

ATCATGTTTA CTTAATATGT TTCAAAAATA CAACTGCATA TGCTTTACGT GTGAAAGAGC 1320

TTAAACGAGA ATGATCATTA GTATTAATAC TAATAAAATC TCTTTATTAT CTCTAGAATC 1380

CACTGGCCGA GGTGATGGCG CTCACCATAG CCCACGCCGA GAAGACAGCG GCTTTCGTGG 1440

```
CTGAGACGGG TAAGGCTGAT CAAACGTTTA CTGAGTACCA CAAGGCCTAC TTAGCCGTGG   1500
TGGCTGATCT CAAGAGCGCA AACCTGAAGC TCAAGCAATC CCCTGACACT GCTCACTACG   1560
ACGTTAGGTC TTCGACCGAC CAGATGAAGC GCGTGGAGGG ATTAGTTGCC AGCAAAAATG   1620
ACCAGGCTTC AACTACTCTT AAGGAAATGA CGGTGCAGAT GGAGAAACTT CTTGATCTTG   1680
CAGCTAGTGC CGCCGATGCT GTGGACGACG ATGATGAGAA CATCCACCGT CGCGTCTGAT   1740
TTTAAACCGG TCCGGTTTCG TTTTTTTGTG TTCACAATAC AAAATATAAT AAATAAATGA   1800
ATATACATAT ACACACACAC AAATGTGTTG TGATAAACTA GTAATTAAGT TTTTGAAATA   1860
TTTGCAGAAC TAATGTTGTC AATATTTTTG GCATATATAA AGAGTCTGCT GTATTATCTT   1920
TTTATAAAAC TAAATATAAA TCTGATTTGT ATCAATTGTT GGACAACCCA AAAGCGCCAA   1980
GACATCACCT GGTACAAACA TATTGACTTT TGTAAGCTTA TCGATACCGT CGACCTCGA    2039
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 33 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CLASE DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO 6

GGCCGTCGAC GCATCAAAGT GATGCGGAAG GAG 33

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA: 7
- (A) LONGITUD: 35 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CLASE DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 7

CCCGGGTCTA GAACGTTGCC ATGGTCTTTG CGTCG 3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 859 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CLASE DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:8

```
CATAGTCGAT CTTAGGGCCG TCGACGCATC AAAGTGATGC GGAAGGAGTA ATTATTCTGT      60
AAATTTAAAT ATTTAGTCTT ACATTGTTCA AATTTTTATG TTTTATATTA TTTTATTTTT     120
TGATTTTGAC GATTTAAGTA TATTTGAATT TTTTTAAGAA AAATACATAA TTAAAATGGG     180
TACCCGAACT CGAATCTGAA TCGAACCCAC AATGATTCGA ACAAAATTCA AACCAAAATT     240
TATAAATATT CCAATACGAT TGAATTTTCT AATATAAGAA TCAGAAATCT GAATAGATTA     300
ACTGAATTCA AACAGGTATA AGAGTGTCCA CCCCAACAAA TCCCTTAGTA CAATATATAG     360
TTATAAATAA TTCAATAAAC TATTTCATTA TGCACAGCGC GGACTACTAC TAGTATAGTA     420
TAATGTATGT CAAATAAAAC TTCAGTGAAA TGTGTTCATA TTAGATTAGA CCACTTCTTT     480
TCTATGATCA CCAAGGACCT CAACACTTGT CACGACATAG CTCAATTTTC TAAACAAAGA     540
AAGAAGATCA CAGACGATTT TTTCGTTGAC TAAATCTATA CAAACCACAT ACTATTTAGA     600
TAGGTTCTCC AAATTTAGCA AATATAAGCA AACTTTTAGT AAAAACCTTA CGCATTTTAC     660
ATCAATTCTT AATATAGTAG TTTCCAAGAA TATCAAACGT CCCTGACCAA GCCCTAGGTG     720
TACTTGTATA TATACCCACC CACAAACTAA AAGCAAATCA ACATACAGAA AACTGAATAA     780
CAACCGGAAG AAAAAAGAGA AAAAAATAAA TAAAACAAAA CTTCCGACGC AAAGACCATG     840
GCAACGTTCT AGACCCGGG                                                 859
```