



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 339 559**

51 Int. Cl.:
A01H 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04814790 .4**

96 Fecha de presentación : **16.12.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1696721**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.09.2006**

54

Título: **Transgenes de supresión de gen dominante y métodos de uso de los mismos.**

30

Prioridad: **16.12.2003 US 530478 P**
29.07.2004 US 591975 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.05.2010

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.05.2010

73

Titular/es:
PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, Inc.
9550 White Oak Lane, Suite 100
Johnston, Iowa 50131-1014, US

72

Inventor/es: **Cigan, Andrew, M.;**
Fox, Timothy, W.;
Hershey, Howard, P.;
Unger, Erica y
Wu, Yongzhong

74

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 339 559 T3

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

DESCRIPCIÓN

Transgenes de supresión de gen dominante y métodos de uso de los mismos.

5 Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

La invención se refiere generalmente a composiciones y métodos para la supresión de genes dominantes.

10

Información antecedente

El fitomejoramiento proporciona un medio para combinar rasgos deseables en una única variedad de planta o híbrido, incluyendo por ejemplo, resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, tolerancia a la sequía, mejora de la producción y mejor calidad agronómica. Los cultivos extensivos generalmente se reproducen por polinización, incluyendo por auto-polinización (autofecundación; autofecundado), en los que el polen de una flor se transfiere a la misma flor o a otra flor de la misma planta o a una planta genéticamente idéntica y por polinización cruzada (cruzamiento; cruzado) en los que el polen de una planta se transfiere a una flor de una planta genéticamente diferente.

15

Las plantas autofecundadas y seleccionadas para el tipo durante muchas generaciones conducen a la homocigosis en casi todos los loci del gen y producen una población uniforme de auténtica descendencia reproductora. Un cruce entre dos líneas homocigóticas diferentes produce una población uniforme de plantas híbridas que pueden ser heterocigóticas en muchos loci del gen. Un cruce de dos plantas, cada una de ellas heterocigótica en varios loci del gen, genera plantas híbridas, que difieren genéticamente y no son uniformes.

20

Muchas plantas de cultivo, incluyendo, por ejemplo, el maíz, pueden reproducirse usando técnicas de auto-polinización o polinización cruzada. El maíz tiene flores macho y hembra distintas en la misma planta, localizadas en la espiga y en la mazorca, respectivamente. La polinización natural ocurre en el maíz cuando el viento transporta el polen desde las espigas hacia las sedas que sobresalen por encima de las mazorcas. Muchas plantas de cultivo, incluyendo el maíz, se cultivan como híbridos, que generalmente muestran mayor vigor que las plantas parentales de las que proceden. De esta manera, cuando se generan plantas híbridas es deseable evitar la polinización al azar.

25

30

Las plantas híbridas (F1) se generan cruzando dos plantas parentales diferentes macho (P1) y hembra (P2) endogámicas. Las plantas híbridas son valoradas porque pueden mostrar mejor rendimiento y vigor en comparación con las plantas parentales de las que derivan las plantas híbridas. Además, las plantas híbridas (F1) tienen generalmente propiedades más deseables que las plantas descendientes (F2) derivadas de las plantas híbridas. Por tanto, las plantas híbridas son importantes desde el punto de vista comercial, e incluyen muchos cultivos agrícolas, incluyendo, por ejemplo, trigo, maíz, arroz, tomates y melones. La hibridación del maíz ha recibido especial atención desde la década de 1930. La producción del maíz híbrido implica el desarrollo de líneas homocigóticas endogámicas macho y hembra, el cruzamiento de estas líneas y la evaluación de los cruces para un rendimiento agronómico mejorado. El mejoramiento del pedigrí y la selección recurrente son dos de los métodos de reproducción usados para desarrollar líneas endogámicas a partir de poblaciones. Los programas de reproducción combinan rasgos deseables de dos o más líneas endogámicas, o diversas fuentes de base amplia, en grupos de reproducción a partir de los que se desarrollan nuevas líneas endogámicas por autofecundación y selección para fenotipos deseados. Estas nuevas líneas endogámicas se cruzan con otras líneas endogámicas y los nuevos híbridos resultantes se evalúan para determinar que han mejorado la producción u otros rasgos deseables, aumentando así el valor comercial. La primera generación de la descendencia híbrida, denominada F₁, es más vigorosa que sus parentales endogámicos. Este vigor híbrido, o heterosis, puede manifestarse de muchas maneras, incluyendo crecimiento vegetativo aumentado y producción de semillas aumentada.

35

40

45

La producción de semillas híbridas requiere el mantenimiento de las existencias de semillas parentales porque el auto-cruzamiento de plantas híbridas produce descendencia (F2) que, al igual que P1 y P2, generalmente muestra características menos deseables que la planta híbrida F1. Debido a que las plantas parentales generalmente tienen menor valor comercial que los híbridos (F1), se han realizado esfuerzos para impedir plantas parentales en un cultivo de auto-cruzamiento (“autofecundación”), ya que dicho cruzamiento reduciría la producción de semillas híbridas. Por consiguiente, se han desarrollado métodos para la autofecundación de una planta parental.

50

55

Un método para controlar la polinización es usar una población parental de plantas que es androestéril, proporcionando de esta manera el parental hembra. Se han usado diversos métodos para controlar la androsterilidad, que incluyen, por ejemplo, la emasculación manual o mecánica (desespigamiento), la androsterilidad citoplásmica, la androsterilidad genética y el uso de gametocidas. Por ejemplo, la autofecundación parental en un campo puede impedirse eliminando las anteras o desespigando las plantas de la población parental (P2) hembra, eliminando de esta manera la fuente de polen P2 del cultivo. Las plantas hembra P2 pueden después polinizarse manualmente con polen P1 o usando medios mecánicos. La semilla del maíz híbrido generalmente se produce por un sistema de androesterilidad que incorpora el desespigamiento manual o mecánico. Franjas alternas de dos líneas endogámicas de maíz se plantan en un campo y las espigas que portan el polen se eliminan de una de las líneas parentales (P2 hembra). Siempre que el campo esté lo suficientemente aislado de fuentes de polen de maíz ajeno, las mazorcas de la línea parental desespigada se fertilizan únicamente con polen de la otra línea parental (P1 macho); dando como resultado semillas híbridas y plantas de formas híbridas. Por desgracia, este método es lento y laborioso. Además, la variación ambiental

60

65

en el desarrollo de la planta puede dar como resultado plantas que producen espigas después realizar el desespigamiento manual del parental hembra. Por lo tanto el desespigamiento no puede asegurar completamente la androesterilidad de una planta endogámica hembra. En este caso, las plantas hembra fértiles resultantes liberarán polen exitosamente y algunas plantas hembra se auto-polinizarán. Esto dará como resultado que la semilla de la hembra endogámica se coseche junto con la semilla híbrida deseada. La semilla endogámica hembra no es tan productiva como la semilla F₁. Además, la presencia del registro de la semilla endogámica hembra representa un peligro de seguridad de germo-plasma para la compañía productora del híbrido. La hembra endogámica también puede desespigarse mecánicamente. El desespigamiento mecánico es aproximadamente tan fiable como el desespigamiento manual pero es más rápido y menos costoso. Sin embargo, la mayoría de las máquinas desespigadoras producen más daños a las plantas que el desespigamiento manual, lo que reduce las producciones de la semilla F₁. Por tanto, en la actualidad ninguna forma de desespigamiento es totalmente satisfactoria y existe una necesidad continua para buscar métodos alternativos de producción híbrida que reduzcan los costes de producción, aumenten la seguridad de la producción y eliminen la auto-polinización del parental hembra durante la producción de la semilla híbrida.

Otro método para impedir la autofecundación de la planta parental es utilizar plantas parentales que sean androestériles o ginoestériles. Se han identificado genes relacionados con la androfertilidad en varias plantas e incluyen genes dominantes y recesivos relacionados con la androfertilidad. Las plantas que son homocigóticas para un gen recesivo relacionado con la androfertilidad no producen polen viable y son útiles como plantas parentales hembra. Sin embargo, un resultado de las plantas hembra que son homocigóticas recesivas para un gen relacionado con la androfertilidad es que no son capaces de autofecundarse y por lo tanto, deben proporcionarse medios para obtener polen con objeto de mantener la línea de la planta parental P2. Generalmente, una línea celular mantenedora, que es heterocigótica para el gen relacionado con la androfertilidad se genera cruzando una planta homocigótica androfértil dominante con la planta homocigótica ginoestéril recesiva. Las plantas mantenedoras heterocigóticas después se cruzan con las plantas homocigóticas androestériles recesivas para producir una población en la que el 50% de la descendencia es androestéril. Las plantas androestériles se seleccionan después para usar en la generación de híbridos. Como tal, el método requiere etapas de selección y mejoramiento adicionales para obtener las plantas androestériles, añadiendo por tanto tiempo y coste necesarios para producir las plantas híbridas.

Para superar la necesidad de tener que seleccionar plantas androestériles de plantas androfértiles generadas por cruzamiento de una línea de planta mantenedora con una línea de planta femenina (androestéril), se han desarrollado métodos para obtener plantas androestériles expresando una molécula citotóxica en las células de los órganos reproductores macho de una planta. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica la molécula citotóxica puede unirse a un promotor específico del tapete e introducirse en las células de la planta, de tal manera, que después de la expresión, la molécula tóxica destruye las células de la antera, volviendo a la planta androestéril. Sin embargo, como se indica anteriormente, dichas plantas parentales hembra no pueden autofecundarse y, por lo tanto, necesitan la preparación y el uso de una línea de planta mantenedora, que, cuando se cruza con el parental hembra androestéril restablezca la fertilidad, por ejemplo, proporcionando un gen dominante androfértil o proporcionando un medio para inactivar o inhibir de otra manera la actividad del producto génico citotóxico (véase la Patente de Estados Unidos N° 5.977.433).

Se han descrito métodos adicionales para conferir la androesterilidad genética, que incluyen, por ejemplo, la generación de plantas con genes múltiples mutantes en distintos lugares en el genoma que confieren androesterilidad (véanse las patentes de Estados Unidos y con translocaciones cromosómicas (véanse las Patentes de Estados Unidos 3.861.709 y 3.710.511). Otro método para conferir la androesterilidad genética incluye identificar un gen necesario para la androfertilidad, silenciar el gen endógeno, generar un transgén que comprenda un promotor inducible unido operativamente a la secuencia codificante del gen relacionado con la androfertilidad e insertar el transgén de nuevo en la planta, generando así una planta que es androestéril en ausencia del agente de inducción, y que puede restaurarse a androfértil exponiendo la planta al agente de inducción (véase la Patente de Estados Unidos N° 5.432.068)

Aunque los métodos descritos anteriormente para la obtención y mantenimiento de líneas de plantas híbridas han sido útiles para fines de fitomejoramiento y agrícolas, estos requieren numerosas etapas y/o líneas adicionales para mantener poblaciones de plantas androestériles o ginoestériles para obtener las plantas híbridas. Dichos requisitos contribuyen al aumento de costes para el cultivo de las plantas híbridas y, en consecuencia, aumento de costes para los consumidores. Por tanto, existe una necesidad de obtener métodos convenientes y eficaces para producir plantas híbridas, y particularmente para generar líneas parentales que puedan cruzarse para obtener plantas híbridas.

Un sistema fiable de androesterilidad genética proporcionaría diversas ventajas sobre otros sistemas. En algunos genotipos, el laborioso proceso de desespigamiento puede evitarse usando parentales endogámicos androestériles citoplásmicos (CMS). En ausencia de un gen restaurador de fertilidad, las plantas de un parental endogámico CMS son androestériles como un resultado de factores del genoma citoplásmico (no nuclear). Por tanto, esta característica CMS se hereda exclusivamente a través del parental hembra en plantas de maíz, ya que sólo el parental hembra proporciona citoplasma a la semilla fertilizada. Las plantas CMS se fertilizan con polen de otra planta endogámica que no es androestéril. El polen de la segunda planta endogámica puede aportar o no genes que producen plantas híbridas androfértiles. Por lo general deben mezclarse semillas de maíz normal desespigado y semillas producidas por CMS del mismo híbrido para asegurar la disponibilidad de cargas de polen adecuadas para la fertilización cuando se cultivan las plantas híbridas y para asegurar la diversidad citoplasmática.

Otro tipo de esterilidad genética se describe en las y en embargo, esta forma de androesterilidad genética requiere el mantenimiento de múltiples genes mutantes en distintos lugares en el genoma y requiere un sistema marcador

complejo para rastrear los genes, haciendo que este sistema no sea conveniente. Patterson describió un sistema genético de translocaciones cromosómicas, que puede ser eficaz, pero también es muy complejo. (Véanse, las Puchos otros intentos para hacer frente a los inconvenientes de los sistemas de esterilización existentes. Por ejemplo, Fabijanski, *et al.*, desarrollaron varios métodos para causar la androesterilidad en plantas (véase el documento n° de publicación y la solicitud P publicada como WO 90/08828) Un método incluye introducir en la planta un gen que codifica una sustancia citotóxica que se expresa usando un promotor específico de tejidos masculinos. Otro implica un sistema antisentido en el que se identifica un gen crítico para la fertilidad y una construcción antisentido en el gen insertada en la planta. *et al.* también muestran varios sistemas antisentido citotóxicos. Véase el documento EP 89/401.194 Por último, otros sistemas usan genes “represores” que inhiben la expresión de otros genes críticos relacionados con la androfertilidad. Véase el documento WO 90/08829.

Una mejora aún mayor de este sistema es la que se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.478.369 en la que se consigue un método para impartir a la planta la androesterilidad controlable por silenciamiento de un gen nativo que es crítico para la androfertilidad e introduciendo adicionalmente una copia funcional del gen relacionado con la androfertilidad controlado por un promotor inducible que controla la expresión del gen. Por tanto, la planta es constitutivamente estéril, volviéndose únicamente fértil cuando se induce el promotor, lo que permite la expresión del gen relacionado con la androfertilidad.

En diversas circunstancias, un rasgo de la planta en particular se expresa manteniendo un estado homocigótico recesivo. Las dificultades surgen en el mantenimiento del estado homocigótico cuando para el mantenimiento debe usarse un gen transgénico de restauración. Por ejemplo, se ha demostrado, en el maíz, que el gen MS45 (documento para expresar androfertilidad. Las plantas heterocigóticas o hemicingóticas para el alelo dominante MS45 son completamente fértiles debido a la naturaleza esporofítica del rasgo de la fertilidad de MS45 Una mutación natural en el gen MS45, denominada ms45, confiere un fenotipo androestéril a las plantas cuando este alelo mutante se encuentra en estado homocigótico. Esta esterilidad puede invertirse (es decir, restaurar la fertilidad), cuando la forma no mutante del gen se introduce en la planta, ya sea a través de métodos normales de cruzamiento o de complementación transgénica. Sin embargo, la restauración de la fertilidad por cruzamiento elimina el estado homocigótico recesivo deseado, y ambos métodos restauran la androfertilidad por completo e impiden el mantenimiento de líneas maternas puras androestériles. Cuando se controla la ginofertilidad de la planta, surgen las mismas consideraciones en las que una hembra homocigótica recesiva debe mantenerse por cruzamiento con una planta que contiene un gen de restauración. Por lo tanto, es un valor considerable, no sólo controlar la expresión de genes de restauración en una línea genética recesiva, sino también controlar la transmisión de los genes de restauración a la descendencia durante el proceso de producción de híbridos.

35 **Resumen de la invención**

La presente invención se basa en la determinación de que puede modificarse el genotipo de un organismo (por ejemplo, de una planta o de un mamífero) para contener alelos o construcciones transgénicas supresores dominantes que reducen, pero sin eliminar, la actividad de un gen, en el que no se afecta sustancialmente el fenotipo del organismo. Por ejemplo, las plantas pueden contener alelos y/o construcciones transgénicas supresores dominantes que supriman la actividad un gen androfértil en la planta, sin hacer que la planta sea androestéril, o puede contener alelos y/o construcciones transgénicas supresores dominantes que supriman la actividad de un gen necesario para la viabilidad, sin destruir la planta. Además, pueden cruzarse pares de dichas plantas que tienen genotipos seleccionados que comprenden los alelos o construcciones transgénicas supresores dominantes para producir descendencia que muestra el cambio fenotípico (por ejemplo, androesterilidad). La descendencia de las plantas que comprenden genes androfértiles suprimidos, puede ser útil, por ejemplo, como hembras en la producción de plantas híbridas.

Por consiguiente, la invención proporciona un método de mantenimiento del estado homocigótico recesivo de una primera planta de maíz cuando se cruza con una segunda planta de maíz, que comprende

- 50 (a) proporcionar una primera planta de maíz androestéril con un genotipo homocigótico recesivo para un rasgo que afecta a la viabilidad o a la fertilidad.
- 55 (b) introducir por transformación en una segunda planta de maíz una construcción génica de restauración exógena que comprende
 - 60 (i) una primera secuencia de nucleótidos que, si se introduce en la primera planta, restablecería el rasgo homocigótico recesivo, estando dicha primera secuencia de nucleótidos en un estado hemicingótico;
 - 60 (ii) una segunda secuencia de nucleótidos, unida operativamente a la primera secuencia de nucleótidos, que inhibe la formación, la función, o la dispersión de gametos masculinos de la planta mantenida, donde la segunda secuencia de nucleótidos está unida operativamente a un promotor que preferentemente dirige la expresión en el gametos masculinos;
- 65 y proporcionar una planta que comprende dicha construcción génica de restauración como una planta mantenida;

ES 2 339 559 T3

cultivar la planta mantenedora de tal manera que todo el polen viable producido contenga el alelo recesivo y no contenga dicha construcción génica de restauración; y

(d) polinizar la primera planta con la planta mantenedora para producir descendencia que mantenga el estado homocigótico recesivo de la primera planta.

La invención proporciona adicionalmente

- este método en el que primera secuencia de nucleótidos restablece la androfertilidad esporofíticamente.
- este método en el que dicha primera secuencia de nucleótidos es MS45.
- este método en el que dicha primera secuencia de nucleótidos es SBMu200, BS92-7, MS1 o MS2.
- este método en el que dicho promotor se selecciona de MS45, BS92-7, y SBMu200.
- este método en el que la segunda secuencia de nucleótidos está unida operativamente a un promotor inducible.

La invención también proporciona:

- una planta mantenedora como se describe anteriormente que, si se auto-fertiliza, produce descendencia en una proporción androestéril: androfétil de 50:50
- una planta mantenedora como se describe anteriormente que adicionalmente comprende una tercera secuencia de nucleótidos unida operativamente a la primera secuencia de nucleótidos y que codifica un producto marcador capaz de usarse para la selección de la descendencia que comprende la construcción génica de restauración.
- una planta mantenedora como se describe anteriormente en la que la tercera secuencia de nucleótidos codifica un producto génico que proporciona resistencia a un producto químico, un producto génico que proporciona un marcador visual en el tejido vegetativo o reproductivo, o un producto génico que afecta al color del tejido.

La invención proporciona adicionalmente un método de propagación de la planta mantenedora como se describe anteriormente que comprende auto-polinizar dicha planta mantenedora y seleccionar la descendencia basándose en la presencia del producto marcador seleccionable.

La presente invención se refiere a la dificultad de propagar una planta que tiene un rasgo reproductor homocigótico recesivo sin perder el estado homocigótico recesivo en la descendencia resultante. Esto puede lograrse introduciendo en una planta al menos una construcción transgénica de restauración, unida operativamente (1) una primera secuencia de nucleótidos que comprende una copia funcional de un gen que complementa el rasgo fenotípico mutante producido por el estado homocigótico recesivo con (2) una segunda secuencia de nucleótidos funcional que interfiere con la formación, la función, o la dispersión de los gametos masculinos de la planta y está unida operativamente a un promotor preferido de tejido de gametos masculinos. Esta construcción se mantiene en el estado hemicigótico y en este documento, una planta que contiene dicha construcción se denomina mantenedora. Cuando la planta mantenedora que contiene dicha construcción unida se utiliza como donante de polen para fertilizar la planta homocigótica recesiva, los únicos gametos masculinos viables proporcionados a la planta homocigótica recesiva son aquellos que contienen el alelo recesivo, y no contienen ningún componente de la construcción transgénica. Ninguno de los granos de polen que contienen la construcción transgénica de restauración es viable, debido a la acción del segundo gen unido que impide la formación de polen viable. Por lo tanto, la descendencia resultante de dicho cruce sexual no es transgénica con respecto a esta construcción transgénica.

Aunque el polen no viable producido por la planta mantenedora contiene la construcción transgénica de restauración, el 50% de los óvulos (el gameto femenino) de la planta mantenedora contendrá la construcción transgénica de restauración. Por lo tanto, la planta mantenedora puede propagarse por auto-fertilización, segregando la construcción transgénica de restauración de tal manera que se incluirá en el 50% de la semilla de la mazorca de una planta mantenedora auto-fertilizada. Uniendo la construcción transgénica de restauración con un marcador seleccionable, el 50% de la semilla que contiene el transgén puede aislarse para propagar la población mantenedora, que sigue siendo homocigótica para el gen recesivo y hemicigótica para la construcción transgénica de restauración.

Si se impide la formación del gameto femenino o que sea funcional, puede ser deseable unir el gen capaz de complementar este fenotipo mutante con un promotor inducible para ayudar en el mantenimiento de la planta mantenedora. Cuando dicha planta se expone al estado de inducción, tendrá la fertilidad femenina restaurada, y la planta puede entonces auto-fertilizarse para producir descendencia con el rasgo mutante recesivo y con la construcción transgénica de restauración deseados.

Aunque la invención se demuestra en plantas, un experto en la materia reconocería su aplicabilidad en otros organismos no humanos, incluyendo mamíferos.

Descripción detallada de la invención

5

La presente invención se demuestra con respecto a la fertilidad en plantas y más particularmente con respecto a la androfertilidad en plantas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

La industria agrícola produce cultivos que se usan para la alimentación en seres humanos y animales, y además se usan en otras industrias para preparar productos tan diversos como adhesivos y explosivos. El maíz por ejemplo, se usa para consumo humano, forraje del ganado (por ejemplo, forraje para ganado bovino, ganado lechero, cerdos y alpiste de las aves de corral) y como una materia prima en la industria. Los usos alimentarios del maíz incluyen el consumo de granos de maíz, así como productos de las industrias de molienda en seco y molienda en húmedo (por ejemplo, sémola, harina, fécula, almidón de maíz, jarabe de maíz y dextrosa). El aceite de maíz se recupera del germen de maíz, que es un producto secundario de las industrias de molienda en seco y molienda en húmedo. Los usos industriales del maíz incluyen la producción de etanol, almidón de maíz en industria de molienda en húmedo y la harina de maíz en la industria de molienda en seco. Las aplicaciones industriales del almidón y de la harina de maíz se basan en sus propiedades funcionales, que incluyen, por ejemplo, la viscosidad, la formación pelicular, las propiedades adhesivas y capacidad para suspender partículas. El almidón y la harina de maíz tienen aplicación en las industrias papeleras y textiles y también se usan en la fabricación de adhesivos, materiales de construcción, aglutinantes de fundición, almidón de lavandería, explosivos, lodos de pozos petrolíferos, otras aplicaciones de la minería.

Muchas plantas de cultivo, incluyendo arroz, trigo, maíz, tomates, y melones se cultivan como híbridos, que presentan mayor vigor y cualidades mejoradas en comparación con las plantas parentales. El desarrollo de híbridos en un programa de fitomejoramiento requiere, en general, el desarrollo de líneas endogámicas homocigóticas, el cruzamiento de estas líneas y la evaluación de los cruces. Los métodos del mejoramiento del pedigrí y mejoramiento por selección recurrente se usan para desarrollar líneas endogámicas a partir de poblaciones de reproducción. Por ejemplo, los programas de cultivo de la planta de maíz combinan los antecedentes genéticos de dos o más líneas endogámicas (o diversas otras fuentes de germoplasma) en grupos de cultivo, a partir de los cuales se desarrollan nuevas líneas endogámicas por auto polinización (autofecundación) y selección de los fenotipos deseados. Después, las líneas endogámicas seleccionadas se cruzan con otras líneas endogámicas y los híbridos de estos cruces se evalúan para determinar cuál de estos tiene potencial comercial. Así pues, el desarrollo del mejoramiento y de híbridos en plantas son procesos lentos y costosos.

El mejoramiento del pedigrí se inicia con el cruce de dos genotipos, cada uno de los cuales puede tener una o más características deseables que no existe en el otro o que se complementa con el otro. Si los dos parentales originales no proporcionan todas las características deseadas, pueden incluirse otras fuentes en la población de cultivo. Usando este método, las plantas superiores se seleccionan y se autofecundan en generaciones sucesivas hasta obtener líneas de plantas homogéneas. El mejoramiento por selección recurrente tal como retrocruzamiento puede usarse para mejorar una línea endogámica y puede producirse un híbrido usando las líneas endogámicas. El retrocruzamiento puede usarse para transferir un rasgo deseable específico de una fuente o línea endogámica a una segunda línea endogámica que carezca de ese rasgo, por ejemplo, cruzando primero una línea endogámica superior (parental recurrente) con una línea endogámica donante (parental no recurrente) que lleva el gen (o los genes) apropiado para el rasgo en cuestión, cruzar la descendencia del primer retrocruzamiento con el parental recurrente superior y seleccionar en la descendencia resultante el rasgo deseado transferido del parental no recurrente. Después de cinco o más generaciones de retrocruzamiento con selección del rasgo deseado, la descendencia es homocigótica para los loci que controlan la característica que se transfiere y son como el parental superior para todos los otros genes esencialmente. La última generación de retrocruzamiento se autofecunda para dar la descendencia de cultivo pura para el gen que se transfiere.

Un híbrido de cruzamiento único (F1) resulta del cruzamiento de dos líneas endogámicas (P1 y P2), cada una de las cuales tiene un genotipo que complementa el genotipo de la otra. En el desarrollo de híbridos comerciales en un programa de mejoramiento de la planta de maíz, por ejemplo, sólo se buscan plantas híbridas F1, ya que son más vigorosas que sus parentales endogámicos. Este vigor híbrido (heterosis) puede manifestarse en muchos rasgos poligénicos tales como mayor crecimiento vegetativo y mayor producción. El desarrollo de un híbrido en un programa de mejoramiento de la planta de maíz, por ejemplo, implica la selección de plantas procedentes de diversos grupos de germoplasma para cruces de mejoramiento inicial; la autofecundación de las plantas seleccionadas a partir de cruzamientos de mejora de varias generaciones para producir una serie de las líneas endogámicas, que, a pesar de ser diferentes entre sí, se cultivan de verdad y son altamente uniformes; y el cruzamiento de las líneas endogámicas seleccionadas con diferentes líneas endogámicas para producir la descendencia de híbridos F1. Durante el proceso de endogamia en el maíz, el vigor de las líneas disminuye, pero se restaura cuando se cruzan dos líneas endogámicas diferentes para producir las plantas híbridas. Una consecuencia importante de la homocigosidad y homogeneidad de las líneas endogámicas es que el híbrido F1 entre un par definido de las plantas parentales endogámicas siempre es el mismo. Por tanto, una vez que se identifican los parentales endogámicos que proporcionan un híbrido superior, la semilla híbrida puede reproducirse indefinidamente siempre que se mantengan los parentales endogámicos.

La producción de semillas híbridas requiere la eliminación o la inactivación de polen producido por el parental femenino. La eliminación o inactivación incompleta del polen proporciona el potencial para la autofecundación, aumentando el riesgo de que las semillas auto-polinizadas inadvertidamente se cosechen y se envasen con semillas

híbridas. Una vez que se planta la semilla, las plantas autofecundadas pueden identificarse y seleccionarse, las plantas autofecundadas son genéticamente equivalentes a la línea endogámica femenina usada para producir el híbrido. Típicamente, las plantas autofecundadas se identifican y seleccionan basándose en su vigor disminuido. Por ejemplo, las plantas de maíz femeninas autofecundadas se identifican por su aspecto menos vigoroso para características vegetativas y/o reproductivas, incluyendo menor altura de la planta, pequeño tamaño de espiga, forma de la espiga y del grano, color de la mazorca u otras características. La líneas autofecundadas también pueden identificarse mediante el análisis de marcadores moleculares (véase, por ejemplo, Smith y Wych, *Seed Sci. Technol.* 14: 1-8, 1995). Usando dichos métodos, la homocigosidad de la línea auto-polinizada puede verificarse mediante el análisis de la composición alélica en diferentes loci en el genoma.

Como las plantas híbridas son cultivos extensivos importantes y valiosos, los obtentores de variedades de plantas están trabajando continuamente para desarrollar híbridos de alto rendimiento que desde el punto de vista agronómico se basan en líneas endogámicas estables. La disponibilidad de dichos híbridos permite que se produzca una cantidad máxima del cultivo con los aportes usados, mientras se minimiza la susceptibilidad a plagas y tensiones ambientales. Para lograr este objetivo, los obtentores de variedades de plantas debe desarrollar líneas parentales endogámicas superiores para la producción de híbridos mediante la identificación y selección de individuos genéticamente únicos que se producen en una población de segregación. La presente invención contribuye a conseguir este objetivo, por ejemplo proporcionando plantas que, cuando se cruzan, generan descendencia androestéril, que puede usarse como plantas parentales femeninas para la generación de plantas híbridas.

Usando métodos tradicionales y métodos mas recientes de alto rendimiento, se ha identificado un gran número de genes como que en su patrón de expresión dan lugar a espigas preferidas. La correlación de la función de estos genes con importantes procesos bioquímicos o de desarrollo que finalmente conducen al desarrollo de polen fértil es ardua cuando las estrategias se limitan al análisis genético mutacional clásico directo o inverso. Como se describe en este documento, las estrategias de supresión en el maíz proporcionan un medio alternativo rápido para identificar genes que están directamente relacionados con el desarrollo de polen en el maíz. El gen de la androfertilidad del maíz bien caracterizado, MS45 y varios genes preferidos de antera de función desconocida se usaron para evaluar la eficacia de la generación de la androesterilidad usando estrategias de silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS, véase, por ejemplo, Kooter *et al.*, (1999). *Trends Plant Sci.* 4: 340-346) o silenciamiento génico transcripcional (TGS; véase, por ejemplo, Mette *et al.* (2000) *EMBO J* 19:5194-5201).

Para examinar el PTGS, se introdujeron en el maíz construcciones de ARNi que contienen horquillas que tienen estructuras en tallo compuestas de repeticiones invertidas de las secuencias de ADNc expresadas en la antera y un bucle que contiene una secuencia codificante no homóloga o un intrón escindible de maíz.

Para examinar el TGS como una estrategia para desactivar la función génica en la antera, se generó una segunda serie de construcciones en las que los promotores de las secuencias génicas específicas de antera formaban el tallo y una secuencia no homóloga formaba el bucle. Las construcciones se expresaron utilizando promotores constitutivos y promotores preferidos de antera.

Se observaron fenotipos contrastantes de fertilidad, dependiendo del tipo de construcción en horquilla expresada. Las plantas que expresaban las construcciones PTGS eran androfértiles. En cambio, las plantas que expresaban las construcciones TGS eran androestériles y carecían de ARNm MS45 y proteína. Además, el fenotipo de esterilidad de las plantas que contenían el ARNhp específico para el promotor MS45 (es decir, las construcciones TGS) se invirtió cuando el MS45 se expresó a partir de promotores heterólogos en estas plantas. Estos resultados demuestran que el TGS proporciona una herramienta para correlacionar rápidamente la expresión génica con la función de genes desconocidos tales como genes de monocotiledóneas expresados en las anteras.

Como se usa en este documento, el término “endógeno”, cuando se usa en referencia a un gen, significa un gen que está normalmente presente en el genoma de las células de un organismo especificado y está presente en su estado normal en las células (es decir, se presenta en el genoma en el estado en el que normalmente se presenta en la naturaleza). El término “exógeno” se usa en este documento para referirse a cualquier material que se introduce en una célula. La expresión “molécula exógena de ácido nucleico” o “transgén” se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico que normalmente no está presente en un genoma de la célula o se introduce en una célula. Dichas moléculas exógenas de ácido nucleico generalmente son moléculas recombinantes de ácido nucleico, que se generan usando métodos de ADN recombinante como se describe en este documento o de otra manera conocida en la técnica. Como se describe en este documento, un organismo transgénico no humano, puede contener, por ejemplo, un primer transgén y un segundo transgén. Dichos primer y segundo transgén puede introducirse en una célula, por ejemplo, una célula progenitora de un organismo transgénico, como moléculas individuales de ácido nucleico o como una sola unidad (por ejemplo, contenidas en vectores diferentes o contenida en un único vector, respectivamente). En cualquier caso, puede confirmarse que una célula de la cual procede el organismo transgénico contiene los dos transgenes usando métodos rutinarios y conocidos tales como la expresión de genes marcadores o hibridación de ácidos nucleicos o análisis por PCR. Como alternativa, o adicionalmente, la confirmación de la presencia de los transgenes puede ocurrir más tarde, por ejemplo, después de la regeneración de una planta a partir de una célula supuestamente transformada.

Un gen endógeno relacionado con la fertilidad de una planta de un par de reproducción descrito en este documento puede estar inactivado debido, por ejemplo, a (1) una mutación del gen endógeno de manera que la función de un producto codificado por el gen se suprime (por ejemplo, el producto génico no se expresa o se expresa en un nivel

que es insuficiente para mediar su efecto completo en la planta o en la célula de la planta); o (2) a la expresión de una molécula exógena de ácido nucleico que reduce o inhibe la expresión del producto génico codificado por el gen endógeno. Como tal, el término “inactivado” se usa ampliamente en este documento para referirse a cualquier manipulación de un gen endógeno, o una célula que contiene el gen, de manera que la función mediada por un producto codificado por el gen se suprime. Adicionalmente debe reconocerse que, independientemente de que el gen endógeno inactivado tenga actividad reducida o sea totalmente inactivo, el fenotipo relevante deseado se mantiene.

La mutación de un gen endógeno que da como resultado la supresión de la función del gen puede efectuarse, por ejemplo, suprimiendo o insertando uno o algunos nucleótidos en la secuencia de nucleótidos del gen (por ejemplo, en el promotor, en la secuencia codificante o en el intrón), sustituyendo uno o algunos nucleótidos en el gen por otros nucleótidos diferentes o desactivando el gen (por ejemplo, por recombinación homóloga usando un vector de dirección apropiado). Las plantas con dichas mutaciones en ambos alelos pueden obtenerse, por ejemplo, usando métodos de cruzamiento como se describe en este documento, o de otra manera, conocidos en la técnica. La inactivación de un gen endógeno que da como resultado la supresión de la función del gen también puede efectuarse introduciendo en las células de la planta un transgén que suprime la expresión del gen endógeno o un producto expresado a partir del gen endógeno (por ejemplo, un polipéptido codificado), o un transgén que codifica un producto (por ejemplo, un ARN) que suprime la expresión del gen endógeno o un producto codificado por el gen endógeno en las células de la planta en la que normalmente se expresa el gen.

A modo de ejemplo, la inactivación de genes endógenos relacionados con la fertilidad puede efectuarse expresando moléculas de ARN en forma de horquilla (ARNhp) en las células de los órganos reproductores de una planta (por ejemplo: células del estambre donde se inactivan genes endógenos de la fertilidad son genes androfértiles). El estambre, que comprende el órgano reproductor masculino de las plantas, incluye diversos tipos de células, incluyendo, por ejemplo, el filamento, la antera, el tapete y el polen. Los ARNhp útiles para los fines de la presente invención se diseñan para incluir repeticiones invertidas de un promotor del gen endógeno a inactivar; se han descrito ARNhp que pueden suprimir la expresión de un gen (véase, por ejemplo, Matzke *et al.* (2001) *Curr. Opin. Genet. Devel* 11:221-227; Scheid *et al.* (2002) *Proc. National Acad. Sci., USA* 99:13659-13662; Waterhouse y Helliwell (2003) *Nature Reviews Genetics* 4:29-38; Aufsatz *et al.* (2002) *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 99 (4): 16499-16506; Sijen *et al.*, *Curr. Biol.* (2001) 11:436-440). Como se describe en este documento, el uso de promotores específicos de estambre o preferidos de estambre, incluyendo promotores específicos de antera, promotores específicos de polen, promotores de específicos de tapete y similares, permite la expresión de los ARNhp en plantas (particularmente en células reproductoras masculinas de la planta), en donde el ARNhp suprime la expresión de un gen endógeno relacionado con la fertilidad, inactivando por lo tanto la expresión del gen endógeno de la fertilidad. Por tanto, el uso de un ARNhp específico para suprimir un promotor que dirige la expresión de un gen de la fertilidad proporciona un medio para inactivar un gen endógeno de la fertilidad.

Los términos “primero”, “segundo”, “tercero” y “cuarto” se utilizan en este documento únicamente para aclarar las relaciones de diversas células y moléculas o para distinguir diferentes tipos de una molécula y, a menos que expresamente se indique lo contrario, no se pretende indicar ningún orden, importancia o característica cuantitativa en particular. Por ejemplo, y a menos que se indique específicamente lo contrario, la referencia a una “primera” planta que contiene un “primer gen endógeno” pretende indicar únicamente que el gen especificado está presente en la planta especificada. Por medio de un segundo ejemplo y a menos que se indique específicamente lo contrario, la referencia a una “primera planta que contiene un primer transgén y un segundo transgén” pretende indicar únicamente que dicha planta contiene dos moléculas exógenas de ácido nucleico que son diferentes entre sí.

Como se usa en este documento, la expresión “molécula de ácido nucleico” o “polinucleótido” o “secuencia de nucleótidos” se refiere ampliamente a una secuencia de dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos que están unidos por un enlace fosfodiéster. Por tanto, los términos incluyen ARN y ADN, que pueden ser un gen o una parte del mismo, un ADNc, una secuencia de ácido polidesoxirribonucleico sintético o similares y puede ser mono- o bicatenaria, así como un híbrido de ADN/ARN. Además, los términos se usan en el presente documento para incluir moléculas de ácido nucleico de origen natural, que pueden aislarse de una célula, así como moléculas sintéticas, que pueden prepararse, por ejemplo, por métodos de síntesis química o por métodos enzimáticos tales como por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El término “recombinante” se usa en este documento para referirse a una molécula de ácido nucleico que se manipula fuera de una célula, incluyendo dos o más secuencias heterólogas de nucleótidos unidas. El término “heterólogo” se utiliza en este documento para referirse a una secuencia de nucleótidos que normalmente no está unida en la naturaleza o, si está unida, lo está de una manera diferente a la descrita. Por ejemplo, la referencia a un transgén que comprende una secuencia codificante unida operativamente a un promotor heterólogo significa que el promotor es uno que normalmente no dirige la expresión de la secuencia de nucleótidos en una célula especificada en la naturaleza.

En general, los nucleótidos que comprende una molécula exógena de ácido nucleico (transgén) son desoxirribonucleótidos de origen natural, tales como adenina, citosina, guanina o timina unidos a 2'-desoxirribosa, o ribonucleótidos tales como adenina, citosina, guanina o uracilo unidos a ribosa. Sin embargo, una secuencia de nucleótidos o una molécula de ácido nucleico también pueden contener análogos de nucleótidos, incluyendo nucleótidos sintéticos de origen no-natural o nucleótidos de origen natural modificados. Dichos análogos de nucleótidos se conocen bien en la técnica y se encuentran disponibles en el mercado, así como los polinucleótidos que contienen dichos análogos de nucleótidos (Lin *et al.*, *Nucl. Acids Res* 22:5220-5234, 1994; Jellinek *et al.*, 34:11363 *Biochemistry* 34:11363-11372, 1995; Pagratis *et al.*, *Nature Biotechnol* 15:68-73, 1997). Asimismo, el enlace covalente que une los nucleótidos de una

ES 2 339 559 T3

secuencia de nucleótidos generalmente es un enlace fosfodiéster, pero también puede ser, por ejemplo, un enlace de tiodiéster, un enlace fosforotioato, un enlace de tipo peptídico o cualquier otro enlace conocido por los expertos en la material que sea útil para unir nucleótidos para producir polinucleótidos sintéticos (véase, por ejemplo, Tam *et al.*, Nucl. Acids. Res. 22:977-986, 1994; Ecker y Crooke, BioTechnology 13:351360, 1995). La incorporación de análogos de nucleótidos de origen no natural o de enlaces que unen a los nucleótidos o a los análogos puede ser especialmente útil cuando la molécula de ácido nucleico va a exponerse a un entorno que puede contener una actividad nucleolítica, incluyendo, por ejemplo, un medio de cultivo de tejidos de plantas o en una celda de la planta, ya que las moléculas modificadas pueden ser menos susceptibles a la degradación.

Una secuencia de nucleótidos que contiene nucleótidos de origen natural y enlaces fosfodiéster puede sintetizarse químicamente o puede producirse usando métodos de ADN recombinante, usando, como molde, un polinucleótido apropiado. En comparación, una secuencia de nucleótidos que contiene análogos de nucleótidos o enlaces covalentes distintos a los enlaces fosfodiéster generalmente se sintetiza químicamente, aunque una enzima tal como la polimerasa T7 puede incorporar determinados tipos de análogos de nucleótidos en un polinucleótido y, por lo tanto, puede usarse para producir dicho polinucleótido de manera recombinante a partir de un molde adecuado (Jellinek *et al.*, *anteriormente*, 1995).

Una molécula exógena de ácido nucleico puede comprender secuencias de nucleótidos unidas operativamente tal como un promotor unido operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica un ARNhp, o un promotor unido a una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de la androfertilidad. El término “operativamente unido” se utiliza en este documento para referirse a dos o más moléculas que, cuando están unidas entre sí, generan una molécula que comparte rasgos característicos de cada una de las moléculas individuales. Por ejemplo, cuando se usa en referencia a un promotor (u otro elemento regulador) y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico, el término “operativamente unido” significa que el elemento regulador está colocado con respecto a la segunda secuencia de nucleótidos, de manera que la transcripción o la traducción de la secuencia de nucleótidos aislada está bajo la influencia del elemento regulador. Cuando se usa en referencia a una proteína de fusión que comprende un primer polipéptido y uno o más polipéptidos adicionales, la expresión “unido operativamente” significa que cada componente polipeptídico de la proteína de fusión (quimérica) muestra algunas o todas las funciones características del polipéptido componente (por ejemplo, un dominio de localización de compartimiento de célula y una actividad enzimática). En otro ejemplo, dos secuencias de nucleótidos unidas operativamente, cada una de las cuales codifica un polipéptido, pueden ser tal que las secuencias codificantes están en fase de lectura y, por lo tanto, después de la transcripción y traducción, dan como resultado la producción de dos polipéptidos, que pueden ser dos polipéptidos distintos o una proteína de fusión.

Cuando una molécula exógena de ácido nucleico incluye un promotor unido operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica un ARN o un polipéptido de interés, puede hacerse referencia a la molécula exógena de ácido nucleico como una molécula exógena de ácido nucleico expresable (o transgén). El término “expresable” se utiliza en este documento porque, aunque dicha secuencia de nucleótidos puede expresarse a partir del promotor, realmente no es necesario que se exprese en un momento determinado. Por ejemplo, cuando un promotor de un transgén expresable es un promotor inducible que carece de actividad basal, una secuencia de nucleótidos unida operativamente que codifica un ARN o polipéptido de interés se expresa sólo después de la exposición a un agente de inducción apropiado.

Los promotores transcripcionales generalmente actúan de una manera dependiente de la posición y orientación y habitualmente se colocan en o dentro de aproximadamente de cinco nucleótidos a aproximadamente cincuenta nucleótidos 5' (cadena arriba) del sitio de inicio de la transcripción de un gen en la naturaleza. Comparándolos, los potenciadores pueden actuar de una manera relativamente independiente de la posición y orientación y se pueden colocar varios cientos o miles de nucleótidos cadena arriba o cadena abajo desde un sitio de inicio de la transcripción, o en un intrón dentro de la región codificante de un gen, sin dejar de estar unido operativamente a la región codificante con objeto de potenciar la transcripción. Las posiciones y orientaciones relativas de diversos elementos reguladores, además de las de un promotor, incluyen el posicionamiento de una secuencia reguladora transcrita tal como un sitio de entrada interno del ribosoma, o un elemento regulador traducido tal como un dominio de compartimentación celular en un marco de lectura adecuado, se conocen bien, y en la técnica los métodos para unir operativamente dichos elementos son rutinarios (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, “Molecular Cloning: A laboratory manual” (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989); Ausubel *et al.*, “Current Protocols in Molecular Biology” (John Wiley y Sons, Baltimore MD 1987 y suplementos durante 1995)).

Los promotores útiles para expresar una molécula de ácido nucleico de interés pueden ser cualquiera de un intervalo de promotores de origen natural, que se sabe que son operativos en plantas o animales, según se desee. Los promotores que dirigen la expresión en las células de los órganos reproductores masculinos o femeninos de una planta son útiles para generar una planta transgénica o par de plantas reproductoras de la invención. Los promotores útiles en la presente invención pueden incluir promotores constitutivos, que generalmente son activos en la mayoría o todos los tejidos de una planta; promotores inducibles, que generalmente son inactivos o presentan un bajo nivel de expresión basal, y pueden inducirse a una actividad relativamente alta después del contacto de las células con un agente de inducción apropiado; promotores específicos de tejidos (o preferidos de tejidos), que generalmente se expresan en un solo o pocos tipos de células en particular (por ejemplo, células de la antera de la planta); y promotores específicos del desarrollo o de fases, que solo son activos durante un período definido durante el crecimiento o desarrollo de una planta. A menudo los promotores pueden modificarse, si es necesario, para variar el nivel de expresión. Algunas realizaciones comprenden promotores exógenos para la especie que se manipula. Por ejemplo, el gen Ms45 introducido

en el germoplasma de maíz ms45ms45 puede conducirse por un promotor aislado de otra especie de planta; después puede diseñarse una construcción en horquilla para dirigir el promotor exógeno de la planta, reduciendo la posibilidad de que la horquilla interactúe con promotores no diana endógenos del maíz.

5 Los promotores constitutivos ejemplares incluyen el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell *et al.* (1985) *Nature* 313:810-812), el promotor de ubiquitina del maíz (Christensen *et al.* (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:619-632 y Christensen *et al.* (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689); el promotor del núcleo del promotor Rsyn7 y otros promotores constitutivos descritos en el documento WO 99/43838 y en la Patente de Estados Unidos N° 6.072.050: actina del arroz (McElroy *et al.* (1990) *Plant Cell* 2:163-171); pEMU (Last *et al.*: Theor (1991). *Appl. Genet.* 81:581-588); MAS (Velten *et al.* (1984) *EMBO J* 3:2723-2730); promotor ALS (Patente de Estados Unidos N° 5.659.026); promotor de la actina del arroz (Patente de Estados Unidos. N° 5.641.876; documento WO 00/70067), promotor de la histona de maíz (Brignon *et al.*, *Plant Mol Biol* 22 (6): 1007-1015 (1993); Rasco-Gante *et al.*, *Plant Cell Rep.* 21 (6): 569-576 (2003)) y similares. Otros promotores constitutivos incluyen, por ejemplo, los descritos en las patentes de Estados Unidos N° 5.608.144 y 6.177.611 y en la publicación PCT WO 03/102198.

15 Los elementos reguladores específicos de tejidos, preferidos de tejidos o específicos de fases incluyen adicionalmente, por ejemplo, el elemento regulador AGL8/FRUITFULL, que se activa después de la inducción floral (Hempel *et al.*, *Development* 124:3845-3853, 1997); elementos reguladores específicos de raíces tales como los elementos reguladores del gen RCPI y del gen LRP1 (Tsugeki y Fedoroff, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 96:12941-12946, 1999; Smith y Fedoroff, *Plant Cell* 7:735-745, 1995); elementos reguladores específicos de flores tales como los elementos reguladores del gen LEAFY y del gen APETALA1 (Blazquez *et al.*, *Development* 124:3835-3844, 1997; Hempel *et al.*, anteriormente, 1997); elementos reguladores específicos de semillas tales como el elemento regulador del gen oleosin (Plant *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 25:193-205, 1994) y elemento regulador específico de la zona de dehiscencia. Otros elementos reguladores específicos de tejidos o específicos de fase incluyen el promotor Zn13, que es un promotor específico de polen (Hamilton *et al.*, *Plant. Mol. Biol.* 18:211-218, 1992); el promotor de ÓRGANOS FLORALES INUSUALES (UFO), que es activo en el meristema apical del vástago; el promotor activo en el meristema de los vástagos (Atanassova *et al.*, *Plant J.* 2:291, 1992), el promotor cdc2 y el promotor cyc07 (véase, por ejemplo, Ito *et al.*, *Plant. Mol. Biol.* 24:863-878, 1994; Martínez *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 89:7360, 1992); los promotores preferidos de meristema meri-5 y H3 (Medford *et al.*, *Plant Cell* 3:359, 1991; Terada *et al.*, *Plant J.* 3:241, 1993); 20 promotores preferidos de meristema y floema de genes Myb relacionados en cebada (Wissenbach *et al.*, *Plant J.* 4:411, 1993); cyc3aAt y cyc1At de *Arabidopsis* (Shaul *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 4868-4872); CYS y CYM de *C. roseus cyclins* (Ito *et al.* (1997) *Plant J.* 11:983-992) y *CyclinBI* de *Nicotiana* (Trehin *et al.* (1997) *Plant Mol. Biol.* 35: 667-672); el promotor del gen APETALA3, que es activo en el meristema floral (Jack *et al.*, *Cell* 76: 703, 1994; Hempel *et al.*, anteriormente 1997); un promotor un miembro de la familia de tipo agamous (AGL), por ejemplo, 35 AGL8, que es activo en el meristema del vástago después de la transición de la floración (Hempel *et al.*, anteriormente 1997); promotores de la zona de abscisión floral; promotores específicos L1; promotor de poligalacturonasa del tomate de maduración potenciada (Nicholass *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 28: 423-435 (1995)), el promotor E8 (Deikman *et al.*, *Plant Physiol.* 100: 2013-2017 (1992)) y el promotor 2A1 específico de fruta, promotores de ARNs de U2 y U5 del maíz, el promotor Z4 de un gen que codifica la proteína zeina Z4 de 22 kD, el promotor Z10 de un gen que codifica una proteína zeina de 10 kD, un promotor Z27 de un gen que codifica una proteína zeina de 27 kD, el promotor A20 del gen que codifica una proteína zeina de 19 kD y similares. Usando métodos bien conocidos (véase, por ejemplo Patente de Estados Unidos N° 5.589.379) pueden aislarse promotores específicos de tejido adicionales. Los promotores específicos de vástagos incluyen promotores preferidos del meristema de vástagos tales como los promotores descritos en Weigel *et al.* (1992) *Cell* 69: 843-859 (N° de Acceso M91208); N° de Acceso AJ131822; N° de Acceso Z71981; N° de Acceso AF049870 y promotores preferidos de vástagos descritos en McAvoy *et al.* (2003) *Acta Hort.* (ISHS) 625: 379-385. Los promotores preferidos de inflorescencia incluyen el promotor de chalcona sintasa (Van der Meer *et al.* (1992) *Plant J.* 2(4): 525-535), LAT52 específico de anteras (Twell *et al.* (1989) *Mol. Gen. Genet.* 217: 240-245), Bp4 específico de polen (Albani *et al.* (1990) *Plant Mol Biol.* 15: 605), gen Zm13 específico del polen de maíz (Hamilton *et al.* (1992) *Plant Mol. Biol.* 18: 211-218; Guerrero *et al.* (1993) *Mol. Gen. Genet.* 224: 161-168), 50 promotores específicos de microsporas tales como el promotor del gen apg (Twell *et al.*, *Sex. Plant Reprod.* 6: 217-224 (1993)), y promotores específicos del tapete tales como el promotor del gen TA29 (Mariani *et al.*, *Nature* 347: 737,1990; Patente de Estados Unidos N° 6.372.967) y otros promotores específicos de estambres tales como el promotor del gen MS45, el promotor del gen 5126, el promotor del gen BS7, el promotor del gen PG47 (documentos US 5.412.085; US 5.545.546; *Plant J* 3(2): 261-271 (1993)), el promotor del gen SGB6 (documento US 5.470.359), el promotor del gen G9 (5.8937.850; 5.589.610), el promotor del gen SB200 (documento WO 02/26789), o similares (véase el Ejemplo 1). Los promotores preferidos de tejido de interés incluyen adicionalmente un gen expresado en el polen de girasol SF3 (Baltz *et al.* (1992) *The Plant Journal* 2: 713-721), genes específicos de polen de *B. napus* (Arnoldo *et al.* (1992) *J. Cell. Biochem. Abstract No.* Y101204). Los promotores preferidos de tejido adicionalmente incluyen aquellos indicados por Yamamoto *et al.* (1997) *Plant J.* 12(2): 255-265 (psaDb); Kawamata *et al.* (1997) *Plant Cell Physiol.* 38(7)792-803 (PsPAU); Hansen *et al.* (1997) *Mol. Gen. Genet.* 254(3): 337-343 (ORF13); Russell *et al.* (1997) *Transgenic Res.* 6(2): 157-168 (waxy or ZmGBS; 27kDa zeina, ZmZ27; osAGP; osGT1); Rinehart *et al.* (1996) *Plant Physiol.* 112(3): 1331-1341 (Fbl2A from cotton); Van Camp *et al.* (1996) *Plant Physiol.* 112(2): 525-535 (*Nicotiana* SodA1 y SodA2); Canevascini *et al.* (1996) *Plant Physiol.* 112(2): 513-524 (*Nicotiana* Itp1); Yamamoto *et al.* (1994) *Plant Cell Physiol.* 35(5): 773-778 (promotor *Pinus* cab-6); Lam (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20: 181-196; Orozco *et al.* (1993) *Plant Mol Biol.* 23(6): 1129-1138 (spinach rubisco activase (Rca)); Matsuoka *et al.* (1993) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 90(20): 9586-9590 (promotor PPDK); y Guevara-García *et al.* (1993) *Plant J.* 4(3): 495-505 (promotor pmas de *Agrobacterium*). En la presente invención puede ser útil un promotor específico de tejidos que es activo en células de los órganos reproductores masculino y femenino.

Los promotores “preferidos de semilla” incluyen promotores “específicos de semilla” (aquellos promotores activos durante el desarrollo de la semilla tales como promotores de proteínas de reserva de la semilla) así como promotores “de germinación de semilla” (aquellos promotores activos durante la germinación de la semilla). Véase Thompson *et al.* (1989) *BioEssays* 10: 108. Dichos promotores preferidos de semilla incluyen, pero sin limitación, Cim1 (mensajero inducido por citoquinina), cZ19B1 (zeína del maíz de 19 kDa), mi1ps (mio-inositol-1-fosfato sintasa); véase el documento WO 00/11177 y la Patente de Estados Unidos N° 6.225.529. La gamma-zeína es un promotor específico del endospermo. Globulin-1 (Glob-1) es un promotor específico embrionario representativo. Para las dicotiledóneas, los promotores específicos de semillas incluyen, pero sin limitación, β -faseolin de judía, napin, β -conglucina, lecitina de semilla de soja, cruciferina y similares. Para las monocotiledóneas, los promotores específicos de semillas incluyen, pero sin limitación, zeína de maíz de 15 kDa, zeína de 22 kDa, zeína de 27 kDa, gamma-zeína, ceroso, encogido 1, encogido 2, globulina 1, etc. Véase también el documento WO 00/12733 y la Patente de Estados Unidos 6.528.704, donde se describen promotores preferidos de semillas de los genes *end1* y *end2*. Otros promotores específicos de embriones se describen en Sato *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 8117-8122 (rice homeobox, OSH1); y Postma-Haarsma *et al.* (1999) *Plant Mol. Biol.* 39: 257-71 (rice KNOX genes). Otros promotores específicos de endospermo se describen en Albani *et al.* (1984) *EMBO* 3: 1405-15; Albani *et al.* (1999) *Theor. Appl. Gen.* 98: 1253-62; Albani *et al.* (1993) *Plant J.* 4: 343-55; Mena *et al.* (1998) *The Plant Journal* 116: 53-62 (barley DOF); Opsahl-Ferstad *et al.* (1997) *Plant J* 12:235-46 (maize Esr); y Wu *et al.* (1998) *Plant Cell Physiology* 39:885-889 (rice GluA-3, GluB-1, NRP33, RAG-1).

Un elemento regulador inducible es uno que es capaz de activar directa o indirectamente la transcripción de una o más secuencias de ADN o genes como respuesta a un inductor. El inductor puede ser un agente químico tal como una proteína, metabolito, regulador del crecimiento, herbicida o compuesto fenólico o una tensión fisiológica, tal como impuesta directamente por calor, frío, salinidad o elementos tóxicos o indirectamente mediante la acción de un agente patógeno o enfermedad tal como un virus; u otro agente biológico o físico o estado ambiental. Una célula vegetal que contiene un elemento regulador inducible puede exponerse a un inductor por aplicación externa del inductor a la célula o planta tal como por pulverización, riego, calentamiento o métodos similares. Un agente de inducción útil para inducir la expresión de un promotor inducible se selecciona basándose en el elemento regulador inducible particular. En respuesta a la exposición de un agente de inducción, la transcripción del elemento regulador inducible generalmente se inicia de novo o se aumenta por encima del nivel de expresión basal o constitutivo. Típicamente el factor de la proteína que se une específicamente a un elemento regulador inducible para activar la transcripción está presente en una forma inactiva que después el inductor convierte directa o indirectamente en la forma activa. En la presente invención puede usarse cualquier promotor inducible (Véase Ward *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 22: 361-366, 1993).

Los ejemplos de elementos reguladores inducibles incluyen un elemento regulador de metalotioneína, un elemento regulador inducible de cobre o un elemento regulador inducible de tetraciclina, cuya transcripción puede efectuarse en respuesta a iones metálicos divalentes, cobre o tetraciclina, respectivamente (Furst *et al.*, *Cell* 55: 705-717, 1988; Mett *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 90: 4567-4571, 1993; Gatz *et al.*, *Plant J.* 2: 397-404, 1992; Roder *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 243: 32-38, 1994). Los elementos reguladores inducibles también incluyen un elemento regulador de ecdisona o un elemento regulador glucocorticoide, cuya transcripción puede efectuarse en respuesta a la ecdisona u otros esteroides (Christopherson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 89: 6314-6318, 1992; Schena *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 88: 10421-10425, 1991; Patente de Estados Unidos N° 6.504.082); un elemento regulador sensible al frío o un elemento regulador de choque térmico, cuya transcripción puede efectuarse en respuesta a la exposición de frío o calor, respectivamente (Takahashi *et al.* *Plant Physiol.* 99: 383-390, 1992); el promotor del gen alcohol deshidrogenasa (Gerlach *et al.*, *PNAS USA* 79: 2981-2985 (1982); Walker *et al.*, *PNAS* 84(19): 6624-6628 (1987)), inducible por condiciones anaerobias y el promotor inducible lumínico procedente del gen *rbcS* del guisante o el gen *psaDb* del guisante (Yamamoto *et al.* (1997) *Plant J.* 12(2): 255-265); un elemento regulador inducible lumínico (Feinbaum *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 226: 449,1991; Lam y Chua, *Science* 248: 471,1990; Matsuoka *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 90(20): 9586-9590; Orozco *et al.* (1993) *Plant Mol. Biol.* 23(6): 1129-1138), un elemento regulador inducible de hormona vegetal (Yamaguchi-Shinozaki *et al.* *Plant Mol. Biol.* 15: 905,1990; Kares *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 15:225, 1990), y similares. Un elemento regulador inducible también puede ser el promotor del gen *ln2-1* o *ln2-2* del maíz, que responde a protectores herbicidas de benceno sulfonamida (Hershey *et al.*, *Mol. Gen. Gene.* 227: 229-237, 1991; Gatz *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 243: 32-38, 1994), y el represor Tet del transposón *Tn 10* (Gatz *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 227: 229-237, 1991). Los promotores inducibles por tensión incluyen promotores inducibles de tensión salina/agua tales como *P5CS* (Zang *et al.* (1997) *Plant Sciences* 129: 81-89); promotores inducibles por frío, tales como, *cor15a* (Hajela *et al.* (1990) *Plant Physiol.* 93: 1246-1252), *cor15b* (Wlhelm *et al.* (1993) *Plant Mol Biol* 23: 1073-1077), *wsc120* (Ouellet *et al.* (1998) *FEBS Lett.* 423-324-328), *ci7* (Kirch *et al.* (1997) *Plant Mol Biol.* 33: 897-909), *ci21A* (Schneider *et al.* (1997) *Plant Physiol.* 113: 335-45); promotores inducibles por sequía, tales como, *Trg-31* (Chaudhary *et al.* (1996) *Plant Mol. Biol.* 30: 1247-57), *rd29* (Kasuga *et al.* (1999) *Nature Biotechnology* 18:287-291); promotores inducibles por osmosis, tales como *Rab17* (Vilardell *et al.* (1991) *Plant Mol. Biol.* 17: 985-93) y *osmotina* (Raghothama *et al.* (1993) *Plant Mol Biol* 23: 1117-28); y promotores inducibles por calor, tales como proteínas de choque térmico (Barros *et al.* (1992) *Plant Mol.* 19: 665-75; Marrs *et al.* (1993) *Dev. Genet.* 14: 27-41), *smHSP* (Waters *et al.* (1996) *J. Experimental Botany* 47: 325-338), y el elemento inducible por choque térmico del promotor de ubiquitina del perejil (documento WO 03/102198). Otros promotores inducibles por tensión incluyen *rip2* (Patente de Estados Unidos N° 5.332.808 y Publicación de Estados Unidos N° 2003/0217393) y *rd29a* (Yamaguchi-Shinozaki *et al.* (1993) *Mol. Gen. Genetics* 236: 331-340). Determinados promotores son inducibles por lesión, incluyendo el promotor *pmas* de *Agrobacterium* (Guevara-García *et al.* (1993) *Plant J.* 4(3):495-505) y el promotor ORF13 de *Agrobacterium* (Hansen *et al.* (1997) *Mol. Gen. Genet.* 254(3): 337-343).

ES 2 339 559 T3

Otros elementos reguladores activos en células de plantas y útiles en los métodos o composiciones de la invención incluyen, por ejemplo, el elemento regulador del gen nitrito reductasa de la espinaca (Back *et al.* Plant Mol. Biol. 17: 9, 1991); un promotor de gamma zeina, un promotor ole16 de oleosina, un promotor de globulin I, un promotor I de actina, un promotor cl de actina, un promotor de sacarosa sintetasa, un promotor de INOPS, un promotor de EXM5, un promotor de globulin2, ab-32, un promotor de ADPG-pirofosforilasa, un promotor de Ltpl, un promotor de Ltp2, un promotor ole17 de oleosina, un promotor ole18 de oleosina, un promotor de actina 2, un promotor de proteína específico de polen, un promotor del gen pectato liasa específico de polen o un promotor del gen PG47, y un promotor del gen RTS2 específico de antera, un promotor del gen SGB6 o promotor del gen G9, un promotor del gen RAB24 específico del tapete, un promotor de la sub-unidad alfa antranilato sintasa, un promotor alfa zeina, un promotor de la subunidad beta antranilato sintasa, un promotor de dihidrodipicolinato sintasa, un promotor de Thi I, un promotor de alcohol deshidrogenasa, un promotor de proteína de unión cab, un promotor H3C4, un promotor de la enzima de ramificación del almidón RUBISCO SS, un promotor de actina 3, un promotor de actin7, un promotor GF14-12 de proteína reguladora, un promotor L9 de proteína ribosómica, un promotor de la enzima biosintética de la celulosa, un promotor de hidrolasa S-adenosil-L-homocisteína, un promotor de superóxido dismutasa, un promotor del receptor C-quinasa, un promotor de fosfoglicerato mutasa, un promotor de ARNm de RCc3 específico de raíz, un promotor de glucosa-6 fosfato isomerasa, un promotor de pirofosfato-fructosa 6-fosfato-1-fosfotransferasa, un promotor de beta-cetoacil-ACP sintasa, un promotor 11 de foto sistema de 33 kDa, un promotor de la proteína desarrolladora de oxígeno, un promotor de la subunidad ATPasa vacuolar de 69 kDa, un promotor gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, un promotor de la proteína de tipo inducible de maduración y ABA, un promotor de amonio liasa de fenilalanina, un promotor de adenosina trifosfatasa S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa, un promotor de chalcona sintasa, un promotor de zeina, un promotor de globulin-1, un promotor de proteína de unión a auxina, un promotor del gen UDP glucosa flavonoide glicosil transferasa, un promotor de NTI, un promotor de actina, y un promotor de opaco 2.

Una molécula exógena de ácido nucleico puede introducirse en una célula como una molécula de ADN desnuda, puede incorporarse en una matriz tal como un liposoma o una partícula tal como una partícula viral, o puede incorporarse en un vector. La incorporación del polinucleótido en un vector puede facilitar la manipulación del polinucleótido o la introducción del polinucleótido en una célula de la planta. Por consiguiente, el vector puede proceder de un plásmido o puede ser un vector viral tal como un vector T-ADN (Horsch *et al.* Science 227: 1229-1231 (1985)). Si se desea, el vector puede incluir componentes de un elemento transposable de una planta, por ejemplo, un transposón Ds (Bancroft y Dean, Genetics 134: 1221-1229, 1993) o un transposón Spm (Aarts *et al.* Mol. Gen. Genet. 247: 555-564, 1995). Además de contener el transgén de interés, el vector también puede contener diversas secuencias de nucleótidos que facilitan, por ejemplo, el rescate del vector desde una célula de la planta transformada; el paso del vector en una célula hospedadora, que puede ser una célula hospedadora vegetal, animal, bacteriana o de insecto; o la expresión de una secuencia de nucleótidos codificante en el vector, incluyendo toda o una parte de una región codificante rescatada. Por tanto, un vector puede contener cualquiera de una diversidad de otros elementos de transcripción y de traducción, que incluyen promotores constitutivos e inducibles, potenciadores y similares (véase, por ejemplo, Bitter *et al.* Meth. Enzymol. 153: 516-544, 1987). Por ejemplo, un vector puede contener elementos útiles para el paso, crecimiento o expresión en un sistema bacteriano, incluyendo un origen de replicación bacteriano; un promotor, que puede ser un promotor inducible; y similares. Un vector también puede contener uno o más sitios de escisión y de reconocimiento de endonucleasas de restricción, que incluyen, por ejemplo, una secuencia poli enlazadora, para facilitar la inserción o eliminación de un transgén.

Además, o como alternativa, una secuencia de nucleótidos pertinente para un gen relacionado con la fertilidad (por ejemplo, un ARNhp que comprende una repetición invertida de un promotor génico relacionado con la fertilidad, o una secuencia codificante de un gen relacionado con la fertilidad, en solitario o unido operativamente a un promotor heterólogo), una molécula exógena de ácido nucleico o un vector que contiene dicho transgén, puede contener una o más de otras secuencias de nucleótidos expresables que codifican un ARN o un polipéptido de interés. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos adicional puede codificar una molécula antisentido de ácido nucleico; una enzima tal como β -galactosidasa, β -glucuronidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glutatión α -transferasa, cloramfenicol acetiltransferasa, guanina xantina fosforibosiltransferasa y neomicin fosfotransferasa; un polipéptido viral o una parte peptídica del mismo o un factor de crecimiento vegetal u hormona.

En determinadas realizaciones, el vector de expresión contiene un gen que codifica un marcador de selección que está unido funcionalmente a un promotor que controla el inicio de la transcripción. Para una descripción general de vectores de expresión y genes indicadores en plantas, véase Gruber *et al.*, "Vectors for Plant Transformation" in Methods of Plant Molecular Biology and Biotechnology 89-119 (CRC Press, 1993). En el uso de la expresión, esto significa incluir todos los tipos de marcadores de selección, valorables o selectivos. La expresión de dicha secuencia de nucleótidos puede proporcionar un medio para seleccionar una célula que contiene la construcción, por ejemplo, confiriendo un fenotipo deseable a una célula de la planta que contiene la secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos adicional puede ser, o codificar, un marcador seleccionable que, cuando está presente o se expresa en una célula de la planta, proporciona un medio para identificar la célula de la planta que contiene el marcador.

Un marcador seleccionable proporciona un medio para explorar una población de organismos o células de un organismo (por ejemplo, plantas o células de plantas) para identificar aquellas que tienen el marcador y, por lo tanto, el transgén de interés. Un marcador seleccionable generalmente confiere una ventaja selectiva a la célula o a un organismo (por ejemplo, una planta) que contiene la célula, por ejemplo, la capacidad de desarrollarse en presencia de un agente selectivo negativo tal como un antibiótico o, en el caso de una planta, un herbicida. Una ventaja selectiva

también puede deberse, por ejemplo, a una capacidad potenciada o novedosa para utilizar un compuesto añadido como un nutriente, factor de crecimiento o fuente de energía. Puede conferirse una ventaja selectiva mediante un solo polinucleótido, o su producto de expresión o mediante una combinación de polinucleótidos cuya expresión en una célula de la planta proporciona a la célula una ventaja positiva selectiva, una ventaja negativa selectiva o ambas.

5 Debe reconocerse que la expresión del transgén de interés (por ejemplo, que codifica un ARNhp) también proporciona un medio para seleccionar células que contienen la secuencia de nucleótidos codificante. Sin embargo, el uso de un marcador seleccionable adicional, que, por ejemplo, permite que una célula vegetal sobreviva en condiciones tóxicas de otra manera, proporciona un medio para enriquecer a las células de la planta transformadas que contienen el transgén deseado. Ejemplos de genes valorables o de selección conocidos en la técnica pueden encontrarse, por ejemplo, en
10 Jefferson *et al.* (1991) in *Plant Molecular Biology Manual*, ed. Gelvin *et al.* (Kluwer Academic Publishers), págs. 1-33; DeWet *et al.* *Mol. Cell. Biol.* 7: 725-737, 1987; Goff *et al.*, *EMBO J.* 9: 2517-2522, 1990; Kain *et al.*, *BioTechniques* 19: 650-655, 1995; y Chiu *et al.*, *Curr. Biol.* 6: 325-330, 1996.

Los ejemplos de marcadores seleccionables incluyen aquellos que confieren resistencia a antimetabolitos tales
15 como herbicidas o antibióticos, por ejemplo, dihidrofolato reductasa, que confiere resistencia a metotrexato (Reiss, *Plant Physiol. (Life Sci. Adv.)* 13: 143-149, 1994; véase también Herrera Estrella *et al.*, *Nature* 303: 209-213, 1983; Meijer *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 16: 807-820, 1991); neomicina fosfotransferasa, que confiere resistencia a neomicina aminoglucósidos, kanamicina y paromicina (Herrera-Estrella, *EMBO J.* 2: 987-995, 1983) e higro, que confiere resistencia higromicina (Marsh, *Gene* 32: 481-485, 1984; véase también Waldron *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 5: 103-108, 1985; Zhijian *et al.*, *Plant Science* 108: 219-227, 1995); trpB, que permite a las células utilizar indol en lugar de triptófano; hisD, que permite a las células usar histinol en lugar de histidina (Hartman, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85: 8047, 1988); manosa-6-fosfato isomerasa que permite a las células utilizar manosa (documento WO 94/20627); ornitina descarboxilasa, que confiere resistencia al inhibidor de ornitina descarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina (DF-MO; McConlogue, 1987, En: *Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory ed.);
20 y deaminasa de *Aspergillus terreus*, que confiere resistencia Blasticidin S (Tamura, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59: 2336-2338, 1995). Los marcadores seleccionables adicionales incluyen, por ejemplo, una sintasa EPSPV mutante, que confiere resistencia al glifosato (Hinchee *et al.*, *BioTechnology* 9: 915-922, 1998), una acetolactato sintasa mutante, que confiere resistencia a imidazolinona o sulfonilurea (Lee *et al.*, *EMBO J.* 7: 1241-1248, 1988), un psbA mutante, que confiere resistencia a atrazina (Smeda *et al.*, *Plant Physiol.* 103: 911-917, 1993), o una oxidasa protoporfirinógena mutante (véase la Patente de Estados Unidos N° 5.767.373), u otros marcadores que confieren resistencia a un herbicida tal como glufosinato. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables adecuados incluyen, pero sin limitación, genes que codifican para la resistencia a cloramfenicol (Herrera Estrella *et al.*, *EMBO J.* 2: 987-992, 1983); estreptomina (Jones *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 210: 86-91, 1987); espectinomina (Bretagne-Sagnard *et al.*, *Transgenic Res.* 5: 131-137, 1996); bleomicina (Hille *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 7: 171-176, 1990); sulfonamida (Guerineau *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 15: 127-136, 1990); bromoxinil (Stalker *et al.*, *Science* 242: 419-423, 1988); glifosato (Shaw *et al.*, *Science* 233: 478-481, 1986); fosfotricin (DeBlock *et al.*, *EMBO J.* 6: 2513-2518, 1987), y similares. Una opción para usar un gen selectivo es un ADN que codifica para la resistencia a glufosinato y en una realización puede ser el gen fosfotricin acetiltransferasa ("PAT"), el gen PAT optimizado para el maíz o el gen bar controlado por los promotores de CaMV 35S o de ubiquitina. Los genes confieren resistencia a bialafos. Véase, Gordon-Kammet al., *Plant Cell* 2: 603; 1990; Uchimiya *et al.*, *BioTechnology* 11: 835, 1993; White *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 18: 1062, 1990; Spencer *et al.*, *Theor. Appl. Genet.* 79: 625-631, 1990; y Anzai *et al.*, *Mol. Gen. Gen.* 219:492, 1989). Una aversión del gen PAT es el gen PAT optimizado del maíz, descrito en la Patente de Estados Unidos N° 6.096.947.
30
35
40

Adicionalmente, los marcadores que facilitan la identificación de una célula vegetal que contiene el polinucleótido
45 que codifica el marcador incluyen, por ejemplo, luciferasa (Giacomin, *Plant Sci.* 116: 59-72, 1996; Scikantha, *J. Bacteriol.* 178:121, 1996), proteína verde fluorescente (Gerdes, *FEBS Lett.* 389: 44-47, 1996; Chalfie *et al.*, *Science* 263: 802, 1994), y otras variantes de proteína fluorescente o β -glucuronidasa (Jefferson, *Plant Mol. Biol.* 5: 387, 1987; Jefferson *et al.*, *EMBO J.* 6: 3901-3907, 1987; Jefferson, *Nature* 342(6251): 837-838, 1989); los genes del maíz que regulan la producción de pigmentos (Ludwig *et al.*, *Science* 247: 449, 1990; Grotewold *et al.*, *PNAS* 88: 4587-4591, 1991; Cocciolone *et al.*, *Plant J* 27(5): 467-478, 2001; Grotewold *et al.*, *Plant Cell* 10: 721-740, 1998); β -galactosidasa (Teeri *et al.*, *EMBO J.* 8: 343-350, 1989); luciferasa (Ow *et al.*, *Science* 234: 856-859, 1986); cloramfenicol acetiltransferasa (CAT) (Lindsey y Jones, *Plant Mol. Biol.* 10: 43-52, 1987); y muchos otros descritos en este documento u otros conocidos en la técnica. Dichos marcadores también pueden usarse como moléculas indicadoras. Los expertos en la materia pueden realizar muchas variaciones sobre promotores, marcadores seleccionables y otros componentes de la construcción.
50
55

El término "planta" se usa ampliamente en este documento para incluir cualquier planta o una parte de una planta, en cualquier fase del desarrollo, que incluye un esqueje de la planta, una célula de la planta, un cultivo celular de la planta, un órgano de la planta, una semilla de la planta y una plántula. Una célula de planta es la unidad estructural y fisiológica de la planta, que comprende un protoplasto y una pared celular. Una célula vegetal puede estar en forma de una célula única aislada o agregado de células tal como un callo friable o una célula cultivada o puede ser parte de una unidad superior organizada, por ejemplo, un tejido de la planta, un órgano de la planta o una planta. Por tanto, una célula vegetal puede ser un protoplasto, una célula productora de gametos o una célula o colección de células que pueden regenerarse en una planta completa. Por tanto, una semilla, que comprende células múltiples de la planta y que es capaz de regenerarse en una planta completa, se considera una célula de la planta para los propósitos de esta descripción. Un tejido o un órgano de una planta pueden ser una semilla, un protoplasto, un callo o cualquier otro grupo de células vegetales que está organizado en una unidad estructural o funcional. Particularmente las partes útiles de una planta incluyen partes cosechables y partes útiles para la propagación de la descendencia de las plantas.
60
65

Una parte cosechable de una planta puede ser cualquier parte útil de una planta, por ejemplo, flores, polen, plántulas, tubérculos, hojas, tallos, fruto, semillas, raíces y similares. Una parte de una planta útil para la propagación incluye, por ejemplo, semillas, frutos, esquejes, plántulas, tubérculos, rizomas y similares.

5 Una planta transgénica puede regenerarse a partir de una célula vegetal modificada genéticamente, es decir, una planta completa puede regenerarse a partir de una célula vegetal; un grupo de células vegetales; un protoplasto; una semilla; o una parte de una planta tal como una hoja, un cotiledón o un esqueje. La regeneración de protoplastos varía entre las especies de plantas. Por ejemplo, en la fase de maduración y germinación, puede prepararse una suspensión de protoplastos y, en determinadas especies, puede inducirse la formación de embriones a partir de la suspensión del protoplastos, Los medios de cultivo generalmente contienen diversos componentes necesarios para el desarrollo y regeneración, que incluyen, por ejemplo, hormonas tales como auxinas y citoquininas; y aminoácidos tales como ácido glutámico y prolina, dependiendo de la especie de planta en particular. La regeneración eficaz dependerá, en parte, del medio, del genotipo y de la historia del cultivo y es reproducible si se controlan estas variables.

15 La regeneración puede producirse a partir de callos, explantes, órganos o partes de la planta. La transformación puede realizarse en el contexto de regeneración de parte de la planta u órgano. (véase Meth. Enzymol. Vol. 118; Klee *et al.* Ann. Rev. Plant Physiol. 38: 467 (1987)). Utilizando el método de regeneración-transformación a partir de discos de hoja, por ejemplo, los discos se cultivan en medios selectivos, seguido de la formación de vástagos en aproximadamente de dos a cuatro semanas (véase Horsch *et al.*, anteriormente 1985). Los vástagos que se desarrollan se extirpan de los callos y se transplantan en un medio selectivo de inducción de raíces apropiado. Las plántulas enraizadas se transplantan al suelo tan pronto como sea posible después de la aparición de las raíces. Las plántulas pueden replantarse si se requiere, hasta alcanzar la madurez.

25 En cultivos propagados por semillas, las plantas maduras transgénicas pueden auto-polinizarse para producir una planta endogámica homocigótica. La planta endogámica resultante produce semillas que contienen el transgén introducido y pueden desarrollarse para producir plantas que expresan el polipéptido. Los métodos para la mejora y selección de plantas de reproducción cruzada que tienen características deseables u otras características de interés incluyen las descritas en este documento y otras que conocen bien los obtentores de variedades de plantas.

30 En diversos aspectos de la presente invención, uno o más transgenes se introducen en las células. Cuando se usa en referencia a un transgén, la expresión "introducción" significa transferir a una célula la molécula exógena de ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico puede introducirse en una célula vegetal mediante una diversidad de métodos. Por ejemplo, el transgén puede estar contenido en un vector, puede introducirse en una célula vegetal usando un método de transferencia génica directa tal como electroporación o transformación mediada por micro proyectiles o usando transformación mediada por *Agrobacterium*. Como se usa en este documento, la expresión "transformado" se refiere a una célula de planta que contiene una molécula de ácido nucleico introducida exógenamente.

40 En las células vegetales pueden introducirse una o más moléculas exógenas de ácido nucleico usando cualquiera de los métodos conocidos y rutinarios para la transformación en plantas, incluyendo los protocolos biológicos y físicos de transformación en plantas (véase, por ejemplo, Miki *et al.*, "Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants"; In Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick y Thompson, Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993) páginas 67-88). Además, los vectores de expresión y los métodos de cultivo *in vitro* para la transformación de tejidos o células vegetales y regeneración de plantas se conocen bien y son rutinarios (véase, por ejemplo, Gruber *et al.*, "Vectors for Plant Transformation"; Id. páginas 89-119).

45 Los métodos adecuados de transformación de células vegetales incluyen microinyección, Crossway *et al.* (1986) Biotechniques 4: 320-334; electroporación, Riggs *et al.* (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5602-5606; transformación mediada por *Agrobacterium*, véase por ejemplo, Townsend *et al.* en la Patente de Estados Unidos 5.563.055; transferencia directa de genes, Paszkowski *et al.* (1984) EMBO J. 3: 2717-2722; y aceleración balística de partículas, véase por ejemplo, Sanford *et al.* Patente de Estados Unidos 4.945.050; Tomes *et al.* (1995) in Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods, ed. Gamborg and Phillips (Springer-Verlag, Berlin); and McCabe *et al.* (1988) Biotechnology 6: 923-926. Véase también Weissinger *et al.* (1988) Annual Rev. Genet. 22: 421-477; Sanford *et al.* (1987) Particulate Science and Technology 5: 27-37 (onion); Christou *et al.* (1988) Plant Physiol. 87: 671-674 (soybean); McCabe *et al.* (1988) Bio/Technology 6: 923-926 (soy bean); Datta *et al.* (1990) Biotechnology 8: 736-740 (rice); Klein *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4305-4309 (maize); Klein *et al.* (1988) Biotechnology 6: 559-563 (maize); Klein *et al.* (1988) Plant Physiol. 91: 440-444 (maize); Fromm *et al.* (1990) Biotechnology 8: 833-839; Hooydaas-Van Slogteren *et al.* (1984) Nature (Londres) 311: 763-764; Bytebier *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 5345-5349 (Liliaceae); De Wet *et al.* (1985) in The Experimental Manipulation of Ovule Tissues, ed. G. P. Chapman *et al.* (Longman, Nueva York), págs. 197-209 (pollen); Kaeppler *et al.* (1990) Plant Cell Reports 9:415-418; y Kaeppler *et al.* (1992) Theor. Appl. Genet. 84: 560-566 (whisker-mediated transformation); D.Halluin *et al.* (1992) Plant Cell 4: 1495-1505 (electroporación); Li *et al.* (1993) Plant Cell Reports 12: 250-255 y Christou *et al.* (1995) Annals of Botany 75: 407-413 (rice); Osjoda *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14:745-750 (maize via *Agrobacterium tumefaciens*); incorporados todos en este documento por referencia.

65 La transformación mediada por *Agrobacterium* proporciona un método útil para la introducción de un transgén en las plantas (Horsch *et al.*, Science 227: 1229 1985). *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* son bacterias patógenas presentes en el suelo que transforman genéticamente las células de la planta. Los plásmidos Ti y Ri de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, respectivamente, portan genes responsables de la transformación genética de la planta (véase, por ejemplo,

Kado, Crit. Rev. Plant Sci.10: 1, 1991; véase, también, Moloney *et al.*, Plant Cell Reports 8: 238, 1989; la Patente de Estados Unidos N° 5.591.616; el documento WO 99/47552; Weissbach y Weissbach, "Methods for Plant Molecular Biology" (Academic Press, NY 1988), sección VIII, páginas 421-463; Grierson y Corey, "Plant Molecular Biology" 2ª Ed. (Blackie, Londres 1988), Capítulos 7-9; véase, también, Horsch *et al.*, *anteriormente* 1985).

5 Con respecto a *A. tumefaciens*, la forma de tipo silvestre contiene un plásmido Ti que dirige la producción de la agalla de la corona tumorigénica que se desarrolla en las plantas hospedadoras. La transferencia de la región del ADN-T que induce el tumor del plásmido Ti a un genoma de la planta requiere los genes de virulencia codificados por el plásmido Ti así como bordes de ADN-T, que son una serie de repeticiones directas de ADN que delinean la región a transferir. Un vector basado en *Agrobacterium* es una forma modificada de un plásmido Ti, en el que las funciones de inducción del tumor se sustituyen por una secuencia de nucleótidos de interés que se introduce en la planta hospedadora. Los métodos de uso de la transformación mediada por *Agrobacterium* incluyen la cocultivación de *Agrobacterium* con protoplastos aislados cultivados; la transformación de células o tejidos vegetales con *Agrobacterium*; y la transformación de semillas, ápices o meristemos con *Agrobacterium*. Además la transformación en la planta por *Agrobacterium* puede realizarse usando infiltración al vacío de una suspensión de células de *Agrobacterium* (Bechtold *et al.*, C.R. Acad. Sci. Paris 316: 1194, 1993).

La transformación mediada por *Agrobacterium* puede emplear sistemas de vectores cointegrados o de vectores binarios, en los que los componentes del plásmido Ti se dividen entre un vector auxiliar, que reside permanente en el hospedador *Agrobacterium* y porta los genes de virulencia, y un vector lanzadera, que contiene el gen de interés unido a secuencias de ADN-T. Los vectores binarios se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, De Framond, BioTechnology 1: 262, 1983; Hoekema *et al.*, Nature 303: 179, 1983) y están disponibles en el mercado (Clontech; Palo Alto CA). Para la transformación, *Agrobacterium* puede cocultivarse, por ejemplo, con células vegetales o tejido lesionado tal como tejido foliar, explantes de raíz, hipocótilos, cotiledones, partes del tallo o tubérculos (véase, por ejemplo, Glick y Thompson, "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (Boca Ratón FL, CRC Press 1993)). Las células lesionadas dentro del tejido de la planta que se han infectado por *Agrobacterium* pueden desarrollar órganos *de novo* cuando se cultivan en condiciones apropiadas, los brotes transgénicos resultantes eventualmente dan lugar a plantas transgénicas que contienen el polinucleótido introducido.

La transformación mediada por *Agrobacterium* se ha usado para producir una diversidad de plantas transgénicas, incluyendo, por ejemplo, plantas crucíferas transgénicas tales como *Arabidopsis*, mostaza, colza y lino; plantas leguminosas transgénicas tales como alfalfa, guisantes, soja, trébol y trébol blanco; plantas solanáceas transgénicas tales como berenjena, petunia, patata, tabaco y tomate (véase, por ejemplo, Wang *et al.*, "Transformation of Plants and Soil Microorganisms" (Cambridge, University Press 1995)). Además, la transformación mediada por *Agrobacterium* puede usarse para introducir una molécula exógena de ácido nucleico en manzana, álamo, belladona, grosella negra, zanahoria, apio, algodón, pepino, uva, rábano picante, lechuga, campanilla, melón rayado, nim, álamo, fresa, remolacha azucarera, girasol, nuez, espárrago, arroz, trigo, sorgo, cebada, maíz y otras plantas (véase, por ejemplo, Glick y Thompson, *anteriormente* 1993; Hiei *et al.*, Plant J. 6: 271-282, 1994; Shimamoto, Science 270: 1772-1773, 1995).

Las cepas adecuadas de *A. tumefaciens* y vectores así como la transformación de *Agrobacterium* y medios de crecimiento y selección adecuados se conocen bien en la técnica (GV3101, pMK90RK), Koncz, Mol. Gen. Genet. 204: 383-396, 1986; (C58C1, pGV3850kan), Deblaere, Nucl. Acid Res. 13: 4777, 1985; Bevan, Nucleic Acid Res. 12: 8711, 1984; Koncz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8467-8471, 1986; Koncz, Plant Mol. Biol. 20: 963-976, 1992; Koncz, Specialized vectors for gene tagging and expression studies. In: Plant Molecular Biology Manual Vol. 2, Gelvin and Schilperoort (Eds.), Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publ. (1994), 1-22; Patente europea A-1 20 516; Hoekema: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985), Capítulo V; Fraley, Crit. Rev. Plant. Sci., 4: 1-46; An, EMBO J. 4: 277-287, 1985).

Como se observa en este documento, la presente invención proporciona vectores capaces de expresar genes de interés controlados por elementos reguladores. En general, los vectores deben ser funcionales en las células vegetales. A veces, puede preferirse tener vectores que sean funcionales en *E. coli* (por ejemplo, producción de proteína para la generación de anticuerpos, análisis de secuencia de ADN, construcción de insertos, obtención de cantidades de ácidos nucleicos). Los vectores y procedimientos para la clonación y expresión en *E. coli* se describen en Sambrook *et al.*, (anteriormente).

El vector de transformación, que comprende el promotor de la presente invención unido operativamente a una secuencia aislada de ácido nucleico en un casete de expresión, también puede contener al menos una secuencia de nucleótidos adicional para un gen que se co-transforma en el organismo. Como alternativa, la secuencia (o secuencias) adicional puede proporcionarse en otro vector de transformación.

Cuando la molécula exógena de ácido nucleico esté contenida en un vector, el vector puede contener elementos funcionales, por ejemplo secuencias del "borde izquierdo" y del "borde derecho" del ADN-T de *Agrobacterium*, que permite la integración estable en un genoma de la planta. Además, se conocen métodos y vectores que permiten la generación de plantas transgénicas sin marcadores, por ejemplo, donde un gen marcador seleccionable se pierde en una fase determinado del desarrollo de la planta o de la reproducción de la planta e incluyen, por ejemplo, métodos de co-transformación (Lyznik, Plant Mol. Biol. 13: 151-161, 1989; Peng, Plant Mol. Biol. 27:91-104,1995), o métodos que utilizan enzimas capaces de promover la recombinación homóloga en plantas (véase, por ejemplo, el documento

WO97/08331; Bayley, *Plant Mol. Biol.* 18: 353-361, 1992; Lloyd, *Mol. Gen. Genet.* 242:653-657, 1994; Maeser, *Mol. Gen. Genet.* 230: 170-176, 1991; Onouchi, *Nucl. Acids Res.* 19: 6373-6378, 1991; véase, también Sambrook *et al.*, *anteriormente* 1989).

5 Los métodos directos de transferencia de genes también pueden usarse para introducir el transgén (o transgenes) deseado en las células, incluyendo células vegetales que son refractarias a la transformación mediada por *Agrobacterium* (véase, por ejemplo, Hiei *et al.*, *Plant J.* 6: 271-282, 1994; Patente de Estados Unidos N° 5.591.616). Dichos métodos incluyen la transferencia directa de genes (véase la Patente Europea A 164 575), inyección, electroporación, métodos de biolística tales como bombardeo de partículas, transformación mediada por polen, transformación mediada por virus en el ARN de la planta, transformación mediada por liposomas, transformación usando embriones inmaduros dañados o degradados por enzimas o callos embriogénicos dañados o degradados por enzimas, y similares. Los métodos directos de transferencia de genes incluyen métodos de transformación mediados por micro proyectiles (biolística), donde los micro proyectiles que miden de 1 a 4 mm llevan el transgén en la superficie. Un vector, particularmente un vector de expresión que contiene el transgén (o transgenes) de interés, se introduce en los tejidos de la planta con un dispositivo biolístico que acelera los micro proyectiles a velocidades de 300 a 600 m/s, suficiente para penetrar las paredes y membranas de la célula de la planta (véase, por ejemplo, Sanford *et al.*, *Part. Sci. Technol.* 5: 27, 1987; Sanford, *Trends Biotech.* 6: 299, 1988, Klein *et al.*, *BioTechnology* 6: 559-563, 1988; Klein *et al.*, *BioTechnology* 10: 268, 1992). En el maíz, por ejemplo, numerosos tejidos diana pueden bombardearse con micro proyectiles cubiertos con ADN para producir plantas transgénicas, incluyendo, por ejemplo, callos (de Tipo I o de Tipo II), embriones inmaduros y tejido meristemático.

Otros métodos para el suministro físico de un transgén en plantas utilizan la sonicación de las células diana (Zhang *et al.*, *BioTechnology* 9: 996, 1991); liposomas o fusión de esferoplastos (Deshayes *et al.*, *EMBO J.* 4: 2731, 1985; Christou *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci., USA* 84: 3962, 1987); precipitación o incubación de CaCl₂ con polivinil alcohol o poli-L-ornitina (Hain *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 199: 61, 1985; Draper *et al.*, *Plant Cell Physiol.* 23: 451, 1982); y electroporación de protoplastos y células y tejidos completos (Donn *et al.*, In "Abstracts of VIIIth International Congress on Plant Cell and Tissue Culture" IAPTC, A2-38, pág. 53, 1990; D'Halluin *et al.*, *Plant Cell* 4: 1495-1505, 1992; Spencer *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 24: 51-61, 1994).

30 Un método de transferencia directa de genes tal como electroporación puede ser particularmente útil para introducir moléculas exógenas de ácido nucleico en una célula tal como una célula vegetal. Por ejemplo, los protoplastos vegetales pueden electroporarse en presencia de una molécula recombinante de ácido nucleico, que puede estar en un vector (Fromm *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 82: 5824, 1985). Los impulsos eléctricos de elevada intensidad de campo permeabilizan reversiblemente las membranas permitiendo la introducción del ácido nucleico. Los protoplastos vegetales electroporados reforman la pared celular, dividen y forman un callo vegetal. La microinyección puede realizarse como se describe en Potrykus y Spangenberg (eds.), *Gene Transfer To Plants*. Springer Verlag, Berlin, NY (1995). Una célula vegetal transformada que contiene introducida la molécula recombinante de ácido nucleico que puede identificarse debido a la presencia de un marcador seleccionable incluido en la construcción.

40 Como se ha mencionado anteriormente, la transformación mediada por micro proyectiles también proporciona un método útil para introducir moléculas exógenas de ácido nucleico en una célula vegetal (Klein *et al.*, *Nature* 327: 70-73, 1987). Este método utiliza micro proyectiles tales como oro o tungsteno, que se recubren con la molécula de ácido nucleico deseada por precipitación con cloruro de calcio, espermidina o polietilenglicol. Las partículas de micro proyectiles se aceleran a elevada velocidad en un tejido vegetal usando un dispositivo tal como el cañón de partículas BIOLISTIC PD-1000 (BioRad; Hercules CA). El suministro mediado por micro proyectiles ("bombardeo de partículas") es especialmente útil para transformar células vegetales que son difíciles de transformar o regenerar usando otros métodos. Los métodos para la transformación usando métodos biolísticos se conocen bien (Wan, *Plant Physiol.* 104: 37-48, 1984; Vasil, *BioTechnology* 11: 1553-1558, 1993; Christou, *Trends in Plant Science* 1: 423-431, 1996). La transformación mediada por micro proyectiles se ha usado, por ejemplo, para generar una diversidad de especies vegetales transgénicas, incluyendo algodón, tabaco, maíz, trigo, avena, cebada, sorgo, arroz, chopo híbrido y papaya (véase Glick y Thompson, *anteriormente* 1993; Duan *et al.*, *Nature Biotech.* 14: 494-498, 1996; Shimamoto, *Curr. Opin. Biotech.* 5: 158-162, 1994).

55 Un sistema de regeneración de transformación rápida para la producción de plantas transgénicas tal como un sistema que produce trigo transgénico en dos o tres meses (véase la Patente Europea N° EP 0709462A2) también puede ser útil para producir una planta transgénica de acuerdo con un método de la invención, permitiendo de esta manera una identificación más rápida de las funciones de los genes. La transformación de la mayoría de las plantas dicotiledóneas es posible con los métodos descritos anteriormente. La transformación de las plantas monocotiledóneas también puede realizarse usando, por ejemplo, métodos biolísticos como se ha descrito anteriormente, transformación de cloroplastos, electroporación o células parcialmente permeabilizadas, introducción de ADN usando fibras de vidrio, transformación mediada por *Agrobacterium* y similares.

65 También puede usarse la transformación de plastos para introducir una molécula de ácido nucleico en una célula vegetal (Patentes de Estados Unidos N° 5.451.513, 5.545.817 y 5.545.818; documento WO 95/16783; McBride *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 91: 7301-7305, 1994). La transformación de cloroplastos implica la introducción de regiones del ADN plastidial clonado flanqueando una secuencia nucleotídica deseada, por ejemplo, un marcador seleccionable junto con el polinucleótido de interés, en un tejido diana adecuado, usando, por ejemplo, un método de transformación biolístico o por protoplastos (por ejemplo, cloruro de calcio o transformación mediada por PEG).

Las regiones flanqueantes de uno a 1,5 kb (“secuencias de dirección”) facilitan la recombinación homóloga con el genoma del plasto, y permite el reemplazamiento o modificación de regiones específicas del plastoma. Usando este método, pueden usarse mutaciones puntuales en los genes 16S ARNr y rps 12 del cloroplasto que confieren resistencia a espectinomicina y estreptomycinina y pueden usarse como marcadores seleccionables para la transformación (Svab *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 87: 8526-8530, 1990; Staub y Maliga, Plant Cell 4: 39-45, 1992), produciendo transformantes homoplásmicos estables, a una frecuencia de aproximadamente uno por 100 bombardeos de hojas diana. La presencia de sitios de clonación entre estos marcadores permite la creación de un vector de dirección plastidial para la introducción de genes extraños (Staub y Maliga, EMBO J. 12: 601-606, 1993). Aumentos sustanciales en la frecuencia de transformación se obtienen por sustitución de los genes ARNr recesivos o de resistencia a antibióticos de proteínas r con un marcador seleccionable dominante, el gen *aadA* bacteriano que codifica la enzima aminoglucosido-3'-adeniltransferasa destoxicante para la espectinomicina (Svab y Maliga, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 90: 913-917, 1993). Generalmente, después de la transformación se necesitan aproximadamente de 15 a 20 ciclos de división celular para alcanzar un estado homoplastidial. La expresión plastidial, en la cual los genes se insertan por recombinación homóloga en todos de los varios cientos de copias del genoma plastidial circular presente en cada célula vegetal, aprovecha la enorme ventaja del número de copias sobre los genes expresados en el núcleo para permitir niveles de expresión que fácilmente pueden sobrepasar el 10% de la proteína total soluble en la planta.

Las células que se han transformado pueden crecer en las plantas de acuerdo con modos convencionales. Véase, por ejemplo, McCormick *et al.* (1986) Plant Cell Reports 5: 81-84. Estas plantas pueden después cultivarse y polinizarse con la misma cepa o diferentes cepas transformadas y dar como resultados plantas que tienen la expresión de las características fenotípicas deseadas que después pueden identificarse. Para asegurar que la expresión de las características fenotípicas deseadas se mantiene y se hereda de manera estable, pueden cultivarse dos o más generaciones.

Las plantas adecuadas para los fines de la presente invención pueden ser monocotiledóneas o dicotiledóneas e incluyen, pero sin limitación, maíz, trigo, cebada, arroz, batata, soja, guisante, chicoria, lechuga, repollo, coliflor, brócoli, nabo, rábano, espinaca, espárrago, cebolla, ajo, pimiento, apio, calabaza, calabacín, cáñamo, zapallo, manzana, pera, membrillo, melón, ciruela, cereza, melocotón, nectarina, albaricoque, fresa, uva, frambuesa, mora, piña, aguacate, papaya, mango, banana, soja, tomate, sorgo, caña de azúcar, remolacha, girasol, colza, trébol, tabaco, zanahoria, algodón, alfalfa, arroz, patata, berenjena, pepino, *Arabidopsis thaliana*, y plantas leñosas tales como coníferas y árboles caducifolios. Por tanto, una planta transgénica o una célula vegetal de la invención genéticamente modificada puede ser una angiosperma o gimnosperma.

Las angiospermas se dividen en dos amplias clases basándose en el número de cotiledones, que son las hojas de la semilla que generalmente almacenan o absorben el alimento; una angiosperma monocotiledónea tiene un solo cotiledón y los angiospermas dicotiledóneas tienen dos cotiledones. Las angiospermas producen una diversidad de productos útiles que incluyen materiales tales como madera, goma y papel; fibras tales como algodón y lino; hierbas y medicinas tales como quinina y vinblastina; flores ornamentales tales como rosas y orquídeas que se incluyen dentro del alcance de la presente invención; y productos alimenticios tales como granos, aceites, frutos y vegetales. Las angiospermas incluyen una diversidad de plantas que florecen, incluyendo, por ejemplo, plantas de cereales, plantas de leguminosas, plantas de semillas oleaginosas, árboles de madera dura, plantas con frutos y flores ornamentales, cuyas clases generales no son necesariamente exclusivas. Las plantas de cereales, que producen un grano comestible, incluyen, por ejemplo, maíz, arroz, trigo, cebada, avena, arroz, dátilo, pasto de guinea y sorgo. Las plantas leguminosas incluyen miembros de la familia del guisante (*Fabaceae*) y produce un fruto característico conocido como una legumbre. Ejemplos de plantas leguminosas incluyen, por ejemplo, soja, guisante, garbanzo, grano de polilla, haba, fríjol, alubia de lima, lenteja, guisante pinto, fríjol seco y cacahuetes así como alfalfa, trébol de pájaro de pie, trébol blanco y esparceta. Las plantas oleaginosas, que tienen semillas que son útiles como una fuente de aceite, incluyen, soja, girasol, aceite de colza (cánola) y semilla de algodón. Las angiospermas también incluyen árboles de madera dura, que son plantas leñosas perennes que generalmente tienen un solo tallo (tronco). Ejemplos de bichos árboles incluyen aliso, fresno, álamo, tilo americano (tilo), haya, abedul, cerezo, algodónero, olmo, eucalipto, nogal, algarrobo, arce, roble, caqui, chopo, sicómoro, nogal, secuoya y sauce. Los árboles son útiles, por ejemplo, como fuente de pulpa, papel, material estructural y combustible.

Las angiospermas producen semillas encerradas dentro de un ovario adulto, maduro. Un fruto de angiosperma puede ser adecuado para el consumo humano o animal o para la recolección de semillas para propagar la especie. Por ejemplo, el lúpulo es un miembro de la familia de la mora que es apreciado por su sabor en el licor de malta. Las angiospermas con frutos también incluyen uva, naranja, limón, pomelo, aguacate, dátil, melocotón, cereza, aceituna, ciruela, coco, manzanos y perales y moras, arándanos, frambuesa, fresa, piña, y plantas de tomate, pepino y berenjenas. Una flor ornamental es una angiosperma cultivada por su flor decorativa. Ejemplos de flores ornamentales importantes desde el punto de vista comercial incluyen rosa, lirio, plantas de tulipán y crisantemo, boca de dragón, camelia, clavel y petunia y pueden incluir orquídeas. Se reconocerá que la presente invención también puede llevarse a la práctica usando gimnospermas, que no producen semillas en un fruto.

Algunas realizaciones de esta invención superan el problema del mantenimiento de rasgos reproductivos homogigóticos recesivos cuando se usa una estrategia de restauración transgénica, disminuyendo el número de plantas, plantaciones y etapas necesarias para el mantenimiento de plantas con dichos rasgos.

La homocigosidad es un estado genético existente cuando alelos idénticos residen en loci correspondientes en cromosomas homólogos. La heterigosidad es un estado genético existente cuando alelos diferentes residen en loci

ES 2 339 559 T3

correspondientes en cromosomas homólogos. La hemicigosidad es un estado genético existente cuando hay sólo una copia de un gen (o conjunto de genes) sin homólogo alélico en el cromosoma hermano.

5 El mantenimiento del estado homocigótico recesivo para la androesterilidad se logra introduciendo en una planta una construcción transgénica de restauración que está unida a una secuencia que interfiere con la formación, la función o la dispersión de los gametos masculinos de la planta, para crear una planta “mantenedora” o “donante”. El transgén de restauración, después de la introducción en una planta que es homocigótica recesiva para el rasgo genético androestéril, restaura la función genética de ese rasgo. Debido al gen unido dirigido por un promotor específico de gametos masculinos, todo el polen que contiene el transgén de restauración se hace inviable. Todo el polen viable producido
10 contiene una copia del alelo recesivo pero no contiene el transgén de restauración. El transgén se mantiene en el estado hemicigótico en la planta mantenedora.

15 El polen de la planta mantenedora puede usarse para fertilizar plantas que son homocigóticas para el rasgo recesivo, y la descendencia, por tanto, mantendrá su estado homocigótico recesivo. La planta mantenedora que contiene la construcción del transgén restauración se propaga por auto-fertilización, con la mitad de la semilla resultante que se usa para producir más plantas que son recesivas homocigóticas para el gen de interés y hemicigóticas para la construcción transgénica de restauración.

20 La planta mantenedora sirve como donante de polen para la planta que tiene el rasgo homocigótico recesivo. La planta mantenedora se produce de forma óptima a partir de una planta que tiene el rasgo homocigótico recesivo y que también tiene secuencias de nucleótidos introducidas en su interior que restaurarían el rasgo creado por los alelos homocigóticos recesivos. Además, la secuencia de restauración está unida a secuencias de nucleótidos que interfieren con la función, la formación o la dispersión de los gametos masculinos. El gen puede funcionar para impedir la formación de gametos masculinos o impedir la función de los gametos masculinos por cualquiera de una diversidad de
25 modalidades bien conocidas y no se limita a una metodología particular. A modo de ejemplo, pero no de limitación, esto puede incluir el uso de uno o más genes que expresan un producto citotóxico para los gametos masculinos (Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos. Nº 5.792.853 y 5.689.049; y el documento PCT/EP89/00495); inhiben la formación del producto de otro gen importante para la formación, función o dispersión de gametos masculinos (véanse, las patentes de Estados Unidos 5.859.341 y 6.297.426); se combinan con otro producto génico para producir
30 una sustancia que impide la formación, función o dispersión de gametos masculinos (véanse las Patentes de Estados Unidos Nº: 6162.964; 6.013.859; 6.281.348; 6.399.856; 6.248.935; 6.750.868; y 5.792.853); son antisentido para o causan co-supresión de un gen crítico para la formación, función o dispersión de gametos masculinos (véanse las patentes de Estados Unidos; Nº: 6.184.439; 5.728.926; 6.191.343; 5.728.558; y 5.741.84), o similares.

35 Normalmente, para producir más plantas que tengan estado recesivo, se podría cruzar la planta recesiva con otra planta recesiva, o auto-polinizar una planta recesiva. Esto puede no ser deseable para algunos rasgos recesivos y puede ser imposible para rasgos recesivos que afectan al desarrollo reproductivo. De manera alternativa, se podría cruzar la planta homocigótica con una segunda planta que tiene el gen de restauración, pero esto requiere cruzamiento adicional para segregarse el gen restaurador para alcanzar otra vez el estado fenotípico recesivo. Por otro lado, en una realización
40 la invención proporciona un proceso en el que se puede mantener el estado homocigótico recesivo, cruzándola con la planta mantenedora. Este método puede usarse en cualquier situación en la que se desee continuar el estado recesivo. Esto da como resultado un sistema relativamente simple y rentable para el mantenimiento de una población de plantas homocigóticas recesivas.

45 Cuando el estado homocigótico recesivo es uno que produce androesterilidad, la planta mantenedora, necesariamente, debe contener una construcción transgénica de restauración funcional capaz de complementar la mutación y hacer que planta recesiva homocigótica sea capaz de producir polen viable. La unión de este gen de restauración androfértil con una segunda secuencia de nucleótidos funcional que interfiere con la formación, la función o la dispersión de los gametos masculinos da como resultado una planta mantenedora que produce polen que contiene sólo
50 el alelo recesivo del gen restaurado en su locus nativo debido a la acción citotóxica específica de polen de la segunda secuencia de nucleótidos. Esta fracción de polen viable es no-transgénica con respecto a la construcción del transgén de restauración.

55 Por ejemplo, para producir plantas femeninas androestériles para usar en el proceso de producción de híbridos que son estériles como resultado de ser homocigóticos para una mutación en el gen MS45, es deseable un gen que sea esencial para la androfertilidad. Dicho alelo mutante MS45 se designa como ms45. Una planta que es homocigótica para ms45 (representado por la anotación ms45/ms45) muestra el fenotipo androestéril homocigótico recesivo y produce polen no funcional. Véanse las Patentes de Estados Unidos Nº: 5.478.369; 5.850.014; 6.265.640; y 5.824.524. En ambos procesos de producción de plantas endogámicas e híbridas, es muy deseable mantener este estado homocigótico recesivo. Cuando se introducen secuencias que codifican el gen MS45 en una planta en estado homocigótico, se produce la restauración esporofítica de androfertilidad. (Cigan *et al.* (2001). Sex Plant. Repro 14:135-142) Mediante el método de la invención, una planta que es homocigótica recesiva ms45/ms45 puede tener introducido en su interior un gen MS45 funcional, y, por tanto, la androfertilidad se restaura. Este gen puede unirse a un segundo gen que funciona para procesar polen no funcional o que impide su formación, o que produce un producto letal en el polen, y que está
65 unido a un promotor que dirige su expresión en los gametos masculinos. Esto da lugar a una planta que produce polen viable que contiene ms45 sin la construcción transgénica de restauración.

ES 2 339 559 T3

Un ejemplo es una construcción que incluye el gen MS45 unido operativamente al promotor 5126, un promotor preferido de tejido masculino (Véase la patente de Estados Unidos N° 5.837.851) y unido adicionalmente al gen citotóxico metilasa DAM controlado por el promotor PG47 (Véanse las patentes de Estados Unidos. N° 5.792.853; 5.689.049). La planta resultante produce polen, pero el polen viable sólo contiene el gen de la ms45. Por lo tanto, puede usarse como un polinizador para fertilizar la planta homocigótica recesiva (ms45/ms45), y el 100% de la descendencia producida seguirá siendo androestéril como resultado del mantenimiento de la homocigosidad para ms45. La descendencia no contendrá la construcción transgénica de restauración introducida.

Evidentemente, en este método están disponibles muchas variaciones en lo que respecta a la androfertilidad. En este sistema puede usarse cualquier otro gen crítico relacionado con la androfertilidad. Por ejemplo y sin limitación, dichos genes pueden incluir el gen SBMu200 (también conocido como SB200 o MS26) descrito en el documento WO 02/26789; el gen BS92-7 (también conocido como BS7) descrito en el documento WO 02/063021; el gen MS2 descrito en Albertsen and Phillips, "Developmental Cytology of 13 Genetic Male Sterile Loci in Maize" Canadian Journal of Genetics & Cytology 23: 195-208 (Ene. 1981); o el gen MS2 de *Arabidopsis* descrito en Aarts *et al.*, "Transposon Tagging of a Male Sterility Gene in *Arabidopsis*", Nature, 363: 715-717 (24 Jun, 1993); y el gen M1 de *Arabidopsis* descrito en Wilson *et al.*, "The *Arabidopsis* MALE STERILITY (MS1) gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PDH-finger family of transcription factors", Plant J., 1:27-39 (28, oct, 2001).

Un resultado deseable del proceso de la invención es que la planta que tiene la secuencia de nucleótidos restauradora pueda auto-fertilizarse; es decir, el polen de la planta se transfiere a la flor de la misma planta para lograr la propagación de las plantas restauradoras. (Debe observarse que la "auto fertilización" incluye tanto la situación en la que la planta que produce el polen se fertiliza con ese mismo polen y la situación en la que el polen de una planta o de un grupo de plantas genéticamente idénticas, poliniza una planta que es un individuo genéticamente idéntico, o un grupo de dichas plantas genéticamente idénticas). La construcción transgénica de restauración no estará presente en el polen, pero estará incluida en el 50% de los óvulos (el gameto femenino). La semilla resultante de la auto-fertilización puede plantarse, y seleccionar la semilla que tiene la construcción transgénica de restauración. El proceso de selección puede realizarse mediante uno o más de cualquiera de los procesos conocidos, siendo el más habitual en el que la secuencia de nucleótidos de restauración está unida a un gen marcador. El marcador puede ser valorable o seleccionable y permite la identificación de la semilla que comprende la secuencia de restauración, y/o de aquellas plantas producidas a partir de la semilla que tiene la secuencia de restauración.

En una realización de la invención, es posible proporcionar que el promotor que dirige el gen de restauración sea inducible. Así se permite el control adicional en el proceso, cuando así se desee, proporcionando que la planta que tiene las secuencias de nucleótidos de restauración sea constitutivamente androestéril. Este tipo de androesterilidad se indica en la patente de Estados Unidos N° 5.859.341. Para que la planta sea fértil, debe proporcionarse la sustancia de inducción, y la planta será fértil. De nuevo, cuando se combina con el proceso de la invención, como se describe anteriormente, el único polen producido no contendrá las secuencias de nucleótidos de restauración.

El gameto que controla la transmisión de las secuencias de nucleótidos de restauración puede ser el gameto femenino, en lugar del gameto masculino. El proceso es el mismo que el que se ha descrito anteriormente, excepto en los casos en los que también se desea mantener la planta que tiene las secuencias de nucleótidos de restauración por auto-fertilización, en ese caso, será útil proporcionar que el promotor que dirige el gen de restauración sea inducible, de esta manera se puede desencadenar la fertilidad femenina por exposición a la sustancia de inducción, y pueden formarse semillas. El control de la fertilidad femenina de esta manera se describe en la patente de Estados Unidos N° 6.297.426. Los ejemplos de genes que impactan en la fertilidad femenina incluyen el gen teosinte ramificado1 (Tb1), que aumenta la dominancia apical, dando como resultado múltiples espigas y la represión del tejido femenino. Hubbard *et al.* (2002) Genetics 162:1927-1935; Doebley *et al.* (1997) Nature 386:485-488 (1997). Otro ejemplo es el denominado "barren 3" o "ba3". Este mutante se aisló de una planta de maíz mutante infectada con el virus del mosaico del trigo estriado y se describe en Pan y Peterson, J Genet. And Breed. 46:291-294 (1992). Las plantas desarrollan espigas normales, pero no tienen ningún brote de mazorca a lo largo de los tallos. En Coe y Beckett, Maize Genet. Coop Newslett 61:46-47 (1987) se describen tallos estériles en la variedad fastigiata. Otros ejemplos incluyen el gen *barren stalk1* (Gallavotti *et al.*, Nature 432:630-635 (2004)); mutante de óvulo letal (Vollbrecht, Maize Genetics Cooperation Newsletter 68:2-3 (1994)); y mutante del pistilo defectuoso (Miku y Mustyatsa, Genetika 14 (2): 365-368 (1978)).

Para controlar la expresión de las regiones de la construcción transgénica de restauración que codifica proteínas y funciones específicas puede emplearse cualquier elemento promotor compatible con la planta. Estos pueden ser promotores de genes de la planta, tales como, por ejemplo, el promotor de ubiquitina, el promotor de la subunidad pequeña de carboxilasa ribulosa-1, 5-bis-fosfato, o promotores de plásmidos que inducen tumores de *Agrobacterium tumefaciens*, tales como promotores de nopalina sintasa y octopina sintasa, o promotores virales como tales como los promotores 19S y 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) o el promotor 35S del virus del mosaico de la escrofularia. Véase, Kay *et al.*, (1987) Science 236:1299 y la solicitud de la patente europea N° 0 342 926. Véase la solicitud internacional WO 91/19806 para una revisión de promotores ilustrativos de plantas empleados adecuadamente en la presente invención. El intervalo de promotores disponibles compatibles con plantas incluye promotores inducibles y los específicos de tejido.

La invención contempla el uso de promotores que proporcionan expresión preferida del tejido, incluyendo promotores que expresan preferentemente el tejido del gameto, masculino o femenino, de la planta. La invención no requiere que en el proceso se use ningún promotor preferido de tejido de gameto particular y puede emplearse cualquiera de los

ES 2 339 559 T3

muchos de dichos promotores conocidos por los expertos en la técnica. A modo de ejemplo, pero sin limitación, un promotor de este tipo es el promotor 5126 que dirige preferentemente la expresión del gen al cual está unido para el tejido masculino de las plantas, como se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 5.837.851 y 5.689.051. Otros ejemplos incluyen el promotor MS45 descrito en la Patente de Estados Unidos N° 6.037.523; el promotor SF3 descrito en la Patente de Estados Unidos N° 6.452.069; el promotor BS92-7 o BS7 descrito en el documento WO 02/063021; el promotor SBMu200 descrito en el documento WO 02/26789; y el elemento regulador SGB6 descrito en la Patente de Estados Unidos N° 5.470.359 y TA39 (Koltunow *et al.* (1990) "Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development". *Plant Cell* 2: 1201-1224; Goldberg *et al.*, (1993) Anther development: basic principles and practical applications. *Plant Cell* 5: 1217-1229; y Patente de Estados Unidos N° 6.399.856. Véase también Nadeau *et al.*, *Plant Cell* 8(2): 213-39 (1996); y Lu *et al.*, *Plant Cell* 8(12): 2155-68 (1996).

El promotor P67 indicado en la SEC ID N°: 1 tiene una longitud de 1112 nucleótidos. Este promotor se aisló a partir de un clon genómico correspondiente a una secuencia EST del maíz. La secuencia demostró homología limitada con respecto a la supuesta pectin metilesterasa.

La especificidad del polen de la expresión del P67 se ha confirmado por RT-PCR y análisis de transferencia de Northern de muestras de ARN de tejidos diferentes incluyendo hoja, raíz, granos de polen maduros/antera, espiga en fase de vacuola, espiguillas, mazorca, vaina, seda y embrión. Los resultados indican un elevado nivel de especificidad para la expresión en el polen de desarrollo, particularmente en la etapa media uni-nucleada.

El análisis de transferencia de Southern ha demostrado que el clon representa genes simples o de pocas copias en el genoma del maíz. Usando la línea de sustitución del cromosoma de la avena, el mapeo cromosómico reveló que la secuencia se localiza en el cromosoma 1 del maíz.

El clon se usó para explorar una biblioteca de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) en el maíz. En el fagémido pBluescript KS s han encontrado y se han subclonado clones BAC positivos. Los subclones correspondientes a las secuencias de ADNc se han identificado y secuenciado. El sitio de inicio transcripcional se ha determinado usando una estrategia de amplificación rápida mediada por ARN ligasa en el extremo 5'. La región promotora se denominó P67.

El promotor P95 indicado en la SEC ID N°: 2 tiene una longitud de 1092 nucleótidos. Este promotor se aisló de un clon genómico correspondiente a una secuencia EST del maíz. La secuencia mostró homología limitada con respecto a la supuesta L-ascorbato oxidasa.

La especificidad de la expresión de P95 con respecto al polen se ha confirmado por RT-PCR y análisis de transferencia de Northern de muestras de ARN de diferentes tejidos incluyendo hoja, raíz, granos de polen maduros/antera, espiga en fase de vacuola, espiguilla, mazorca, vaina, seda y embrión. Los resultados indican un elevado nivel de especificidad para la expresión en el polen de desarrollo, particularmente en el estado medio uni-nucleado.

El análisis de transferencia Southern ha demostrado que el clon representa genes simples o de pocas copias en el genoma del maíz. Usando la línea de sustitución del cromosoma de la avena, el mapeo cromosómico reveló que la secuencia se localiza en los Cromosomas 6 y 8 del maíz.

El clon se usó para explorar una biblioteca de BAC en el maíz. En el fagémido pBluescript KS s han encontrado y se han subclonado clones BAC positivos. Los subclones correspondientes a las secuencias de ADNc se han identificado y secuenciado. El sitio de inicio transcripcional se ha determinado usando una estrategia de amplificación rápida mediada por ARN ligasa en el extremo 5'. La región promotora se denominó P95.

Usando técnicas bien conocidas, pueden aislarse secuencias promotoras adicionales basándose en su homología de secuencia con respecto a la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2. En estas técnicas, toda o parte de una secuencia promotora conocida se usa como una sonda que se hibrida selectivamente con otras secuencias presentes en una población de fragmentos de ADN genómico clonado (es decir, genotecas) de organismo seleccionado. Pueden usarse métodos que están disponibles fácilmente en la técnica para la hibridación de secuencias de ácido nucleico para obtener secuencias que se corresponden con estas secuencias promotoras en especies que incluyen, pero sin limitación, maíz (*Zea mays*), colza (*Brassica napus*, *Brassica rapa ssp.*), alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), girasol (*Helianthus annuus*), trigo (*Triticumaestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), patata (*Solanum tuberosum*), cacahuete (*Arachis hypogaea*), algodón (*Gossypium hirsutum*), batata (*Ipomoea batatas*), yuca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea spp.*), coco (*Cocos nucifera*), piña (*Ananas comosus*), cítricos (*Citrus spp.*), cacao (*Theobroma cacao*), té (*Camellia sinensis*), banana (*Musa spp.*), aguacate (*Persea americana*), higo (*Ficus casica*), guayaba (*Psidium guajava*), mango (*Mangifera indica*), aceituna (*Olea europaea*), avena, cebada, verduras, plantas ornamentales y coníferas. Preferiblemente, las plantas incluyen maíz, soja, girasol, cártamo, colza, trigo, cebada, centeno, alfalfa y sorgo.

Puede usarse la secuencia promotora completa o partes de la misma como una sonda capaz de hibridarse específicamente con las secuencias promotoras correspondientes. Para conseguir la hibridación específica en una diversidad de condiciones, dichas sondas incluyen secuencias que son únicas y preferiblemente tienen una longitud de al menos aproximadamente 10 nucleótidos y más preferiblemente una longitud de al menos aproximadamente 20 nucleótidos. Estas sondas pueden usarse para amplificar secuencias promotoras correspondientes de un organismo seleccionado

ES 2 339 559 T3

mediante el proceso bien conocido de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica puede usarse para aislar secuencias promotoras adicionales de un organismo deseado o como un ensayo de diagnóstico para determinar la presencia de la secuencia promotora en un organismo. Los ejemplos incluyen exploración por hibridación de genotecas de ADN en placa (tanto placas como colonias; véase, por ejemplo, Innis *et al.* (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, eds., Academic Press).

En general, secuencias que corresponden a una secuencia promotora de la presente invención y que se hibridan con una secuencia promotora descrita en este documento tendrán al menos una homología del 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% incluso del 98% o más con la secuencia descrita.

Los fragmentos de una secuencia promotora particular descrita en este documento pueden funcionar para promover la expresión preferida de polen de una secuencia de nucleótidos aislada unida operativamente. Estos fragmentos comprenderán al menos aproximadamente 20 nucleótidos contiguos, preferiblemente al menos aproximadamente 50 nucleótidos contiguos, más preferiblemente al menos aproximadamente 75 nucleótidos contiguos incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 100 nucleótidos contiguos de las secuencias de nucleótidos promotoras particulares descritas en este documento. Los nucleótidos de dichos fragmentos normalmente comprenderán la secuencia de reconocimiento TATA de la secuencia promotora particular. Dichos fragmentos pueden obtenerse mediante el uso de enzimas de restricción para escindir las secuencias promotoras de origen natural descritas en este documento; sintetizando una secuencia de nucleótidos a partir de la secuencia de ADN de origen natural; o mediante el uso de tecnología PCR. Véase particularmente, Mullis *et al.* (1987) *Methods Enzymol.* 155: 335-350, y Erlich, ed. (1989) *PCR Technology* (Stockton Press, Nueva York). De nuevo, variantes de estos fragmentos, tales como las resultantes de la mutagénesis dirigida a sitio, se incluyen en las composiciones de la presente invención.

Por tanto, se incluyen las secuencias de nucleótidos que comprenden al menos aproximadamente 20 nucleótidos contiguos de la secuencia establecida en la SEC ID N°: 1 o SEQ ID N°: 2. Estas secuencias pueden aislarse por hibridación, PCR, y similares. Dichas secuencias incluyen fragmentos capaces de dirigir la expresión preferida de polen, fragmentos útiles como sondas para identificar secuencias similares, así como elementos responsables para la especificidad de tejido o temporal.

Las variantes biológicamente activas de la secuencia promotora también se incluyen en las composiciones de la presente invención. Una "variante" reguladora es una forma modificada de un promotor en la que se han modificado, eliminado o añadido una o más bases. Por ejemplo, un modo rutinario para eliminar parte de una secuencia de ADN es usar una exonucleasa junto con la amplificación de ADN para producir delecciones anidadas unidireccionales de clones de ADN bicatenarios. Un kit comercial para este propósito se comercializa con el nombre comercial Exo-Size™ (New England Biolabs, Beverly, Mass.). Brevemente, este procedimiento supone la incubación de la exonucleasa III con ADN para eliminar progresivamente nucleótidos en la dirección 3' a 5' en los salientes 5', extremos romos o cortes enzimáticos en el molde de ADN. Sin embargo, la exonucleasa III no puede eliminar nucleótidos en el extremo 3', sobre extremos romos o cortes de 4 bases en el molde de ADN. La digestión temporalizada de un clon con esta enzima produce delecciones unidireccionales anidadas.

Un ejemplo de una variante de secuencia reguladora es un promotor formado causando una o más delecciones en un promotor más grande. La delección de la parte 5' de un promotor hasta la caja TATA cerca del sitio de inicio de la transcripción puede realizarse sin cancelar la actividad del promotor, como se describe en Zhu *et al.*, *The Plant Cell* 7: 1681-89 (1995). Dichas variantes deben conservar la actividad del promotor, particularmente la capacidad de dirigir la expresión en tejidos específicos. Las variantes biológicamente activas incluyen, por ejemplo, las secuencias nativas reguladoras de la invención que tienen una o más sustituciones, delecciones o inserciones de nucleótidos. La actividad puede medirse por análisis de transferencia Northern, mediciones de actividad indicadora cuando se usan fusiones transcripcionales y similares. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.), incorporados en este documento como referencia.

Las secuencias de nucleótidos para los promotores preferidos de polen descritas en la presente invención, así como las variantes y fragmentos de las mismas, son útiles en la manipulación genética de cualquier planta cuando se unen operativamente a una secuencia de nucleótidos aislada cuya expresión se controla para conseguir una respuesta fenotípica deseada.

La secuencia de nucleótidos unida operativamente a los elementos reguladores descritos en este documento puede ser una secuencia anti-sentido para un gen diana. Por "secuencia de nucleótidos de ADN anti-sentido" se entiende una secuencia que está en orientación inversa a la orientación normal 5' a 3' de esa secuencia de nucleótidos. Cuando se suministra dentro de una célula vegetal, la expresión de una secuencia de ADN antisentido impide la expresión normal de la secuencia de nucleótidos del ADN para el gen diana. La secuencia de nucleótidos antisentido codifica un ARN transcrito que es complementario y capaz de hibridar con el ARN mensajero (ARNm) endógeno producido por la transcripción de la secuencia de nucleótidos del ADN para el gen diana. En este caso, la producción de la proteína nativa codificada por el gen diana se inhibe para conseguir una respuesta fenotípica deseada. De esta manera, las secuencias reguladoras reivindicadas en este documento pueden unirse operativamente a secuencias de ADN antisentido para reducir o inhibir la expresión de una proteína nativa o exógena en la planta.

Se conocen muchas secuencias de nucleótidos que inhiben la formación o función o dispersión del polen, y bastará cualquier secuencia que consiga esta inhibición. En la Patente de Estados Unidos N° 6.399.856 se incluye una des-

cripción relativa a genes que pueden impactar correctamente sobre el desarrollo o función e incluye genes negativos dominantes tales como genes de citotoxina, genes de metilasa, y genes de inhibición del crecimiento. Los genes dominantes negativos incluyen el gen de la toxina de la difteria de cadena A (Czako y An (1991) *Plant Physiol.* 95 687-692); mutantes de la división del ciclo celular tales como CDC en maíz (Colasanti *et al.*, (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3377-3381); el gen WT (Farmer *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* 3, 723-728, 1994); y P68 (Chen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 315-319, 1991). Un gen adecuado también puede codificar una proteína implicada en la inhibición del desarrollo del pistilo, interacciones del estigma que recibe al polen, crecimiento o fertilización del tubo polínico o una combinación de los mismos. Además, los genes que interfieren con la acumulación normal del almidón en el polen o afectan al equilibrio osmótico dentro del polen también pueden ser adecuados. Estos incluyen, por ejemplo, el gen alfa-amilasa del maíz, el gen beta-amilasa del maíz, las enzimas desramificadoras tales como Sugary1 y pululanasa, glucanasa y SacB.

En una realización ilustrativa, se usa el gen DAM-metilasa, el producto de expresión que cataliza la metilación de restos adenina en el ADN de la planta. Las adeninas metiladas no afectarán a la viabilidad celular y se encontrarán únicamente en los tejidos en los que se expresa en el gen DAM-metilasa, ya que dichos restos metilados no se encuentran endógenamente en el ADN de la planta. Ejemplos de los denominados genes "citotóxicos" se han descrito anteriormente y pueden incluir, pero sin limitación, al gen pectato liasa pelE, de *Erwinia chrysanthemi* (Kenn *et al.* (1986) *J. Bacteriol* 168: 595); el gen de la toxina de la difteria de cadena A (Greenfield *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 6853, Palmiter *et al.* (1987) *Cell* 50: 435); el gen T-urf13 de genomas mitocondriales del maíz cms-T (Braun *et al.* (1990) *Plant Cell* 2: 153; Dewey *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5374); el gen de la toxina CytA de *Bacillus thuringiensis Israeliensis* que causa la rotura de la membrana celular (McLean *et al.* (1987) *J. Bacteriol* 169: 1017, Patente de Estados Unidos N° 4.918.006); ADNasas, ARNasas, (Patente de Estados Unidos N° 5.633.441); proteasas, o genes que expresan ARN anti-sentido.

Además, los métodos de la invención son útiles para mantener el estado homocigótico recesivo de rasgos distintos a aquellos que impactan en la fertilidad de la planta. El gen de interés que restablece el estado se introduciría en una planta unido a una secuencia de nucleótidos que inhibe la formación, función o dispersión del polen y que adicionalmente puede unirse a un promotor preferido de tejido de gameto masculino o a un gen que codifica un marcador, por ejemplo, un marcador específico de semilla. El polen viable producido por la planta en la que se introduce la construcción contiene solamente el alelo recesivo del gen de interés y ninguna de las secuencias transgénicas de restauración. La mitad de los gametos femeninos de la planta transgénica hemicingótica contiene el transgén y puede auto-polinizarse o polinizarse por una planta que comprende los alelos recesivos. La mitad de las semillas producidas llevarán el transgén y podrán identificarse por medio del marcador unido. El estado hemicingótico puede mantenerse autofecundando la planta hemicingótica; la mitad de la progenie contendrá el transgén y por tanto el rasgo de interés.

Los genes de interés reflejan mercados e intereses comerciales y los implicados en el desarrollo de cultivos. Los cultivos y los mercados de interés cambian y según se van abriendo a nuevos mercados las naciones en desarrollo, también surgen nuevos cultivos y tecnologías. Además, a medida que aumenta la comprensión de rasgos y características agrícolas tales como el rendimiento y la heterosis, cambiará la elección de genes para la transformación de acuerdo con esto.

La regulación de la androfertilidad se mide necesariamente en términos de su efectividad en las células individuales. Por ejemplo, la supresión en el 99,99% de los granos de polen es necesaria para conseguir esterilidad fiable para uso comercial. Sin embargo, el éxito de la supresión o restauración de la expresión de otros rasgos puede lograrse con menor rigurosidad. Dentro de un tejido particular, por ejemplo, la expresión en las células del 98%, 95%, 90%, 80% o menor da como resultado el fenotipo deseado.

Esta invención tiene utilidad para una diversidad de genes recesivos, no limitados a aquellos en los que la expresión del rasgo homocigótico recesivo compromete la capacidad de las plantas para mantener su capacidad reproductora completa. Las categorías generales de genes de interés, incluyen, por ejemplo, los genes implicados en la información, tales como dedos de cinc, los implicados en comunicación, tales como quinasas, y los implicados en la gestión interna tales como proteínas de choque térmico. Categorías más específicas de transgenes, por ejemplo, incluyen genes que codifican rasgos importantes para características agrícolas, resistencia a insectos, resistencia a enfermedades, resistencia a herbicidas, esterilidad, características del grano y productos comerciales. Los genes de interés incluyen, en general, los implicados en el metabolismo de aceite, almidón, carbohidratos o nutrientes así como los que afectan al tamaño del grano, la carga de sacarosa y similares. Rasgos importantes desde el punto de vista agrícola tales como el contenido de aceite, almidón y proteínas pueden alterarse genéticamente de manera adicional usando métodos de cultivo tradicionales. Las modificaciones incluyen el aumento del contenido de ácido oleico, aceites saturados o insaturados, el aumento de los niveles de lisina y azufre, la disposición de aminoácidos esenciales y también la modificación del almidón. En las solicitudes de Patente de Estados Unidos N° 5.703.049, 5.885.801, 5.885.802 y 5.990.389. se describen modificaciones de la proteína hordotionina. Otro ejemplo es la proteína de semillas rica en azufre y/o lisina codificada por albúmina 2S de soja descrita en la Patente de Estados Unidos N° 5.850.016 y el inhibidor de quimiotropina de cebada, descrito en Williamson *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 165:99-106. (1987). Otros genes importantes codifican factores de crecimiento y factores transcripcionales.

Los rasgos agronómicos pueden mejorarse alterando la expresión de genes que: afectan al crecimiento y desarrollo, especialmente durante la tensión ambiental. Estos incluyen, por ejemplo, genes que codifican enzimas de la biosíntesis de la citoquinina, tales como isopentenil transferasa; genes que codifican enzimas catabólicas de citoquinina, tales

ES 2 339 559 T3

como citoquinina oxidasa; genes que codifican polipéptidos implicados en la regulación del ciclo celular, tales como CyclinD o cdc25; genes que codifican receptores o sensores de citoquinina, tales como CRE1, CKI1 y CKI2, fosfo-transmisores de histidina o reguladores de respuesta a citoquinina.

5 Los genes de resistencia a insectos pueden codificar resistencia a plagas que dejan un gran rastro de rendimiento, tales como gusano de las raíces, el gusano cortador, el perforador del maíz europeo y similar. Dichos genes incluyen, por ejemplo: genes de endotoxina de *Bacillus thuringiensis*, Patentes de Estados Unidos N° 5.366.892; 5.747.450; 5.737.514; 5.723.756; 5.593.881; Geiser *et al.* (1986) Gene 48: 109; lectinas, Van Damme *et al.* (1994) Plant Mol. Biol. 24: 825; y similares.

10 Los genes que codifican rasgos de resistencia a enfermedades incluyen: genes de destoxicación, tales como contra fumonosina (documento WO 9606175 presentado el 7 de junio, 1995); genes de avirulencia (avr) y de resistencia a enfermedades (R), Jones *et al.* (1994) Science 266: 789; Martin *et al.* (1993) Science 262: 1432; Mindrinos *et al.* (1994) Cell 78: 1089; y similares.

15 Los rasgos comerciales también pueden codificarse en un gen (o genes) que podrían alterar o aumentar por ejemplo, el almidón para la producción de papel, textiles y etanol o proporcionar la expresión de proteínas con otros usos comerciales. Otro uso comercial importante de las plantas transformadas es la producción de polímeros y bioplásticos tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.602.321 expedida el 11 de febrero, 1997. Genes tales como B-cetotiolasa, PHBasa (polihidroxibutirato sintasa) y acetoacetyl-CoA reductasa (véase Schubert *et al.* (1988) J. Bacteriol 170(12): 5837-5847) facilitan la expresión de polihidroxialcanoatos (PHA).

20 Los productos exógenos incluyen enzimas y productos vegetales así como los procedentes de otras fuentes que incluyen procariotas y otros eucariotas. Dichos productos incluyen enzimas, cofactores, hormonas y similares. Se puede aumentar el nivel de proteínas de las semillas, en particular proteínas de semillas modificadas que tienen distribución de aminoácidos mejorada para mejorar el valor nutritivo de la semilla. Esto se consigue por la expresión de dichas proteínas que tienen un contenido de aminoácidos potenciado.

25 Los casetes de expresión de la invención, que comprenden un promotor y la secuencia de ácidos nucleicos aislada de interés, también pueden incluir, en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos aislada de interés, una región de terminación transcripcional y traduccional funcional en plantas. La región de terminación puede ser nativa con la secuencia de nucleótidos promotora del casete, puede ser nativa con la secuencia de ADN de interés o puede proceder de otra fuente.

30 Otras regiones de terminación convenientes se encuentran disponibles del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, tales como las regiones de terminación de octopina sintasa y nopalina sintasa. Véase también: Guerineau *et al.* (1991) Mol. Gen. Genet. 262: 141-144; Proudfoot (1991) Cell 64: 671-674; Sanfacon *et al.* (1991) Genes Dev. 5: 141-149; Mogen *et al.* (1990) Plant Cell 2: 1261-1272; Munroe *et al.* (1990) Gene 91:151-158; Ballas *et al.* 1989) Nucleic Acids Res. 17: 7891-7903; Joshi *et al.* (1987) Nucleic Acid Res. 15: 9627-9639.

35 Los casetes de expresión pueden contener adicionalmente secuencias líder 5'. Dichas secuencias líder pueden actuar para potenciar la traducción. En la técnica se conocen las secuencias líder de la traducción e incluyen: secuencias líderes de picornavirus, por ejemplo: el líder de EMCV (región 5' no codificante de Encefalomiocarditis), Elroy-Stein *et al.* (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86: 6126-6130; líderes de potyvirus, por ejemplo, líder de TEV (Virus del grabado del tabaco), Allison *et al.* (1986); líder de MDMV (Virus del Mosaico del Enanismo del Maíz), Virology 154: 9-20; proteína de unión a la cadena pesada de inmunoglobulina humana (BiP), Macejak *et al.* (1991) Nature 353: 90-94; líder no traducido del ARNm de la proteína de la cubierta del virus del mosaico de la alfalfa (AMV RNA 4), Jobling *et al.* (1987) Nature 325: 622-625); líder del virus del mosaico del tabaco (TMV), Gallie *et al.* (1989) Molecular Biology of RNA, páginas 237-256; y líder del virus de las manchas cloróticas del maíz (MCMV) Lommel *et al.* (1991) Virology 81: 382-385. Véase también Della-Cioppa *et al.* (1987) Plant Physiology 84: 965-968. El casete también puede contener secuencias que potencian la traducción y/o estabilidad del ARNm tales como intrones.

40 En los casos en los que es deseable que el producto expresado de la secuencia de nucleótidos aislada se dirija a un orgánulo particular, particularmente al plasto, amiloplasto o al retículo endoplásmico, o se secrete en la superficie celular o extracelularmente, en el casete de expresión puede comprender adicionalmente una secuencia codificante para un péptido de tránsito. Dichos péptidos de tránsito se conocen bien en la técnica e incluyen, pero sin limitación: el péptido de tránsito para la proteína transportadora de acilo, la subunidad pequeña de RUBISCO, la EPSP sintasa vegetal y similares.

45 En la preparación del casete de expresión, los diversos fragmentos de ADN pueden manipularse para proporcionar las secuencias de ADN en la orientación adecuada y, cuando sea apropiado, en la fase de lectura apropiada. Para este fin, pueden emplearse adaptadores o enlazadores para unir los fragmentos de ADN o pueden estar implicadas otras manipulaciones para proporcionar sitios de restricción convenientes, la eliminación del ADN superfluo, la eliminación de sitios de restricción o similares. Para este fin, pueden estar implicadas técnicas tales como mutagénesis *in vitro*, reparación de cebadores, digestión de restricción, hibridación y resubstituciones, tales como transiciones y transversiones.

ES 2 339 559 T3

Las siguientes expresiones se usan para describir las relaciones de secuencias entre dos o más ácidos nucleicos o polinucleótidos: (a) “secuencia de referencia”, (b) “ventana de comparación”, (c) “porcentaje de identidad de secuencia” y (d) “identidad sustancial”.

- 5 (a) Como se usa en este documento, “secuencia de referencia” es una secuencia definida usada como base para una comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser una subserie o la totalidad de una secuencia específica; por ejemplo, un segmento de una secuencia promotora de longitud completa, o la secuencia promotora
- 10 (b) Como se usa en este documento, “ventana de comparación” hace referencia a un segmento contiguo y específico de una secuencia polinucleotídica, en la que la secuencia polinucleotídica puede compararse a una secuencia de referencia y en la que la parte de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. En general, la ventana de comparación tiene una longitud de al menos 20 nucleótidos contiguos, y opcionalmente puede tener una longitud de 30, 40, 50, 100 o más nucleótidos. Los especialistas en la técnica entenderán que para evitar una alta similitud con una secuencia de referencia debido a la inclusión de huecos en la secuencia polinucleotídica, típicamente se introduce una penalización de hueco y se resta del número de acoplamientos.
- 15 (c) Como se usa en este documento, “porcentaje de identidad de secuencia” significa el valor determinado por comparación de dos secuencias alineadas óptimamente sobre una ventana de comparación, donde la porción de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que existe una base de ácido nucleico idéntica en las dos secuencias para producir el número de posiciones acopladas, dividiendo el número de posiciones acopladas por el número total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia
- 20 (d) La expresión “identidad sustancial” de secuencias polinucleotídicas significa que un polinucleótido comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos un 70%, preferiblemente de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90% y aún más preferiblemente de al menos un 95% en comparación con una secuencia de referencia, usando uno de los programas de alineación descritos usando parámetros convencionales.
- 25
- 30
- 35

En la técnica se conocen bien métodos de alineamiento de secuencias para comparación. Las comparaciones genéticas pueden determinarse mediante búsquedas realizadas por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul, S. F., *et al.*, (1993) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410; véase también www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) con parámetros por defecto para identificar con respecto a secuencias contenidas en la base de datos BLAST “GENEMBL”. Una secuencia puede analizarse para determinar su identidad con respecto a todas las secuencias de ADN disponibles al público contenidas en la base de datos GENEMBL usando el algoritmo BLASTN con los parámetros por defecto.

40

Con objeto de definir la presente invención, se usa GAP (Programa de Alineamiento Global). GAP usa el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48: 443-453, 1970) para buscar el alineamiento de dos secuencias completas que maximiza el número de acoplamientos y minimiza el número de huecos. Los valores de penalización para la creación de huecos por defecto y los valores de penalización de la extensión de huecos en la Versión 10 del paquete informático Wisconsin Package® (Accelrys, Inc., San Diego, CA) para las secuencias de la proteína son 8 y 2, respectivamente. Para las secuencias de nucleótidos, la penalización de la creación de huecos por defecto es de 50 mientras que la penalización de la extensión de huecos por defecto es de 3. El porcentaje de similitud es el porcentaje de los símbolos que son similares. Los símbolos a través de los huecos se ignoran. Se puntúa una similitud cuando el valor de puntuación de la matriz para un par de símbolos es superior a o igual a 0,50, el umbral de similitud. La matriz de puntuación usada en la Versión 10 del paquete informático Wisconsin Package® (Accelrys, Inc., San Diego, CA) es BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915).

45

50

55

Pueden producirse grandes cantidades de ácidos nucleicos de la presente invención mediante replicación en una célula hospedadora adecuada. Los fragmentos de ácido nucleico natural o sintético que codifican un fragmento deseado se incorporarán en las construcciones de ácido nucleico recombinante, normalmente construcciones de ADN, capaces de introducirse y replicarse en una célula procariota o eucariota. Normalmente, las construcciones de ácido nucleico serán adecuadas para la replicación en un hospedador unicelular, tal como una levadura o bacteria, pero también se pretende la introducción (con o sin integración en el genoma) de líneas celulares eucariotas cultivadas de mamíferos o vegetales u otras. La purificación de los ácidos nucleicos producidos por los métodos de la presente invención se describe, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2ª Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) o Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, J. Wiley and Sons, NY (1992).

60

65

ES 2 339 559 T3

Las construcciones de ácido nucleico preparadas para la introducción en un hospedador procariota o eucariota puede comprender un sistema de replicación reconocido por el hospedador, incluyendo el fragmento de ácido nucleico que se pretende que codifica la proteína deseada e incluirá también preferiblemente la transcripción y las secuencias reguladoras de la iniciación de la transcripción unidas operativamente al segmento de la proteína codificante. Los vectores de expresión pueden incluir, por ejemplo, un origen de replicación o secuencias que se replican autónomamente (ARS) y secuencias de control de la expresión, un promotor, un potenciador y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión al ribosoma, sitios de unión y empalme del ARN, sitios de poliadenilación, secuencias terminadoras de la transcripción y secuencias estabilizadoras del ARNm. Las señales de secreción también pueden incluirse si es apropiado. Dichos vectores pueden prepararse por medios de técnicas recombinantes convencionales bien conocidas en la técnica y descritas, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2ª Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) o Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, J. Wiley and Sons, NY (1992).

Los vectores para la introducción de genes tanto por recombinación como por mantenimiento extracromosómico se conocen en la técnica y puede usarse cualquier vector adecuado. Los métodos para introducir ADN en las células tales como electroporación, co-precipitación con fosfato de calcio y transducción viral se conocen en la técnica y la elección del método está dentro de la competencia de un experto en la materia (Robbins, Ed., *Gene Therapy Protocols*, Human Press, NJ (1997)).

Los sistemas de transferencia de genes conocidos en la técnica pueden ser útiles en la realización práctica de la presente invención. Estos incluyen métodos de transferencia viral y no viral. Se han usado diversos virus como vectores de transferencias de genes, que incluyen poliovirus, es decir, SV40 (Madzak *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 73: 1533-1536 (1992)), adenovirus (Berkner, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158: 39-61 (1992); Berkner *et al.*, *Bio Techniques*, 6: 616-629 (1988); Gorziglia *et al.*, *J. Virol.*, 66: 4407-4412 (1992); Quantin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 2581-2584 (1992); Rosenfeld *et al.*, *Cell*, 68: 143-155 (1992); Wilkinson *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 20: 2233-2239 (1992); Stratford-Perricaudet *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 1: 241-256 (1990)), virus de vacunas (Mackett *et al.*, *Biotechnology*, 24: 495499 (1992)), adeno-virus asociados (Muzyczka, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158: 91-123 (1992); Ohi *et al.*, *Gene*, 89: 279-282 (1990)), virus del herpes incluyendo HSV y EBV (Margolskee, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158: 67-90 (1992); Johnson *et al.*, *J. Virol.*, 66: 2952-2965 (1992); Fink *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 3: 11-19 (1992); Breakfield *et al.*, *Mol. Neurobiol.*, 1: 337-371 (1987); Fresse *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, 40: 2189-2199 (1990)), y retrovirus de ave (Brandyopadhyay *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 4: 749-754 (1984); Petropoulos *et al.*, *J. Virol.*, 66: 3391-3397 (1992)), murino (Miller, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158: 1-24 (1992); Miller *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 5: 431-437 (1985); Sorge *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 4: 1730-1737 (1984); Mann *et al.*, *J. Virol.*, 54:401-407 (1985)), y de origen humano (Page *et al.*, *J. Virol.*, 64: 5370-5276 (1990); Buchschalcher *et al.*, *J. Virol.*, 66: 2731-2739 (1992)).

Los métodos no-virales de transferencia de genes conocidos en la técnica incluyen técnicas químicas tales como coprecipitación con fosfato de calcio (Graham *et al.*, *Virology*, 52: 456-467 (1973); Pellicer *et al.*, *Science*, 209:1414-1422 (1980)), técnicas mecánicas, por ejemplo microinyección (Anderson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 5399-5403 (1980); Gordon *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 7380-7384 (1980); Brinster *et al.*, *Cell*, 27:223-231 (1981); Constantini *et al.*, *Nature*, 294: 92-94 (1981)), métodos de transferencia mediada por fusión de membrana mediante liposomas (Feigner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 7413-7417 (1987); Wang *et al.*, *Biochemistry*, 28: 9508-9514 (1989); Kaneda *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264: 12126-12129 (1989); Stewart *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 3: 267-275 (1992); Nabel *et al.*, *Science*, 249: 1285-1288 (1990); Lim *et al.*, *Circulation*, 83: 2007-2011 (1992)), y captación directa del ADN y transferencia de ADN mediada por receptores (Wolff *et al.*, *Science*, 247: 1465-1468 (1990); Wu *et al.*, *BioTechniques*, 11: 474-485 (1991); Zenke *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 3655-3659 (1990); Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264: 16985-16987(1989); Wolff *et al.*, *BioTechniques*, 11: 474485 (1991); Wagner *et al.*, 1990; Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 42554259 (1991); Cotten *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 4033-4037 (1990); Curiel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 8850-8854 (1991); Curiel *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 3: 147-154 (1991)).

Ejemplo 1

La expresión del promotor del ARN en horquilla afecta a la fertilidad de la planta

Este ejemplo demuestra que la fertilidad o el potencial de fertilidad de las plantas puede modificarse mediante la expresión de moléculas de ARN en horquilla (ARNhp) específica de los promotores de genes que codifican proteínas implicadas en las rutas relacionadas con la androfertilidad.

Se generaron construcciones del promotor de ARNhp uniendo un promotor de ubiquitina a una repetición invertida del promotor deseado, incluyendo un segmento del promotor NOS entre las secuencias repetidas invertidas. La expresión de cada construcción generó un ARNhp específico para una de las siguientes promotores: MS45, 5126, BS7, SB200, y PG47. Las moléculas de ácido nucleico y métodos para preparar las construcciones y transformación del maíz se han descrito previamente (Cigan *et al.* (2001) *Sex Plant Reprod.* 14: 135-142). Se analizó la descendencia (generación T1) de las plantas transformadas (T0).

De 32 eventos de transformación que comprendían el ARNhp específico para el promotor del gen MS45, 29 produjeron plantas T1 que eran androestériles.

ES 2 339 559 T3

De 32 eventos de transformación que comprendían el ARNhp específico para el promotor del gen 5126, 29 produjeron plantas T1 que eran androestériles.

De 32 eventos de transformación que comprendían el ARNhp específico para el promotor del gen BS7, 23 produjeron plantas T1 que produjeron una pequeña cantidad de polen no viable (fenotipo “destructor”) o eran androfértiles pero sólo producían una pequeña cantidad de polen viable (fenotipo “derramador”).

De 31 eventos de transformación que comprendían el ARNhp específico para el promotor del gen SB200, 13 produjeron plantas T1 de fenotipo destructor o derramador.

De 24 eventos de transformación que comprendían el ARNhp específico para el promotor del gen PG47 unido a una construcción para proporcionar resistencia a herbicidas, 15 revelaron ninguna transmisión de resistencia a herbicidas para la plántula T1 usando polen de transformantes primarios. Esto concuerda con la expresión post-meiótica esperada del PG47.

Se analizó el ARN de las anteras de plantas que expresaban los diversos ARNhp mediante transferencia de northern. Para cada diana, se analizaron seis eventos independientes en la generación T1 para determinar si la expresión del ARNhp reducía los niveles continuos de ARN de estado continuo de los genes diana. Las anteras se llevaron al estado de liberación de tétradas para el estado uninucleado temprano del desarrollo de microsporas. Se aisló Poli A+ ARN, se separó por electroforesis, se transfirió a membranas y se hibridó secuencialmente con sondas específicas para MS45, 5126, BS7, SB200, NOS y actina (control de carga del ARN). No se detectaron transcritos de MS45, 5126 o BS7 en plantas que expresaban ARNhp específico para estos promotores endógenos. Únicamente se observó una ligera reducción de ARN del SB200 en plantas que expresaban ARNhp de SB200.

Se realizó también análisis de inmunotransferencia de proteínas de las proteínas de la antera esencialmente como se ha descrito anteriormente (Cigan *et al.*, Sex Plant Reprod. 14: 135-142, 2001). Para cada diana, se analizaron seis eventos independientes en la generación T1 para determinar si la expresión del ARNhp promotor reducía los niveles de proteína en el estado continuo de los genes diana. Las anteras se llevaron al estado anterior, se cultivaron en tampón Laemelli, se separaron por electroforesis y se hicieron reaccionar secuencialmente con anticuerpos específicos para las proteínas MS45, BS7, SB200 o 5126. El resultado fue similar al de la transferencia de northern, no se detectaron proteínas MS45, 5126 o BS7 en plantas que expresaban ARNhp específico para estos promotores endógenos y solamente se observó una ligera reducción de proteína SB200 para eventos que comprendían SB200hp.

Estos resultados demuestran que la expresión del ARNhp promotor puede suprimir selectivamente la expresión de los genes endógenos en células vegetales. Además, los resultados demuestran que la supresión de diferentes genes implicados en la androesterilidad de las plantas puede afectar de manera diversa en el fenotipo de la planta incluyendo el grado de androfertilidad.

Ejemplo 2

La expresión del producto génico exógeno MS45 restaura la fertilidad

Este ejemplo demuestra que las plantas que se vuelven androestériles por la expresión de una construcción en horquilla del promotor MS45 pueden restablecer la fertilidad mediante la expresión de una construcción del gen exógeno MS45.

Se prepararon construcciones que contenían la secuencia codificante de MS45 unida operativamente a un promotor heterólogo de ubiquitina (UBI), 5126, SB200 o BS7; estas construcciones se introdujeron en célula vegetales ms45ms45. Las plantas regeneradas y su descendencia eran fértiles, demostrando que el promotor nativo de MS45 puede sustituirse por un promotor constitutivo o preferido de antera para conferir un fenotipo androfértil a mutantes del maíz ms45. (Véase también Cigan *et al.*, Sex Plant Reprod. 14: 135-142, 2001).

Adicionalmente, las plantas que contenían la construcción UBI:MS45 o 5126:MS45 se cruzaron con plantas que eran androestériles debido a la expresión de un ARNhp promotor del gen MS45. La descendencia se ensayó por PCR para detectar la presencia de la construcción hp y de UBI:MS45 o 5126:MS45. Se realizó análisis de hibridación del ARN y se puntuaron los fenotipos fértiles.

El análisis de transferencia de northern del ARN obtenido de las hojas de las plantas descendientes reveló que el MS45 se expresaba a partir del promotor de ubiquitina en la descendencia que contenía 7 de 12 hp obtenida a partir del cruzamiento UBI:MS45. Además, la expresión de MS45 a partir del promotor UBI se correlaciona con la fertilidad observada en las plantas descendientes. Estos resultados demuestran que el MS45 se expresa a partir del promotor constitutivo de ubiquitina y que la expresión constitutiva de producto del gen MS45 confiere androfertilidad en las plantas descendientes.

Adicionalmente, se analizó el ARN de las anteras de estas plantas de maíz MS45hp que contenían 5126:MS45, BS7:MS45 o UBI:MS45. Las anteras se llevaron a la etapa de liberación de tétradas hasta el estado uninucleado temprano del desarrollo de microsporas y se recogió poli A+ ARN, se realizó la electroforesis y se hibridó secuencial-

ES 2 339 559 T3

mente con sondas para MS45, SB200 y BS7. MS45 se expresó en las anteras de las plantas descendientes androfértiles tanto dirigidas por el promotor constitutivo UBI como por los promotores 5126 o BS7 específicos de anteras, con sincronización de recogida de anteras probablemente afectando a la fuerza de la señal. No se observó ARN MS45 en las plantas androestériles que contenían únicamente horquilla. Estos resultados demuestran que la supresión de la expresión de MS45 debido al ARNhp del MS45 puede superarse mediante la expresión de MS45 a partir de un promotor heterólogo que conduce la expresión al menos en las células de la antera.

El promotor que expresa el gen MS45 puede proceder de una fuente distinta del maíz y puede ser, por ejemplo, cualquier promotor vegetal capaz de transcribir el MS45 de manera que la expresión de la unidad de transcripción produce plantas androfértiles. Por ejemplo, se han aislado e identificado genes del arroz y homólogos de *Arabidopsis* del maíz MS45, 5126, BS7 y MS26. Globalmente existe una similitud significativa entre las regiones codificantes, con conservación de las regiones intrónicas. De manera importante, los promotores correspondientes del arroz y maíz tienen una identidad aproximadamente del 50 al 60%, sugiriendo que estos promotores pueden funcionar suficientemente en el tapete del maíz para transcribir el gen MS45. Para ensayar esto, cada uno de los promotores del arroz MS45, arroz BS7, arroz MS26 y *Arabidopsis* 5126 se fusionaron con la región codificante MS45 del maíz y se ensayaron para detectar la capacidad de la construcción para conferir la fertilidad cuando se transforman en mutantes ms45ms45. Usando este sistema de ensayo, se observó una elevada frecuencia de plantas androfértiles para las cuatro construcciones.

En determinados aspectos, es ventajoso usar promotores que no sean del maíz para expresar el gen MS45. Por ejemplo, cuando los ARNhp promotores de algunas especies reducen la función del gen diana de manera que la planta es inviable o no reproductora, puede usarse un promotor de una especie diferente para expresar transcripcionalmente la función del gen de complementación (por ejemplo, MS45), superando así este problema potencial. Además, las construcciones de ARNhp pueden generarse para dirigir los promotores que no son de maíz para suprimir la expresión del gen MS45 y un medio para reducir o eliminar la función y hacer que la planta sea androestéril dirigiendo el promotor que no es de maíz usado en el casete de expresión MS45. Por ejemplo, una planta homocigótica recesiva ms45 puede transformarse con un homólogo promotor de arroz MS45 conduciendo la expresión del gen MS45 (MS45r::MS45), haciendo que la planta sea androfértil. Para suprimir la expresión de este casete MS45r::MS45, puede generarse una segunda planta de maíz que es heteróloga para la mutación MS45 del maíz y expresa un ARNhp promotor del MS45r. Como no existen secuencias diana equivalentes del promotor endógeno MS45 del arroz en esta planta de maíz, esta planta sería androfértil. La segunda planta puede cruzarse con la planta ms45 homocigótica que contiene la construcción MS45r::MS45 y explorarse la progenie para detectar las construcciones MS45r::MS45 y ARNhp MS45r. En esta situación, la función del gen MS45r::MS45 se suprime por la presencia y expresión del MS45rHP, dando como resultado una planta androestéril.

El uso de dichas construcciones se basa en descubrimiento de que el hp promotor 5126 del arroz en el maíz no da como resultado plantas androestériles. Esto contrasta con los resultados obtenidos usando un hp promotor 5126 del maíz (véase el Ejemplo 1) y sugiere que la expresión de la horquilla del promotor 5126 del arroz no es capaz de suprimir el gen endógeno 5126 del maíz.

En su conjunto, los presentes Ejemplos que demuestran que los genes endógenos relacionados con la fertilidad de las plantas pueden inactivarse usando supresión mediada por ARNhp y que en plantas fenotípicamente estériles puede restaurarse un fenotipo fértil.

Ejemplo 3

El ARN en horquilla específico del promotor suprime la transmisión de la resistencia a herbicidas mediada por transgenes

Este ejemplo demuestra que el polen de las plantas hemicigóticas para una construcción en horquilla UBI:PG47 es inviable como se determina por la no transmisión de resistencia a herbicidas para cruzamientos T1 cuando un gen de resistencia a herbicidas se une a la construcción en horquilla PG47.

En las células de la planta se introdujo un ARNhp específico para el promotor del gen PG47 que comprendía una repetición invertida del promotor del gen PG47 conducido por un promotor de ubiquitina (UBI: PG47hp), unido a una construcción 35S:PAT. El polen de las plantas que expresan el transgén, que representan 24 eventos de transformación de una sola copia o menor, se transportó a las mazorcas de maíz de tipo silvestre. El conjunto de semillas en las mazorcas era muy bueno y comparable al observado cuando se usó polen de tipo silvestre. Para cada evento, se plantaron 32 semillas en el suelo y las plántulas se rociaron 5 días después de la germinación con herbicida LIBERTY 2X para detectar la transmisión de UBI:PG47hp unido a 35S:PAT.

Se esperaba que si el ARNhp específico de PG47 funcionaba en la división post-meiótica de las microsporas, entonces la viabilidad sería normal, y el 50% del polen llevaría el transgén, proporcionando resistencia al herbicida en el 50% de la descendencia. Sin embargo, si la función del PG47 es necesaria para la viabilidad del polen y la construcción en horquilla puede suprimir la expresión del producto génico PG47, entonces el 50% de los granos de polen serían inviables; todo el polen viable carecería del transgén y sería incapaz de transmitir resistencia al herbicida. Las construcciones sin funcionamiento UBI:PG47hp serían detectables por la presencia de plantas resistentes al herbicida.

ES 2 339 559 T3

Quince de los 24 eventos ensayados fueron sensibles al herbicida. Estos resultados demuestran que las construcciones UBI:PG47hp suprimen la expresión del gen PG47 en el polen, haciendo inviable al 50% del polen y evitando la transmisión de la resistencia al herbicida unida operativamente a la construcción de supresión.

5 Ejemplo 4

Plantas que contienen los ARN en horquilla específicos del promotor múltiple suprimen promotores múltiples diana

10 Plantas que contienen 5126HP (es decir un transgén que codifica un ARNhp promotor de 5126) se usan como receptoras de polen para polen de plantas que expresan BS7HP. En plantas que contienen tanto 5126HP como BS7HP, la expresión endógena de 5126 y BS7 se suprime, conduciendo a un fenotipo de esterilidad más fuerte que el observado con cualquier construcción en solitario. Las plantas se seleccionan para contener 5126HP o BS7HP o ambos, se desarrollan hasta alcanzar la madurez y se determinan los fenotipos de fertilidad de estas plantas resultantes.

15 Alternativamente o además del cruzamiento como un medio para combinar construcciones en horquilla, una de dichas construcciones, por ejemplo la 5126HP, puede ponerse bajo el control transcripcional de un promotor inducible. En ausencia de inducción, estas plantas que contienen BS7HP son capaces de producir suficiente polen por sí mismas. Sin embargo, después de la inducción del 5126HP, estas plantas son androestériles y pueden usarse como hembras durante la producción de híbridos. Este proceso depende de la expresión combinada de las construcciones en horquilla (HP) para dar una planta estéril, mientras que la expresión de una sola construcción HP no confiere esterilidad.

20 En determinadas realizaciones, la expresión de ambos ARNhp puede ponerse bajo el control transcripcional de un solo promotor. En este caso, los ARNhp pueden diseñarse para contener promotores múltiples diana dentro del mismo ARN codificado. Por ejemplo, la región del promotor 5126 puede yuxtaponerse a la región del promotor BS7 y ponerse bajo el control transcripcional de un solo promotor de ubiquitina u otro promotor constitutivo, preferido del desarrollo o de tejido, dando como resultado la expresión de un ARN que contiene una horquilla híbrida 5126 y BS7 que dirige la supresión de ambos genes endógenos 5126 y BS7. En este esquema puede usarse cualquier combinación y número de diversos promotores que multiplican la diana y promotores diferentes. Por ejemplo, puede combinarse un
30 promotor que regula los genes de la altura de la planta y un promotor vital para un proceso reproductor, dando como resultado plantas estériles de estatura corta.

35 Ejemplo 5

Mantenimiento de plantas endogámicas y producción de plantas híbridas que contienen construcciones de complementación y promotores diana que suprimen los ARN en horquilla específicos de promotores

40 Este ejemplo demuestra como puede mantenerse y usarse una planta endogámica que contiene dos construcciones, una construcción de ARN en horquilla (ARNhp) dominante específica para un promotor y un gen MS45 expresado a partir de un promotor específico de tejido, en la producción de hembras androestériles para la producción de híbridos.

45 Ambas plantas endogámicas A1 y A2 son homocigóticas recesivas ms45ms45. La fertilidad se restablece en las plantas endogámicas A1 por la introducción de un transgén que expresa la región codificante MS45 usando el promotor 5126. Las plantas endogámicas A1 también contienen una construcción que expresa BS7HP. Estas plantas pueden autofecundarse y mantenerse independientemente de las plantas endogámicas A2. En las plantas endogámicas A2, la fertilidad se restaura por la expresión de la región codificante MS45 usando el promotor BS7. Las plantas endogámicas A2 también contienen una construcción que expresa 5126HP. Estas plantas pueden autofecundarse y mantenerse independientemente de las plantas A1 endogámicas.

50 Para generar semillas para obtener hembras endogámicas para la producción híbrida, se desespiga la planta endogámica A1 y se fertiliza usando polen de la planta endogámica A2. La semilla resultante de este cruce se planta y todas las plantas descendientes son androestériles debido a la presencia de los alelos homocigóticos ms45 y el 5126HP y BS7HP que suprimen los genes de restauración de la fertilidad, 5126-MS45 y BS7-MS45, respectivamente.
55 Estas plantas se usan como hembras en la producción de híbridos y se polinizan con plantas que tiene el gen MS45 de tipo silvestre dando como resultado una semilla híbrida F1. Todas las plantas procedentes de estas semillas son heterocigóticas para el gen MS45 y por lo tanto androfértiles.

60 Este ejemplo demuestra que las plantas que contienen ambas construcciones dominantes de supresión y restauración pueden mantenerse y usarse en una estrategia de producción de semillas híbridas para generar plantas híbridas fértiles y endogámicas ginoestériles.

65

ES 2 339 559 T3

Ejemplo 6

Utilidad de plantas que contienen promotores diana específicos de polen que suprimen los ARN en horquilla específicos de promotores y construcciones de complementación MS45 para la producción de plantas híbridas y mantenimiento de plantas endogámicas

Este ejemplo demuestra como un método que comprende el uso de dos construcciones, una construcción de ARN en horquilla (ARNhp) dominante específica para un promotor específico de polen y un transgén de restauración, permite la propagación de una planta que tiene un rasgo reproductor homocigótico recesivo sin pérdida del estado homocigótico recesivo en la descendencia resultante, para usar en la producción de plantas estériles para la producción de híbridos. Esto se consigue introduciendo en una planta al menos una construcción transgénica de restauración, unida operativamente a un primera secuencia de nucleótidos que comprende una copia funcional de un gen que complementa el rasgo fenotípico mutante producido por el estado homocigótico recesivo con una segunda secuencia de nucleótidos funcional que interfiere con la formación, función o dispersión de los gametos masculinos de la planta. Esta construcción se mantiene en el estado hemocigótico y una planta que contiene dicha construcción se denomina como mantenedora. La interferencia con la formación, función o dispersión del gameto masculino puede lograrse uniendo las secuencias que interfieren con la formación, función o dispersión del gameto masculino con un promotor preferido de tejido de gametos. Como el transgén está en estado hemocigótico, únicamente la mitad de los granos de polen producidos contienen la construcción transgénica restauradora y ninguno de estos son viables debido a la acción de un segundo gen que impide la formación del polen viable. Por lo tanto, cuando la planta mantenedora que contiene dicha construcción unida se usa como donante de polen para fertilizar la planta homocigótica recesiva, solamente los gametos masculinos viables proporcionados a la planta homocigótica recesiva son aquellos que contienen el alelo recesivo, pero no contienen ningún componente de la construcción transgénica. La descendencia resultante de dicho cruce sexual no es transgénica con respecto a esta construcción transgénica.

Aunque el polen no viable producido por la planta mantenedora contiene la construcción transgénica de restauración, el 50% de los óvulos (el gameto femenino) contendrá la construcción transgénica de restauración. Por lo tanto, la planta mantenedora puede propagarse por auto fertilización, segregando la construcción transgénica de restauración de manera que esta estará contenida en el 50% de las semillas de una planta mantenedora auto-fertilizada. Uniendo la construcción transgénica de restauración con un marcador seleccionable, el 50% de la semilla que contiene el transgén puede aislarse para propagar la población mantenedora que permanece homocigótica para el gen recesivo y hemocigótica para la construcción transgénica de restauración. En este caso, puede mantenerse una planta endogámica única.

La planta endogámica A1 es homocigótica recesiva para el gen de la fertilidad ms45. Las plantas endogámicas A1 contienen una construcción en la que la androfertilidad se restablece expresando la región codificante MS45 usando un promotor específico de tejido, por ejemplo el promotor nativo MS45. Las plantas A1 endogámicas también contienen una construcción en horquilla dirigida para suprimir un promotor que expresa polen, en este ejemplo, una construcción que expresa PG47HP unida operativamente a la construcción de restauración MS45 y un marcador seleccionable o identificable, por ejemplo, un marcador que confiere resistencia a herbicidas y/o una construcción que sirve como un marcador visual o detectable para explorar la planta y/o semilla. Estas plantas son fértiles y pueden autofecundarse y mantenerse. La semilla de estas plantas segregará 50:50 para el transgén porque únicamente es viable el polen no transgénico y capaz de efectuar la fertilización de un óvulo, cuyo 50% contiene la construcción.

Para generar semillas para obtener plantas endogámicas femeninas para la producción de híbridos, se mantuvieron en una hilera, únicamente plantas no transgénicas de plantas endogámicas A1; estas plantas son homocigóticas recesivas ms45 y androestériles. En una hilera adyacente, se cultivaron plantas transgénicas y no transgénicas a partir de la planta endogámica A1. En esta hilera la fertilidad se segrega una a una (fértil a estéril); las plantas fértiles se usan para polinizar a las plantas estériles de la hilera adyacente. La semilla de este cruce no es transgénica para las construcciones del restaurador unido operativamente, el ARNhp y el marcador explorable y toda la descendencia es androestéril debido a la presencia del alelo ms45 homocigótico. Estas plantas se usan como hembras en la producción de híbridos y se polinizan con plantas que tienen el gen MS45 de tipo silvestre dando como resultado semillas F1 híbridas. Todas las plantas procedentes de estas semillas son heterocigóticas y para el gen MS45 y por lo tanto, androfértiles.

Este ejemplo demuestra que las plantas que contienen una construcción en horquilla para la supresión de polen dominante y una construcción de restauración de la fertilidad pueden mantenerse como plantas endogámicas y usarse en una estrategia de producción de semillas híbridas para generar plantas ginoestériles endogámicas y plantas híbridas fértiles.

Ejemplo 7

Combinaciones

Dos o más componentes de las construcciones descritas en este documento puede combinarse de diversas maneras para crear sistemas para controlar la expresión génica. Dichas combinaciones pueden hacerse uniendo dichos componentes dentro de un solo vector, usando vectores múltiples en transformaciones simultáneas o secuenciales y/o cultivando plantas que comprenden uno o más componentes. En la siguiente Tabla 1 se describen posibles componen-

ES 2 339 559 T3

tes. La Tabla 2 proporciona representaciones de combinaciones ilustrativas, pero no exhaustivas, útiles en el control de la androfertilidad.

5 Por ejemplo, los componentes pueden incluir promotores o regiones codificantes distintas a las indicadas y el orden de los componentes dentro de las construcciones pueden ser diferentes a las mostradas. Además, una construcción podría comprender combinaciones de secuencias promotoras/codificantes individuales y un promotor que dirige la transcripción de componentes múltiples de la secuencia de codificación. Como un ejemplo de lo último, una construcción podría comprender un promotor constitutivo que dirige la transcripción de una secuencia que codifica el MS45 así como un polinucleótido que codifica un producto génico implicado en la producción o regulación de un marcador identificable (por ejemplo, pigmento) para crear un producto de difusión. Esto permitiría la exploración de transformantes usando cualquier tejido de la planta, aunque la expresión del MS45 dé como resultado la androfertilidad.

15 Dentro de cualquiera de las construcciones, podrían incluirse uno o más componentes en horquilla del promotor, por ejemplo dentro de un intrón de cualquiera de los genes codificados o dentro de una región no codificante 5' o 3' o como una extensión inicial o terminal. Una horquilla puede dirigir un solo promotor, o dos o más promotores, dentro de un solo ARN transcrito. Las configuraciones en horquillas de promotores de polen y/o polinucleótidos que codifican polipéptidos que alteran el polen, pueden servir para impedir la transmisión del transgén a través de los gametos masculinos.

20 Los promotores específicos de polen o preferidos de polen ("Poll-P") incluyen, por ejemplo, PG47, P95 (comienzo entre las etapas uninucleadas media y última; véase la SEC ID N°: 2), y P67 (perfil similar a P95, expresado mas intensamente el estado uninucleado medio; véase la SEC ID N°: 1).

25 Los promotores específicos de tapete ("Tisp-P") o preferidos de tapete ("Tap-P") incluyen, por ejemplo, MS45 (Patente de Estados Unidos 6.037.523); 5126 (Patente de Estados Unidos 5.837.851); Bs7 (documento WO 02/063021); y SB200 (documento WO 02/26789).

Otros promotores preferidos de tejido o específicos de tejido útiles en la invención incluyen, por ejemplo, Br2 (Science 302 (5642): 71-2, 2003), CesA8, y LTP2 (Plant J 6: 849-860, 1994).

30 Los promotores constitutivos ("ConstP") incluyen, por ejemplo, el promotor CaMV 35S (documento WO 91/04036 y documento WO 84/02913); y el promotor de la ubiquitina del maíz.

35 Los genes andrófertil ("MF") útiles en la invención incluyen, por ejemplo, MS45 (Cigan *et al.*, Sex. Plant Repro. 14: 135-142 (2001); Patente de Estados Unidos 5.478.369) y MS26 (publicación de Patente de Estados Unidos 20030182689).

40 Los genes de supresión de polen ("Cytotox") útiles en la invención incluyen DAM (GenBank J01600, Nucleic Acids Res. 11: 837-851 (1983); alfa-amilasa (GenBank L25805, Plant Physiol. 105(2): 759-760 (1994)); D8 (Physiol. Plant. 100 (3): 550-560 (1997)); SacB (Plant Physiol. 110(2): 355-363 (1996)), lipasas y ribonucleasas. En este aspecto, se contempla un solo polipéptido o una fusión de dos o más polipéptidos para generar un producto de fusión. Los sistemas de marcadores seleccionables útiles en la realización práctica de la invención incluyen, por ejemplo, resistencia a herbicidas conferida por PAT o MoPAT.

45 Los sistemas marcadores identificables útiles en la realización práctica de la invención, por ejemplo en la identificación de semillas transgénicas entre la descendencia de una línea mantenedora autofecundada, incluyen GFP (Gerdes (1996) FEBS Lett. 389: 44-47; Chalfie *et al.* (1994) Science 263: 802), RFP.DSred (Dietrich *et al.* (2002) Biotechniques 2(2): 286-293), KN1 (Smith *et al.* (1995) Dev. Genetics 16(4): 344-348), CRC, P, (Bruce *et al.* (2000) Plant Cell 12 (1): 65-79, y Sugary1 (Rahman *et al.* (1998) Plant Physiol. 117: 425-435; James *et al.* (1995) Plant Cell 7: 417-429; U18908).

50 Las configuraciones en horquilla pueden comprender, por ejemplo, PG47hp, P95hp o P67 hp. Una horquilla puede dirigir un solo promotor o puede dirigir dos o más promotores por medio de un solo ARN transcrito. La horquilla puede localizarse en cualquier posición apropiada dentro de la construcción, tal como dentro de un intrón o cualquiera de los genes codificados o dentro de regiones no codificantes 5' o 3'.

60

65

ES 2 339 559 T3

TABLA 1

Símbolo	Descripción	Ejemplo
Poll-P	Promotor de polen	PG47, P95, P67
Tisp-P	Promotor específico de tejido	Br2, CesA8, LTP2
Tap-P	Promotor del tapete	Ms45, 5126, Bs7, Sb200
ConstP	Promotor constitutivo	35S, Ubi
MF	Gen de la fertilidad	Ms45, Ms26
Cytotox	Gen citotóxico	DAM, Alfa-Amilasa, D8, SacB
HerbR	Resistencia a herbicidas	PAT, MoPAT
Exploración	Marcador identificable	RFP, GFP, KN1.CRC, Su1
HP	Horquilla	PG47hp, P95hp, P67hp

TABLA 2

Descripción	Componentes
Solo citotóx. + Selección	Poll-P:Citotox/Tap-P:MF/ConstP:Herb R
Solo citotóx. + Selección + Exploración	Poll-P:Citotox/Tap-P:MF/ConstP:Herb R/Tisp-P:Exploración
Citotóx. doble + Selección	Poll-P:Citotox/Poll-P:Citotox/Tap-P:MF/ConstP:Herb R
Solo Citotóx. + Exploración	Poll-P:Citotox/Tap-P:MF/Tisp-P:Exploración
Citotóx. doble + Exploración	Poll-P:Citotox/Poll-P:Citotox/Tap-P:MF/Tisp-P:Exploración
Horquilla + Solo citotóx. + Selección	ConstP:HP/Poll-P:Citotox/Tap-P:MF/ConstP:HerbR
Horquilla + Solo citotóx. +	ConstP:HP/Poll-P:Citotox/Tap-P:MF/Tisp-

ES 2 339 559 T3

Exploración	P:Exploración
Horquilla + Selección	ConstP:HP/Tap-P:MF/ConstP:Herb R
Horquilla + Exploración	ConstP:HP/Tap-P:MF/Tisp-P:Exploración
Fusión horquilla/androfértil + Exploración	ConstP:HP + MF/Tisp-P:Exploración
Fusión horquilla/androfértil + Selección	ConstP:HP + MF/ConstP:Herb R
Horquilla incluida/Androfértil+ Selección	ConstP:MF incluido HP/ConstP:Herb R
Horquilla incluida/Androfértil+ Exploración	ConstP:MF incluido HP/Tisp-P:Exploración
Horquilla incluida/Exploración	Tap-P:MF/ConstP:Exploración incluido HP
Horquilla incluida solo citotóx./Exploración	Poll-P:Citotox/Tap-P:MF/ConstP:Exploración incluido HP
Fertilidad constitutiva/Exploración con horquilla incluida	ConstP:(MF + Exploración) incluido HPTap-P:Citotox/ConstP: (MF + Exploración) incluido HP

35 Ejemplo 8

Selección basada en el marcador visual

40 Los experimentos descritos a continuación se diseñaron para indagar si el gen *p1* del maíz, podría usarse como un marcador visual para detectar la semilla portadora de un transgén unido, cuando se expresaba a partir de diversos promotores no *p1*. Como parte del diseño experimental, se ensayó la coloración de la semilla de la planta transformada así como la coloración de la semilla generada por cruzamiento del polen de la planta transformada, para examinar la herencia materna y paterna del gen *p1*.

45 Se ha demostrado que el gen *p1* del maíz es un activador transcripcional relacionado con Myb que regula los genes *a1* y *c2* para producir 3-desoxi flavonoides tales como C-glicosil flavonas, 3-desoxiantocianinas, flavan-4-ols y flobafenos (Grotewold *et al.*, PNAS 88: 4587-4591 (1991)). La síntesis de estos compuestos y relacionados da como resultado la coloración de los órganos florales que incluyen pericarpio, mazorca, sedas, cáscaras y glumas de las espigas (Cocciolone *et al.*, Plant J 27(5): 467-478 (2001)). Típicamente la expresión de este gen es materna; es decir, el cruzamiento del gen *p1* no confiere coloración a las partes reproductoras hasta el cultivo de la semilla en la siguiente generación. Como se he demostrado que el gen *p1* confiere color a los tejidos no reproductores del maíz por la expresión constitutiva en células BMS (Black Mexican Sweet) (Grotewold *et al.*, PI Cell 1998), la expresión del gen *p1* se investigó poniendo el gen *p1* bajo el control transcripcional de los promotores preferidos de la semilla del maíz END2 y LTP2. También se usaron promotores constitutivos del arroz Actina y del maíz Ubiquitina para regular transcripcionalmente el gen *p1*. Estos vectores ensayarían si la expresión del gen *p1* conferiría diferencias de color lo suficiente para usar como un marcador visual.

60 Los siguientes vectores se introdujeron en el maíz por transformación con *Agrobacterium* y se ensayaron para detectar el color de la semilla tanto de la planta transformada como de las mazorcas polinizadas con polen de las plantas transformadas.

23030 End2:P1-UbimoPAT

23066 Actin:P1-UBImoPat

65 23069 LTP2:P1-UBImoPat

ES 2 339 559 T3

	23528	End2:P1-35SPAT
	23535	LTP2:P1-35S:PAT
5	23537	UBI:P1-35S:PAT

La transformación con PHP23030 y PHP23069 ha producido plantas que demuestran que segregan semilla coloreada tanto en las mazorcas de las plantas primarias transformadas como en las mazorcas polinizadas por polen de estas plantas transformadas. Para PHP23030, 12 de los 14 eventos independientes usados para el cruzamiento lejano demostraron segregación de granos de color marrón entre los granos amarillos a una proporción de segregación aproximada de 1:1. Las mazorcas de las transformantes primarias se polinizaron con polen de plantas no transformadas y los granos de estas mazorcas también se segregaron de color marrón: amarillo en una proporción aproximada de 1:1. Con tres de los cuatro eventos generados con PHP23069 se observaron idénticos resultados.

Las semillas marrón y amarilla de 5 eventos PHP23030 de copias simples se clasificaron y se plantaron para ensayar la germinación de la semilla marrón y la co-segregación del marcador de resistencia a herbicidas unido, 35SPAT, con los granos coloreados. En este pequeño ensayo, la mayoría (>95%) de las semillas marrones produjeron plantas resistentes a herbicidas, mientras que 39 de las 40 plántulas germinadas de semillas amarillas eran sensibles a herbicidas.

El examen cercano de las semillas marrones de PHP23030 reveló que la capa de aleurona era verde fluorescente, mientras que el endospermo de la semilla marrón de PHP23069 mostró fluorescencia verde intensa cuando se comparó con la semilla segregada amarilla procedente de la misma mazorca. Esto concuerda con la observación de fluorescencia verde observada en las células BMS bombardeadas con 35S:P1 (Grotewold *et al.*, Plant Cell 10(5): 721-740 (1998)). Además, el examen de los callos transformados con PHP23528 (End2:P1-35SPAT) y PHP23535 (LTP2:P1-35S:PAT) reveló, a diferencia de los callos GS3 no transformados, que ambos callos que contenían PHP23528- y PHP23535-eran verde fluorescente. La observación de fluorescencia verde en estos callos transformados y la co-segregación de granos marrones con el marcador seleccionable a herbicidas en plantas transformadas indican que la expresión de *pI* de al menos promotores preferidos de semilla puede usarse como un marcador visual para identificar tejidos de maíz transformados.

Ejemplo 9

Alternativas para la citotoxicidad del polen

Como se muestra en las Tablas 1 y 2, la alteración de la función del polen puede conseguirse mediante cualquiera de numerosos métodos, que incluyen la degradación dirigida del almidón en el grano de polen o la interferencia con la acumulación de almidón en el desarrollo de polen. Por ejemplo, una construcción que comprende la región codificante alfa-amilasa está unida operativamente a un promotor específico de polen. La región peptídica de la señal secretora nativa puede estar presente, puede eliminarse o puede sustituirse por un péptido de señal amiloplastidial-dirigido. En otras realizaciones, una construcción puede comprender un promotor específico de polen unido operativamente a una región codificante para la beta-amilasa o para una enzima desramificadora tal como *Sugary1* (Rahman *et al.* (1998) Plant Physiol. 117: 425-435; James *et al.* (1995) Plant Cell 7: 417-429; U18908) o pululanasa (Dinges *et al.* (2003) Plant Cell 15(3): 666-680; Wu *et al.* (2002) Archives Biochem. Biophys. 406(1): 21-32).

Por ejemplo, se crean construcciones en horquilla que dirigen el promotor del gen *Sugary1* del maíz. Debido a la pérdida de la actividad de la enzima desramificadora del almidón, los mutantes *sugary1* presentan granos encogidos. La expresión constitutiva de la repetición invertida del promotor puede causar la pérdida de la actividad del promotor *Sul* y dar como resultado una morfología del grano modificada hereditaria.

ES 2 339 559 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para mantener el estado homocigótico recesivo de una primera planta de maíz cuando se cruza con una segunda planta de maíz que comprende:
- (a) proporcionar una primera planta de maíz androestéril con un genotipo homocigótico recesivo para un rasgo que afecta la viabilidad o fertilidad.
 - 10 (b) introducir por transformación en una segunda planta de maíz una construcción exógena del gen de restauración que comprende
 - 15 (i) una primera secuencias de nucleótidos que, si se introduce en la primera planta, restauraría el rasgo homocigótico recesivo, estando dicha primera secuencia de nucleótidos en un estado hemicingótico;
 - (ii) una segunda secuencia de nucleótidos, unida a la primera secuencia de nucleótidos, que inhibe la formación, función o dispersión de gametos masculinos de la planta mantenedora, en el que la segunda secuencia de nucleótidos está unida operativamente a un promotor que preferiblemente dirige la expresión en los gametos masculinos;
 - 20 y proporcionar una planta que comprende dicha construcción génica de restauración como una planta mantenedora;
 - (c) cultivar la planta mantenedora de manera que todo el polen viable producido contenga el alelo recesivo y no contenga dicha construcción génica de restauración; y
 - 25 (d) polinizar la primera planta con la planta mantenedora para producir descendencia que mantenga el estado homocigótico recesivo de la primera planta.
- 30 2. El método de la reivindicación 1, en el que la primera secuencia de nucleótidos restaura la androfertilidad esporofíticamente.
3. El método de la reivindicación 2 en el que dicha primera secuencia de nucleótidos es MS45.
- 35 4. El método de la reivindicación 1 en el que dicha primera secuencia de nucleótidos es SBMu200, BS92-7, MS1 o MS2.
5. El método de la reivindicación 1, en el que dicho promotor se selecciona de MS45, BS92-7 y SBMu200.
- 40 6 El método de la reivindicación 1, en el que la segunda secuencia de nucleótidos está unida operativamente a un promotor inducible.
7. La planta mantenedora de maíz de la reivindicación 1 que, si se auto-fertiliza, produce una descendencia en una proporción androestéril: androfértil del 50:50.
- 45 8. La planta mantenedora de la reivindicación 7 que comprende adicionalmente una tercera secuencia de nucleótidos unida a la primera secuencia de nucleótidos y que codifica un producto marcador capaz de usarse para la selección de la descendencia que comprende la construcción génica de restauración.
- 50 9. La planta mantenedora de la reivindicación 8 en la que la tercera secuencia de nucleótidos codifica un producto génico que proporciona resistencia a producto químico, un producto génico que proporciona un marcador visual en el tejido vegetativo reproductivo o un producto génico que afecta al color del tejido.
- 55
- 60
- 65

ES 2 339 559 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Pioneer Hi-Bred International, Inc.

5 <120> Transgenes de Supresión del Gen Dominante y Métodos de Uso de los Mismos

<130> 1554-PCT

10 <150> 60/530.478

<151> 16-12-2003

<150> 60/591.975

15 <151> 29-07-2004

<160> 2

20 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 1112

25 <212> ADN

<213> *Zea mays*

<220>

30 <221> promotor

<222> (1)...(1112)

<223> P67

35 <400> 1

```
gacgcgactg ctgacaacc tagctagaaa caccctgaac actagttagg tttcctctg 60
ttatctgcgt tgtcgatgta gtttcttta tctcgagcac cgatgtgcat ctgtgatcgg 120
gagatcatgt ctctggaaac tgttgctctc gagatcctgt attaggagaa ggaaaataag 180
gtttttgaga agcgtattca catgactact cacgttttcc ttgccatcga ccacgtcgtc 240
gaccctgcta gcttccacgt tgtcattcag tatgttcgat cgcacatct gatctaactc 300
tataatgcag ttcacatctgt atggtagaag tgtgtcgcac tcttataatt agcatgttag 360
45 ggttacatgt taggtaacag acaccgagat tatctctgta caccattgtt gcctcattg 420
cctacgtcgt ctctcacagc cacaggtgtc tgaatcatga cctcctttt aggagtagtc 480
tgtagagatg tgaggtaaag cagctttgca cgagaacgcc aatctcgcgt gtttccgagt 540
atcttactgc tccatttgtg ggctacgcct gttgtttccg ccacggatgt cggctgctca 600
50 tcaccaaaaa tatgactact ttgaagtctt ggtagcagag tgggccaga cgcctgtgct 660
tgattctggc tgggccaggc tacgtgaggc cttcttatta gatcatttcc gctgaaaggc 720
cgaaacgtga gagcctggca aacttttcta gaaaaaaaaa attcgcaaac aaaatttttt 780
ccgaacaaac gctacaccag tgaccgccgt ccgtcgtcgt tgcttggtc tccctttact 840
tcggctccaa cgccaatgca caaccgtccc tcttcgcat gtcccagttt tgacgtgcc 900
55 tgtagcgcag tataaaaaat cgtctcgatg ctcttgctcg gtactccaat tcacaccaa 960
acatagagtg tgcacttttc tattggtgtg attgggggca ctaaatacct accacattgc 1020
actcagacta catatactgt gtttgtgtg tgtaagccgt aagcgtgtgt gagcttgcgc 1080
aaattggaca tctaggccgt gcgtaccctg cg 1112
```

60 <210> 2

<211> 1092

<212> ADN

65 <213> *Zea mays*

ES 2 339 559 T3

<220>

<221> promotor

<222> (1)...(1092)

5 <223> P95

<400> 2

```

10      gcgacgtcga gatcacgaga ggctcgtacg gggacaacgc gctaggtctc ttagtcagat 60
      cagttcaaat ctcttaattc ttgtcctcct tctcagteca gttcttacat ctatctgtct 120
      gatcccatta tttccaacac cacttgaacc aatctgctct gatgccccgt tcctgatggt 180
      gtcgtcgttg tcactttctc gacgtgcggt gtcgtccgac cctgaccctt tctcgatgcc 240
15      tcatctccga cagacgacga gtttagcaaa ccagcgagcg ttgattctct gccgaaaagg 300
      ttgcctgacc cegtctcctt cccgatggcc ctacacttcg agaagatcac cacttcgaga 360
      agatcaccag atcaatatcc gaaaagatac acatagttta gattcagtca gcaaaaagct 420
      aacattatgt ttgcttcttt tattcatata gttttcttag catgaaattt aaattctata 480
      tagtactggt tttttacgag cttaactaat ttatttaggg ctaatttggg aaccacattt 540
20      ttccacggaa tttcaatttt cctaaggaaa attagttaat ttctcgttgg gaaaatagaa 600
      atttcatggg aaaatgcggg tcccaaacta gccttagcct tataggtttt ttttagccca 660
      tgtgaattct cgtcaaaggg actcagtcca cttcacagca ggtgaggtgg tttttgaatg 720
      cccaaataca gatctgttaa ttaattttca gagggtcagg acgcggtcgc ccgaacgggc 780
25      ggacgcgcga acaatccgcc cgcccgcgcg cgcgacctgc cacttcgggc catggccagc 840
      acccagcatg cgtcgtccta aacgacgagc accgcccgtt ggcgctataa agccccgcct 900
      cggcgtcccc ttgtcaattc gaagccttcc cggttacccc ttcggcctcc acctatcacc 960
      acccgggacg tcttccaggg tctcctcgta gtagaatagc tctatctcac cgcaacaact 1020
      cctcattaca tccttttagga gaggctgatc gattggtaga tacgtactcg ggtggagcag 1080
30      aacaacgaga ga
      
```

35

40

45

50

55

60

65